

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
des Universitätsklinikums Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. G. Ertl

**Erhöhte Anfälligkeit von Creatinkinase-defizienten Mauserzen gegenüber
Ischämie und Reperfusionsschaden bei veränderter Calcium-Homöostase**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Klaus Meyer
aus Darmstadt

Würzburg, Oktober 2008

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Spindler

Koreferent: Prof. Dr. rer. nat. Kai Schuh

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19. März 2009

Der Promovend ist Arzt

In Dankbarkeit meinen Eltern und meiner Ehefrau Petra gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS:

1	EINLEITUNG:	1
1.1	ENERGIEMETABOLISMUS DES HERZENS	1
1.1.1	Zentrale Stellung der Phosphocreatinkinase als ATP-Lieferant	2
1.1.2	Rolle der Creatinkinase innerhalb des Energieflusses zwischen mitochondrialer Energiegewinnung und myofibrillärer Kontraktion	2
1.1.3	Creatinkinase-Isoenzyme	4
1.1.4	Phosphocreatinkinase als Regulations- und Funktionsenzym	6
2	VERSUCHSAUFBAU, MATERIALIEN UND METHODIK	7
2.1	LANGENDORFF-PERFUSIONSMODELL	7
2.1.1	Präparation der Mäuseherzen:	7
2.1.2	Ballon	9
2.1.3	Schrittmacher	11
2.1.4	Biolumineszenz und Aequorin	11
2.1.5	Aequorin-Injektion	13
2.1.6	Ca ²⁺ -Messung:	13
2.1.7	Prinzip und Funktionsweise eines Photomultipliers:	14
2.2	DIE IM EXPERIMENT ERMITTELBAREN KARDIALEN PARAMETER:	15
2.3	STATISTISCHE ANALYSE	16
2.4	VERSUCHSPROTOKOLL	16
2.5	WEITERE PARAMETER INNERHALB DES PROTOKOLLS	17
2.5.1	Definitionen während des Baseline-Abschnitts (Ruhebedingungen)	17
2.5.2	Definitionen während des Ischämie-Abschnitts (No-Flow)	17
2.5.3	Definitionen während der Reperfusionphase	18
3	ERGEBNISSE	20
3.1	HÄMODYNAMIK: WILDTIER VS. CK-KNOCKOUT	20
3.1.1	Baseline-Phase	20
3.1.2	Coronarperfusion (Baseline)	22
3.1.3	Ischämie-Phase (No-Flow)	23
3.1.4	Reperfusionphase	24
3.1.5	Hämodynamische Erholung zum Ende der Reperfusion (Recovery)	27
3.2	BIOLUMINESZENZ: WILDTIER VS. CK-KNOCKOUT	29
3.2.1	Ergebnisse Baseline (t=15min), Biolumineszenz	29
3.2.2	Synopsis zwischen Hämodynamik und intrazellulärer Ca ²⁺ -Konzentration	31
3.2.3	Ischämische Kontraktur und Anstieg des [Ca ²⁺] _i [Baseline (L _{dias})]	32
3.2.4	Ischämie (L _{dias})	32
3.2.5	Reperfusion (L _{dias})	33

4	DISKUSSION	35
4.1	HINTERGRUND:	35
4.2	PHYSIOLOGISCHER HINTERGRUND DER ISCHÄMIE UND DIE ROLLE DES SOG. Ca^{2+} -OVERLOADS	38
4.3	Ca^{2+} -VERHALTEN IN CK-DEFIZIENTEN HERZEN UNTER RUHEBEDINGUNGEN	39
4.4	UNTERSCHIED ZUR SKELETTMUSKULATUR	40
4.5	GESTEIGERTE ANFÄLLIGKEIT $CK_{M/MITO}^{-/-}$ -HERZEN GEGENÜBER ISCHÄMIE UND REPERFUSION	41
4.6	PROTRAHIERTER LINKSVENTRIKULÄRER FUNKTIONSVERLUST	43
4.7	URSACHE DER VERSTÄRKTEN DIASTOLISCHEN DYSFUNKTION $CK_{M/MITO}^{-/-}$ -HERZEN	45
4.8	POTENZIELLE LIMITATIONEN DES VERSUCHSMODELLS	46
5	ZUSAMMENFASSUNG	47
6	ABKÜRZUNGEN:	49
7	LITERATURVERZEICHNIS	51
8	DANKSAGUNG	56

1 EINLEITUNG:

1.1 Energiemetabolismus des Herzens

Das Herz hat von allen menschlichen Organen nicht zuletzt wegen seiner unerlässlichen Pumpleistung und damit Muskularbeit den weitaus höchsten Energieverbrauch. Es verbraucht ca. 6 kg an ATP pro Tag, das 30-fache seines Organgewichtes. Für eine solche Energieleistung, die mit ca. 100000 Schlägen pro Tag ca. 10 Tonnen Blut durch den Kreislauf fließen lässt, werden hauptsächlich die durch Nahrung aufgenommenen Fettsäuren und Glucose verstoffwechselt¹.

Durch Fettsäuretransporter wird das Substrat über das Sarkolemma den Mitochondrien zur β -Oxydation zur Verfügung gestellt, wo sie über das Acetyl-CoA in den Krebszyklus eingeschleust werden. Die Endstrecke zur Synthese von Acetyl-CoA wird über eine zweite Energiebereitstellung durch das Pyruvat bzw. durch die Glykolyse realisiert. Über dieses Substrat kann auch schließlich Lactat zur Energiegewinnung zur Verfügung gestellt werden².

Als zweiten Schritt der Energiegewinnung dient die oxydative Phosphorylierung (s.u.), in der NADH als Protonendonatoren für die Aufrechterhaltung des elektro-chemischen H^+ -Gradienten und CO_2 entstehen².

Als finalen Schritt wird der aus der obigen Reaktion entstandene Protonengradient über die innere Mitochondrienmembran genutzt, um die Elektronen auf den Sauerstoff zu transferieren und im Folgenden sog. F_1 - und F_0 -ATPasen zur Phosphorylierung von ADP zu ATP anzutreiben. Dabei entsteht H_2O und die Reduktionsäquivalente NAD, welche erneut zur H^+ -Ionen-Anlagerung, also zur Protonierung zur Verfügung stehen² (siehe Abbildung 1).

Bis zum für die Zelle nutzbaren Endprodukt ATP sind also viele Enzyme und Regulationsmechanismen involviert, die ihrerseits teilweise Energie verbrauchen und bis dato in dem komplizierten Energiesystem der Zelle als Ganzes wie auch in den subzellulären Kompartimenten nicht vollständig geklärt sind.

1.1.1 Zentrale Stellung der Phosphocreatinkinase als ATP-Lieferant

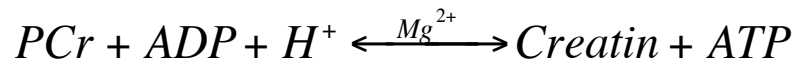
Das Creatinkinase- (CK)-Enzymsystem bzw. Phosphocreatin-(PCR) System steht schon seit langer Zeit im Zentrum der Beobachtungen, will man die schnelle Energiebereitstellung in Form des Adenosintriphosphat (ATP) in stark energieverbrauchenden bzw. exzitativen Zellsystemen wie Skelettmuskel, Gehirn oder Herz verstehen^{3, 4}. Insbesondere ist in diesen Organen von großem Interesse, wie sich ein möglicher Verlust dieses effektiven Enzymsystems auswirkt, um dadurch etwaige Adaptionenprozesse oder Regulationsmechanismen besser verstehen zu können. Neue Modellversuche mit genetisch veränderten Tieren, bei denen selektiv einzelne Gene des CK-Systems ausgeschaltet werden konnten (sog. K.O.- Tiere), bieten hierbei ein ideales Werkzeug, um die verschiedenen Aufgaben der einzelnen CK-Isoenzyme und die möglicherweise stattfindenden Kompensationsmechanismen des jeweiligen Organs zu verstehen⁵.

1.1.2 Rolle der Creatinkinase innerhalb des Energieflusses zwischen mitochondrialer Energiegewinnung und myofibrillärer Kontraktion

Die in der Herzmuskelzelle im Bereich der Myofibrillen gespeicherte und sofort abrufbare Energie in Form des ATP (Adenosintriphosphat) reicht lediglich für wenige Kontraktionen². Um Energie schnell an den Ort der Kontraktion bringen zu können, muss also ein Transfer von entsprechenden Energieträgern stattfinden.

Unter aeroben Bedingungen wird in den Mitochondrien die elektrogene Potentialdifferenz über die innere Mitochondrienmembran genutzt, um die Übertragung der Protonen auf O₂ und die gleichzeitige Nutzung des entstandenen Protonengradienten zur Phosphorylierung des ADP (Adenosindiphosphat) zu ermöglichen. Mit Hilfe der mitochondrien-gebundenen, sogenannten mitochondrialen Creatinkinase (CK_{mito}) kann dann vor Ort das anorganische Phosphat (P_i) auf das zytosolisch ausreichend vorliegende Creatin übertragen werden^{4, 6, 7}. Endprodukt ist somit das Phosphocreatin, welches wiederum aufgrund seines im Vergleich zu ATP hohen sog. Phosphorylgruppenübertragungspotentials als Phosphatdonor für ADP oder AMP (Adenosinmonophosphat) fungiert⁴ und offensichtlich als insgesamt kleineres Molekül im Vergleich zu ATP schneller diffundieren kann¹ (siehe Abbildung 1).

Die Übertragung der Phosphorylgruppe von Phosphocreatin auf ADP unter Bildung von ATP geschieht grundsätzlich nach folgender Gleichung⁵:



Gleichung 1: Phosphorylierung

Bei einem pH=7 beträgt die freie Energie der Hydrolyse des Phosphocreatins $-43,1$ kJ/mol, verglichen mit $-30,5$ kJ/mol für ATP². Somit beträgt die Standardenergie bei der Bildung von ATP aus Phosphocreatin $-12,6$ kJ/mol. Es ergibt sich folgende Gleichgewichtskonstante:

$$K = \frac{[ATP][Creatin]}{[ADP][Phosphocreatin]} = 10^{12,6/5,7} = 162$$

Gleichung 2: Gleichgewichtskonstante

Das Gleichgewicht der Reaktion (siehe Gleichung 1) liegt also stark auf der rechten Seite, ist also zugunsten der Produkte verschoben.

Das Phosphocreatin sichert somit als Energiespeicher bei anhaltender Muskelkontraktion die Bereitstellung der energiereichen Phosphate für die mechanische Arbeit, die Ionenhomöostase und den Zellmetabolismus^{2,4}.

Mittels der weiteren, überwiegend zytosolisch vorliegenden CK-Isoenzyme (CK_{MB} und CK_{MM}) und dem extramitochondrialen Phosphocreatin als Transporter wird dann letztlich das ATP den Myofibrillen für dortige ATPasen bereitgestellt, um die Energie für Kontraktion oder die Regulation von Ionenkanälen zur Verfügung zu stellen. Somit ist die Creatinkinase nicht nur Energiespeicher, sondern mit ihren Iso-Enzymen auch ein effizienter und notwendiger Energietransporter (Shuttle-System) über Grenzen der Zellkompartimente hinweg (Mitochondrien → Cytoplasma → z.B. Myofibrillen):

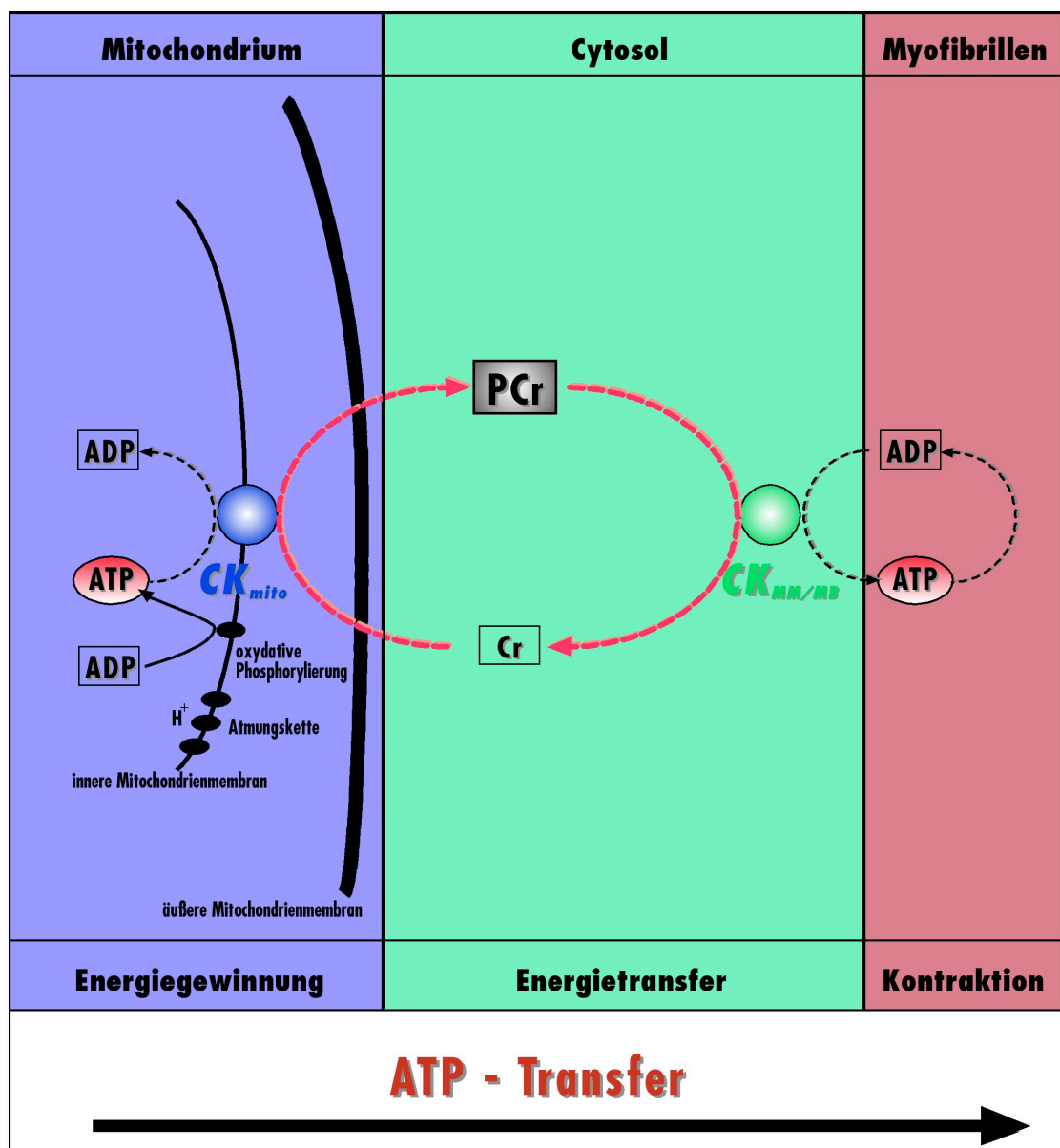


Abbildung 1: Energietransfer der Zellkompartimente mittels PCr

1.1.3 Creatinkinase-Isoenzyme

Die Creatinkinase-Familie besteht insgesamt aus verschiedenen Isoenzymen, die ihre Namen durch den Erstnachweis aus den verschiedenen hochenergetischen Organen wie Muskel (M), Gehirn (Brain, B), und Herz (MB) erhalten haben und damit überwiegend historisch und nicht funktionell begründet sind.

Es können 4 verschiedene Isoenzyme der Creatinkinase identifiziert werden. Dabei unterscheidet man in der Muskelzelle auf der einen Seite zytosolische und auf der anderen Seite mitochondriale CK-Isoenzyme. Die zytosolischen Isoenzyme existieren nur in der dimeren Form, exprimiert durch die Allele M (für muscle) und B (für brain). Somit ergeben sich die drei denkbaren Kombinationen CK_{MM} , CK_{MB} und CK_{BB} .

Das mitochondriale Isoenzym CK_{mito} existiert vor allem in der oktameren, aber auch in einer dimeren Form⁶. Lokalisiert ist es zum einen im intermembranösen Spalt oder membrangebunden. Dieser Konformationsunterschied ist z.T. abhängig vom pH-Wert⁷. Die CK_{MM} andererseits ist ein integraler Bestandteil innerhalb der Vesikelmembranen des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR)⁸. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass ein effizientes und schnelles Energiebereitstellungssystem für eine optimale Funktion der sarkolemmalen Ca^{2+} -ATPasen notwendig ist. Diese Annahme konnte durch verschiedene Studien an Skelettmuskeln von transgenen Mäusen mit entsprechendem Knockout der CK_{MB} und CK_{MM} abgeleitet werden, wo nicht nur veränderte Kontraktionsbedingungen in Skelett- und Zwerchfellmuskeln, sondern auch eine verminderte Ca^{2+} -Freisetzung und Wiederaufnahme in den Myofibrillen der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden konnte^{9,10,11}.

Auf Grund der doch erheblichen Unterschiede in Funktion und Aufbau zwischen Skelettmuskel und Herzmuskel ist es jedoch schwierig aus den vorhandenen Studien an Skelettmuskelzellen eine Voraussage bezüglich des Effekts eines CK-Knockouts für den Herzmuskel abzuleiten. Dies wird grundsätzlich umso schwieriger, je mehr Kompensationsmöglichkeiten der Zelle bereitstehen, alternativ ATP für die entsprechenden Ca^{2+} -ATPasen aus den verschiedenen Energiequellen bereitzustellen.

Durch das Unvermögen des Phosphocreatins wie bisher ATP bereitzustellen, bzw. durch ein Absinken des Quotienten von ATP/ADP wird beispielsweise die Glykogenolyse bzw. die Glykolyse und der Citratzyklus stimuliert¹. Dieses Beispiel verdeutlicht, dass neben der zentralen Stellung des CK-Systems, eine Fülle von alternativen Stoffwechselwegen und Kompensationsmechanismen in das komplexe Regelwerk der Energiebereitstellung eingreifen können.

1.1.4 Phosphocreatinkinase als Regulations- und Funktionsenzym

Aber nicht nur als isoliertes Energie-Shuttle-System per se steht das Creatinkinasesystem im Mittelpunkt der Muskelfunktion und damit des Interesses, sondern auch dadurch, dass das CK-System die Ca^{2+} -Akkumulation und dessen Freisetzung zu verändern imstande ist⁸. Aus diesem Grund ist es von großem Interesse, nicht nur die Auswirkungen der CK-Depletion auf die direkte Hämodynamik, sondern auch auf die Ca^{2+} -Homöostase zu untersuchen.

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung bestand zum einen darin, den kardialen Phänotyp durch Verlust des CK_{MM} , CK_{MB} -und CK_{mito} -Enzyms auf Grund von hämodynamischen Veränderungen unter simulierten Stressbedingungen (Ischämie) und somit einer eventuellen Dekompensation der oben beschriebenen Mechanismen unter Belastung zu identifizieren bzw. demaskieren. Dabei sollten zum anderen Veränderung bezüglich der Ca^{2+} -Homöostase nachgewiesen werden, die angesichts der Vermittlung der elektromechanischen Kopplung durch Ca^{2+} -Ionen entscheidend zur Inotropie und Lusiotropie beitragen könnten.

Aus diesen Gründen ist die Kombination aus der etablierten Langendorff-Perfusionsmethode für isolierte Mäuseherzen und der Aequorin-Biolumineszenz-Methode zur Messung der intrazellulären Ca^{2+} - Veränderung am schlagenden Herzen während eines jeden einzelnen Kontraktionszyklus eine notwendige Voraussetzung. Um eine relevante Imbalance des myokardialen Energiehaushaltes erzeugen zu können, wurde ein Ischämie-Protokoll gewählt, welches die Auswirkungen der CK-Defizienz auf die hämodynamische Funktion der transgenen Tiere zeigen soll.

2 VERSUCHSAUFBAU, MATERIALIEN UND METHODIK

2.1 Langendorff-Perfusionsmodell

2.1.1 Präparation der Mäuseherzen:

Die für die Versuche verwandten Tiere wurden gemäß den Richtlinien der Amerikanischen Physiologischen Gesellschaft (American Physiological Society) untergebracht und versorgt. Die CK-defizienten Tiere wurden uns von der Arbeitsgruppe von Dr. Bé Wieringa von der Universität von Nijmegen, Niederlanden zur Verfügung gestellt. Die untersuchten transgenen Tiere wie auch die aus der so genannten Kontrollgruppe (Stamm: BL6, Charles River) waren alle zwischen 20 und 30 Wochen alt.

Die unten stehende Abbildung 2 zeigt den prozentualen Anteil der gemessenen CK-Aktivität, der auf die verschiedenen CK-Isoenzyme entfällt, die durch die drei CK-Gene (CK-M, -B sowie -Mito) kodiert werden. Durch den Verlust (Loss of Function) des M-Allels kann keine Kombination entstehen, die für CK_{MM} und CK_{MB} kodiert, so dass hier bereits ein funktioneller Verlust von 62% (58% + 4%) entsteht. Kommt es zusätzlich zum Knockout für CK_{mito} fehlen weitere 36% an Enzymaktivität. Somit verbleiben den Kardiomyozyten der Doppel-Knockout Tiere (im Folgenden als $CK_{M/Mito}^{-/-}$ abgekürzt) lediglich 2% an CK-Restaktivität.

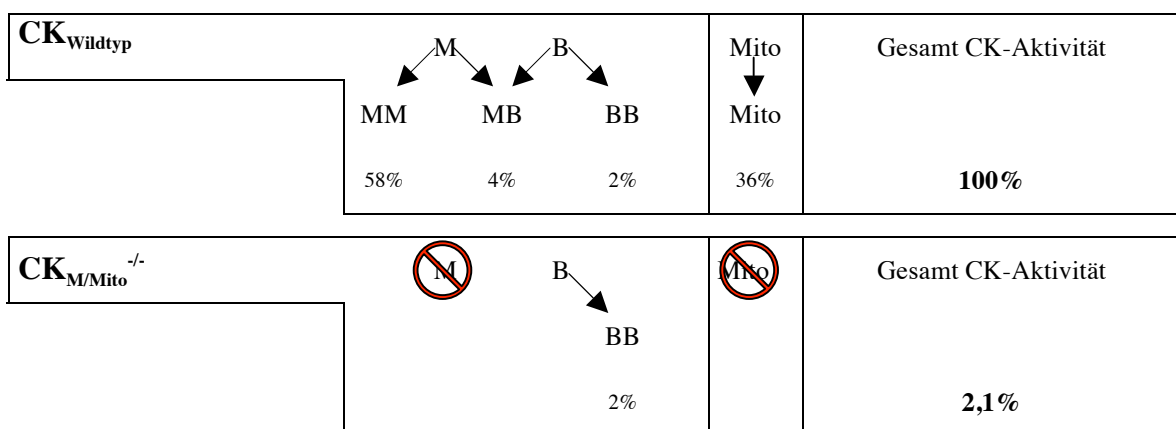


Abbildung 2: CK-Aktivität von $CK_{M/Mito}^{-/-}$ Kardiomyozyten

Die Isolierung und Präparation des perfundierten Mäuseherzens wird mit der intraperitonealen Injektion mit 0,4 ml einer 10000 IE/ml (\Rightarrow 4000 IE) konzentrierten Heparin-Lösung vorbereitet, um eine etwaige in-vivo Thrombenbildung in den Ventrikeln oder in den Koronararterien zu verhindern. Nach ca. 20 Minuten kann mit der Thorakotomie begonnen werden. Dabei erfolgen eine paramediane Laparotomie und eine subdiaphragmale Freilegung des Abdominalsitus. Von kaudal wird das Diaphragma rasch entlang der unteren Thoraxapertur eröffnet und somit der Zugang zum schlagenden Myokard gewährleistet¹². Um den anatomischen Verhältnissen gerecht zu werden und den Zugang zu erleichtern, wird der Situs um eine anterolaterale Thorakotomie erweitert. Das Herz wird mit den Fingern vorsichtig gefasst und mit einem Scherenschnitt auf Höhe des Arcus aortae im Bereich des Truncus brachiocephalicus rasch exzidiert.

Um den Gesamtmetabolismus und damit auch den Energiebedarf des noch schlagenden Herzens zu minimieren und damit den Abbau energiereicher Phosphate zu verhindern, wird das Herz vor der weiteren Präparation sofort in den vorher eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer (s.u.) gelegt¹³. Der Herzschlag sistiert sofort, und mit der Feinpräparation kann begonnen werden. Mediastinale Organe wie Thymus, Oesophagus und Trachea sowie Bindegewebe werden zügig entfernt bis schließlich die Aorta ascendens auf Höhe des Sinus maximus abgesetzt werden kann.

Mit zwei Pinzetten gefasst, wird die Aorta über die Perfusionskanüle der Langendorff-Apparatur gestülpt (siehe Abbildung 3) und mit Prolene-Fäden sicher fixiert. Es erfolgt die alsbaldige Perfusion mit einem 30 °C warmen Krebs-Henseleit-Puffer. Dem Langendorff-Modell entsprechend und entgegen den physiologischen bzw. hämodynamischen Verhältnissen¹⁴, wird das Herz nun retrograd über die Aorta perfundiert¹⁵. Um eine konstante Coronar-Perfusion zu ermöglichen und aerogene Mikroembolien in den Coronararterien zu verhindern, ist zwischen Perfusionsansatz und Perfusionskanüle eine Blasenfalle (Bubbletrap) plaziert. Der Perfusionsdruck im Coronarsystem wurde durch einen hydrostatischen Druck von 75 mmHg einjustiert.

Der verwendete (modifizierte) Krebs-Henseleit-Puffer bestehend aus NaCl (118 mM), KCl (5,3 mM), NaHCO₃ (25 mM), MgSO₄ (1,2 mM), Pyruvat (0,5 mM), CaCl₂ (initial 1,0 mM und Steigerung in 0,5 mM-Schritten auf 2,0 mM) und Glucose (10 mM) (SIGMA-Chemie, Deisenhofen, Deutschland) wurde in demineralisiertem Wasser

(Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) gelöst und mit 95% O₂ und 5% CO₂ oxygeniert bzw. carboxyliert, um einen physiologischen pH-Wert von genau 7,4 zu gewährleisten. Das Herz beginnt wieder spontan zu schlagen. Dieser Abschnitt der Präparation sollte im Allgemeinen innerhalb von 3 Minuten abgeschlossen sein.

Um den Abfluss des Perfusats, das über das Koronarsystem und den Koronarsinus in den rechten Vorhof und damit in den rechten Ventrikel gelangt, zu gewährleisten, wird der Truncus pulmonalis eingeschnitten. Die insgesamt durch das Herz austretende Flüssigkeitsmenge wird kontinuierlich mit einer Rollerpumpe abgesaugt und entspricht dem Koronarfluss. Dieser wird kontinuierlich und online mittels eines Ultraschall-Flowmeters (TranssonicInc., Ithaca, NY) registriert. Der Coronarfluss wurde in ml/min registriert¹⁶.

Alle zu- und ableitenden Perfusionsschläuche, sowie das Pufferreservoir sind zur konstanten Temperaturerhaltung mit einem zweiten Wärmesystem umflossen, das mit Hilfe einer Pumpe in Zirkulation gebracht und mit einem integrierten Thermostat zu jedem Versuchszeitpunkt konstant gehalten wird.

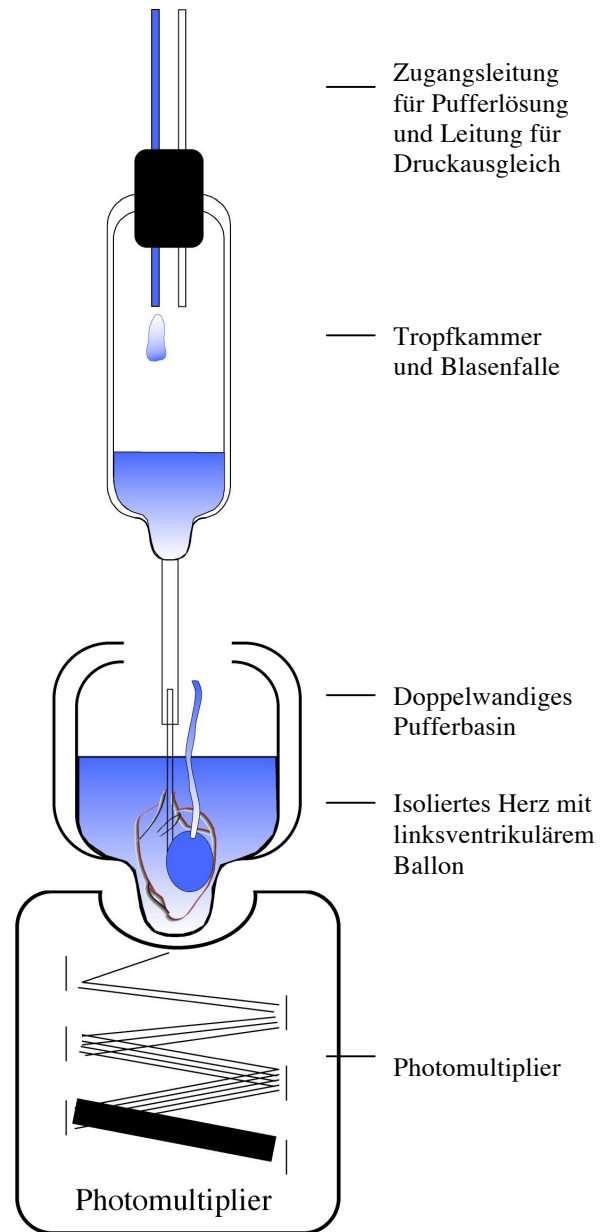


Abbildung 3: Versuchsaapparatur

2.1.2 *Ballon*

Zur Messung der linksventrikulären Funktion wird ein ca. 30-40 μ l-fassender Ballon nach Eröffnung des linken Atriums in ungefülltem Zustand über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingebracht und dort sicher fixiert. Der Ballon wurde aus extrem dünner Polyethylenfolie (Haushaltsware) jeweils selbst hergestellt, indem ein ca. 8x8

cm großes Quadrat ausgeschnitten wurde und mit relativ kleinem Volumen mit ca. 2 mm Abstand zum Schlauch übergestülpt wurde. Danach wurde mit einem Faden die Folie fixiert und destilliertes Wasser äußerst vorsichtig eingespritzt. Dies erfolgte bis zur Compliancegrenze, so dass Falten und Unebenheiten ausgeglichen wurden. Die überstehenden Reste der Folie wurden entfernt¹³.

Die Größe und das Volumen des Ballons wird im Ventrikel so angepasst bzw. gefüllt, dass ein enddiastolischer Druck von ca. 8 mmHg erreicht wird. Dies gewährleistet, dass nahezu der komplette Ballon dem Endokard anliegt.

Der Ballon wurde vor jeder Versuchsdurchführung auf

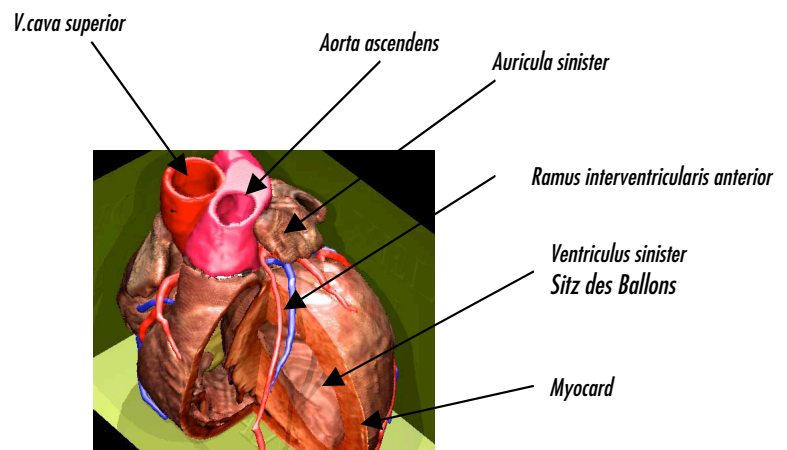


Abbildung 4: Anatomie des linken Ventrikels

Dichtigkeit und auf Abwesenheit von Luftblasen überprüft, um Messungenauigkeiten durch Dämpfung oder Resonanz bzw. Volumenverlust zu vermeiden.

Die Druckregistrierung erfolgt über einen flüssigkeitsgefüllten Polyethylenschlauch im Ballon, verbunden mit einer Statham P23Db Drucksonde (Gould Instruments, Oxnard, CA), die eine kontinuierliche Druckmessung erlaubt. Das geschlossene Ballonsystem kann während des gesamten Versuchs über einen zweiten Zugangsweg zur Einstellung des LVEDP („Vorlast“) durch Volumengabe mit einer 100 μ l-fassenden Glasspritze (Hamilton, Reno, NV) modifiziert werden.

Die kontinuierliche Aufzeichnung und Analyse sämtlicher hämodynamischer Parameter (siehe Kapitel 2.5) erfolgt mittels eines IBM-kompatiblen Pentium I Rechners bzw. eines 12bit AD-Wandlers mit einer Sampling-Rate von 1kHz und der von Dr. med. Hinrik Strömer (Universität Würzburg, Deutschland) entwickelten Software (Hemodyn 2000).

2.1.3 *Schrittmacher*

Zur stabilen Vergleichbarkeit der hämodynamischen Funktion der Herzen untereinander während des gesamten Versuchsprotokolls und zur arithmetischen Mittelung der Ca^{2+} -Transienten während der Herzschläge ist es unerlässlich, dass die Herzfrequenz durch einen Schrittmacher (HSE-Stimulator, Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten, Deutschland) konstant gehalten wird.

Aus diesem Grund werden zwei Platin-Elektroden als Schrittmachersonden appliziert. Die Kathode wird an der Perfusionskanüle fixiert, die Anode wird tangential in das oberflächliche Myocard eingebracht. Die Herzfrequenz wird auf 420 Schläge pro Minute eingestellt (Rectangular Wave Pulse; 7 Hz, 5 ms, 5 bis 10 V).

2.1.4 *Biolumineszenz und Aequorin*

Im Allgemeinen wird in der Biologie der Prozess der Biolumineszenz (lumen = lat. Licht) als eine Fähigkeit von Lebewesen beschrieben, entweder autonom oder mit Hilfe von Symbionten Licht zu erzeugen. Diese Fähigkeit wird zur Beute- oder Partneranlockung, zur Kommunikation oder zur Abschreckung und Tarnung eingesetzt. Besondere Verbreitung findet die Biolumineszenz in Meerestieren, so auch in der Leuchtqualle (*Aequorea victoria*), die dem Substrat der Aequorin-Lichtreaktion ihren Namen gegeben hat.

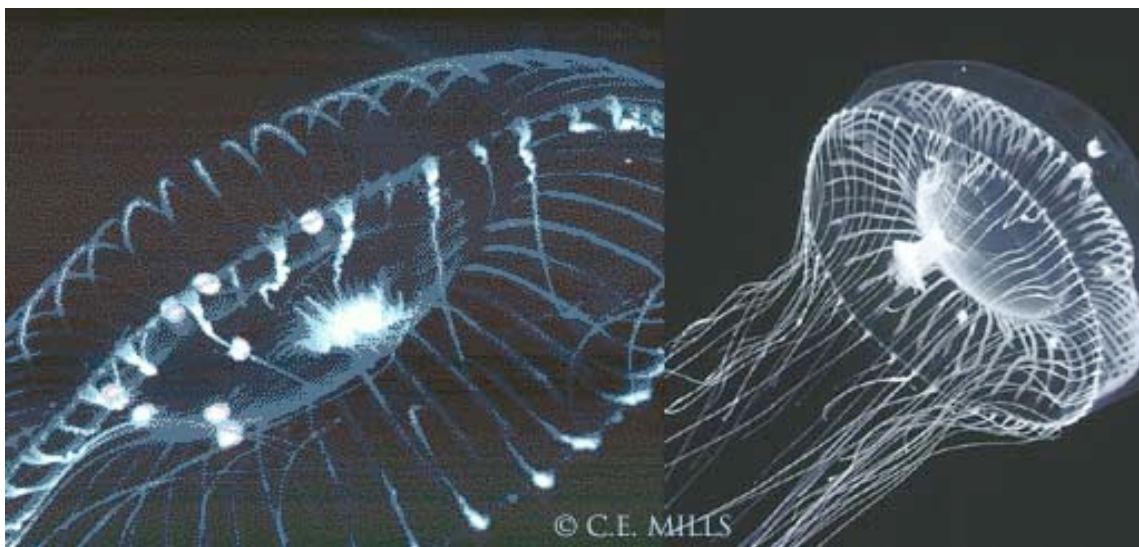


Abbildung 5: Leuchtqualle *Aequorea victoria*

Aequorin wurde bereits 1962 von Shimomura und Johnson als erster ionensensitiver Farbstoff eingesetzt^{17,18,19,20,21}.

Anders als bei anderen Tierarten werden bei *Aequorea victoria* keine sog. Luciferine benötigt, die durch Oxidation von elementarem O₂ Energie in Form von Lichtquanten aussenden. Bei Aequorin handelt sich um ein primäres Photoprotein, das nach Anlagerung von 3 Ca²⁺-Ionen im sterischen Zentrum Lichtquanten emittiert und danach in den Ausgangszustand zurückgelangt²⁴. Es findet somit keine chemische Umwandlung statt, was eine Re-Synthese unnötig macht²². Es wird somit in unbegrenzter Form dem Organismus zur Verfügung gestellt. Ein funktioneller Verbrauch findet somit nicht statt.

Aequorin, auch als Coelenterazin bezeichnet, bildet mit Ca²⁺ ein sog. Coelenteramid, welches unter Abspaltung von CO₂ (Decarboxylierung) Lichtquanten mit einer Wellenlänge von 470nm aussendet. In der Leuchtqualle wird mit Hilfe von GFP (Green Fluorescent Protein) die Wellenlänge auf 508 nm modifiziert, was schließlich die Grünfärbung bedingt²³.

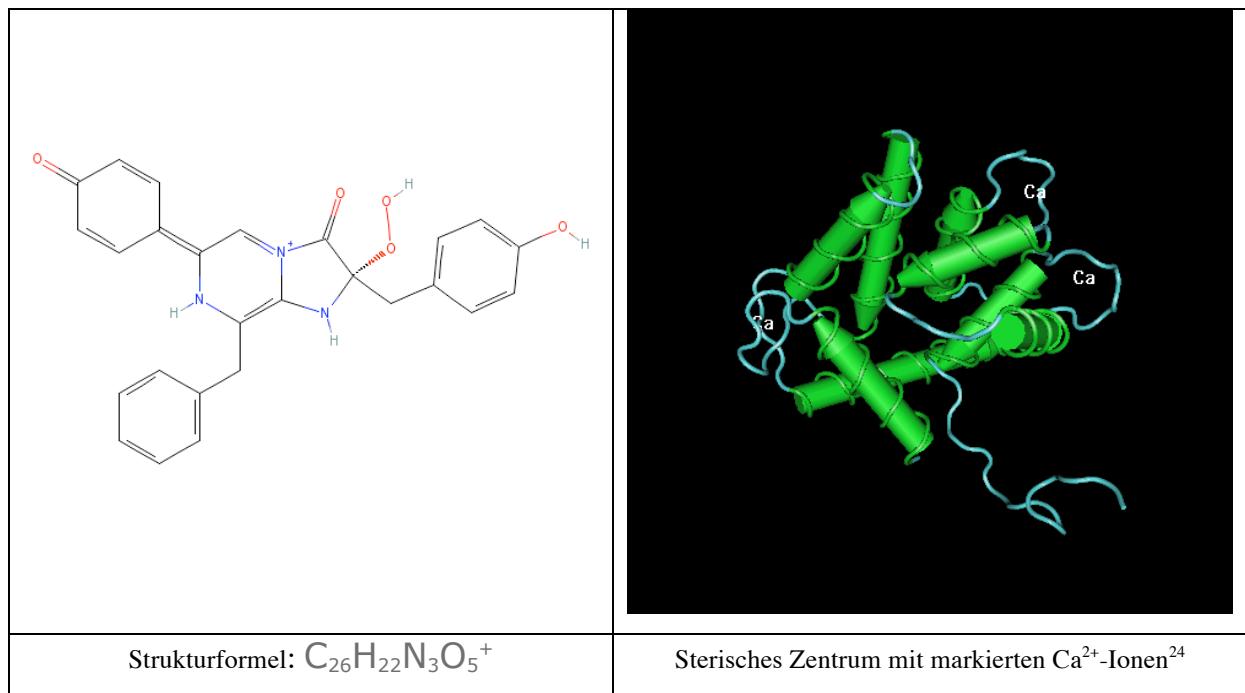


Abbildung 6: Ca²⁺-Bindungsstellen des Aequorin-Moleküls

2.1.5 *Aequorin-Injektion*

Nach erfolgreich etablierter primärer retrograder Perfusion wird mit Hilfe einer handgefertigten extrem dünnen Glaskanüle durch 2-3 Mikroinjektionen jeweils ca. 1 μl des Biolumineszenzproteins Aequorin (Konzentration: 1 $\mu\text{g/ml}$) subepicardial in die Herzspitze injiziert²⁵.

Eine wichtige Voraussetzung zur verlässlichen Interpretation der Ergebnisse ist die Notwendigkeit, dass die abgeleiteten Transienten über mehrere Kontraktionszyklen arithmetisch gemittelt werden müssen. Die Erfahrung aus eigenen Vorversuchen zeigte, dass die Güte der Injektion von Aequorin in die Herzspitze für die Brauchbarkeit der Mittelungen essentiell ist. So darf unter keinen Umständen ein makroskopisch sichtbares Depot entstehen, welches eine hohe Dichte an Lichtquanten emittieren würde. Eine Messung wäre somit nicht möglich.

Anschließend wird das Herz in das mit Puffer gefüllte und mit Wasser umflossene Wärmebad abgesenkt. 10 Minuten nach der Aequorin-Injektion wurde die Ca^{2+} -Konzentration beginnend mit 1 mM in 0,5 mM-Schritten in 5-minütigem Abstand auf 2,0 mM erhöht und die Temperatur des Perfusats auf 37°C gesteigert. Aus den Ergebnissen der zahlreichen Vorversuche konnten mit diesem Protokoll die stabilsten myokardialen Ca^{2+} -Transienten erzielt werden.

2.1.6 *Ca^{2+} -Messung:*

Die Messung der Ca^{2+} -Transienten wird durch einen Photomultiplier (Model 9635QA, Thorn-EMI, Gencom Inc., Fairfield NJ) und einem Signalverstärker realisiert, der unterhalb des Wasserbades die Lichtemissionen aus der Herzspitze registriert. Diese kommt durch die chemische Reaktion zwischen Ca^{2+} und dem Quallenfarbstoff Aequorin (siehe Kapitel 2.1.4) zustande. Voraussetzung für diese Methodik ist die absolute Elimination von Störlicht aus Umwelt und Versuchsapparatur. Aus diesem Grund wird die komplette Versuchsanlage in schwarze, lichtundurchlässige Plastikfolie eingehüllt³⁵. Da die isolierten Herzen zur anschließenden biochemischen Analyse bzw. zur Genotypisierung verwandt wurden, wurde auf eine Triton-X-Lyse, die zur Zerstörung aller (auch Ca^{2+} -speichernden) Zellkompartimente mit Freisetzung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt²⁶, verzichtet. Mit dieser Methode könnten rechnerisch Absolutwerte der Ca^{2+} -Konzentration durch einen „Overburst“ der

Transienten am Ende des Versuches ermittelt werden, d.h. die Aequorin-Spektren retrospektiv normiert werden. Aus diesem Grunde werden im Folgenden somit relative Veränderung der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude vor und nach der Ischämiephase berechnet, die allerdings eine Vergleichbarkeit der einzelnen Gruppen und der jeweiligen Versuchsherzen im Versuchsverlauf ermöglichen. Hierzu wird ausgehend von den Baselinebedingungen eine Normalisierung aller postischämischen Mittelungen zum Zeitpunkt t15 min durchgeführt (siehe Kapitel 2.4).

Mit diesem Versuchsaufbau wird zum ersten Mal die Aequorin-Biolumineszenz Methode an isolierten und unter physiologischen Bedingungen (d.h. unter Normothermie und unter normalem Frequenzspektrum) schlagenden Mauserzen realisiert. Es ist damit möglich, die schnelle Umverteilung der Ca^{2+} -Ionen innerhalb eines einzigen Kontraktionszyklus mit einer Auflösung im Millisekunden-Bereich zu messen und diese in eine direkte zeitliche Beziehung zur simultanen linksventrikulären Druckentwicklung zu setzen.

2.1.7 Prinzip und Funktionsweise eines Photomultipliers:

Ein Photomultiplier besteht im Wesentlichen aus drei Funktionseinheiten, der Photokathode, den Dynoden (Kathode) und einem Kollektor (Anode).

Lichtquanten aus der Umwelt (hier: aus der Apex cordis durch Aequorin erzeugt)

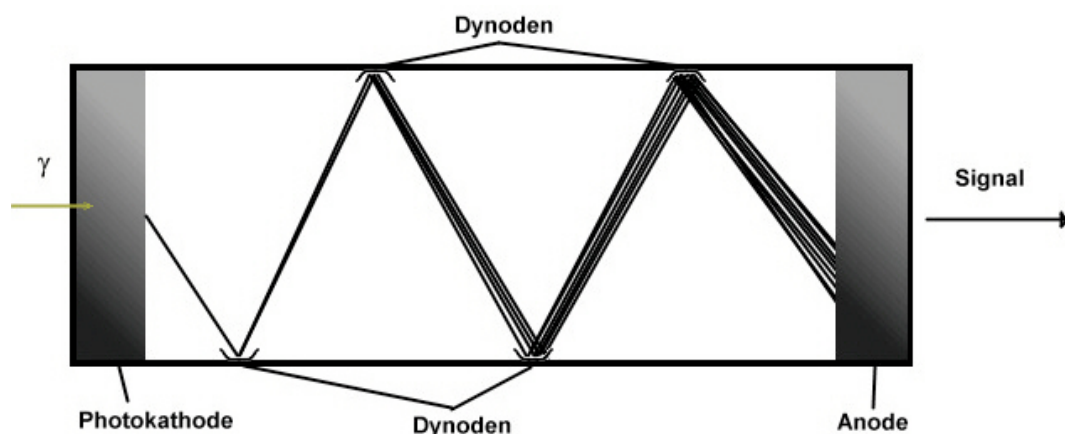


Abbildung 7: Prinzip und Aufbau eines Photomultipliers

treffen primär auf der Photokathode auf. Durch den äußeren Photoeffekt bedingt, werden im Vakuum sog. Primärelektronen freigesetzt, die entsprechend der angelegten Spannung an den Dynoden dort ihre Beschleunigung erfahren und beim Auftreffen sog.

Sekundärelektronen emittieren. Dieser Effekt kommt mehrere Male zur Wiederholung bis die Elektronenlawine schließlich auf die Anode trifft, die das endgültige, jetzt etwa 10^7 -fach verstärkte Signal, einem entsprechendem Analog/Digital-Wandler (AD-C) dem Rechner zugänglich macht. Im aktuellen Versuchsaufbau wird dieses Signal parallel zur Druckmessung des linken Ventrikels registriert.

2.2 Die im Experiment ermittelbaren kardialen Parameter:

Die Versuchsanordnung erlaubt die parallele Aufzeichnung in digitaler Form von linksventrikulären Funktionsparametern wie dem systolischen Druck (P_{sys}), dem linksventrikulären-endsdiastolischen Druck (LVEDP), dem sich entwickelnden Druck (errechnet aus systolischem Druck (P_{sys}) minus endsdiastolischen Druck (P_{dev}) und den Differenzial-Zeitparametern wie maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (Kontraktilität, dP/dt_{max}) und Druckabfallgeschwindigkeit (Lusiotropie, $-dP/dt_{\text{max}}$).

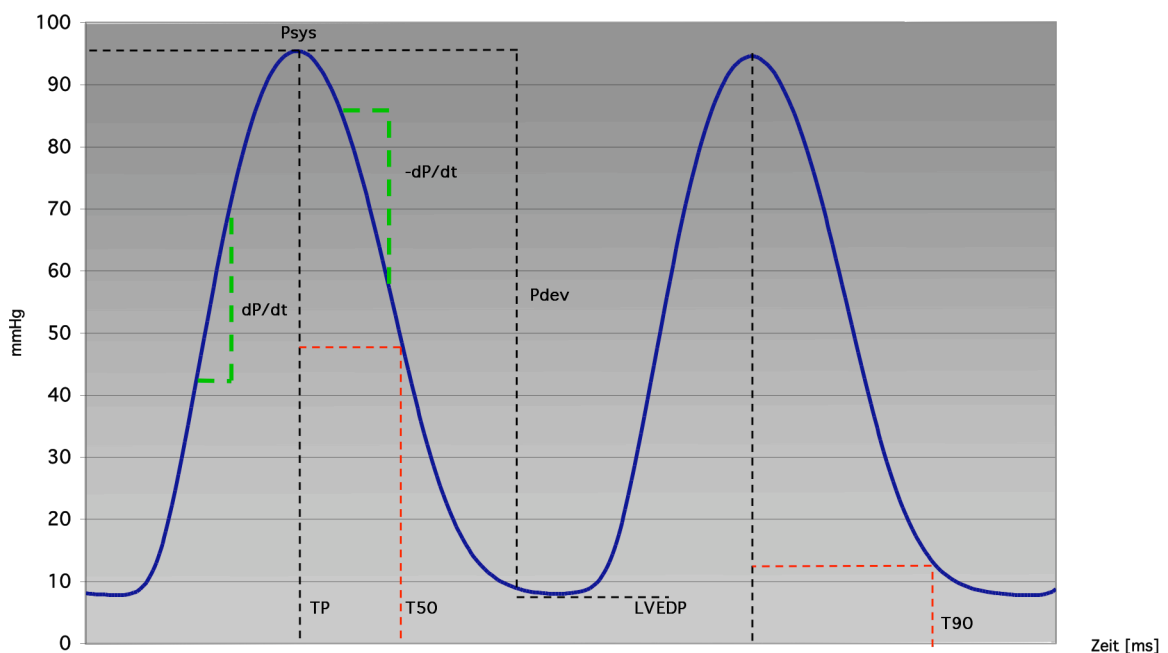


Abbildung 8: Linksventrikuläre Druckentwicklung über zwei Herzaktionen mit den ableitbaren Druck- und Zeitparametern

TP ist als derjenige Zeitpunkt definiert, bei dem der maximale systolische Druck erreicht wird.

Weitere Relaxationsparameter wurden bestimmt, wie z.B. der Zeitpunkt, bis 50% (T_{50}) bzw. 90% (T_{90}) der maximalen Druckamplitude abgefallen sind (siehe Abbildung 8).

Die Messgrößen der Lichtemission wurden in Analogie zu den hämodynamischen Größen definiert. Dabei werden die gemittelten Transienten während der Systole als $L(\text{Light})_{\text{sys}}$, die während der Diastole als L_{dias} und die Differenz beider Größen als L_{dev} bezeichnet. Die oben erwähnten Zeitparameter werden ebenfalls für die Licht-Transienten verwendet:

Maximale Transientenanstiegsgeschwindigkeit (dL/dt_{max}), -relaxation ($-dL/dt_{\text{max}}$), sowie der Zeitpunkt T50% (T_{50}) und T90% (T_{90}) wenn 50% bzw. 90% der abfallenden Transientenamplitude erreicht werden.

2.3 Statistische Analyse

Die gemessenen Daten wurden durch das Versuchsprogramm Hemodyn 2000 in Excel-Datenblätter exportiert und für die statistische Auswertung vorbereitet.

Alle Ergebnisse der Auswertung werden in Mittelwerte \pm S.E.M. (Standardabweichung des Mittelwertes) angegeben und durch einen ungepaarten Student-t-test einer Signifikanzprüfung unterzogen. Dabei bedeutet $p < 0.05$ (5%), dass ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messwerten vorhanden ist.

2.4 Versuchsprotokoll

Die Tiere werden gewogen, dann nach obiger Beschreibung präpariert (siehe Kapitel 2.1). Das retrograd perfundierte Herz wird nun unter Ruhebedingungen für die Dauer von 10 Minuten schlagen gelassen. In dieser Zeit erfolgen die Aequorin-Injektionen, anschließend wird das Herz in das gewärmte Wasserbad abgesenkt und der Schrittmacher wird auf 420 BPM eingestellt.

Es erfolgt eine erste Messperiode für 15 min. Diese als **Baseline** bezeichnete Zeitperiode dient der Erfassung der kardialen Grund-Parameter. Durch die Druckvorgabe des Ballons auf 8 mmHg wird eine entsprechende Vordehnung des

linken Ventrikels erreicht, die den physiologischen in-vivo Bedingungen entspricht. Im Anschluss wird die **Ischämiephase** von 20 min. eingeleitet, indem der Coronarfluss sofort und komplett unterbrochen (No-Flow) wird. Dennoch bleibt die Temperatur auf 37°C eingestellt, entsprechend einer sogenannten warmen Ischämie. Der Schrittmacher bleibt in dieser Phase aktiv, um, wie oben erwähnt, auch hier Lichtsignale getriggert mitteln zu können. Danach kommt es zur 30-minütigen **Reperfusionphase**, indem die Perfusion wieder hergestellt wird (Re-Flow).

2.5 Weitere Parameter innerhalb des Protokolls

2.5.1 Definitionen während des Baseline-Abschnitts (Ruhebedingungen)

- **DevP_{Base}t_x** (Developed Pressure Baseline) entspricht dem sich entwickelnden linksventrikulären Druck zum Zeitpunkt t5, t10 und t15.

2.5.2 Definitionen während des Ischämie-Abschnitts (No-Flow)

- **TTC** (Time To Contracture) gibt die Zeit in Sekunden an bis es zum signifikanten Anstieg des enddiastolischen Druckes kommt. Als signifikanter Anstieg wurde ein Zuwachs um 30% des LVEDP definiert.
- **TTMC** (Time To Maximum Contracture) entspricht dem Zeitpunkt in Sekunden bis der maximale enddiastolische Druck erreicht ist.
- **VOMC** (Value Of Maximum Contracture) gibt den Wert des maximalen enddiastolischen Druckes in mmHg an.
- **LVOC** (Last Value Of Contracture) spiegelt den letzten enddiastolischen Wert in mmHg der ischämischen Kontraktur wider, mit der die Reperfusion beginnt.

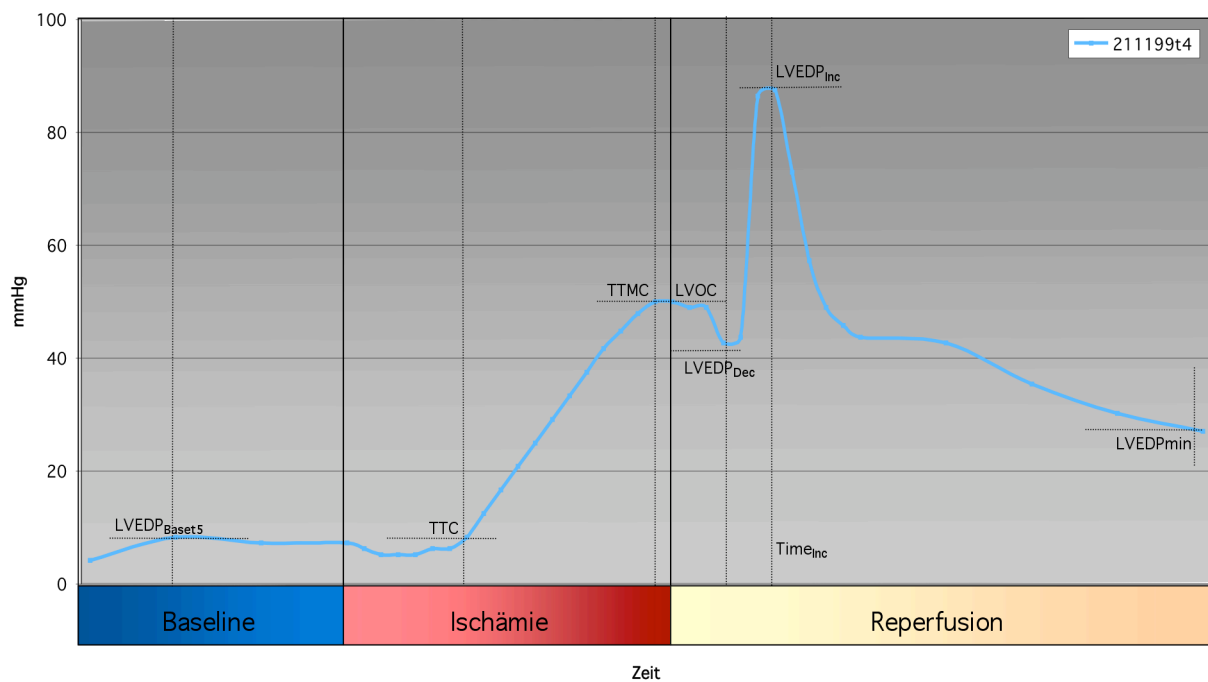


Abbildung 9: Repräsentativer Verlauf des LVEDP während eines gesamten Versuchablaufes

2.5.3 Definitionen während der Reperusionsphase

- **Spike (LVEDP)** bezeichnet den kurzen, direkt (ca. 6 sec) nach Reperfusion einsetzenden Aufstrich der Druckregistrierung in mmHg.
- **Spike (vs. LVOC)** ermittelt das Verhältnis in Prozent des kurzzeitigen Zuwachses des linksventrikulären Druckes bezogen auf den letzten registrierten Druckwert (LVOC, siehe oben).
- **LVEDP_{Dec}** hält den linksventrikulären enddiastolischen Druck 1 Minute nach Reperfusion fest. Weil es hier zu einem Absinken des Druckes kommt, wurde der Index Dec. für Decrement gewählt.
- **DevP_{Dec}** beschreibt den sich entwickelnden Druck 1 Minute nach Reperfusion, gemessen in mmHg.

- **LVEDP_{Inc}** (LV-End-Diastolic-Pressure Increment) repräsentiert den maximalen Anstieg des enddiastolischen Druckes zu Beginn der Reperfusion in mmHg.
- **Time_{Inc}** (Increment Time) gibt den Zeitpunkt des LVEDP_{Inc} in Sekunden nach Beginn der Reperfusion an.
- **LVEDP_{min}** (LV-End-Diastolic-Pressure Minimum) entspricht dem niedrigsten enddiastolischen Druck in mmHg innerhalb der Reperfusion.
- **DevP_{Rec}** (Developed-Pressure Recovery) gibt die maximale linksventrikuläre Druckamplitude bei maximaler funktioneller Erholung am Ende der Reperfusion an. Dieser Zeitpunkt wird durch das Ende des Versuches (30 Minuten Reperfusion) bestimmt.
- **Recovery** gibt das Verhältnis DevP_{Rec} zu DevP_{Basel15} in Prozent an und ist somit ein Maß für die Erholung der Funktion am Ende des Versuchsprotokolls verglichen mit dem sich entwickelnden Druck zum Zeitpunkt t15 der Baseline.

3 ERGEBNISSE

3.1 Hämodynamik: Wildtier vs. CK-KnockOut

3.1.1 Baseline-Phase

<i>Baseline</i>	CK_{Wild-Typ}	CK_{M/Mito}^{-/-}	p
n	8	6	
Körpergewicht [g]	26,6 ± 0,1	29,0 ± 0,4	n.s.
Herzgewicht [mg]	118,8 ± 1,2	153,3 ± 6,5	n.s.
Gewicht des linken Ventrikels [mg]	92,5 ± 1,1	121,7 ± 4,4	0,042
LVEDP [mmHg]	6,9 ± 0,3	8,2 ± 0,7	n.s.
P _{sys} t ₁₅ [mmHg]	89,6 ± 1,1	94,8 ± 5,0	n.s.
P _{dev} (Baseline) [mmHg]	82,7 ± 0,5	86,7 ± 2,3	n.s.

Beide Versuchsgruppen, die der Wildtypen, bestehend aus 8 Tieren mit einem Körpergewicht von $26,6 \pm 0,1$ g und mit einem nach Versuchsende registrierten Herzgewicht von $118,8 \pm 1,2$ mg und die der CK_{M/Mito}^{-/-}-Mäuse, bestehend aus 6 Tieren mit einem Körpergewicht von $29,0 \pm 0,4$ g und einem Herzgewicht von $153,3 \pm 6,5$ mg wurden entsprechend dem oben beschriebenen Versuchsablauf gewogen, präpariert, retrograd perfundiert und mit Aequorin beladen.

Unter Baseline-Bedingungen in 37°C warmem Krebs-Henseleit-Puffer wurden der enddiastolische Druck über das intraventrikuläre Ballonvolumen auf physiologische 8 mmHg eingestellt, nachdem in 5 μ l-Schritten eine Druck-Volumen-Kurve angefertigt wurde, um Aussagen über die linksventrikuläre Compliance machen zu können.

Zum Zeitpunkt t₁₅ der Baseline-Registrierung ergab sich in der Wildtyp-Gruppe ein LVEDP von $6,9 \pm 0,3$ mmHg mit einem P_{dev} von $82,7 \pm 0,5$ mmHg, in der CK_{M/Mito}^{-/-} ein LVEDP von $8,2 \pm 0,7$ mmHg und ein entsprechender P_{dev} von $86,7 \pm 2,3$ mmHg.

Zusammenfassend zeigen sich unter Baseline-Bedingungen keine signifikanten Unterschiede bezüglich des systolischen, des diastolischen Druckes und der daraus resultierenden Druckdifferenz (P_{dev}).

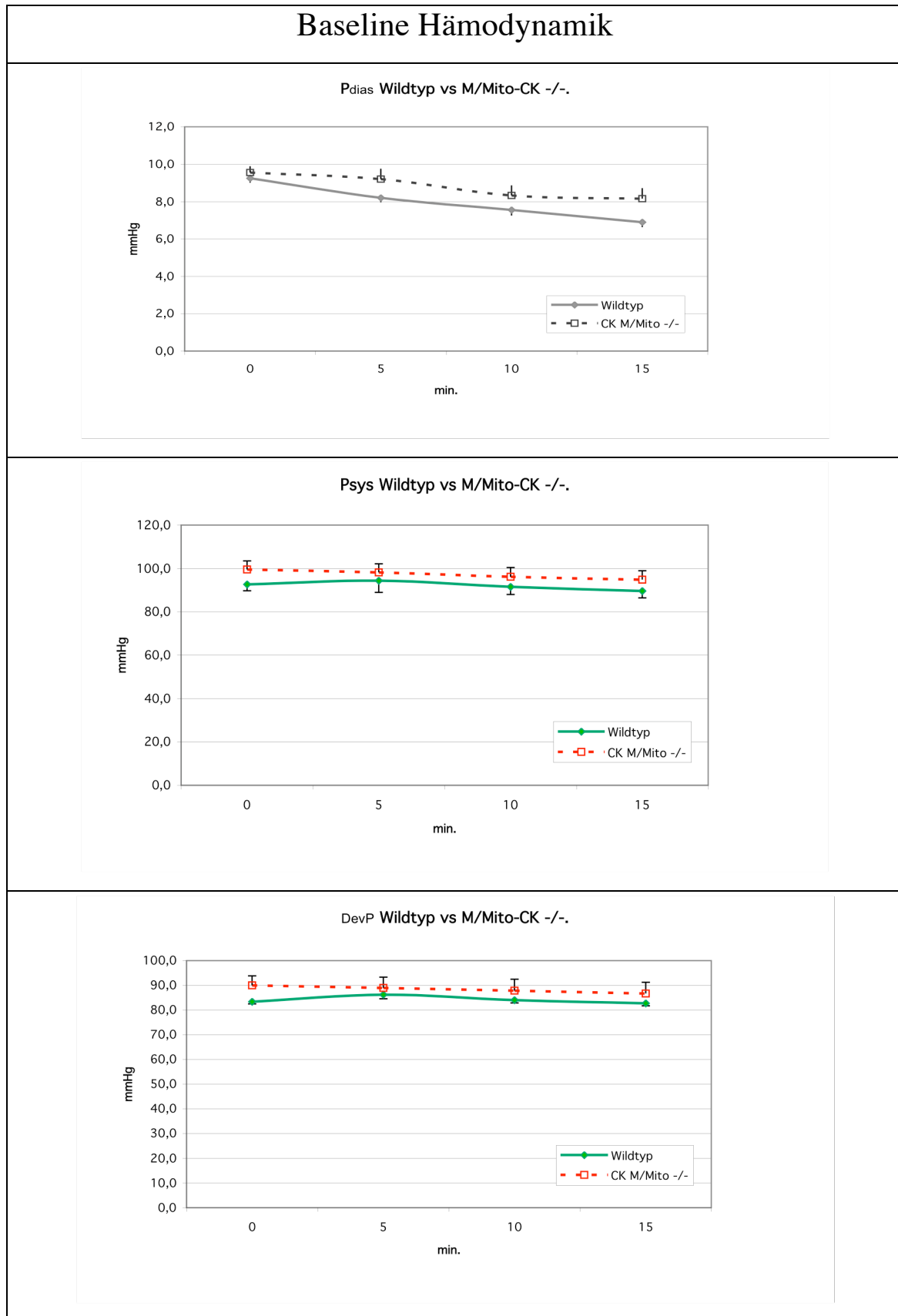


Abbildung 10: Synopsis der Druckwerte unter Baseline-Bedingungen

Baseline	CK_{Wild-Typ}	CK_{M/Mito}^{-/-}	p
n	8	6	
TP (Time To Peak) [ms]	50,0 ± 0,6	45,1 ± 1,0	0,004
T50 [ms]	31,1 ± 0,7	27,3 ± 0,8	0.004
T90 [ms]	51,1 ± 0,9	48,2 ± 0,9	0.039
+dP/dt/DP [s ⁻¹]	31,0 ± 0,5	34,9 ± 1,3	0,024
-dP/dt/DP [s ⁻¹]	26,8 ± 0,4	27,4 ± 0,5	n.s.

Die Zeitparameter und hier insbesondere TP (Time To Peak, [ms]) zeigten unter den Baseline-Bedingungen in der Kontrollgruppe Werte von $50,0 \pm 0,6$ ms und in der CK_{M/Mito}^{-/-} Gruppe Zeiten von $45,1 \pm 1,0$ ms ($p=0,004$). Entgegen den initial zu erwartenden Ergebnissen erreichen die CK_{M/Mito}^{-/-}-Herzen eine um ca. 9% schnellere maximale Kraftentwicklung als die Kontrollgruppe. Entsprechend wurden bei den CK_{M/Mito}^{-/-}-Tieren konsistent früher nach $27,3 \pm 0,8$ ms vs. $31,1 \pm 0,7$ ms 50% bzw. nach $48,2 \pm 0,9$ ms vs. $51,1 \pm 0,9$ ms 90% der Kontraktionsamplitude nach dem TP erreicht. Erwartungsgemäß wurde der Quotient aus Druckentwicklung/Zeit als Maß für die Kontraktilität bei den CK_{M/Mito}^{-/-}-Tieren erhöht $34,9 \pm 1,3$ s⁻¹ vs. Wildtypen $31,0 \pm 0,5$ s⁻¹ gemessen. Für die Relaxation, also dem negativen Quotienten aus Druckentwicklung/Zeit, kam es zu keinen signifikanten Unterschieden. Hier lagen die Werte für die CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe bei $27,4 \pm 0,5$ s⁻¹ und in der Wildtyp-Gruppe bei ebenfalls $26,8 \pm 0,4$ s⁻¹.

3.1.2 Coronarperfusion (Baseline)

Baseline	CK_{Wild-Typ}	CK_{M/Mito}^{-/-}	p
n	8	6	
Perfusion [ml/min]	3,0 ± 0,3	2,6 ± 0,3	n.s.
Perfusion pro Herzgewicht [ml/min/mg]	0,02	0,02	n.s.
Perfusion pro LV-Gewicht [ml/min/mg]	0,03	0,02	n.s.

In Relation zum Herzgewicht wie auch in Relation zum Gewicht des linken Ventrikels ergaben sich bezüglich der Perfusion keine signifikanten Unterschiede.

3.1.3 Ischämie-Phase (No-Flow)

Ischämie	n	CK _{Wild-Typ}	CK _{M/Mito^{-/-}}	p
TTC (Time To Contracture) [s]		459 ± 10	365 ± 12	0,043
TTMC (Time To Max. Contracture) [s]		1113 ± 16	1097 ± 18	n.s.
VOMC (Value Of Max. Co) [mmHg]		35,2 ± 1,5	54,5 ± 1,7	0.007

Nachdem alle Herzen 15 Minuten lang unter Ruhebedingungen in 37°C warmem Krebs-Henseleit-Effluat schlugen, wurde die Perfusion für 20 Minuten im Sinne eines No-Flow unterbrochen.

Die folgende Abbildung 11 zeigt die Entwicklung des LVEDP während der Ischämie-Periode in den Wildtyp- und CK_{M/Mito^{-/-}}-Herzen.

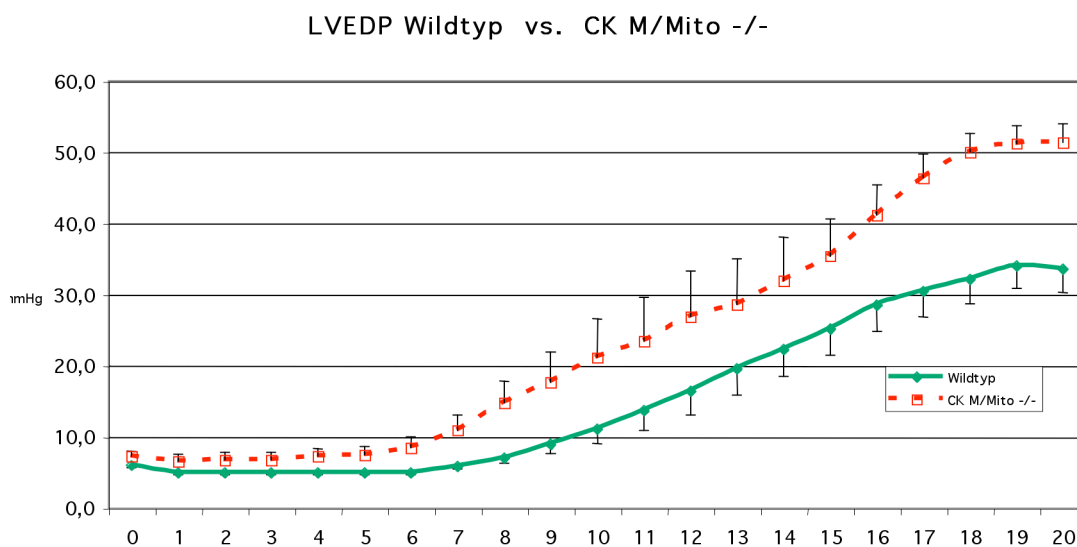


Abbildung 11: Verlauf der ischämischen Kontraktur bzw. der LVEDP-Werte beider Gruppen

Auffällig ist die signifikant frühere Manifestation der ischämischen Kontraktur (TTC), gemessen an dem LVEDP-Anstieg auf über 30% des Ausgangswertes, die in der Kontrollgruppe nach 459 ± 83 s (7,6 min) und in der CK_{M/Mito^{-/-}}-Gruppe nach 365 ± 72 s (6,0 min) zu sehen war ($p=0,043$). Prozentual ausgedrückt beginnt somit die ischämische Kontraktur 20% früher in der CK_{M/Mito^{-/-}}-Gruppe im Vergleich zum Wildtypstamm.

Die Zeit bis zum maximalen Anstieg der Kontraktionsamplitude war in beiden Gruppen gleich: 1113 s (18,6 min) in der Kontrollgruppe vs. 1097 s (18,3 min) in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe.

Signifikant höher war allerdings in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe der maximale LVEDP während der Ischämie-Phase. Während in der Kontrollgruppe lediglich ein LVEDP-Anstieg auf maximal $35,2 \pm 1,5$ mmHg zu verzeichnen war, zeigten die CK_{M/Mito}^{-/-}-Tiere einen signifikant höheren LVEDP von $54,5 \pm 1,7$ mmHg ($p=0,007$). Dies entspricht einer mittleren Erhöhung von 157%.

3.1.4 Reperfusionphase

Reperfusion	CK_{Wild-Typ}	CK_{M/Mito}^{-/-}	p
n	8	6	
Spike LVEDP [mmHg]	46,5 ± 1,6	64,2 ± 1,2	0,006
Spike (vs. LVOC) [%]	151	126	n.s.
LVEDP _{Dec} (Decrement) [mmHg]	28,4 ± 3,9	33,3 ± 4,3	n.s.
DevP _{Dec} (Developed Pres.) [mmHg]	14,7 ± 5,3	24,5 ± 6,7	n.s.
LVEDP _{Inc} (Increment) [mmHg]	41,9 ± 2,1	82,6 ± 2,3	0,0003
DevP _{Inc} (Developed Pres.) [mmHg]	24,5 ± 1,6	24,4 ± 1,2	n.s.
Time _{Inc} [s]	115 ± 5	147 ± 8	n.s.
LVEDP _{min} [mmHg]	16,0 ± 1,6	36,8 ± 1,5	0,004
DevP _{min} [mmHg]	29,4 ± 2,4	12,0 ± 1,5	0,045
Time _{min} (nach Reperfusion) [s]	635 ± 23	585 ± 12	n.s.
DevP _{Rec} [mmHg]	43,9 ± 2,3	41,4 ± 3,9	n.s.
Recovery (vs. Baseline _{t15}) [%]	58	61	n.s.
LVEDP _{Rec} [mmHg]	10,7 ± 3,0	24,8 ± 3,9	0,012

Um die Druckverläufe gerade innerhalb der frühen Reperfusionphase beschreiben und vergleichen zu können, wurden protokollgemäß charakteristische Zeitmarken definiert (Details siehe Kapitel 2.5.3). In den ersten Sekunden nach Beginn der Reperfusion wurde in beiden Versuchsgruppen ein Druckanstieg für wenige Sekunden (im Mittel für 6 Sekunden) registriert, der als Spike (siehe Abb. 12) bezeichnet wird; in der Kontrollgruppe im Mittel Werte von $46,5 \pm 1,6$ mmHg und in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe von $64,2 \pm 1,2$ mmHg ergab ($p=0,006$).

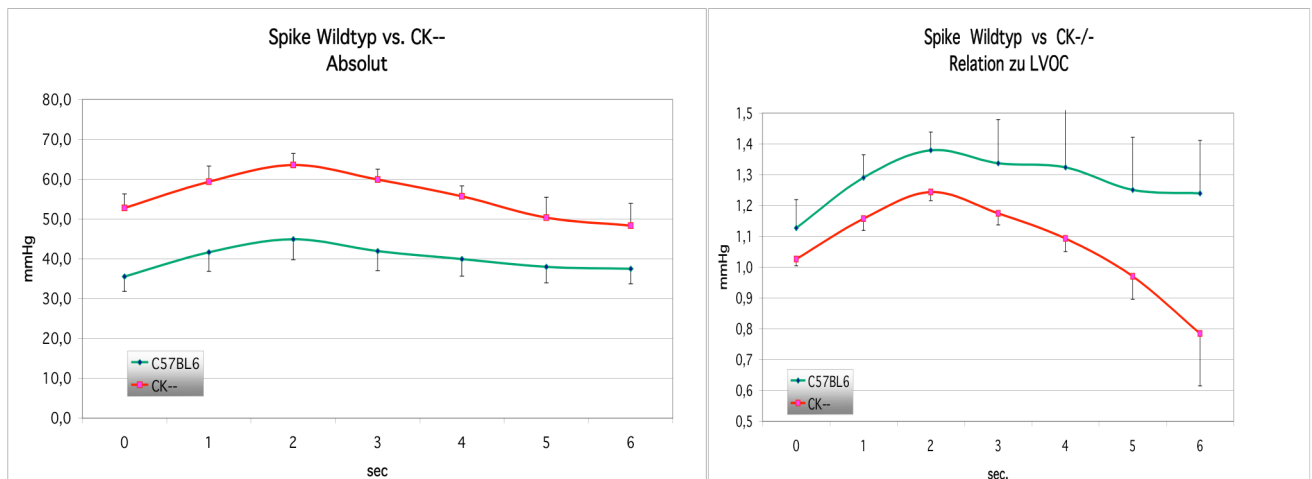


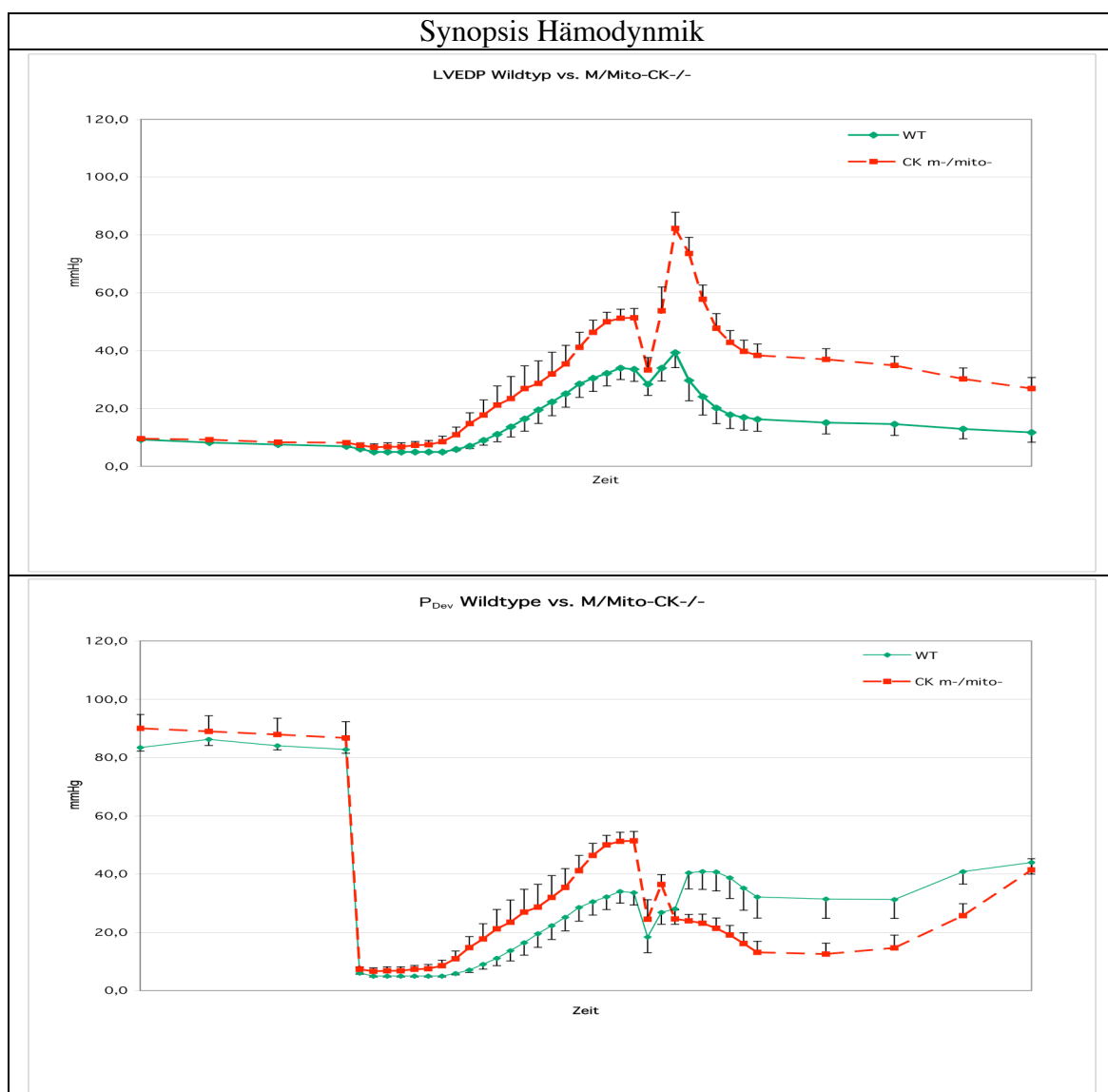
Abbildung 12: Spike

Der deutliche Unterschied entspricht den ischämischen Kontrakturwerten beider Gruppen und lässt sich durch das deutlich unterschiedliche Druckniveau kurz vor Ende der Ischämie erklären. Bezogen auf die letzten, während der Ischämie registrierten Werte (LVOC), zeigt die Wildtiergruppe einen Zuwachs um 151 % und die $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Herzen einen im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant ($p=0,170$) unterschiedlichen Zuwachs von 126 %.

Charakteristischerweise schloss sich ca. 1 Minute nach Reperfusion eine kurzdauernde Erholung des LVEDP an. In der Wildtypgruppe konnte der niedrigste LVEDP bei $28,4 \pm 3,9$ mmHg und in der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Gruppe bei $33,3 \pm 4,3$ mmHg gesehen werden. Hierbei bestehen keine unterschiedlichen Absolutwerte. Verglichen mit dem LVOC und ausgedrückt in Prozent ergaben sich Werte von 98% in der Kontrollgruppe und 64% in der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Gruppe. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede beider Gruppen bezogen auf den ischämischen Ausgangswert (LVOC). Der DevP war in beiden Gruppen zu diesem Zeitpunkt statistisch ebenfalls nicht signifikant unterschiedlich.

Im weiteren Verlauf der Reperfusion kam es zeitgleich (115 s in der Kontrollgruppe und 147 s in der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Gruppe) zum erneuten Anstieg des LVEDP auf maximale Absolutwerte während des Versuchsprotokolls. Während die Wildtyp-

Herzen einen maximalen Druckanstieg auf $41,9 \pm 2,1$ mmHg zeigten, stiegen die der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Tiere auf annähernd doppelte und damit signifikant höhere Druckwerte ($82,6 \pm 2,3$ mmHg) an ($p=0,0003$). Im weiteren Verlauf kam es in den nächsten 8 Minuten zu einem parallelen Abfall der LVEDP-Werte, entsprechend der Ausgangs- $DevP_{Inc}$ -Werte zu einer Parallelverschiebung beider Kurven. Der $DevP$ zu diesem Zeitpunkt ($DevP_{Inc}$) war in beiden Gruppen gleich (siehe Abbildung 13).



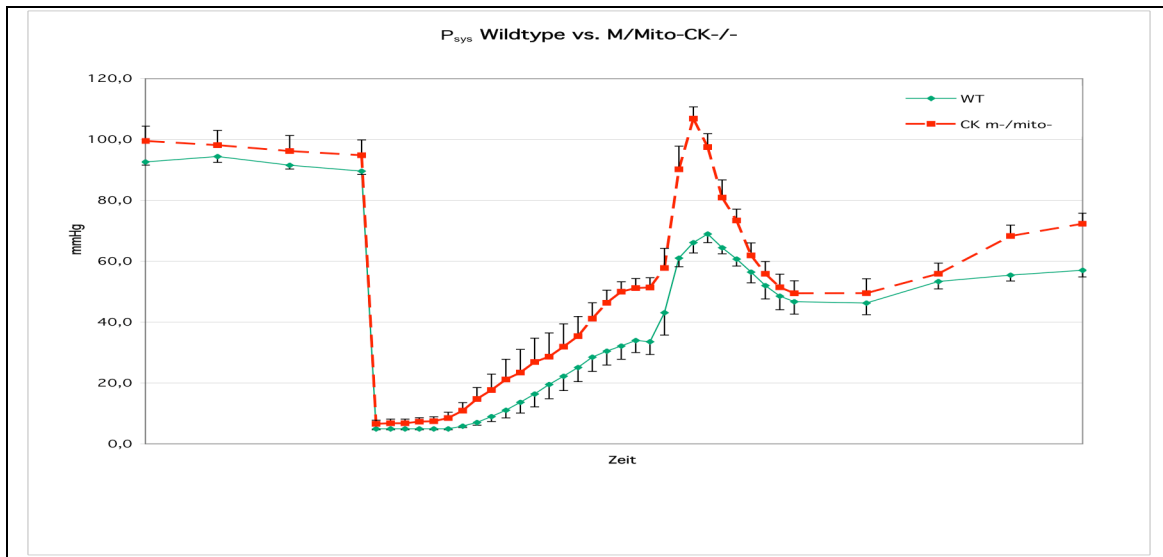


Abbildung 13: Synopsis der Druckwerte im zeitlichen Verlauf über das gesamte Versuchsprotokoll hinweg

3.1.5 Hämodynamische Erholung zum Ende der Reperfusion (Recovery)

Neben der hämodynamisch unterschiedlichen Ischämiephase beider Gruppen mit signifikant erhöhtem ischämischen Kontrakturniveau in der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Gruppe, war es auch Ziel dieser Untersuchung, ob eine vollständige Erholung und Wiederherstellung der linksventrikulären Funktion der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Herzen erreicht wird.

Zu Beginn der Reperfusion zeigt sich parallel zum signifikanten Anstieg des LVEDP (siehe Kapitel 3.1.4) ein gleichsinniger Anstieg des P_{sys} in beiden Gruppen und ein Abfall des P_{dev} mit niedrigeren Werten in der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Gruppe (siehe Abbildung 13).

Nach ca. 7 Minuten kommt es zum steady-state bzw. zur Stabilisierung in beiden Gruppen auf niedrigem, aber signifikant unterschiedlichem Druckniveau (P_{Dev} Wildtyp: $35,2 \pm 7,6$ mmHg vs. $CK_{M/Mito}^{-/-}$: $16,1 \pm 3,7$ mmHg; $p < 0,05$). Von diesem Moment an kommt es zur Erholung der linksventrikulären Funktion, gemessen am steigenden P_{Dev} , sowie gemessen am zögerlich, aber stetig fallenden LVEDP (siehe Abb. 13).

Nach 30 Minuten Reperfusion erreichen die $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Herzen den gleichen P_{Dev} (Wildtyp: $43,9 \pm 2,3$ mmHg vs. $CK_{M/Mito}^{-/-}$: $41,4 \pm 3,9$ mmHg) wie die Wildtypherzen. Dies wird allerdings durch einen deutlich erhöhten LVEDP bzw. durch eine persistierende Vorlasterrhöhung erreicht (LVEDP_{Rec}: Wildtyp: $10,7 \pm 3,0$ mmHg vs. $CK_{M/Mito}^{-/-}$: $24,8 \pm 3,9$ mmHg; $p = 0,012$).

Vergleichend zu den Ausgangswerten zum Zeitpunkt Baseline und den Druckwerten am Ende der Reperfusionphase ergeben sich folgende Werte (ausgedrückt in Prozent):

Recovery (Hämodynamik)	CK_{Wild-Typ}	CK_{M/Mito}^{-/-}	p
n	8	6	
LVEDP _{Recovery} /LVEDP _{t15} [%]	142 ± 37	284 ± 54	0,05
P _{Dev/Recovery} /P _{Dev/t15} [%]	58 ± 2	61 ± 5	n.s.

Recovery (Kontraktilitätsparameter)	CK_{Wild-Typ}	CK_{M/Mito}^{-/-}	p
n	8	6	
TP (Time To Peak) [ms]	44,8 ± 0,6	44,7 ± 1,3	n.s.
T50 [ms]	29,1 ± 0,6	29,1 ± 0,7	n.s.
T90 [ms]	49,3 ± 0,8	53,0 ± 2,2	n.s.
+dP/dt/DP [s ⁻¹]	34,8 ± 0,4	34,9 ± 1,9	n.s.
-dP/dt/DP [s ⁻¹]	27,1 ± 0,5	24,9 ± 0,6	0,01

Beide Gruppen unterscheiden sich nach Ischämieereignis nicht mehr in ihrer Kontraktilität (+dP/dt/DP); ($34,8 \pm 0,4 \text{ s}^{-1}$ in CK Wildtyp-Gruppe bzw. $34,9 \pm 1,9 \text{ s}^{-1}$ in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe). Postischämisch beträgt der TP in beiden Gruppen 45 ms. Die CK_{M/Mito}^{-/-}-Tiere büßen somit ihre initial bessere Kontraktilität (TP vor Ischämie: $50,0 \pm 0,6 \text{ ms}$ vs. $45,1 \pm 1,0 \text{ ms}$; $p=0,004$) nach Ende der Ischämie ein.

Die Relaxation bzw. Lusiotropie der CK_{M/Mito}^{-/-}-Herzen am Ende der 30 minütigen Reperfusion ist entgegen den Daten unter Ruhebedingungen etwas besser bzw. akzeleriert ($-dP/dt/DP$ $27,1 \pm 0,5 \text{ s}^{-1}$ vs. $24,9 \pm 0,6 \text{ s}^{-1}$; $p=0,01$), obwohl die Zeitpunkte T50 und T90 statistisch nicht signifikant unterschiedlich waren (siehe Abbildung 8).

3.2 Biolumineszenz: Wildtier vs. CK-KnockOut

3.2.1 Ergebnisse Baseline (t=15min), Biolumineszenz

Im Gegensatz zu den hämodynamischen Unterschieden bezüglich des TP, T50, T90 und der Kontraktilität zwischen beiden Gruppen, sind bei den Ca^{2+} -Transienten bezüglich der Dynamik keine signifikanten Unterschiede unter Baseline-Bedingungen zu erheben:

Baseline (t=15) Transienten	CK_{Wild-Typ}	CK_{M/Mito}^{-/-}	p
n	8	6	
TP (Time To Peak) [ms]	27,5 ± 1,4	29,3 ± 3,9	n.s.
T50 [ms]	31,0 ± 2,9	27,3 ± 4,3	n.s.
T90 [ms]	73,1 ± 7,7	61,9 ± 9,2	n.s.
+dL/dt/DL [s^{-1}]	79,7 ± 2,5	76,5 ± 5,9	n.s.
-dL/dt/DL [s^{-1}]	40,3 ± 6,8	43,3 ± 2,9	n.s.

So erreicht der Ca^{2+} -Efflux aus dem sarkoplasmatischen Retikulum nach 28 ms in der Wildtypgruppe und nach 29 ms in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe sein Maximum (siehe Abbildung 11). Im Durchschnitt war in der Kontrollgruppe nach 31 ms bzw. nach 27 ms in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe 50% der Transientenamplitude und damit 50% des Ca^{2+} -Influx in die entsprechenden Ca^{2+} -Speicher erreicht, respektive nach 73 ms in der Kontrollgruppe und nach 61 ms bei den CK_{M/Mito}^{-/-}-Mauserzen 90% des Ca^{2+} -Influx. In beiden Gruppen fanden sich somit hier keine signifikanten Unterschiede.

Ohne signifikanten Unterschied verhielt sich ebenfalls die Anstiegssteilheit der Transientenamplituden +dL/dt/DL mit $79,7 \pm 2,5 \text{ s}^{-1}$ in der Wildtyp- und mit $76,5 \pm 5,9 \text{ s}^{-1}$ in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe.

Gleich war ebenfalls das Relaxationsäquivalent -dL/dt/DL mit $40,3 \pm 6,8 \text{ s}^{-1}$ in der Wildtyp- und $43,3 \pm 2,9 \text{ s}^{-1}$ in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe (siehe Abb. 14).

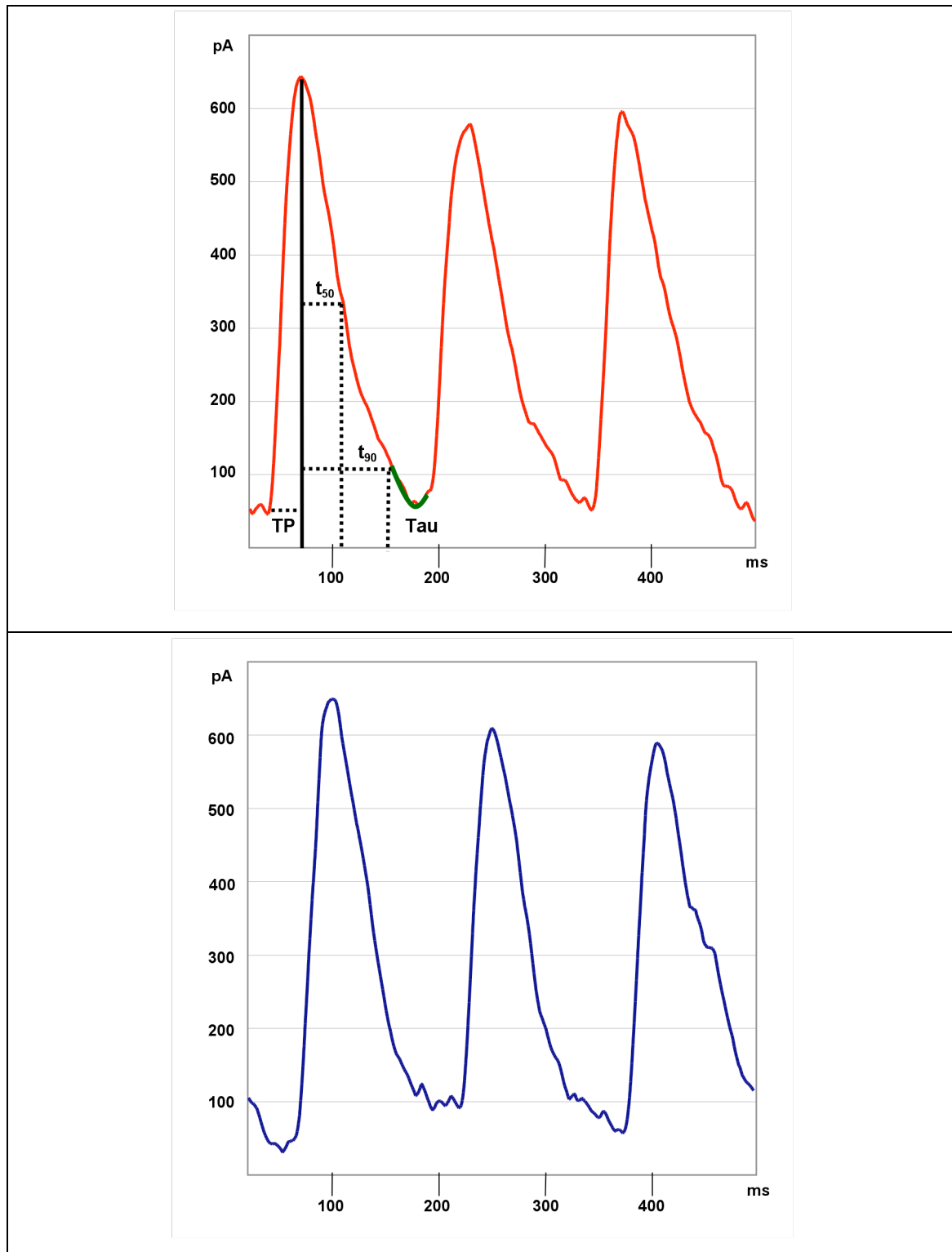


Abbildung 14: Repräsentative (ausschnittsweise = 3 Herzaktionen) Aufzeichnung der Aequorin-vermittelten und durch den Photomultiplier erzeugten Stromamplitude gemessen in pico-Ampere (oben Wildtyp, unten CK M/Mito -/-)

3.2.2 Synopsis zwischen Hämodynamik und intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentration

Die folgende Abbildung Nr. 15 zeigt die Druckentwicklung des linken Ventrikels im zeitlichen Verlauf über eine Sekunde mit simultaner Registrierung des über den Photomultiplier verstärkten Lichtquantensignals der mit Äquorin reagierenden intrazellulären Ca^{2+} -Ionen.

In der zeitlichen Auflösung im Millisekundenbereich ist zu erkennen, dass ein initialer Ca^{2+} -Efflux vor dem Beginn der Kontraktionsamplitude liegt und dass bei einer Herzfrequenz von 420 Schlägen pro Minute mit dieser Methodik eine sehr exakte Auflösung der Ca^{2+} -Dynamik bzw. Kinetik möglich ist.

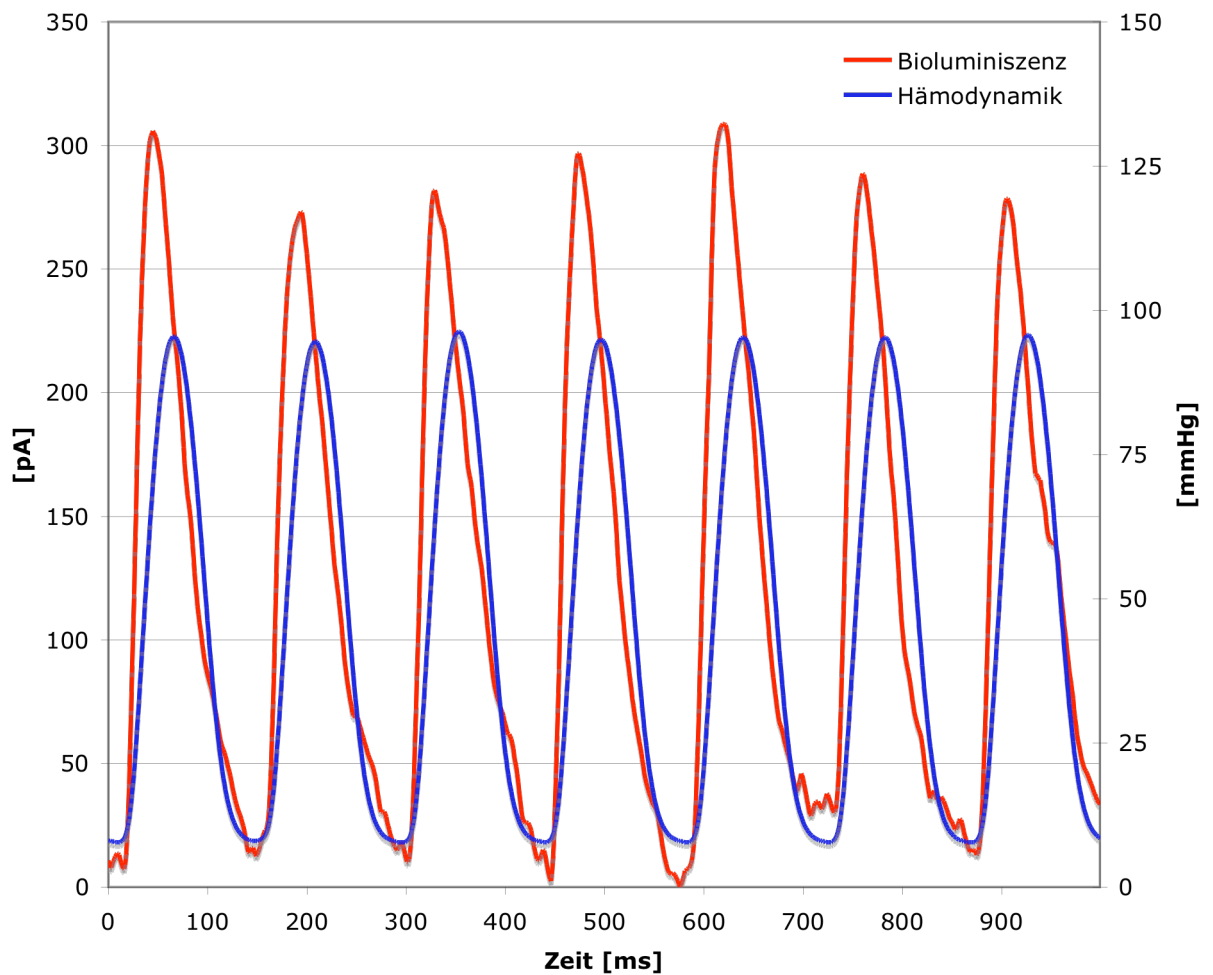


Abbildung 15: Repräsentative und simultane Aufzeichnung der Aequorin-vermittelten Ca^{2+} -Transienten und der Druckamplitude im Zeitraum von einer Sekunde bei einer Hf von 7 Hz (=420BPM)

Jede einzelne Transientenamplitude entspricht der intrazellulären Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration; die Zeitspanne bis zum Erreichen des TP beschreibt die Dauer bis Ca^{2+} aus den Speicherkompartimenten zur Verfügung gestellt wird, ab dem TP kommt es zur erneuten Umverteilung des Ca^{2+} zurück in die Speicherkompartimente, vorzugsweise in das SR. Dabei markiert der Endpunkt der maximalen Ca^{2+} -Konzentration die maximale Anstiegssteilheit der Druckamplitude, also die maximale Kontraktilität.

3.2.3 *Ischämische Kontraktur und Anstieg des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ [Baseline (L_{dias})]*

Die Abbildung Nr. 16 zeigt die gemittelten diastolischen Ca^{2+} -Transienten über den gesamten Versuchsablauf hinweg: Dabei wurde als Basis für den Ausgangswert der Zeitpunkt $t=15$ unter Ruhebedingungen gewählt und alle anderen Werte hierzu in Relation gesetzt. Während der Baseline-Periode zeigt sich ein milder Rückgang der diastolischen Ca^{2+} -Transienten (L_{dias}) ohne signifikanten Unterschied zum Ausgangswert sowie zwischen den beiden Gruppen:

L_{dias} Baseline [min.]	n	$\text{CK}_{\text{Wild-Typ}}$ [%]	$\text{CK}_{\text{M/Mito}^{-/-}}$ [%]	p
0		8 150 ± 27	6 137 ± 23	n.s.
5		150 ± 27	137 ± 23	n.s.
10		111 ± 6	117 ± 20	n.s.
15		100 ± 0	100 ± 0	(1)

(1) $L_{\text{dias}_{t=15}}=100\%$, aller anderen Werte sind relativ zu diesem

3.2.4 *Ischämie (L_{dias})*

Mit Beginn der Ischämie kommt es zum Anstieg des L_{dias} . Bereits 6 Minuten nach Beginn der Ischämie kommt es zum signifikanten Anstieg der Ca^{2+} -Transienten in beiden Tiergruppen, wobei nach 12 Minuten ein Peak in der $\text{CK}_{\text{M/Mito}^{-/-}}$ -Gruppe auf das 2,4fache des Ausgangswertes zu registrieren ist. Im Weiteren fällt dieser Wert nach 18 Minuten wieder auf das ca. 2fache des Ausgangswertes ab, während in der Kontrollgruppe noch ein leichter Anstieg zu verzeichnen ist.

<i>L_{dias} Ischämie [min.]</i>		CK_{Wild-Typ} [%]	CK_{M/Mito}^{-/-} [%]	p
	n	8	6	
6		148 ± 21	191 ± 27	n.s.
12		163 ± 22	237 ± 54	n.s.
18		167 ± 25	207 ± 38	n.s.

Ca²⁺ als Vermittler der elektromechanischen Kopplung zeigt zusammenfassend in allen Abschnitten der Ischämie trotz angedeutet erhöhter Konzentration in der CK_{M/Mito}^{-/-} Gruppe keine signifikanten Unterschiede.

3.2.5 Reperfusion (*L_{dias}*)

<i>L_{dias} Reperfusion [min.]</i>		CK_{Wild-Typ} [%]	CK_{M/Mito}^{-/-} [%]	p
	n	8	6	
0,5		462 ± 132	343 ± 94	n.s.
1		357 ± 82	226 ± 72	n.s.
15		56 ± 9	42 ± 6	n.s.
30		38 ± 9	31 ± 6	n.s.

Mit dem Beginn der Reperfusion setzt sofort ein exzessiver Anstieg der Transientenamplitude ein. Dieses „Ca²⁺-Burst-Signal“ ist nur von kurzer Dauer, weswegen hier eine 30-Sekunden andauernde Transientenmittelung durchgeführt wurde (siehe Abb. 16). In der Wildtypgruppe kommt es zum 4,6fachen Anstieg des Ca²⁺-Transientensignals, in der CK_{M/Mito}^{-/-}-Gruppe zu einem 3,4fach erhöhten Signal.

Bereits nach weiteren 30 Sekunden findet ein deutlicher Abfall der Transientenamplitude statt. Sowohl das maximale Ca^{2+} -Signal als auch der rasche Konzentrationsabfall waren in der Kontrollgruppe stärker, wenn auch im Vergleich zu den $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Tieren nicht signifikant unterschiedlich ausgeprägt. In der weiteren Reperfusionphase sind nur noch relativ schwache Signale zu mitteln, deren Niveau bei den Wildtyphertzen bei 56% (nach 15 Minuten Reperfusion) und bei 38% am Ende der Reperfusion bzw. bei 42% und bei 31% bei den $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Herzen liegt. Ein signifikanter Unterschied war zu diesen Zeitpunkten nicht festzustellen.

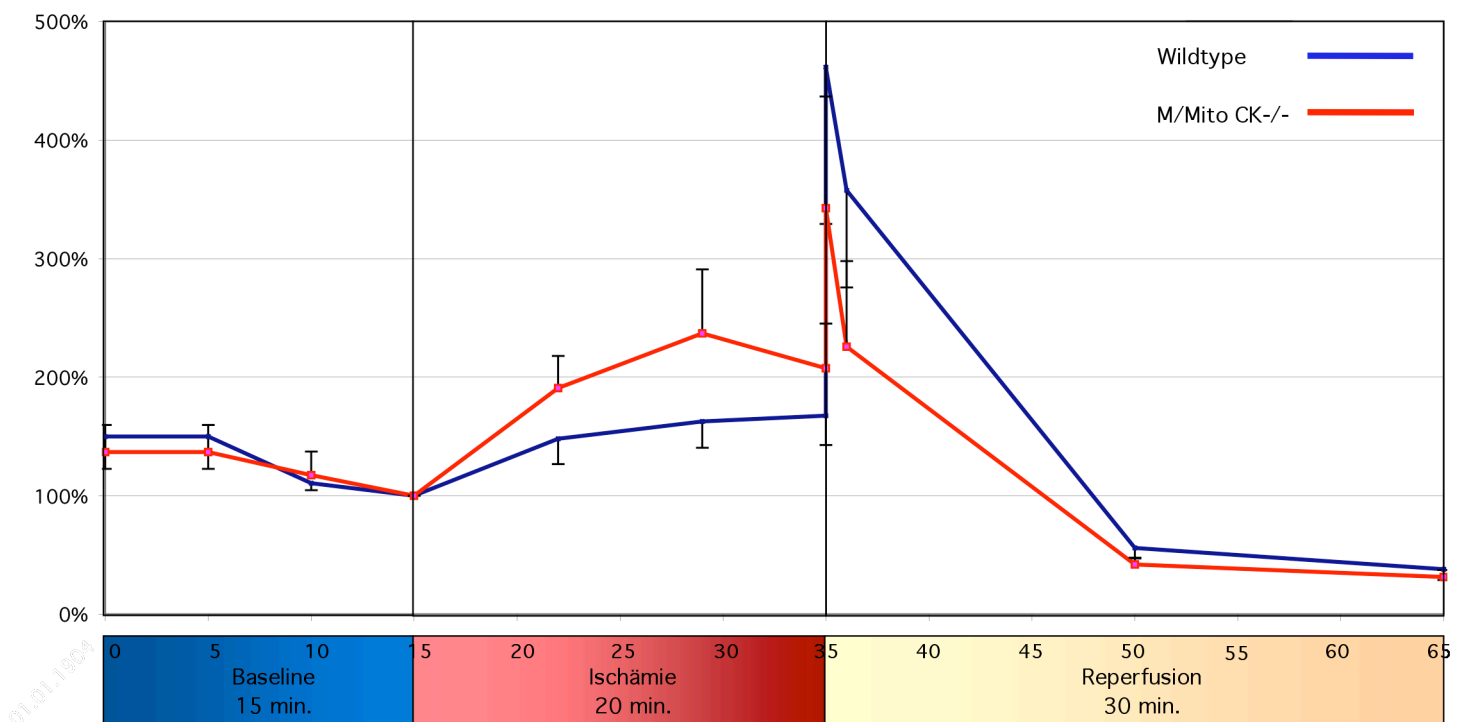


Abbildung 16: Verlauf der diastolischen Ca^{2+} -Transienten während des gesamten Versuches in beiden Gruppen. Dabei wurden die ermittelten Werte mit dem Zeitpunkt t15 normalisiert (=100%) und in Prozent dargestellt.

4 DISKUSSION

4.1 Hintergrund:

Grundlage und wichtige Voraussetzung für diese Arbeit ist das Vorhandensein der transgenen Mäuse, bei denen die zytosolische (M-CK) als auch die mitochondriale Creatinkinase (Mito-CK) nicht mehr exprimiert werden⁹. Die Konsequenzen dieses KnockOut sollten bei oberflächlicher Überlegung angesichts der essentiellen Aufgaben der Energiegewinnung, -bereitstellung und -transport fatal ausfallen, findet doch der Energiemetabolismus über die per Nahrung aufgenommenen Substrate über die β -Oxydation und anschließend über die oxydative Phosphorylierung statt, so dass letztlich energiereiche Phosphate in Form von lebenswichtigem ATP generiert werden, auch um ATPasen anzutreiben^{1,2}.

ATP in lokalisierter Form, also im mitochondrialem Kompartiment, ist für die Zelle allerdings nur sehr eingeschränkt brauchbar, da er als der finale Energieträger nur am Ort der Utilisation sinnvoll eingesetzt werden kann. Jede Zelle braucht deshalb ein System, das den Energietransfer und somit den gerichteten Energiefluss realisiert. Dies wird unter anderem durch das Creatinkinase- bzw. Phosphocreatinsystem bereitgestellt. Voraussetzung hierfür sind die verschiedenen CK-Isoenzyme, die die Phosphorylgruppen vom Phosphocreatin auf das ADP übertragen, um ATP zu generieren. Darüber hinaus hat das Phosphocreatinsystem auch eine Pufferwirkung zur Aufrechterhaltung der Phosphat- und damit der Energiehomöostase in Situationen eines stark schwankenden Energiebedarfs.

Die zu beantwortende Frage ist nun, welche Konsequenz der Verlust dieser Isoenzyme in den entsprechenden Kompartimenten in funktioneller Hinsicht für die Herzmuskelzelle hat.

In den vorherigen Arbeiten²⁷ zu diesem Thema wurde gezeigt, dass die isovolumentrische linksventrikuläre Funktion in CK-defizienten Mäusen bei niedriger bis mäßiger Arbeitslast im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen unverändert war. Protokolle, die dieser Frage unter ausgeprägteren Stressbedingungen nachgehen fehlen bis dato.

Ferner gibt es bereits experimentelle Hinweise^{25, 9}, dass eine direkte Verbindung zwischen einem fehlendem bzw. depletiertem CK-System und einer veränderten Ca^{2+} -

Homöostase besteht. Studien, insbesondere an CK-defizienten Mäuseherzen sind allerdings nicht existent.

Die hämodynamischen Daten aus dieser Arbeit unterstreichen die bisherigen Ergebnisse, dass unter physiologischen Ruhebedingungen (Baseline) gemessen an P_{dev} und P_{sys} bei vorgegebenen LVEDP (8 mmHg) keine Unterschiede vorhanden sind. Es war jedoch festzustellen, dass einige Kontraktilitätsparameter der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ Herzen wie z.B. die Time To Peak-Zeit, T50, T90, $+dP/dt/DP$ in den $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Herzen signifikant besser waren. Dieses Phänomen könnte Ausdruck einer veränderten und optimierten Ventrikelgeometrie sein (La-Place-Gesetz). Die linksventrikuläre Masse der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ Herzen war isoliert betrachtet statistisch signifikant erhöht (122 vs 93 mg), das Gesamtgewicht der Herzen allerdings in beiden Gruppen nicht unterschiedlich. Zeichen für eine pathologische Hypertrophie des linken Ventrikels, die womöglich im Rahmen von Adaptionsvorgängen der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Tiere stattgefunden haben und Korrelat der erhöhten LV-Masse darstellt, konnten retrospektiv nicht gesehen werden. Weiterhin ergaben sich auch an Hand der errechneten Werte für die Lusiotropie ($-dP/dt/DP$) als möglichen Ausdruck einer Relaxationsstörung im Sinne einer diastolischen Dysfunktion keine Unterschiede.

Eine der Hauptfragen, nämlich, ob sich der veränderte Genotypus der KnockOut-Tiere auch phänotypisch innerhalb der Ischämiephase als simulierte Stressreaktion manifestiert, konnte mittels der gewählten Versuchsmethodik in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

Tatsächlich zeigte sich bei Unterbrechung des Koronarflusses bereits nach 365 Sekunden eine vorzeitige ischämische Kontraktur bei den $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Mäusen. Erst 94 Sekunden später war ein Anstieg des LVEDP bei den Wildtieren zu sehen. Zusätzlich kam es zum signifikant höheren Anstieg des LVEDP der $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Herzen zum Ende der 20minütigen Ischämiephase.

Bisherige Arbeiten²⁷ an Skelettmuskelzellen *in vivo* konnten bereits MR-spektroskopisch zeigen, dass die PCr-Level des Skelettmuskels nur marginal verändert, die Funktion des Muskels in $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Mäusen allerdings deutlich verändert waren. So war die Tetanie des Muskels (burst-activity) verstärkt und konsekutiv die Relaxationszeit deutlich verlängert. Ferner bestanden ultrastrukturelle Unterschiede: So

war das Volumen der Mitochondrien deutlich vergrößert sowie die Lokalisation der Mitochondrien verändert¹⁰. Zudem kam es zur Aggregation von Myofibrillen. In vitro konnte die gleiche Arbeitsgruppe eine veränderte Sequestration und Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen bei Skelett-Muskeln von $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Mäusen feststellen⁹. Hier wurde bereits die direkte Verbindung zwischen dem fehlenden mitochondrialen und zytosolischem CK-System und den direkten Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Homoöstase am Skelettmuskel hergestellt.

Die Möglichkeiten der Veränderung während der Ischämie und die damit verbundenen funktionellen Auswirkungen sind äußerst vielfältig¹, gerade unter dem Aspekt einer fehlenden mitochondrialen und zytosolischen $\text{CK}_{\text{MM/MB}}$:

- Umstellung des Energiestoffwechsels auf die anaerobe Glykolyse³² und Akkumulation von Lactat und Glycerolphosphat und Induktion der Glykogenolyse
- Depletion von Phosphocreatin und damit Erschöpfung der ATP-Synthese
- In der Primärphase der Ischämie werden hauptsächlich mitochondriale ATPasen bedient
- Der Metabolismus wird stark verlangsamt
- Akkumulation von AMP und H^+ -Ionen und damit Beginn einer metabolischen Azidose,
- Steigerung der Osmolalität mit Ödembildung³¹ und schließlich
- Ruptur des Sarkolemms³¹

Neben all diesen Effekten sollte mit Hilfe des Versuchsaufbaus und mit Einsatz von Aequorin gleichzeitig die Veränderung des Ca^{2+} -Stoffwechsels untersucht werden. Zum ersten Mal konnte diese Methodik in $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Mäusen erfolgreich unter physiologischen d.h. auch normothermischen Voraussetzungen zum Einsatz kommen.

4.2 Physiologischer Hintergrund der Ischämie und die Rolle des sog. Ca^{2+} -Overloads:

Nach Jennings^{28,29,30,31} ist Ischämie ein Zustand des reduzierten Blutflusses, der eine der Leistung des Herzens inadäquate Oxygenierung für den notwendigen aeroben Metabolismus bedingt und gleichzeitig die Unfähigkeit beschreibt, Stoffwechselendprodukte zurück in die Zirkulation und damit zur Elimination zu bringen.

Während der Ischämie kommt es aufgrund der ungenügenden Bereitstellung von ATP zum Ausfall der Na^+/K^+ -ATPase und konsekutiv zum Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration. Dies hat zur Folge, dass der sekundär-aktive $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter verstärkt den Ca^{2+} -Influx antreibt. Weiterhin stellen Ca^{2+} -Ionenpumpen sowohl am sarkoplasmatischen Retikulum, als auch an der Zellmembran ihre Arbeit ein, was zu einem massiven Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führt. Dieses sog. Ca^{2+} -Overload hat de-facto fünf Konsequenzen für die Herzmuskelzelle:

- erhöhter Verbrauch energiereicher Phosphate, um die hohe intrazelluläre Konzentration von Ca^{2+} in die entsprechenden Kompartimente (ER, Mitochondrien) zu sequestrieren. Dadurch kommt es zur Reduktion von [ATP] und [PCr] bei gleichzeitigem Anstieg von $[\text{P}]_i$ ^{27,28,29}.
- Ca^{2+} -abhängige Aktivierung von verschiedensten Enzymen, die die Zellmembran und das Cytoskelett schädigen (insbesondere Vinculin)^{31,33}.
- Triggereffekt auf die Phosphorylierung von zellulären Proteinen (Calmodulin-abhängige Proteinkinase und die Ca^{2+} -aktivierbare Phospholipid-abhängige Proteinkinase)^{31,33}.
- Durch den Abfall der ATP-Konzentration im Rahmen der Ischämie kommt es im Muskel zur verringerten „Weichmacherfunktion“. Durch den oben beschriebenen Mechanismus bedingt, bewirkt der erhöhte Ca^{2+} -Influx unter anderem einen verstärkten Rigor-ähnlichen Zustand. Beides zusammen bewirkt die ischämische Kontraktur, wobei der [ATP]-Abfall hierfür initial zu sein scheint (siehe Kapitel 4.5)^{31,32}.
- Arrhythmogene Wirkung durch verspätete Nachdepolarisation²⁹.

Diese Aufzählung zeigt jedoch gleichzeitig, dass nicht etwa nur die Na/K-ATPase oder das Absinken von ATP für die kardiale Dysfunktion zuständig ist, sondern dass Ca^{2+} an vielen weiteren negativen Effekte beteiligt ist.

Als zusätzliche Faktoren wirken die vom ischämischen Myocard freigesetzten Metabolite (cAMP, Adenosin, Laktat, O_2 -Radikale und Fettsäuremetaboliten) arrhythmogen und bedingen eine kritische metabolische Azidose^{32,33,34}.

Kommt es zu einer zeitnahen Reperfusion, so zeigt das zwar beeinträchtigte, aber noch reversibel geschädigte Herz eine über längere Zeit bestehende mechanische Einschränkung mit prolongierter funktioneller Erholung („Stunned Myocardium“)^{28,30,31}. Diese Phase kann von wenigen Stunden bis hin zu mehreren Tagen andauern²⁸. Die in dieser Phase ablaufenden zahlreichen intrazellulären Veränderungen sind komplex und Gegenstand intensiver Forschung. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine Azidose nach Reperfusion protektiv bzw. prognoseverbessernd ist, da der Ca^{2+} -Influx reduziert wird und damit mutmaßlich die Ca^{2+} -vermitteltenden schädigenden Effekte abgemildert werden³⁵.

Aufgrund des oben genannten Geschehens (ATP-Abfall und Ca^{2+} -Anstieg) und den davon abhängigen Prozessen wird deutlich, warum die Energiebereitstellung und damit unter anderem das Phosphocreatin/Creatinkinase-System als komplexes Energiesystem während solcher Ischämie- aber auch anderer Stressreaktionen besonders im Zentrum des Interesses stehen.

4.3 Ca^{2+} -Verhalten in CK-defizienten Herzen unter

Ruhebedingungen:

Gemessen an bisherigen Veröffentlichungen^{13, 25} konnte mit dieser Arbeit erstmals eine Aequorin-gestützte Ca^{2+} -Messung am intakten und schlagenden Mäuseherzen bei 37 Grad Celsius erfolgreich etabliert und in einer Versuchsserie durchgeführt werden. In vielen eigenen Vorversuchen im Sinne einer Dosisfindungsstudie für eine optimale Aequorindosis zeigte sich, dass die Güte der Injektionen mit einer aus Glas hergestellten

Mikroinjektionsspritze die besten Ergebnisse erbrachte. Entscheidend war ferner eine streng subepikardial lokalisierte Injektion ohne Entstehung eines sichtbaren Depots. Zur Verbesserung des Messsignals, das über den Photomultiplier akquiriert wurde, trug entscheidend die schrittweise Steigerung der externen Ca^{2+} -Konzentration des Perfusionspuffers in 0,5 mM-Schritten bis zu einer Gesamtkonzentration von 2 mM mit gleichzeitiger langsamer Steigerung der Puffer- und Wärmebadtemperatur von 30°C auf 37°C bei.

Hampton et al.²⁵ zeigte erstmalig, dass eine erfolgreiche Messung qualitativer und quantitativer Ca^{2+} -Konzentrationsänderungen am schlagenden isolierten Mausherz mit der Aequorin-Biolumineszenz Methode möglich ist. Die Messungen wurden allerdings unter unphysiologischen Bedingungen bei 30°C Effluattemperatur und deutlich niedrigeren und damit subnormalen Herzfrequenzen bis max. 300/min. durchgeführt. In dem hier beschriebenen Protokoll wurde nicht nur die Ca^{2+} -Konzentration schrittweise in mehr physiologische Bereiche, sondern auch die Herzfrequenz auf 420/min erhöht und damit mehr der physiologischen Herzfrequenz von Mäusen angenähert, was auf der anderen Seite aber die Ansprüche an die Auflösung der ermittelten Ca^{2+} -Transienten deutlich erhöht. Zusätzlich ist dadurch der Energieverbrauch der Zellen in Ruhe und unter Ischämiebedingungen deutlich erhöht. Ziel des gewählten Versuchsaufbaus war es jedoch auch, die verlässliche Aufrechterhaltung der physiologischen Temperatur während der Ischämie zur exakten Reproduzierbarkeit des Ischämie- bzw. Reperfusionsschadens zu gewährleisten. Bleibt nämlich die Perfusion der Koronarien und damit die Erneuerung des Effluats im Wasserbad des Herzens aus, fällt damit die Temperatur, wie in Vorversuchen nachweisbar, rasch auf unphysiologische 30°C ab. Damit würden unkontrollierbare und gleichzeitig unphysiologische Einflüsse auf die verschiedenen Enzymsysteme, wie insbesondere auf das CK-System der Wildtiere einwirken, und somit beispielsweise die thermodynamischen Effekte wie auch die Ca^{2+} -Messungen im Vergleich zu den $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Tieren nicht verlässlich abbilden.

4.4 Unterschied zur Skelettmuskulatur

Steeghs et al.⁹ berichtet bei CK-defizienten Skelettmuskeln im Gegensatz zu den vorliegenden Daten am Herzmuskel über ein deutlich verändertes Ansprechverhalten

auf Ca^{2+} nach Depolarisation und über eine signifikant veränderter Ca^{2+} -Aufnahme. Interessanterweise fand sich keine veränderte Expression von Ca^{2+} -ATPasen des sarkoplasmatischen Retikulums dieser Skelettmuskeln. Demnach könnte man postulieren: Wenn die sarkolemmale Ca^{2+} -ATPase doch eine Rolle in der veränderten Ca^{2+} -Homöostase spielt, dann liegt dies eher in einer veränderten Verteilung oder in einem funktionellem Verlust begründet als an einer Abnahme der ATPasen selbst.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse daraufhin, dass Skelettmuskelzellen mit ihrer erhöhten CK-Aktivität und reduzierten Mitochondriendichte und deswegen geringeren Kapazität für aerobe ATP-Produktion mehr auf ein intaktes CK-System zur Aufrechterhaltung der Ca^{2+} -Homöostase angewiesen sind als Kardiomyozyten.

4.5 Gesteigerte Anfälligkeit der $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Herzen gegenüber Ischämie und Reperfusion

Die zentrale Erkenntnis dieser Arbeit ist der Umstand, dass die $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Herzen, die einen fast vollständigen Verlust eines effizienten Phosphattransportsystems haben, eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber den Anforderungen eines Energieverbrauchs- bzw. Energiebereitstellungs-Missverhältnisses haben als Wildtypherzen.

Obwohl der funktionelle myokardiale Energie-Metabolismus in CK-depletierten Herzen signifikant verändert ist³⁶ (Kapitel 2.1.1), ist die isovolumetrische Kontraktion bei moderater Arbeitslast, wie auch in diesem Versuchsaufbau (Kapitel 3.1.1) beschrieben, unverändert. Ähnliches wurde bereits in vorhergehenden Studien anhand einer erhaltenen linksventrikulären Funktion an isolierten Rattenherzen mit vergleichbaren energetischen Veränderungen unter niedriger Arbeitslast gezeigt. Hierbei konnte Tian et al.³⁷ durch chemische Inhibition durch den Einsatz von Iodacetamid die CK-Aktivität auf 5%, verglichen mit den Kontrolltieren, senken. Eine Änderung der sarkolemmalen ATPase-Aktivität, was zur Ca^{2+} -Interferenz beitragen könnte, wurde hierbei ebenfalls ausgeschlossen. Die gleiche Gruppe konnte zeigen, dass die Steigerung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration zur Erhöhung der Inotropie und damit der Arbeitslast mit einer Beeinträchtigung der Kontraktionsreserve bei CK-depletierten Rattenherzen einhergeht. Gleichzeitig kam es hier weder zur signifikanten Erhöhung

des LVEDP noch zur Augmentation der Ca^{2+} -Transienten-Amplitude. Die Gruppe führte dies auf die reduzierte Energiegewinnung durch ATP-Hydrolyse zurück, welches konsekutiv die Ca^{2+} -Homöostase und davon abhängig die Kontraktionsreserve negativ beeinflusst.

Dennoch führt die experimentelle Steigerung der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration auch in $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Mäusen zur ähnlichen Steigerung der kardialen Arbeitslast und des Sauerstoffverbrauches³⁶. Möglicherweise ist hierbei die Methode der Inotropiesteigerung mitverantwortlich für die unterschiedlichen Ergebnisse. Bereits MacGowan et al.³⁸ postulierte, dass die Ca^{2+} -induzierte Inotropie kein adäquater Stimulus zur maximalen Ausschöpfung der Arbeitslast und des ATP-Verbrauches darstellt. Im Gegensatz dazu bedeutet eine anhaltende Ischämie einen metabolischen Stressor, der auf grundsätzlich andere Art und Weise zur steigenden Arbeitslast beiträgt. Diese Ergebnisse konnten ebenfalls durch die aktuelle Arbeit bestätigt werden. Die isolierte Steigerung der externen Ca^{2+} -Konzentration über 1,5 mM hinaus konnte zwar eine Erhöhung der Kontraktionsamplitude (P_{sys}) und damit eine Verbesserung des DevP bedingen, allerdings keinen kritischen Anstieg der Arbeitslast in Bezug auf vergleichbare Steigerungen der Hämodynamik in-vivo.

In den erhobenen Ergebnissen zeigen $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Herzen tatsächlich eine deutliche veränderte Dynamik in der Entwicklung der sog. ischämischen Kontraktur. Hier kam es signifikant früher zur Kontraktur. Zusätzlich zeigen die $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Herzen einen wesentlich höheren P_{dias} als Ausdruck einer anhaltend verstärkten ischämischen Kontraktur zum Ende der Ischämiephase. Hier betrug der Unterschied fast das 1,6fache der Tiere mit intaktem CK-System. Der Zeitpunkt bis zum Erreichen des maximalen Druckanstieges (TTMC) war indes nicht unterschiedlich.

Trotz ausgedehnten Untersuchungen^{39, 40, 41} ist der zugrunde liegende Mechanismus der ischämisch bedingten Kontraktur bisher noch nicht vollständig verstanden. Zwei grundlegende Mechanismen werden im Wesentlichen verantwortlich gemacht:

1. Der Anstieg der Muskelspannung wird verursacht durch eine gesteigerte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration, die eine Steigerung der Ca^{2+} -vermittelten Querbrückenzyklen bedingt

2. durch eine reduzierte myokardialen ATP-Konzentration und/oder gleichzeitig erhöhten ADP-Spiegel verharren die Actin/Myosinquerbrücken in einem Rigor-ähnlichen Kontraktionszustand.

Eine Reihe von bereits länger zurückliegenden experimentellen Studien^{41, 42, 43} deuten eher zugunsten des zweiten Mechanismus. Unterstützt wird dies durch eine neuere Arbeit von Eberli et al.⁴⁴, in der keinerlei Änderung der linksventrikulären Funktion und ischämischen Kontraktur unter experimentell veränderter Ca^{2+} -Konzentration während der Ischämie nachgewiesen werden konnte. Zumindest gibt dies Hinweise darauf, dass die unter Ischämie auftretende diastolische Dysfunktion offensichtlich nicht ausschließlich direkt durch die Ca^{2+} -aktivierte Kontraktion verursacht wird.

In ähnlicher Weise und unter Verwendung der NMR-Spektroskopie zur direkten Quantifizierung energiereicher Phosphate und der Ca^{2+} -Konzentration zeigte Koretsune et. al.⁴⁵, dass der ATP-Abfall zeitlich eng mit dem Beginn der Kontraktur zusammenfällt. Interessanterweise soll die intrazelluläre Azidose als Ausdruck der anaeroben Glykolyse und die Akkumulation von Phosphaten während der Ischämie die Sensitivität der Myofilamente gegenüber Ca^{2+} reduzieren, was zusätzlich gegen einen überwiegend Ca^{2+} -vermittelten Mechanismus sprechen würde.

Dennoch findet sich als Ergebnis der vorliegenden Arbeit ein Anstieg der Ca^{2+} -Transienten in der Wildtypgruppe in strengem zeitlichen Zusammenhang zur Entwicklung der diastolischen Dysfunktion. Interessanterweise ist hierbei der Ca^{2+} -Anstieg in beiden Gruppen wesentlich früher nachweisbar als die darauf folgende ischämische Kontraktur (siehe Abbildung 17).

4.6 Protrahierter linksventrikulärer Funktionsverlust

In beiden Gruppen konnte nach 20 Minuten Ischämiezeit und 30 Minuten Reperfusionsdauer die initiale linksventrikuläre Funktion nicht wieder erreicht werden: Verglichen zum P_{dev} vor der Ischämie blieb im Mittel der LVEDP als Ausdruck der Dysfunktion in beiden Gruppen erhöht, allerdings mit signifikantem Unterschied zu Gunsten eines niedrigeren Wertes in der Kontrollgruppe.

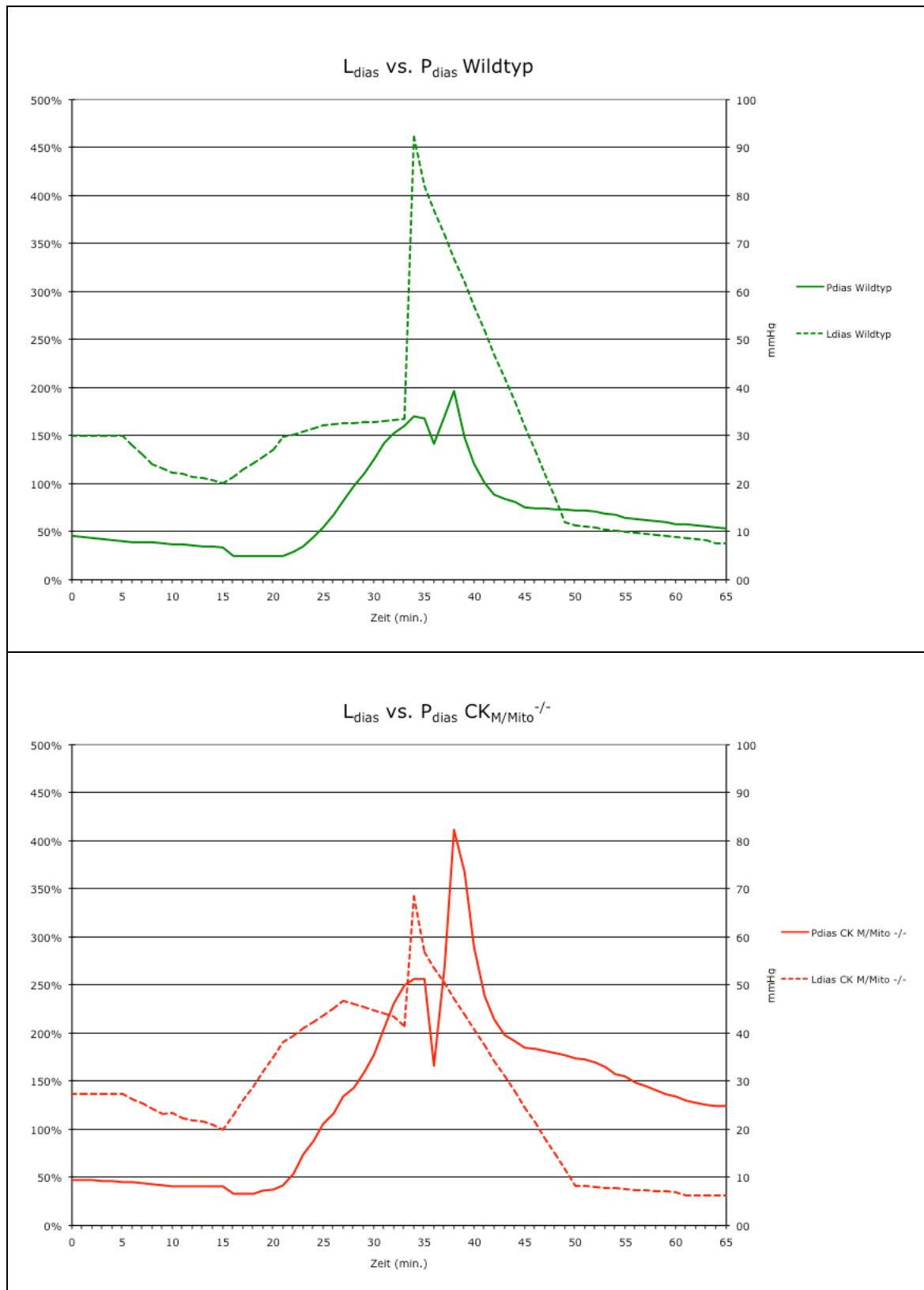


Abbildung 17: Simultane Darstellung des L_{dias} und des P_{dias} oben Wildtyp, unten CK_{M/Mito}^{-/-}

4.7 Ursache der verstärkten diastolischen Dysfunktion $CK_{M/Mito}^{-/-}$

Herzen

Energetisch betrachtet konnte bereits gezeigt werden, dass CK -defiziente Herzen nicht nur veränderte Konzentrationen energiereicher Phosphate unter Ruhebedingungen aufweisen, sondern dass es bei steigender Arbeitslast auch zu einer vermehrten Akkumulation von ADP und konsekutiv zu einem gesteigerten Abfall der freien Energie aus der Hydrolyse des ATP (ΔG_{ATP}) im Vergleich zu Wildtypherzen kommt²⁷. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass während einer Phase eines relevanten Missverhältnisses zwischen Energieversorgung und -verbrauch, wie beispielsweise durch Ischämie induziert, die bereits in Ruhe vorhandenen Energieveränderungen in CK -defizienten Herzen noch aggraviert werden.

Der hier gezeigte Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und die signifikant schlechtere diastolische Funktion bzw. ischämische Kontraktur sind somit durch die oben beschriebene Hypothese einer eingeschränkten und schließlich limitierenden Energiebereitstellung energiereicher Phosphate in Form von ATP ausgelöst und durch den Mangel der Creatinkinase erklärbar. Die primär ausbleibende Energiebereitstellung durch die ATP-Hydrolyse während der Ischämie führt zum Versagen des gerichteten Ionenflusses für Ca^{2+} und somit sekundär zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration: Insgesamt wird der Ca^{2+} -Influx verstärkt; es kommt gleichzeitig zum Rückgang des Ca^{2+} -Efflux und zum verminderten Ca^{2+} -Reuptake in das Sarkoplasmatische Retikulum. Die ansteigende Ca^{2+} -Konzentration findet ihr Korrelat in der früheren Kontraktur und dem signifikant erhöhten diastolischen Druckanstieg. Diese Hypothese wird durch die Versuchsdaten gestützt, wenn auch das Signifikanzniveau der Ca^{2+} -Transienten zwischen beiden Versuchsgruppen nicht erreicht wird.

Sichtbar wird der sog. Ca^{2+} -Overload während der Ischämie zusätzlich kurz nach Wiederbeginn der Reperfusion durch exzessiv hohe Amplituden der Ca^{2+} -Transienten. Interessanterweise zeigten die Wildtypherzen einen höheren Ca^{2+} -Exzess als die $CK_{M/Mito}^{-/-}$ -Herzen. Der Mechanismus dieses Unterschiedes zwischen beiden Gruppen ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt unklar.

4.8 Potenzielle Limitationen des Versuchsmodells

Die Pharmakokinetik des Aequorin und dessen potentieller Konzentrationsabfall am Ende der Ischämie sind gegenwärtig unklar. Dadurch, dass sich Ca^{2+} im sterischen Zentrum des Aequorins anlagert und damit primär gebunden wird, könnte ein verändertes Fließgleichgewicht der Ca^{2+} -Ionen hergestellt werden. Der vorhandenen Literatur¹⁷⁻²² zufolge sollte allerdings netto-bereinigt kein Ca^{2+} -Verbrauch stattfinden, denn nach der Lichtemission werden durch Decarboxylierung des Ca^{2+} -Aequorin-Komplexes (das sog. „Coelenteramid“) die Ca^{2+} -Ionen wieder aus dem funktionellen Zentrum disloziert. Dennoch besteht die Möglichkeit, dass durch den Versuchsaufbau ein Ca^{2+} -Verlust zu verzeichnen ist, z.B. durch chemische Bindung mit anorganischem Phosphat (Pufferlösung) oder durch anderweitige enzymatische Bindung.

Als weitere Erklärung könnte der natürliche Verbrauch von Aequorin bzw. die Stabilität des Moleküls eine entscheidende Rolle spielen. Schließlich vergehen zwischen Injektion (und damit Aktivierung durch Erstkontakt mit Ca^{2+} -Ionen) und dem Ende des Versuchs ca. 65 bis 70 Minuten. Um diesen Fehler zu minimieren wurde das kürzestmögliche Protokoll ausgewählt.

Bezüglich der Hämodynamik ist pathophysiologisch die zelluläre Ödembildung in der Ischämiephase durch Erhöhung der Osmolalität ein Faktor, der zur mechanischen Compliancestörung des linken Ventrikels beiträgt.

Die genannten Mechanismen sollten prinzipiell jedoch für Wildtyp und $\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$ -Herzen gleichermaßen zutreffen und damit die beschriebenen Unterschiede zwischen beiden Gruppen nicht erklären. Es ist aber andererseits durchaus möglich, dass die genannten Phänomene durch die mangelnde Energiebereitstellung auf Grund der CK-Defizienz unterschiedlich moduliert werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch die Konzeption des Versuchsaufbaus und der Wahl der Komponenten konnte die aktuelle Arbeit an intakten isolierten Mäuseherzen zeigen, dass unter weitgehend physiologischen in-vitro-Bedingungen die Möglichkeit besteht, mit Hilfe des Biolumineszenzproteins Aequorin Messungen der intrazytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration während eines einzelnen Herzschlages mit einer Frequenz von 420 Schlägen pro Minute zu gewinnen und diese gleichzeitig in die linksventrikuläre Funktion integrieren zu können.

Das wesentliche Ergebnis dieser Arbeit ist dabei, dass während moderater Arbeitsbelastung der Verlust eines effizienten CK-Systems transgener CK-defizienter Herzen ($\text{CK}_{\text{M/Mito}}^{-/-}$) hinsichtlich des intramyokardialen Calciumstoffwechsels und der linksventrikulären Funktion durch Adaptionenmechanismen offensichtlich gut kompensiert wird. Allerdings wird in Situationen des Ungleichgewichtes zwischen Energieversorgung und Energieverbrauch, ausgelöst durch Ischämie und anschließende Reperfusion, eine signifikante Verschlechterung der linksventrikulären Funktion und gleichzeitig der Ca^{2+} -Homöostase sichtbar, was einen weiteren Beweis für die enge Beziehung zwischen myokardialer Energetik und des Ca^{2+} -Haushaltes insbesondere in CK-defizienten Herzen unter metabolischem Stress darstellt.

Schließlich zeigt die simultane Aufzeichnung des Ca^{2+} -Signals und die Druckentwicklung des linken Ventrikels, dass es schon vor der Entwicklung der ischämischen Kontraktur zur intrazytoplasmatischen Veränderung der Ca^{2+} -Homöostase kommt, die durch eine unzureichende Bereitstellung durch ATP ausgelöst wird und maßgeblich durch das Fehlen eines effizienten Energietransportsystem in Form der Kreatinkinase bedingt sein könnte.

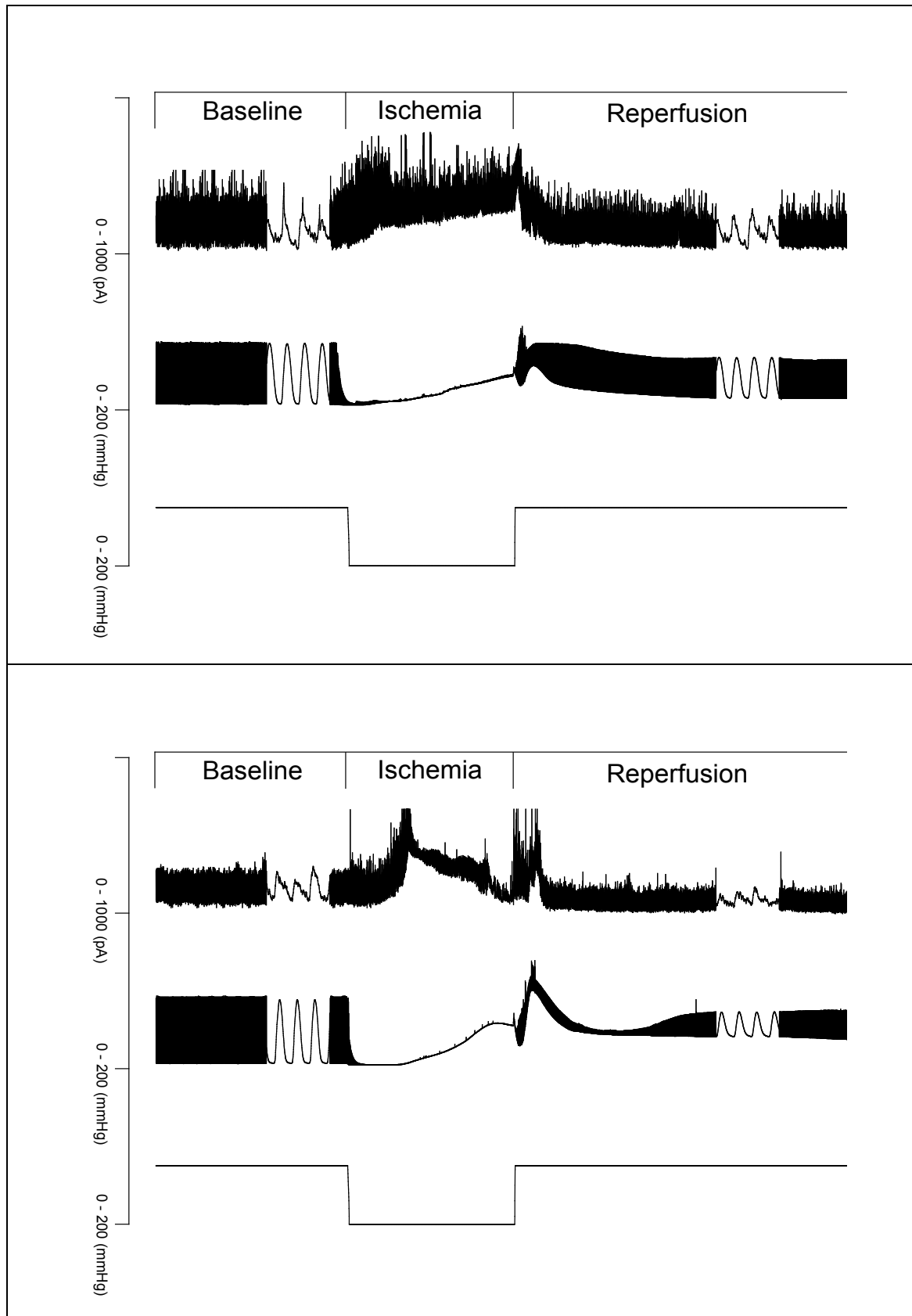


Abbildung 18: Originalaufzeichnung eines kompletten Versuches, oben Wildtyp, unten $CK_{M/Mito}^{-/-}$

6 ABKÜRZUNGEN:

AD	Analog/Digital
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	ATP-hydrolysierendes Enzym
BPM	Beats per minute (Schläge pro Minute)
cAMP	Zyklisches AMP (2nd Messenger)
CF	Koronarfluß
CK	Creatinkinase
$CK_{M/Mito}^{-/-}$	KnockOut für das Allel der M und der mitochondrial codierenden Creatinkinase
CoA	Coenzym A (Zitratzyklus, Glykolyse)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
GFP	Green Fluorescent Protein
kD	kilo Dalton (Molekulargewichtseinheit)
L_{Dev}	Entspricht der Transientenamplitudenhöhe
L_{dias}	Minimaler Transientenwert in der Diastole
L_{sys}	Maximaler Transientenwert in der Systole
LV	linksventrikulär, das linke Herz betreffend
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck

LVOC	Last Value Of Contracture
NAD	Nikotinamid Adenin Dinukleotid
NADH	Nikotinamid Adenin Dinukleotid H ⁺
NMR = MRT = MR	Nuclear Magnetic Resonance
P	Phosphat bzw. Phosphorylgruppe
p	Wahrscheinlichkeit (probability)
PCr	Phosphocreatin, Creatinphosphat
P _{dev} = DevP	Developed Pressure, entwickelnder Druck
P _{dias}	Diastolischer Druck
P _{sys}	Systolischer Druck
SEM	Standard Error of the Mean
SR	Sarkoplasmatische Retikulum
T50	Zeitpunkt, wenn 50% der Amplitude erreicht sind (nach TP)
T90	Zeitpunkt, wenn 90% der Amplitude erreicht sind (nach TP)
TNT, TNI, TNC	Troponin T, Troponin I, Troponin C (Ca ²⁺)
TP	Time To Peak
TTC	Time To Contracture
TTMC	Time To Maximum Contracture
VOMC	Value Of Maximum Contracture
vs	Versus, lat., gegen(über)

7 LITERATURVERZEICHNIS

- ¹ S. Neubauer, "The Failing Heart--an Engine out of Fuel," N Engl J Med 356.11 (2007).
- ² L. Stryer, „Lehrbuch Biochemie“, 2. Auflage, Verlag Spektrum (1994).
- ³ S. P. Bessman and P. J. Geiger, "Transport of Energy in Muscle: The Phosphorylcreatine Shuttle," Science 211.4481 (1981).
- ⁴ J. S. Ingwall, "On the Hypothesis That the Failing Heart Is Energy Starved: Lessons Learned from the Metabolism of Atp and Creatine," Curr Hypertens Rep 8.6 (2006).
- ⁵ K. W. Saupe, M. Spindler, J. C. Hopkins, W. Shen and J. S. Ingwall, "Kinetic, Thermodynamic, and Developmental Consequences of Deleting Creatine Kinase Isoenzymes from the Heart. Reaction Kinetics of the Creatine Kinase Isoenzymes in the Intact Heart," J Biol Chem 275.26 (2000).
- ⁶ L. Kay, K. Nicolay, B. Wieringa, V. Saks and T. Wallimann, "Direct Evidence for the Control of Mitochondrial Respiration by Mitochondrial Creatine Kinase in Oxidative Muscle Cells in Situ," J Biol Chem 275.10 (2000).
- ⁷ S. Soboll, D. Brdiczka, D. Jahnke, A. Schmidt, U. Schlattner, S. Wendt, M. Wyss and T. Wallimann, "Octamer-Dimer Transitions of Mitochondrial Creatine Kinase in Heart Disease," J Mol Cell Cardiol 31.4 (1999).
- ⁸ A. M. Rossi, H. M.Epperberger, P. Volpe, R. Cotrufo, T. Wallimann, Muscle.type MM creatine kinase is specifically bound to sarcoplasmatic reticulum and can support Ca²⁺ uptake and regulate local ATP/ADP ratios," J Biol Chem; 265(9):5258-66 (1990)
- ⁹ K. Steeghs, A. Benders, F. Oerlemans, A. de Haan, A. Heerschp, W. Ruitenbeek, et al. "Altered Ca²⁺ responses in muscle with combined mitochondrial and cytosolic creatine kinase deficiencies," Cell 89(1):93-103 (1997).

-
- ¹⁰ K. Steeghs, F. Oerlemans, A. de haan, A. Heerschap, L. Verdoodt , M. de Bie, et al. Cytoarchitectural and metabolic adaptations in muscles with mitochondrial and cytoolic creatine kinase defiecenies". Mol Cell Biochem; 184(1-2):183.94 (1998).
- ¹¹ J. F. Watchko, M. J. Daood, B. Wieringa, A. P. Koretsky. "Myofibrillar or mitochondrial creatine kinase deficiency alone does not impair diaphragm isotonic function". J Appl Physiol 88(3):973.80 (2000)
- ¹² C. Ince, H. Vink, P. A. Wieringa, M. Giezeman and J. A. Spaan, "Heterogeneous Nadh Fluorescence During Post-Anoxic Reactive Hyperemia in Saline Perfused Rat Heart," Adv Exp Med Biol 277 (1990).
- ¹³ T. G. Hampton, I. Amende, K. E. Travers and J. P. Morgan, "Intracellular Calcium Dynamics in Mouse Model of Myocardial Stunning," Am J Physiol 274.5 Pt 2 (1998).
- ¹⁴ O. Langendorff, „Untersuchung am überlebenden Säugetierherzen," Pfluegers Arch. 61: 291-307, (1895).
- ¹⁵ I. L. Grupp, A. Subramaniam, T. E. Hewett, J. Robbins and G. Grupp, "Comparison of Normal, Hypodynamic, and Hyperdynamic Mouse Hearts Using Isolated Work-Performing Heart Preparations," Am J Physiol 265.4 Pt 2 (1993).
- ¹⁶ H. Stromer, A. Cittadini, G. Szymanska, C. S. Apstein and J. P. Morgan, "Validation of Different Methods to Compare Isovolumic Cardiac Function in Isolated Hearts of Varying Sizes," Am J Physiol 272.1 Pt 2 (1997).
- ¹⁷ O. Shimomura and F. H. Johnson, "Properties of the Bioluminescent Protein Aequorin," Biochemistry 8.10 (1969).
- ¹⁸ O. Shimomura and F. H. Johnson, "Calcium Binding, Quantum Yield, and Emitting Molecule in Aequorin Bioluminescence," Nature 227.5265 (1970).
- ¹⁹ O. Shimomura and F. H. Johnson, "Structure of the Light-Emitting Moiety of Aequorin," Biochemistry 11.9 (1972).

-
- ²⁰ O. Shimomura and F. H. Johnson, "Further Data on the Specificity of Aequorin Luminescence to Calcium," Biochem Biophys Res Commun 53.2 (1973).
- ²¹ O. Shimomura, F. H. Johnson and H. Morise, "Mechanism of the Luminescent Intramolecular Reaction of Aequorin," Biochemistry 13.16 (1974).
- ²² O. Shimomura and F. H. Johnson, "Regeneration of the Photoprotein Aequorin," Nature 256.5514 (1975).
- ²³ L. Deng, S. V. Markova, E. S. Vysotski, Z. J. Liu, J. Lee, J. Rose and B. C. Wang, "Crystal Structure of a Ca²⁺-Discharged Photoprotein: Implications for Mechanisms of the Calcium Trigger and Bioluminescence," J Biol Chem 279.32 (2004).
- ²⁴ L. Deng, E. S. Vysotski, S. V. Markova, Z. J. Liu, J. Lee, J. Rose and B. C. Wang, "All Three Ca²⁺-Binding Loops of Photoproteins Bind Calcium Ions: The Crystal Structures of Calcium-Loaded Apo-Aequorin and Apo-Obelin," Protein Sci 14.3 (2005).
- ²⁵ T. G. Hampton, E. G. Kranias and J. P. Morgan, "Simultaneous Measurement of Intracellular Calcium and Ventricular Function in the Phospholamban-Deficient Mouse Heart," Biochem Biophys Res Commun 226.3 (1996).
- ²⁶ R. Ventura-Clapier, H. Mekhfi and G. Vassort, "Role of Creatine Kinase in Force Development in Chemically Skinned Rat Cardiac Muscle," J Gen Physiol 89.5 (1987).
- ²⁷ K. W. Saupe, M. Spindler, R. Tian and J. S. Ingwall, "Impaired Cardiac Energetics in Mice Lacking Muscle-Specific Isoenzymes of Creatine Kinase," Circ Res 82.8 (1998).
- ²⁸ R. B. Jennings, C. Steenbergen, Jr. and K. A. Reimer, "Myocardial Ischemia and Reperfusion," Monogr Pathol 37 (1995).
- ²⁹ R. B. Jennings, H. M. Sommers, J. P. Kaltenbach and J. J. West, "Electrolyte

- Alterations in Acute Myocardial Ischemic Injury,” Circ Res 14 (1964).
- ³⁰ R. B. Jennings, H. M. Sommers, P. B. Herdson and J. P. Kaltentbach, “Ischemic Injury of Myocardium,” Ann N Y Acad Sci 156.1 (1969).
- ³¹ R. B. Jennings, J. Schaper, M. L. Hill, C. Steenbergen, Jr. and K. A. Reimer, “Effect of Reperfusion Late in the Phase of Reversible Ischemic Injury. Changes in Cell Volume, Electrolytes, Metabolites, and Ultrastructure,” Circ Res 56.2 (1985).
- ³² R. B. Jennings, K. A. Reimer, C. Steenbergen, Jr. and J. Schaper, “Total Ischemia Iii: Effect of Inhibition of Anaerobic Glycolysis,” J Mol Cell Cardiol 21 Suppl 1 (1989).
- ³³ R. B. Jennings, K. A. Reimer and C. Steenbergen, “Myocardial Ischemia Revisited. The Osmolar Load, Membrane Damage, and Reperfusion,” J Mol Cell Cardiol 18.8 (1986).
- ³⁴ R. B. Jennings and K. A. Reimer, “The Cell Biology of Acute Myocardial Ischemia,” Annu Rev Med 42 (1991).
- ³⁵ H. Strömer, M. C. de Groot, M. Horn, C. Faul, A. Leupold, J. P. Morgan, W. Scholz and S. Neubauer, “Na(+)/H(+) Exchange Inhibition with Hoe642 Improves Postischemic Recovery Due to Attenuation of Ca(2+) Overload and Prolonged Acidosis on Reperfusion,” Circulation 101.23 (2000).
- ³⁶ K. W. Saupe, M. Spindler, et al. (1998). “Impaired cardiac energetics in mice lacking muscle-specific isoenzymes of creatine kinase.” Circ Res 82(8): 898-907.
- ³⁷ R. Tian, “Thermodynamic Limitation for the Sarcoplasmic Reticulum Ca(2+)-Atpase Contributes to Impaired Contractile Reserve in Hearts,” Ann N Y Acad Sci 853 (1998).
- ³⁸ G. A. MacGowan, C. Du and A. P. Koretsky, “High Calcium and Dobutamine Positive Inotropy in the Perfused Mouse Heart: Myofilament Calcium Responsiveness, Energetic Economy, and Effects of Protein Kinase C Inhibition,” BMC Physiol 1 (2001).

- ³⁹ C. Steenbergen, E. Murphy, J. A. Watts and R. E. London, "Correlation between Cytosolic Free Calcium, Contracture, Atp, and Irreversible Ischemic Injury in Perfused Rat Heart," Circ Res 66.1 (1990).
- ⁴⁰ Y. Kihara, W. Grossman and J. P. Morgan, "Direct Measurement of Changes in Intracellular Calcium Transients During Hypoxia, Ischemia, and Reperfusion of the Intact Mammalian Heart," Circ Res 65.4 (1989).
- ⁴¹ D. J. Hearse, P. B. Garlick and S. M. Humphrey, "Ischemic Contracture of the Myocardium: Mechanisms and Prevention," Am J Cardiol 39.7 (1977).
- ⁴² C. Ventura, C. Ferroni, F. Flamigni, C. Stefanelli and M. C. Capogrossi, "Polyamine Effects on $[Ca^{2+}]_i$ Homeostasis and Contractility in Isolated Rat Ventricular Cardiomyocytes," Am J Physiol 267.2 Pt 2 (1994).
- ⁴³ R. Tian, M. E. Christe, M. Spindler, J. C. Hopkins, J. M. Halow, S. A. Camacho and J. S. Ingwall, "Role of Mgadp in the Development of Diastolic Dysfunction in the Intact Beating Rat Heart," J Clin Invest 99.4 (1997).
- ⁴⁴ F. R. Eberli, H. Stromer, M. A. Ferrell, N. Varma, J. P. Morgan, S. Neubauer and C. S. Apstein, "Lack of Direct Role for Calcium in Ischemic Diastolic Dysfunction in Isolated Hearts," Circulation 102.21 (2000).
- ⁴⁵ Y. Koretsune and E. Marban, "Mechanism of Ischemic Contracture in Ferret Hearts: Relative Roles of $[Ca^{2+}]_i$ Elevation and Atp Depletion," Am J Physiol 258.1 Pt 2 (1990).

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Spindler M., Meyer K., Strömer H., Leupold A., Böhm E., Wagner, H., Neubauer S. „Creatine kinase-deficient hearts exhibit increased susceptibility to ischemia-reperfusion injury and impaired calcium homeostasis“. Am J Physiol Heart Circ Physiol (2004).

8 DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Georg Ertl, in dessen Klinik und Forschungslabore die Untersuchungen durchgeführt werden konnten.

Die Arbeit wurde durch Mittel aus dem Sonderforschungsbereich SFB 355 „Pathophysiologie der Herzinsuffizienz“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft, eingeworben durch Privatdozent Dr. Matthias Spindler und Prof. Dr. Stefan Neubauer sowie durch einen Zuschuss der „Verum-Foundation for behavior and environment (Dr. Hinrik Strömer) als auch durch die „British Heart Foundation“ (Prof. Dr. S. Neubauer) unterstützt.

Danken möchte ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Neubauer und nach dessen Berufung an die University of Oxford, UK insbesondere Herrn Privatdozent Dr. Spindler für die Betreuung während meiner experimentellen Promotionsarbeit.

Ferner möchte ich ausdrücklich Frau Andrea Leupold, MTA für ihre weit reichende Unterstützung und große Erfahrung im Bereich der Aequorin-Biolumineszenz danken. Für die Koordination der biochemischen Analysen danke ich Frau Helga Wagner, MTA, sowie Charlotte Dienesch, MTA und Frau Lisa Bauer, MTA, die alle maßgeblich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hinrik Strömer, der mit seiner Arbeit und Entwicklung der Software die Voraussetzungen für die Datenerfassung und –auswertung insbesondere der Calciummessungen geschaffen hat.

Für die großzügige Bereitstellung der CK-defizienten Mäuse möchte ich Dank Herrn Prof. Dr. Bé Wieringa und Prof. Dr. Klaas Nicolay aussprechen, sowie Herrn Prof. Dr. Walter und dessen Arbeitsgruppe für deren Unterstützung.

Als Koreferent möchte ich Herrn Prof. Dr. Kai Schuh herzlichst für die Durchsicht meiner Arbeit danken.