

Aus dem Institut für Physiologie  
des Universitätsklinikums Charité  
Direktor Prof. Dr. med. P. B. Persson

*PDF-Version der Dissertation*



DISSERTATION

Thema:

„Charakterisierung der Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivität des sarkoplasmatischen  
Retikulums nach experimentellem Myokardinfarkt“

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Dominik Geil

geb. am 04.12.1969 in Lahnstein

Dekan: Prof. Dr. med. M. Dietel

Gutachter: 1) Prof. Dr. med. P.B. Persson

2) Prof. Dr. sc. med. C. Pfeiffer

3) Prof. Dr. rer. nat. E.-G. Krause

eingereicht: August 1997

Datum der Promotion: 03.06.1998

<b>1</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>2</b>
<b>3</b>	<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	<b>3</b>
<b>4</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
4.1	Herzinsuffizienz als eine Folge von koronarer Herzerkrankung und Myokardinfarkt beim Menschen	4
4.2	Pathophysiologie der Herzarbeit	5
4.3	Tiermodell zur Untersuchung chronischer Veränderungen nach Myokardinfarkt	6
4.4	Ca <sup>2+</sup> -Homöostase und Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums (SR)	8
4.5	Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz	11
4.6	Substratoxidation im Herzmuskel	14
4.7	Fettsäureoxidation in der Herzmuskelzelle	14
4.8	Der Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1-Hemmstoff Etomoxir	17
4.9	Aufgabenstellung	19
<b>5</b>	<b>UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODIK</b>	<b>21</b>
5.1	Verwendete Chemikalien	21
5.2	Durchführung des experimentellen Infarktes	22
5.3	Behandlungsmuster und Messung der Hämodynamik	22
5.4	Präparieren der Homogenate	23
5.5	Proteinbestimmung	24
5.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Elektrotransfer	24
5.7	Quantitativer immunchemischer SERCA2a-Nachweis	25

5.8	Oxalat-stimulierte Ca <sup>2+</sup> -Aufnahme in Membranvesikel des sarkoplasmatischen Retikulums	28
5.9	Statistik	30
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>31</b>
6.1	Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere	31
6.2	Hämodynamik- und Frequenzmessung	33
6.3	Relaxationsverhalten von Papillarmuskelpräparaten nach Myokardinfarkt	36
6.4	Beziehung zwischen Infarktgröße und Hypertrophiegrad	37
6.5	Ca <sup>2+</sup> -Transport in Membranvesikel des sarkoplasmatischen Retikulums	39
6.5.1	Transportaktivität der SERCA2a in Herzmuskelhomogenaten	39
6.5.2	Beziehung zwischen Infarktgröße und Ca <sup>2+</sup> -Transport in das sarkoplasmatische Retikulum	45
6.6	Western-Blot Analyse der SERCA2a	46
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>49</b>
7.1	Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere	49
7.2	Hämodynamik- und Frequenzmessung	52
7.3	Beziehung zwischen Infarktgröße und Hypertrophie	55
7.4	Ca <sup>2+</sup> -Transport in das sarkoplasmatische Retikulum und Western-Blot Analyse	56
<b>8</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>60</b>
<b>9</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>61</b>

## 1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ANOVA	<i>Analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Ca/CAM-PK	Calzium/Calmodulin-Proteinkinase
$[Ca^{2+}]_i$	intrazelluläre $Ca^{2+}$ -Konzentration
CPT	Carnitin-Palmitoyl-Transferase
$+dP/dt_{max}$	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit
$-dP/dt_{min}$	maximale Druckabfallgeschwindigkeit
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
EKG	Elektrokardiogramm
FS	Fettsäuren
HF	Herzfrequenz
KG	Körpergewicht
KH	Kohlenhydrate
kDa	Kilo-Dalton
LV	linker Ventrikel, respektive linksventrikulär
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
MI	Myokardinfarkt
mRNA	„messanger“-Ribonukleinsäure
NC	Nitrozellulose
NCX	$Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher
OD	optische Dichte
PKA	Proteinkinase A
PKI	inhibitorisches Peptid der Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PMCA	Plasmamembran $Ca^{2+}$ -ATPase
PMSF	Phenylmethylsulfonylfleurid
POD	Peroxidase
r	Korrelationskoeffizient
RT	Relaxationszeit
RV	rechter Ventrikel, respektive rechtsventrikulär
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SERCA	Sarko(endo)plamatische Retikulum $Ca^{2+}$ -ATPase
SO	scheinoperiert
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SV	Schlagvolumen
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TBST	<i>tris bufferd saline</i> + Tween-20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TDGA	Tetradecylglyzidat
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
vs.	versus

---

## 2 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schema der $\text{Ca}^{2+}$ -Bewegungen in einer Herzmuskelzelle.....	9
Abb. 2: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Sekundärstruktur der SR $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.....	11
Abb. 3: Schema der Wechselwirkung zwischen Fettsäure- und Glukoseoxidation im Myokard.....	16
Abb. 4: Strukturformel von Etomoxir.....	17
Abb. 5: Prinzip der Chemoluminiszenz .....	27
Abb. 6: Schema zur Oxalat-stimulierten Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in Membranvesikel des SR.....	28
Abb. 7: Versuchsaufbau zur Messung der Oxalat-stimulierten $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme.....	29
Abb. 8: Veränderte linksventrikuläre hämodynamische Parameter sechs Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt .....	35
Abb. 9: Beziehung zwischen Infarktgröße und relativem linksventrikulärem Gewicht.....	38
Abb. 10: Korrelation zwischen Größe des linksventrikulären Infarkts und relativem rechtsventrikulärem Gewicht .....	39
Abb. 11: Zeitabhängigkeit des Oxalat-stimulierten SR $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes .....	40
Abb. 12: SR $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität unter Kontrollbedingungen sowie in Gegenwart von 10 $\mu\text{M}$ Peptidinhibitor (PKI) der Proteinkinase A und 2 $\mu\text{M}$ katalytischer Untereinheit der Proteinkinase A (PKA).....	42
Abb. 13: Stimulierung des SR $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes durch Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban.....	43
Abb. 14: Einzelwertdarstellung der Oxalat-stimulierten SR $\text{Ca}^{2+}$ -Transport- geschwindigkeit.....	44
Abb. 15: Korrelation zwischen Infarktgröße und Oxalat-stimuliertem SR $\text{Ca}^{2+}$ -Transport.....	46
Abb. 16: Western-Blot Analyse der SERCA2a in Homogenaten .....	47

---

### 3 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Hemmstoffe der mitochondrialen Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1.....	17
Tab. 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Wirkstoffe .....	21
Tab. 3: Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere.....	32
Tab. 4: Darstellung von Herzfrequenz (HF) und aortalem Blutfluß (AF).....	33
Tab. 5: Relaxationsparameter von linksventrikulären Papillarmuskelpräparaten chronisch infarzierter Ratten .....	37

## 4 EINLEITUNG

### 4.1 Herzinsuffizienz als eine Folge von koronarer Herzerkrankung und Myokardinfarkt beim Menschen

Nach wie vor stehen Herz-Kreislauf Erkrankungen in den westlichen Industrieländern als Todesursachen an erster Stelle (87). Einen nicht unerheblichen Anteil daran stellen Patienten mit der Diagnose Herzinsuffizienz. Unter Herzinsuffizienz versteht man laut Pschyrembel (76) eine „...unzureichende Funktion des Herzens. Das Herz ist nicht imstande, eine den Anforderungen entsprechende Förderleistung zu erbringen.“ Anders ausgedrückt handelt es sich um ein klinisches Bild, bei dem das venöse Blutangebot nicht ausreichend bis in die Peripherie gepumpt werden kann (18). Die häufigste Ursache für die Herzinsuffizienz ist heutzutage die koronare Herzerkrankung und hier insbesondere der Myokardinfarkt (25). An zweiter Stelle folgt die dilatative Kardiomyopathie (41). Erst danach kommen Hypertonie, Vitien und Myokarditis als Primärkrankheit in Betracht (71). Seltener führen auch verschiedene extrakardiale Ursachen zur Herzinsuffizienz. Ein verminderter O<sub>2</sub>-Transport bei Anämie ist z.B. als Grund bekannt. Die Koronarinsuffizienz kann vor allem durch Minderperfusion des Myokards zur Kontraktionsschwäche führen, während der Herzinfarkt direkt vitales Gewebe unwiederbringlich zerstört. Das überlebende Myokard muß das verlorene Gewebe funktionell ersetzen. Gerade bei größeren Infarkten geschieht dies unzureichend, so daß die Entwicklung einer Herzschwäche begünstigt wird. Meist geht der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, aufgrund einer koronaren Herzerkrankung, eine Latenzzeit von mehreren Monaten bis Jahren voraus.

Die Herzinsuffizienz tritt vor allem im höheren Lebensalter auf. Die Inzidenz beträgt 3/1000/Jahr bei 35-64jährigen und 10/1000/Jahr in der Altersgruppe von 65-94 Jahren. Die Mortalität steigt bei 75jährigen fast um den Faktor 200 gegenüber der Altersgruppe zwischen 35 und 44 Jahren (31). Die Mortalitätsrate ist zwischen 1970 und 1983 annähernd konstant geblieben und beträgt bei Männern 8/10<sup>6</sup> und bei Frauen 5/10<sup>6</sup> pro Jahr, wie Untersuchungen in den USA ergaben (31). Für die Bundesrepublik sind gleiche Zahlen anzunehmen (71). Mehr als 50% der Patienten versterben in den ersten fünf Jahren nach Diagnosestellung (25); (44). Nach der *New York Heart Association* (NYHA) wird die Herzinsuffizienz in vier Schweregrade eingeteilt (NYHA I-IV). Patienten, die zur Klasse I und II gezählt werden, klagen über nur geringe Belastungsintoleranz. Diese nimmt bis zum Stadium IV zu, wobei hier Beschwerden

schon in Ruhe auftreten. Die Prognose für Erkrankte mit NYHA III bzw. IV ist durch das Auftreten einer Vielzahl von Komplikationen (Rhythmusstörungen, Lungenödem, kardiogener Schock, Thrombosen) schlecht. Welche pathophysiologischen Mechanismen für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz verantwortlich sind, werden im nun folgenden Kapitel dargestellt.

## 4.2 Pathophysiologie der Herzarbeit

Die Pumpleistung des Herzens ist im wesentlichen von drei Faktoren abhängig:

1. Inotropie: Darunter wird die Kraft und Geschwindigkeit der Muskelfaserverkürzung des Herzens verstanden. Ein geeigneter klinisch meßbarer Parameter zur Bestimmung der Kontraktilität ist die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{max}$ ). Die maximale Druckabfallgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{min}$ ) charakterisiert die Lusitropie des Myokards. Eine adäquate und vollständige Relaxation des Herzens ist nötig, um eine ausreichende diastolische Füllung der Herzkammern und eine effiziente Koronardurchblutung zu ermöglichen.

Die Kontraktionskraft kann durch den Frank-Starling-Mechanismus gesteigert werden, indem die Kammer durch zunehmende Vorlast (Preload), also ein gesteigertes enddiastolisches Ventrikelvolumen vorgedehnt wird. Dadurch nimmt das Schlagvolumen zu. Sowohl inotroper Zustand als auch Frank-Starling-Mechanismus sind die entscheidenden Determinanten für die Größe des Schlagvolumens (SV).

2. Die Größe des SV hängt außerdem von der sogenannten Nachlast (Afterload) ab. Sie repräsentiert die maximale systolische Wandspannung des Ventrikels und ist vom Auswurfwiderstand abhängig. Die Nachlast wird im wesentlichen vom arteriellen Blutdruck bestimmt. Der Systemdruck wiederum wird u.a. vom peripheren Widerstand beeinflusst.
3. Das Herzzeitvolumen ist das Produkt aus SV und Herzfrequenz (HF). Deshalb kann der chronotrope Zustand des Myokards ganz entscheidend zur Pumpleistung des Herzens beitragen.

Bei der Herzinsuffizienz vermindert sich die Zahl der funktionsfähigen Herzmuskelzellen (7). Die Kontraktilität der verbliebenen Kardiomyozyten sinkt und dadurch fällt das maximal erreichbare Herzminutenvolumen ab. Ein erforderliches SV läßt sich nur noch mit einer Erhöhung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) erreichen. Aufgrund der hohen Plastizität des Myokards entwickelt sich zuerst eine kompensatorische myokardiale

Hypertrophie, welche die zuvor erhöhte Wandspannung wieder in den Normbereich zurückführen kann (10). Auf molekularer Ebene kommt es dabei zu einer Aktivierung von verschiedenen Genen und einem veränderten molekularen Phänotyp der hypertrophen Kardiomyozyten (14).

Ein anderer Kompensationsmechanismus wird über eine verstärkte  $\beta$ -adrenerge Stimulation erreicht. Die Folge sind eine Zunahme von Inotropie, Chronotropie und Lusitropie (51). Neben der direkten Kurzzeitwirkung der Katecholamine bei gesteigertem sympathischen Tonus, sind diese Substanzen wichtige Mediatoren des hypertrophen Wachstums (86). Bei anhaltender Sympathikusaktivierung über die physiologische Ebene hinaus, erfolgt eine Desensibilisierung (Downregulation) von  $\beta$ -Rezeptoren am Herzen (24). Gleichzeitig steigert die Katecholaminausschüttung den Arteriolentonus, in dessen Folge eine Erhöhung der Nachlast auftritt. Reichen die Möglichkeiten des Organismus nicht aus, eine suffiziente Anpassung zu erreichen, kommt es zum Herzversagen.

### **4.3 Tiermodell zur Untersuchung chronischer Veränderungen nach Myokardinfarkt**

Tiermodelle sind zur Untersuchung von physiologischen und pathologischen Veränderungen geeignet, die im Rahmen verschiedenster Erkrankungen auftreten können. In der Regel verbieten ethisch-moralische Gründe solche Studien am Menschen durchzuführen. Darüber hinaus bietet das Tiermodell durch eine ausgeprägte Homogenität eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse. Die Labormaus ist das kreislaufphysiologisch am besten charakterisierte Versuchstier. Sie wurde bereits mehrfach als geeignetes Modell für die Entwicklung einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt (MI) untersucht (72); (16); (53); (104); (4); (5); (80). Durch Unterbindung der linken Herzkranzarterie entsteht ein akuter MI. In der Regel kommt es zur Induktion transmuraler Infarkte. Die Letalität bei diesen Versuchen beträgt je nach Verfahren bis zu 50%. Das infarzierte linksventrikuläre Gewebe wird innerhalb weniger Wochen über eine Koagulationsnekrose in Narbengewebe umgewandelt. Um aber ein bestimmtes Herzminutenvolumen aufrechtzuerhalten, muß sich das überlebende Restgewebe an den funktionellen Wegfall der vernarbten Region anpassen. Das betrifft nicht nur die Herzmuskelzellen, sondern in gleicher Weise das Nicht-Myozytenkompartiment. Dazu gehören Blut- und Lymphgefäße, die amorphe Interzellulärsubstanz, Fibroblasten, Makrophagen, Leukozyten, Kollagen und andere extrazelluläre Matrixproteine (11). Dieser Prozeß wird als

„Remodeling“ (Umbau) bezeichnet. Die Aktivierung verschiedenster Wachstumsfaktoren endokriner, parakriner oder neurohormonaler Art erzeugt eine veränderte Genexpression und Proteinsynthese. Dadurch entwickelt sich eine zelluläre Hypertrophie der Kardiomyozyten und Proliferation anderer Zellen. Wesentlich beteiligt sind das Renin-Angiotensin-System (99), Katecholamine und eine Vielzahl anderer Wachstumsfaktoren. Dazu gehören das Wachstumshormon (GH) und der IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor-1*), deren hypertrophe Wirkungen *in vitro* nachgewiesen werden konnten (21). Eine Vielzahl von anderen vermuteten Stimuli und die zugrunde liegenden Wirkmechanismen sind bei weitem noch nicht aufgeklärt. Interessant ist, daß sich während des „Remodeling“ der Gehalt sowohl an kollagenen, als auch an nicht-kollagenen Proteinen im überlebenden Myokard signifikant erhöht (72). Bei der Ratte kommt es zu einer typischen Verschiebung des Isomyosinmusters von V<sub>1</sub> mit hoher ATPase-Aktivität nach V<sub>3</sub> mit niedriger ATPase-Aktivität. Ursache ist eine verstärkte Expression des schweren Myosinketten (MHC)- $\beta$ -Gens, während die Expression des  $\alpha$ -MHC-Gens vermindert ist (61). Für das menschliche Herzen ist diese Verschiebung irrelevant, da ausschließlich  $\beta$ -MHC exprimiert wird (82). Proteine des Energiestoffwechsels und der kardialen Ca<sup>2+</sup>-Regulation sind ebenfalls betroffen (siehe Kap. 4.5).

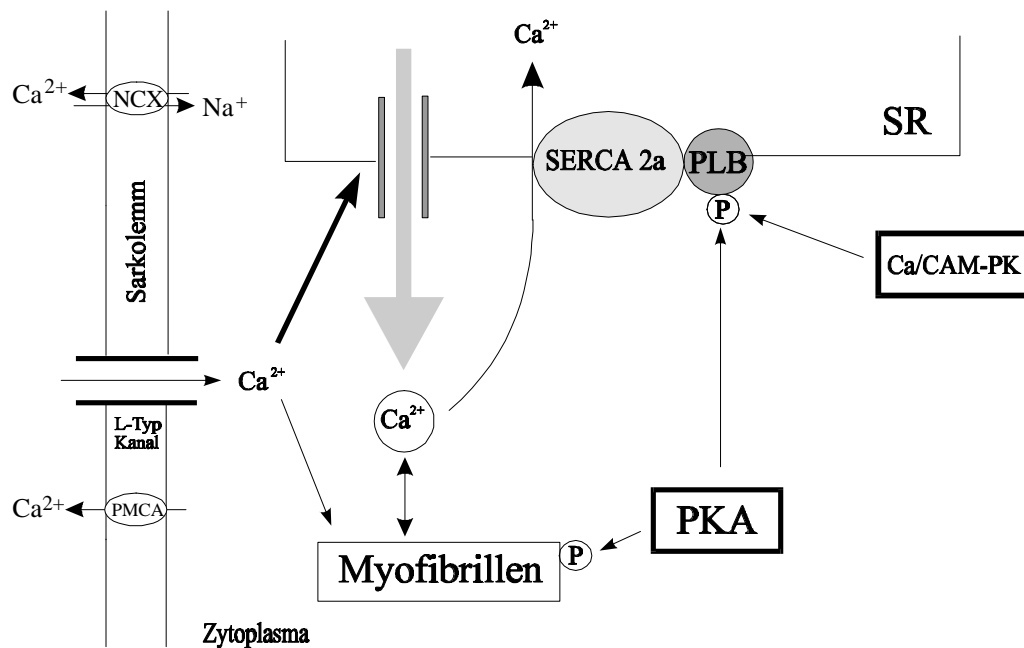
Bei ausgedehnten Infarkten kann sich das Volumen der überlebenden Myozyten nahezu verdoppeln (104). Ein wesentlicher Einflußfaktor für die Entwicklung einer Hypertrophie des Herzens ist die Größe des infarzierten Gewebes (29) und damit der Verlust funktionellen Myokards. Untersuchungen haben ergeben, daß es bei Infarktarealen um 20% zu sehr gering ausgeprägter Hypertrophie kommt (80). Mit zunehmender Infarktgröße nimmt das Ausmaß der Hypertrophie zu. Ein Maß hierfür ist das absolute und relative links- und rechtsventrikuläre Herzgewicht (relatives Herzgewicht ist gleich dem Quotienten aus Herzgewicht und Körpergewicht). Anversa und Mitarbeiter zeigten, daß es sich bei der Hypertrophie nach MI um die Kombination aus konzentrischem und exzentrischem Wachstum des Herzens handelt (6). Die Hypertrophie erfaßt nicht nur das überlebende Gewebe des linken Ventrikel, sondern in gleicher Weise auch die rechte Herzkammer (94), was dafür spricht, daß neben mechanischen Einflüssen auch die Stimulation durch zirkulierende Wachstumsfaktoren eine entscheidende Rolle spielt. Infolge der rechtsventrikulären Hypertrophie erzeugt die Muskulatur einen höheren Druck in der rechten Herzkammer. Es kann zur Ausbildung einer pulmonalen Hypertonie kommen (74).

Bei ausgedehnten Infarkten des Gewebes kann eine inadäquate Hypertrophie des Myokards entstehen, gefolgt von einem Anstieg der diastolischen Wandspannung. Bei der nachfolgenden

progressiven linksventrikulären Dilatation (68); (75) ist der Ventrikel nicht länger in der Lage, das ihm angebotene Blut in ausreichendem Maße auszuwerfen. Rückstau in das venöse System und unzureichende Versorgung der Peripherie schließen sich an. Es entwickelt sich das klinische Bild einer Herzinsuffizienz. Interventionen zur Induktion eines adäquaten „Remodeling“ nach Myokardinfarkt sollten deshalb ein geeigneter Ansatz sein, um der Entwicklung einer Herzinsuffizienz entgegenzuwirken. Dies ist u.a. über einen Eingriff in Stoffwechselforgänge möglich. Eine interessante neue Intervention sind pharmakologische Eingriffe in die Substratoxidation von Fettsäuren (FS) und Glukose, die über hypothetische „metabolische Signale“ das „Remodeling“ des Herzmuskels günstig zu beeinflussen scheinen (siehe Kap. 4.7). Das in vorliegender Studie zum Einsatz gekommene Etomoxir (siehe Kap. 4.8) hemmt die Carnitin-Palmitoyltransferase-1 (CPT-1). Dieses Enzym ist an der Mitochondrienmembran lokalisiert und katalysiert die Aufnahme langkettiger Fettsäuren in die Mitochondrien, wo sie zur Energiegewinnung herangezogen werden.

#### **4.4 $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums (SR)**

Der Herzmuskel besteht aus einem Verbund einer Vielzahl von einzelnen Myozyten, die ein funktionelles Synzytium bilden. Im normalen Herzzyklus werden im Sinusknoten Aktionspotentiale (AP) generiert und auf alle Muskelzellen übergeleitet. Als Folge der Erregung kommt es unter anderem zu einer Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen im Sarkolemm, was den Einstrom dieses Ions in das Zytoplasma der Zelle ermöglicht (Abb. 1). Daneben existieren in viel geringerer Anzahl sog. T-Typ Kanäle, die sich elektrophysiologisch und pharmakologisch von den L-Typ Kanälen unterscheiden (35). Der überwiegende Teil des einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$  gelangt über den L-Typ Kanal in die Zelle. Hier triggern die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR), einer Zellorganelle von zentraler Bedeutung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in der Herzmuskelzelle (26). Strukturell besteht das SR aus drei unterschiedlichen Komponenten: (1) dem longitudinalen Anteil, der von einem Tubulus-Netzwerk gebildet wird und die Myofibrillen umgibt; (2) dem transversalen SR, aufgebaut aus Zisternen, die an die T-Tubuli gekoppelt sind und sogenannte Diaden bzw. Triaden bilden; (3) einem speziellen nicht-junktionalen SR, das die Verlängerung des longitudinalen SR ohne Verbindung zum Sarkolemm oder den T-Tubuli darstellt (42).



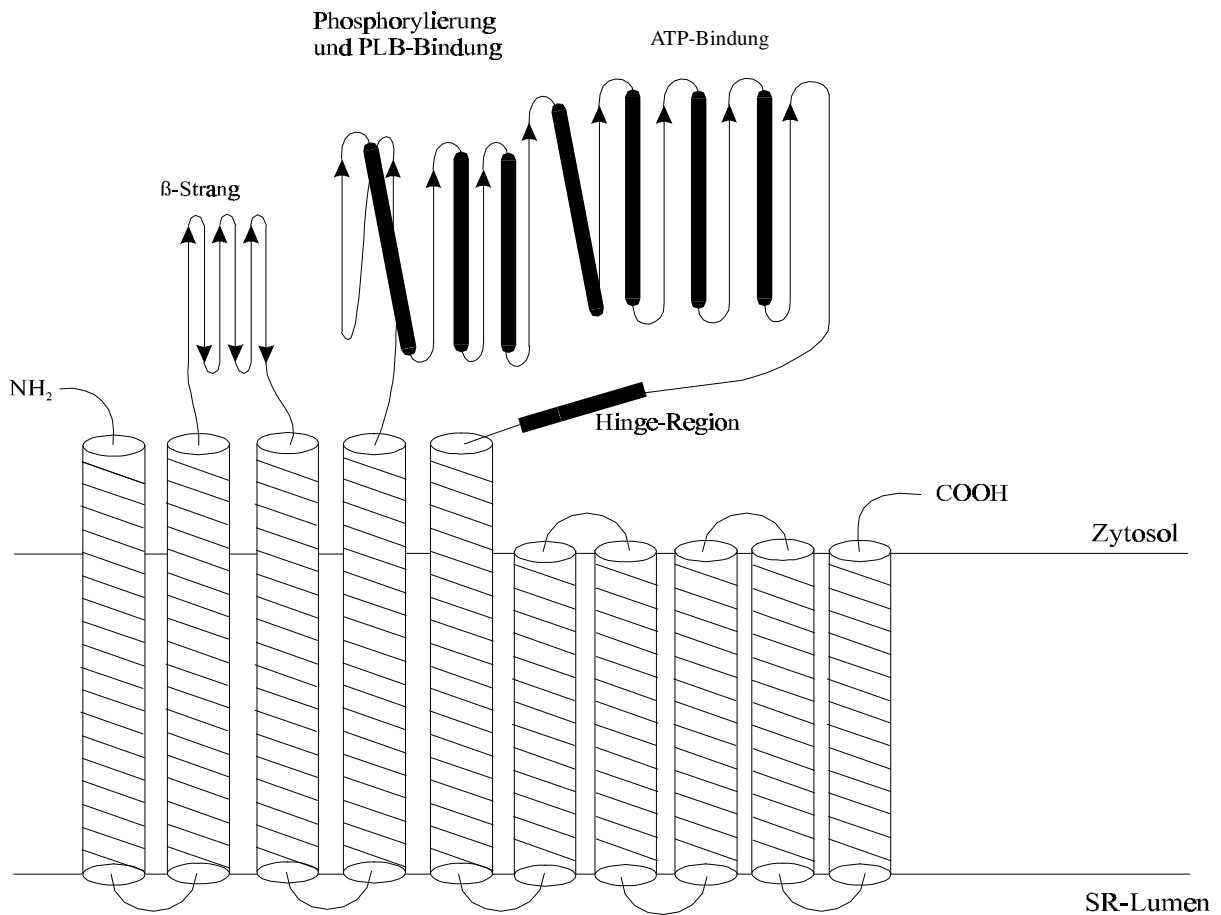
**Abb. 1: Schema der Ca<sup>2+</sup>-Bewegungen in einer Herzmuskelzelle**

PKA, cAMP-abhängige Proteinkinase; Ca<sup>2+</sup>/CAM-PK, Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin abhängige Proteinkinase; SR, sarkoplasmatisches Retikulum; SERCA2a, sarko(endo)plasmatische Retikulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase Isoform 2a; PLB, Phospholamban; P, Phosphorylierung; NCX, sarkolemmaler Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher; PMCA, Plasmamembran Ca<sup>2+</sup>-ATPase

Durch die Ca<sup>2+</sup>-getriggerte Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem SR steigt die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in kürzester Zeit um ca. zwei Zehnerpotenzen an. Ca<sup>2+</sup>-Ionen ändern die Konformation des Troponinmoleküls, wodurch Bindungsplätze für Myosin am Aktin freierwerden und sich die beiden kontraktilen Proteine miteinander vernetzen können (Myofibrillen, Abb. 1). Dies führt letztendlich zur Verkürzung und Kraftentwicklung jeder einzelnen Herzmuskelzelle und im Verband zur Kontraktion des Herzmuskels und zum Auswurf des Schlagvolumens. Um eine adäquate diastolische Füllung der Ventrikel zu ermöglichen, muß das Kammermyokard erschlaffen. Auf molekularer Ebene ist dafür die Inaktivierung der Aktin-Myosin Interaktion erforderlich. Diese setzt ein, wenn der Ca<sup>2+</sup>-Troponinkomplex infolge einer gesunkenen intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> dissoziiert. Für eine schnelle [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>-Senkung ist insbesondere die schnelle Rückbindung des zytosolischen Ca<sup>2+</sup> in das Lumen des SR verantwortlich. Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten von Kaninchen und Ratte haben

gezeigt, daß 80-90 % des  $\text{Ca}^{2+}$  auf diesem Wege aus dem Zytoplasma entfernt werden (8). Der verbleibende Anteil wird zum einen von dem sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauscher (NCX) zum anderen von der Plasmamembran  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) aus der Zelle gepumpt. Für die langfristige Pufferung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sind außerdem  $\text{Ca}^{2+}$ -Bewegungen in die Mitochondrien von Bedeutung (12).

Der Transport in das SR erfolgt unter Katalyse einer membranständigen  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase (34); (22). Sie wird auch als sarko(endo)plasmatische **Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ ATPase** (SERCA) bezeichnet. Unterschieden werden fünf Isoformen, kodiert von drei verschiedenen Genen. Das SERCA1- und SERCA2-Gen kodieren jeweils für zwei alternativ gespleißte Transkripte. Der Untertyp 2a ist derjenige, welcher im Herzen, sowie im undifferenzierten weißen und im roten Skelettmuskel exprimiert wird (3). Das Molekulargewicht dieses großen Polypeptids beträgt 110 kDa und repräsentiert über 40 % des Totalproteins im kardialen SR (89). Durch ATP-Hydrolyse wird der Konformationszustand des Transporters verändert und jeweils zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen von der zytosolischen Seite mit hoher Affinität zu der SR-luminalen Seite mit niedriger Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$  transportiert (Übersichtsarbeit in (39)). SERCA2a ist vor allem im SR-Netzwerk rund um die Myofibrillen lokalisiert, weniger dagegen im transversalen Anteil. Nach Hydropathieanalyse besteht die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aus zehn transmembranären Helices und mehreren extramembranären Schleifen (59); (9) (Abb. 2). Ein „Scharnier“ (Hinge-Region) ermöglicht die freie Beweglichkeit der extramembranären Schleifen. An der zytosolischen Seite sind Domänen für die  $\text{Ca}^{2+}$ - und ATP-Bindung, für Phosphorylierung und Wechselwirkung mit dem Modulatorprotein Phospholamban (PLB) ausgebildet (59). Letzteres ist in der longitudinalen SR-Membran lokalisiert und hat im unphosphorylierten Zustand einen inhibitorischen Einfluß auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (36). Erst durch Phosphorylierung von Phospholamban wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der SERCA2a erhöht, und damit die Transportrate für  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR gesteigert (90). Die Phosphorylierung erfolgt durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA), die funktionell am bedeutendsten ist. Das Protein kann auch über die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase (Ca/CAM-PK) (Abb. 1) und in geringem Maße durch Proteinkinase C, sowie einer cGMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden (77); (48); (88); (45). Die Phosphorylierung des 52 Aminosäuren-Proteins erfolgt an zwei Aminosäureresten. Serin-16 wird durch cAMP-abhängige Proteinkinase und Threonin an Position 17 durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Kinase phosphoryliert (85).



**Abb. 2: Schematische Darstellung der vorgeschlagenen Sekundärstruktur der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase**

Erläuterungen siehe Text. Modifiziert entnommen aus (59)

#### **4.5 Funktion des sarkoplasmatischen Retikulums bei Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz**

Durch eine kompensatorische Hypertrophie des überlebenden Myokards nach Infarkt kann vorübergehend die Kontraktilität und damit die Auswurfleistung des Herzens verbessert werden. Letztlich führt das ventrikuläre „Remodeling“ jedoch bei großem Gewebeverlust zu einer vorwiegend exzentrischen Massenzunahme (Volumenbelastung), zur Dilatation der Kammer und zum Linksherzversagen (51). Erschwerend kommt hinzu, daß insuffiziente Herzen einem verstärkten Sympathikotonus ausgesetzt sind. Dies führt zu erhöhter Herzfrequenz und damit zu einer Abnahme sowohl der Systolen- als auch Diastolendauer, was sich negativ auf eine ökonomische Arbeit des Herzens auswirkt. Darüber hinaus steigt der  $\text{O}_2$ -

Verbrauch bei zunehmender Frequenz an, so daß die Minderversorgung von ischämisch vorgeschädigten Arealen zusätzlich verschlechtert wird.

Verschiedene Veränderungen auf molekularer Ebene, wie Störungen des kontraktilen Apparats, Beeinträchtigungen der Mitochondrien und des Energiestoffwechsels, werden durch Aktivierung von Wachstumsfaktoren ausgelöst. Ein wichtiges Kennzeichen ist dabei eine gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase der Myozyten. Sie ist in entscheidendem Maße für diastolische und systolische Funktionsstörungen in hypertrophierten und insuffizienten Herzen verantwortlich (13); (63). Es lassen sich erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel bei experimenteller Überlasthypertrophie und an insuffizienten Herzen nachweisen. Die rhythmischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, also die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im zeitlichen Verlauf betrachtet, sind verlängert (33); (32); (73). Ein diastolisch erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel bedeutet, daß sich das Myokard nicht adäquat relaxieren kann, die Füllung der Ventrikel demnach verzögert abläuft und zusätzlich die Perfusion des Myokards erschwert ist. Verantwortlich für die gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Diastole ist eine verminderte Rückbindung von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR; die unzureichende Transportleistung der SERCA2a spielt dabei eine zentrale Rolle. Die Folge davon ist ein verringerter  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt im SR. Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aber für die Aktivierung des kontraktilen Apparats unerlässlich sind, erklärt sich, warum zusätzlich zu diastolischen auch systolische Funktionsstörungen auftreten können. Wie Untersuchungen an drucküberlasteten hypertrophierten Herzen zeigten, wird die SERCA2a gemessen an den Erfordernissen nicht ausreichend exprimiert. Drucküberlast und anschließende Hypertrophie wurde durch Aorten- bzw. Pulmonalarterienligatur induziert. Es liegt also keine Schädigung des Transportmoleküls vor, vielmehr ist die Konzentration von  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Molekülen an der SR-Membran verringert. Der Mechanismus, der zu verminderter SERCA2a-Expression führt, ist vermutlich mit einer verminderten Aktivierung des Gens verbunden, welches für die SERCA2a kodiert. Dies läßt sich anhand verminderter mRNA-Spiegel postulieren (15); (65). Feldman und Mitarbeiter nehmen an, daß der Abfall des  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-mRNA-Spiegels ein Marker für den Übergang von kompensierter Hypertrophie zur Insuffizienz darstellt. Diese Vermutung stützt sich auf Befunde, bei denen lediglich bei Tieren mit Zeichen einer Dekompensation der mRNA-Spiegel verringert war (27). Neben der SERCA2a ist im Modell der drucküberlasteten Herzen auch Phospholamban (65) und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle am SR (66) vermindert. Letztere Befunde im Zusammenhang mit verminderten SERCA2a-mRNA-Spiegeln gesehen, lassen an einen relativen Verlust von SR-Membranen in hypertrophierten Herzen denken (54).

Erste Befunde zu Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion des SR bei experimenteller Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt kommen aus dem Labor von Naranjan S. Dhalla (2). Die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion in rechts- und linksventrikulären Membranpräparationen von Ratten vier, acht und sechzehn Wochen nach Infarkt war im linken Ventrikel zu allen Zeitpunkten signifikant vermindert. Das SR der rechten Herzkammer zeigte dagegen eine Steigerung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei den Tieren vier und acht Wochen nach Infarkt und einen Abfall der Transportfunktion nach sechzehn Wochen auf Kontrollwerte. Diese Befunde lassen vermuten, daß der linke Ventrikel in einem insuffizienten Stadium, der rechte Ventrikel zumindest zu diesem Zeitpunkt noch kompensiert ist. Gestützt wurden die Befunde von einer anderen Untersuchung, in welcher parallel der linksventrikuläre SERCA2a-mRNA- und Proteinspiegel quantifiziert wurden. Vermindert  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Protein korrelierte mit abgesunkenen mRNA-Werten (102).

Im gleichen Tiermodell ist ein deutlicher Abfall der sarkolemmalen NCX-Aktivität nachgewiesen worden (20). Im gesunden Herzen ist dieser Kationen-Transporter entscheidend für den diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Auswärtstransport. Offensichtlich gehört die veränderte Expression verschiedener Gene der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation zum Phänotyp des hypertrophierten Myokards nach überlebtem Myokardinfarkt. Somit wird verständlich, daß eine Verminderung der NCX-Aktivität an einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase und an systolischen und diastolischen Funktionsstörungen beteiligt ist.

Vergleichbare Ergebnisse ließen sich auch beim menschlichen Herzen feststellen. Einschränkend muß allerdings gesagt werden, daß Befunde am Humanmyokard größeren individuellen Schwankungen unterworfen sind. Die Patienten haben häufig koexistente Stimuli für die Entwicklung einer Herzhypertrophie, wie z.B. arteriellen Hypertonus oder Klappendysfunktionen (80). Außerdem gelangen fast nur Herzproben von terminal insuffizienten Patienten (NYHA IV) zur Untersuchung, die zusätzlich mit verschiedensten herzwirksamen Medikamenten therapiert worden sind. Im Vergleich von insuffizienten Herzen bei ischämischer Kardiomyopathie und nicht-insuffizienten Herzen ergab sich allgemein ein erniedrigter Spiegel der SERCA2a-mRNA (83); (33); (92); (62). Dagegen waren die Ergebnisse bei der Untersuchung der SERCA2a Proteinspiegel nicht eindeutig.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß es durch die Induktion eines Myokardinfarktes im Tiermodell zuerst zu einer kompensatorischen Hypertrophie des überlebenden Myokards kommt, die mit veränderter Expression und Funktion von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteinen einhergeht.

---

Ein Abfall der SERCA2a Expression ist vermutlich Folge einer verminderten Aktivierung des SERCA2a-Gens. Im Gegensatz dazu ist die Expression einer großen Anzahl anderer Gene unter dem Einfluß verschiedener Wachstumsfaktoren gesteigert. Qualitativ zeichnet sich diese durch die Reexpression von fötalen Genprogrammen aus, quantitativ als Zunahme der linken und rechten Ventrikelmasse (95). Warum unter diesen Bedingungen eine Aktivierung der Expression des SERCA2a-Gens ausbleibt, und welche möglichen Faktoren daran beteiligt sind, ist nach wie vor nicht geklärt. Sicher ist aber, daß es zu keiner Expression anderer SERCA-Isoformen kommt (65).

#### **4.6 Substratoxidation im Herzmuskel**

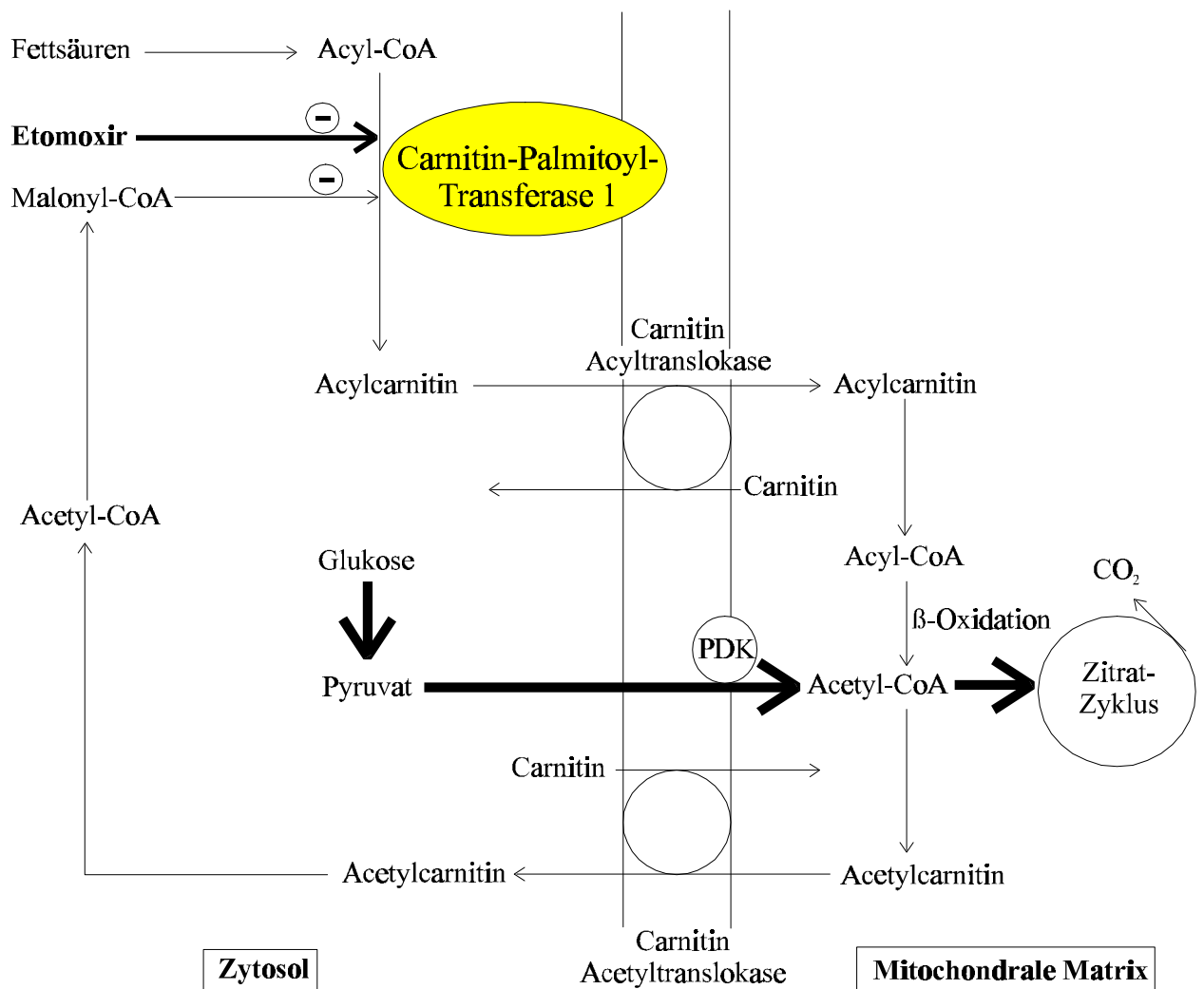
Der Herzmuskel kann sowohl freie Fettsäuren als auch Kohlenhydrate (KH) zur Energiegewinnung oxidieren. Von Fisher und Williamson wurde 1961 ein wichtiges generelles Prinzip entdeckt: Bei adäquater Koronarperfusion mit ausreichender Sauerstoff- und Substratversorgung konkurrieren die verschiedenen Substrate um O<sub>2</sub> (28). Randle und Mitarbeiter konnten 1963 nachweisen, daß die FS-Oxidation durch Glukoseangebot im Koronarperfusat zu Gunsten der Glukose-Oxidation vermindert wird (sog. Glukose-Fettsäure-Zyklus oder Randle-Zyklus) (78). Umgekehrt gelang es Taegtmeyer und Mitarbeitern 1980 nachzuweisen, daß die Glukoseoxidation im Myokard durch das Angebot freier Fettsäuren reduziert werden kann (91). Das gesunde Herz oxidiert vor allem FS, während die Glykolyse durch anfallendes ATP und Ziträt gehemmt wird. Im Falle einer milden Ischämie des Myokards resultiert eine Stimulierung der Glykolyse, die auf dem anaeroben Stoffwechselweg zur Synthese von Laktat führt (Pasteur-Effekt). Bei schweren Ischämien dagegen wird die Glykolyse durch einen stark angestiegenen Laktatspiegel und niedrigen pH-Wert gehemmt. Dadurch wird die Kapazität des Gewebes zum Überleben des ischämischen Insults limitiert (70).

#### **4.7 Fettsäureoxidation in der Herzmuskelzelle**

Fettsäuren (es dominieren Öl- und Palmitinsäure) sind der wesentliche Energielieferant in der Herzmuskelzelle. Sie werden in die Mitochondrien transportiert und nach der  $\beta$ -Oxidation dem Zitratzyklus zugeführt. Jeder Zyklus der  $\beta$ -Oxidation schließt mit der Verkürzung der Fettsäure um zwei Kohlenstoffatome und der Bildung von NADH und FADH<sub>2</sub> ab. Im Zitratzyklus entstehen dann pro Mol aktivierter Essigsäure 12 Mol ATP, 2 Mol CO<sub>2</sub>, 3 Mol

---

NADH und 1 Mol FADH<sub>2</sub>. Die Abb. 3 zeigt die zentrale Rolle der Carnitin-Palmitoyltransferase-1 (CPT-1) bei der mitochondrialen Oxidation von langkettigen Fettsäuren. Es werden zwei Formen dieses Enzyms unterschieden: CPT-1 und CPT-2. CPT-1 ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert (64). Es katalysiert die Kopplung von langkettigem Acyl-CoA an L-Carnitin (30). In der Folge wird langkettiges Acylcarnitin gebildet. Erst dieses Produkt kann in die mitochondriale Matrix mit Hilfe der Carnitin-Acyltranslokase transportiert werden. Kurz- und mittelkettige Fettsäure gelangen dagegen passiv in die Mitochondrien. An der Innenseite der inneren Mitochondrienmembran befindet sich die CPT-2 (in der Abb. 3 nicht dargestellt). Dieses Enzym ist für die Umwandlung von Acylcarnitin in Acyl-CoA verantwortlich, das im Zitratzyklus zur Energiegewinnung verstoffwechselt wird. Ein geringer Anteil des Acetyl-CoA wird zu Acetylcarnitin konvertiert und gegen Carnitin durch die Carnitin-Acetyltranslokase aus den Mitochondrien herausgeschleust. Aus Acetylcarnitin entsteht zuerst Acetyl-CoA, katalysiert durch die Carnitin-Acetyltransferase und im nächsten Schritt Malonyl-CoA mit Hilfe der Malonyl-CoA-Carboxylase (beide Enzyme sind in der Abb. 3 nicht dargestellt). Malonyl-CoA ist der physiologische Hemmstoff der CPT-1. Somit existiert ein negativer Rückkopplungsmechanismus zwischen anfallendem mitochondrialem Acetyl-CoA und der Aktivität der CPT-1. Durch Hemmung der CPT-1, sei es durch Malonyl-CoA oder durch synthetische Hemmstoffe wie Etomoxir (siehe Kap. 4.8), wird verstärkt Glukose utilized (Abb. 3), (56). Der Mechanismus, der dafür verantwortlich zeichnet, ist noch nicht gänzlich aufgeklärt. Klar ist, daß der Pyruvatdehydrogenasekomplex (PDK) in die Regulation eingebunden ist. Diese Enzym katalysiert die Umwandlung von Pyruvat als Abbauprodukt der Glykolyse. In einer mehrstufigen, als dehydrierende Decarboxylierung bezeichneten Reaktion, wird Acetyl-CoA synthetisiert. Dieses Produkt dient nun im Zitratzyklus zur Energiegewinnung.



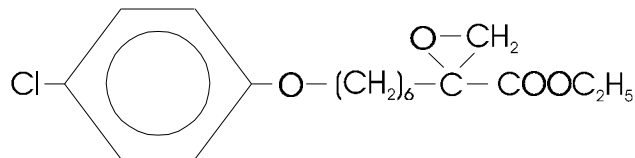
**Abb. 3: Schema der Wechselwirkung zwischen Fettsäure- und Glukoseoxidation im Myokard**

PDK, Pyruvatdehydrogenasekomplex. Modifiziert aus: (57)

Da im gesunden Herzen bevorzugt Fettsäuren mobilisiert werden, ist eine Hemmung der Kohlenhydrat-Utilisation auf der Ebene des Glukosetransports, der Phosphofruktokinase, der Hexokinase, der Glykogenphosphorylase und Pyruvatdehydrogenase, genauso wie eine Stimulierung der Glykogensynthetase, anzunehmen (17). Durch Unterbindung der FS-Oxidation durch CPT-1-Inhibition unterbleibt folglich diese Hemmung auf den KH-Stoffwechsel. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Effekt an chronisch infarzierten Rattenherzen untersucht, die sechs Wochen mit dem CPT-1-Hemmstoff Etomoxir behandelt worden sind. Durch die dauerhafte Verschiebung der myokardialen Substratoxidation von Fettsäuren nach Glukose sollten Einflüsse auf das überlebende Herzgewebe analysiert werden. Im folgenden Kapitel wird der CPT-1-Inhibitor Etomoxir mit seiner Wirkung eingehend beschrieben.

#### 4.8 Der Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1-Hemmstoff Etomoxir

Etomoxir (Ethyl 2-[6-(4-chlorphenoxy)hexyl]oxiran-2-carboxylat) (Abb. 4) ist ein Hemmstoff der mitochondrialen Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1.



**Abb. 4: Strukturformel von Etomoxir**

Andere spezifische Inhibitoren der CPT-1 sind in Tab. 1 dargestellt. Intrazellulär wird Etomoxir in seinen CoA-Ester umgewandelt und bindet kovalent an die CPT-1. Es ist 100-1000 Mal stärker wirksam als der physiologische Inhibitor der CPT-1 Malonyl (23).

**Tab. 1: Hemmstoffe der mitochondrialen Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1**

Agens	Kurzform	Referenz
2-Tetradecylglyzidat	TDGA	(49)
Natrium-2[5-(4-Chlorphenyl)-pentyl]oxiran-2-carboxylat	POCA	(101)
Emeriamin		(43)
Natrium-4-Hydroxyphenylglyzin	Oxfenizin	(37)

Etomoxir ist ursprünglich für die Behandlung des Diabetes mellitus entwickelt worden, da dieser Stoff, wie in Kap. 4.7 beschrieben, die Glukoseutilisation steigert und gleichzeitig die Glukoneogenese hemmt (55); (23). Darüberhinaus ist Etomoxir für eine günstige Beeinflussung der Substratoxidation bei ischämischen Erkrankungen des Herzens interessant geworden. Schon länger ist bekannt, daß sich nach einem akuten Myokardinfarkt toxische Substanzen des FS-Stoffwechsels im Herzen akkumulieren. Zwei dieser FS-Metaboliten sind

unter anderem langkettiges Acyl-CoA und langkettiges Acylcarnitin (38). Im Plasma läßt sich ein Anstieg der freien Fettsäuren feststellen (69), die für die Größe des Infarktareals und die Mortalität verantwortlich gemacht werden (98); (67). Der endogene langkettige Fettacyl ester Palmitoylcarnitin hemmt in höherer Konzentration die sarkolemmale  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPase und die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen-Aktivität, wie in vitro Versuche von Adams und Mitarbeitern ergaben (1). Es kann daraus geschlossen werden, daß erhöhte Spiegel an Palmitoylcarnitin, das auch zu den nach MI verstärkt anfallenden Produkten gehört, Einfluß auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückbindung in das SR nimmt.

Es gibt mehrere Ansatzmöglichkeiten, die Störungen im Lipidstoffwechsel nach Myokardischämie pharmakologisch zu beeinflussen. Zum einen kann dies durch eine Erniedrigung freier Fettsäuren im Plasma erfolgen. Eine andere Möglichkeit liegt in der Reduktion der Nahrungsmittellipide oder auch in der Hemmung der endogenen Mobilisation von Fetten. Desweiteren kann die intrazelluläre Konzentration von Fettsäuren durch Inhibition von sarkolemmalen FS-Transportern erniedrigt werden (17). Auch der PDK ist ein Angriffspunkt für Interventionen an der myokardialen Substratoxidation.

Welchen Effekt kann Etomoxir am ischämischen Herzen bewirken? In einer Studie wurde gezeigt, daß Etomoxir die myokardiale Funktion, ausgedrückt als Produkt aus Herzfrequenz und systolischem Spitzendruck, nach einer Ischämiephase am isolierten, mit Palmitinsäure und Glukose perfundierten Rattenherzen signifikant verbesserte (55). In drucküberlasteten, hypertrophierten Herzen zeigten Rupp und Mitarbeiter unter Etomoxirbehandlung einen signifikanten Abfall der freien Fettsäuren im Plasma, eine Zunahme des relativen Herzgewichtes (Quotient aus Herz- und Körpergewicht) und eine Steigerung der kolorimetrisch gemessenen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase Aktivität (81). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, daß CPT-1-Inhibition bei Drucküberlast mit einem erhöhten mRNA-Spiegel der kardialen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase einhergeht (103). Folglich scheint Etomoxir das für die SERCA2a kodierende Gen zu stimulieren oder die SERCA2a-mRNA zu stabilisieren.

Eine weitere Eigenschaft von Etomoxir ist die Induktion einer myokardialen Hypertrophie. Eine 5-wöchige Behandlung von Versuchsratten mit hohen Dosen (12-15 mg/kg/d) dieser Substanz induzierte ein moderates biventrikuläres Myokardwachstum, das alle Kennzeichen einer physiologischen Hypertrophie aufwies (97). Dieses Kennzeichen ist mehreren CPT-1-Hemmstoffen gemeinsam. Vorangegangene Studien bei Nagetieren ergaben eine deutliche Zunahme der Herzmasse bei Behandlung mit CPT-1-Inhibitoren (52); (50); (37). Histologische

Untersuchungen des nichtinfarzierten Gewebes zeigten einen Anstieg des Volumens der Herzmuskelzellen ohne Anzeichen einer Fibrose. Extravaskuläre Flüssigkeit oder Fetteinlagerung nahmen nur geringfügig zu (53). Daher ist anzunehmen, daß die Hypertrophie des Herzens unter Etomoxirbehandlung vor allem durch eine gesteigerte Proteinsynthese bedingt ist. Auf molekularer Ebene ist in Etomoxir-behandelten Ratten eine Isomyosinverschiebung von  $V_3$  nach  $V_1$  nachgewiesen worden. Qualitativ ähnliche Effekte können z.B. auch durch Schilddrüsenhormone ausgelöst werden (96). Die Arbeiten der Gruppen um Rupp und Vetter haben außerdem gezeigt, daß die Isomyosinverschiebung hin zu  $V_1$  mit erhöhter ATPase-Aktivität mit gesteigerter SR  $Ca^{2+}$ -Transportaktivität korrelierte (97). Deshalb wurden ein oder mehrere bisher nicht identifizierte metabolische Signale postuliert, die bei einer pharmakologisch induzierten Umschaltung der kardialen Substratoxidation von FS nach Glukose an der Expression zusätzlicher SR  $Ca^{2+}$ -ATPasen beteiligt sein könnten.

Nach den vorausgegangenen Ausführungen läßt sich folgende Schlußfolgerung treffen:

Unter einer Behandlung mit Etomoxir nach MI kann erwartet werden, daß die kompensatorische Hypertrophie verstärkt wird und die Entwicklung einer eventuellen Herzinsuffizienz verzögert eintritt. Gleichzeitig soll durch die Inhibition der CPT-1 verstärkt Glukose oxidiert und so der toxische Einfluß der langkettigen Fettsäuren, die nach MI verstärkt anfallen, minimiert werden. Weiter wird vermutet, daß durch die Behandlung mit Etomoxir eine verstärkte Gen-Aktivierung der SERCA2a induziert wird, und es in der Folge zu einer verbesserten  $Ca^{2+}$ -Homöostase in der Zelle kommt.

#### **4.9 Aufgabenstellung**

In der vorliegenden Arbeit sollte tierexperimentell untersucht werden, wie sich der Verschuß der linken Herzkranzarterie, also die Induktion eines Myokardinfarkts auf das hypertrophe Myokardwachstum auswirkte. Es ist bekannt, daß es nach einem MI über das Stadium einer kompensierten Hypertrophie zu einer zunehmenden Dysfunktion des Ventrikels und Ausbildung einer Herzinsuffizienz kommen kann (68); (75); (6)). Da es bei Herzinfarkt zu drastischen Veränderungen der Substratoxidation kommt, wurde in erster Linie untersucht, welchen Einfluß eine pharmakologische Modulation der Glukose- und mitochondrialen FS-Oxidation auf das „Remodeling“ hat. Vorliegende Arbeit ist Teil einer Studie, die zwischen April und August 1996 am Universitätsklinikum Charité durchgeführt wurde. Dabei erfolgte

---

die Untersuchung von Langzeitwirkungen von Angiotensin-Conversions-Enzym (ACE)-Hemmung,  $\beta$ -Blockade und Inhibition der CPT-1 auf das überlebende Myokard nach MI. Vorliegende Arbeit enthält drei Versuchsgruppen. Zum einen handelt es sich um ein unbehandeltes Kollektiv mit Myokardinfarkt (MI-Gruppe), zum anderen um eine Gruppe von Ratten, die nach Infarkt mit Etomoxir (Etomoxir-Gruppe) behandelt wurden. Eine dritte, scheinoperierte Kontrollgruppe (SO-Gruppe) diente als Vergleich. Im einzelnen sollen in der Arbeit folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Wird die myokardiale Hypertrophie nach Infarkt durch chronische Hemmung der CPT-1 verändert?
- 2) Verändert die Etomoxir-Behandlung die kontraktile Funktion des Myokards nach MI?
- 3) Kann durch chronische Verschiebung der kardialen Substratoxidation von FS nach Glukose die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion infarzierter Herzen verbessert werden?

## 5 UNTERSUCHUNGSGUT UND METHODIK

### 5.1 Verwendete Chemikalien

Tab. 2 enthält eine Übersicht der in dieser Studie verwendeten Chemikalien und Wirkstoffe. Wenn nicht ausdrücklich vermerkt, stammten alle im Text erwähnten Detergenzien von der Firmen Serva, Heidelberg und entsprachen dem höchsten Reinheitsgrad (p.A. Qualität).

**Tab. 2: Übersicht der verwendeten Chemikalien und Wirkstoffe**

Agens	Firma
Acrylamid	BioRad, Richmond, CA, USA
Ammoniumpersulfat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Anti-Kaninchen IgG-Meerrettich	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Peroxidasekonjugat	
<sup>45</sup> CaCl <sub>2</sub>	Amersham, Little Chalfout, GB
EDTA	Merck, Darmstadt
<i>Enhanced Chemoluminescence Analysis Kit</i> (ECL)	Amersham, Little Chalfout, GB
Etomoxir	RBI, Natick, MA, USA
EGTA	Merck, Darmstadt
Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Gentamicin	Merck, Darmstadt
Kaninchen anti-SERCA2a anti-Serum	Geschenk von W. Dillmann, St. Diego, CA, USA
Ketaminhydrochlorid	Parke-Davis, Berlin
Kreatinphosphat	Boehringer-Mannheim
katalytische Untereinheit der PKA	Präparation der Arbeitsgruppe
PKI-(6-22)amide	GibcoBRL, Grand Island, New York, USA
Ponceaurot-Konzentrat	Sigma, Deisenhofen
Szintillatorlösung Rotiszint	Carl Roth, Karlsruhe
Tris-ATP	Sigma, Deisenhofen
Xylazinhydrochlorid	Bayer, Leverkusen

## 5.2 Durchführung des experimentellen Infarktes

Die Durchführung der Operation zur Herzinfarktinduktion einschließlich der Hämodynamikmessung erfolgte im Labor der Inneren Medizin an der Charité. Die Tierversuche wurden von der Senatsverwaltung für Gesundheit und Soziales Berlin genehmigt. Die Operationsmethode zur Unterbindung der linken Herzkranzarterie wurde im wesentlichen nach Selye und Mitarbeitern (84) sowie Johns und Olson (40) durchgeführt. Versuchstiere waren zehn bis fünfzehn Wochen alte männliche HAN-Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht zwischen 250 g und 350 g. Die Narkose wurde durch eine Mischinjektion aus Ketaminhydrochlorid (75 mg/kg KG) und Xylazinhydrochlorid (7.5 mg/kg KG) in das Peritoneum eingeleitet. Anschließend erfolgte die Fixation und Intubation der Ratte. Nach Rasur der Brust, des Oberbauches und der unteren Halsregion folgte eine Hautdesinfektion. Der Zugang zum Thorax wurde über einen kleinen Hautschnitt paramedial gewählt. Nach Durchtrennung des großen Brustmuskels erfolgte die Anbringung einer Tabaksbeutelnaht und das Ablegen des lockeren Knotens auf der Ratte. Die künstliche Beatmung wurde mittels eines selbstgefertigten Tubus aufgenommen mit ca. 15 ml Raumluft/Atemzug/kg KG bei 40 Atemzügen/min. Nach vorsichtigem Durchtrennen der vierten und fünften Rippe und Spreizen der Wunde, folgte die Eröffnung des Herzbeutels, das Herausnehmen des Herzens und das Umstechen und Verschließen der linken Koronararterie nahe dem Ursprung. Das Herz wurde reponiert, die vorbereitete Tabaksbeutelnaht zugezogen und die künstliche Beatmung beendet. Daran schloß sich eine 15minütige EKG Aufzeichnung nach Einthoven an. Alle Tiere erhielten eine subkutane Injektion von Gentamicinsulfat (20 mg/Ratte) zur Antibiose. Bei den durchgeführten Scheinoperationen entfiel der Verschluß der Koronararterie. Bei der im Mittel 8 min dauernden Operation war der Brustkorb etwa 85 s offen. Nach der OP erfolgte eine Randomisierung, um die Tiere zufällig einer der Behandlungsgruppen zuzuordnen. Die postoperative Letalität betrug unter den infarzierten Tieren annähernd 50 %.

## 5.3 Behandlungsmuster und Messung der Hämodynamik

Die Tiere der SO-Gruppe erhielten über den gesamten Zeitraum von sechs Wochen Rattenstandardfutter und Wasser ad libitum. Die MI-Gruppe wurde mit 30 g/kg KG Rattenstandardfutter und 10 ml Wasser pro Ratte und Tag versorgt. Die Behandlung der Etomoxir-Gruppe setzte am ersten postoperativen Tag ein. Jedes Tier bekam 8 mg/kg KG (+) Etomoxir (Na<sup>+</sup>-Salz) in 10 ml Trinkwasser gelöst und Rattenstandardfutter ad libitum. Sechs

Wochen nach Infarkt wurden die Ratten wiederum mit Ketaminhydrochlorid und Xylazinhydrochlorid intraperitoneal narkotisiert. Es folgte die Ermittlung des Körpergewichtes, eine Rasur und die Fixation der Tiere. Die Beatmung wurde, wie schon oben beschrieben, durchgeführt. Über die Arteria carotis communis wurde ein 2 French Mikrotip Katheter (Millar Instruments, Houston, Texas, USA) unter Blutdruck-Monitorkontrolle bis in den linken Ventrikel vorgeschoben. Es folgte die Messung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks, der maximalen Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeit. Ein angelegtes Elektrokardiogramm lieferte die Herzfrequenz. Anschließend wurde nach Durchtrennen der dritten bis siebten Rippe rechts parasternal die Aorta freipräpariert und zur Messung des aortalen Blutflusses ein Flußmeßkopf (Transsonic Systems, USA) um den aufsteigenden Teil dieses Gefäßes gelegt. Nachfolgend wurden die arteriellen und venösen Hauptgefäße durchtrennt und das Herz entnommen und sofort in Blutersatz-Lösung (NaCl 140 mM, KCl 5 mM, CaCl<sub>2</sub> 0.75 mM, MgCl<sub>2</sub> 1.1 mM, Tris/HCl 10 mM, Glukose 11.1 mM, ph 7.4, Zimmertemperatur) überführt. Nach Abtrennen der Vorhöfe und dem rechten Ventrikel wurden die Ventrikelgewichte bestimmt und die linke Herzkammer von der Basis zur Spitze aufgeschnitten. Im Anschluß daran folgte die Aufspannung des Ventrikels mit dem Septum und das Ausmessen des infarzierten Gewebes mit Hilfe von Planimetrie. Von der Gesamtfläche des Ventrikels wurde das Infarktareal subtrahiert. Entnommene Papillarmuskeln aus dem linken Ventrikel dienen zur Charakterisierung der kontraktilen Funktion des Myokards. Der Rest des Gewebes wurde umgehend in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C eingelagert. Von der Entnahme des Herzens bis zum Einfrieren vergingen ca. fünf Minuten.

#### **5.4 Präparieren der Homogenate**

Von den Proben des gefrorenen Herzmuskelgewebes (-80 °C) wurde zwischen 20 und 30 mg abgenommen. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei einer Temperatur von +4 °C. Die Gewebestückchen wurden zu einem dem Gewicht entsprechenden Volumen an Schutzpuffer (250 mM Saccharose, 10 mM Histidin, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM NaF, 1 mM EDTA, 0.3 mM PMSF, 0.5 mM DTT, ph 7.4) gegeben, so daß ein Milliliter Puffer 30 mg Gewebe enthielt. NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaF und PMSF dienen der Hemmung der Proteinphosphatasen, während DDT als SH-Gruppenschutz eingesetzt wurde. Nun erfolgte eine mechanische Zerkleinerung des Gewebes mittels einer Schere. Die Homogenisierung mit dem Polytron PT 3000 (Kinemata AG, Littau, Schweiz) bei 21000 U/min erfolgte sechsmal für je 10 s. Um eine Überhitzung zu

vermeiden, wurden Pausen von je 15 s zwischen den Umläufen eingehalten. Zur Entfernung von bindegewebigen Anteilen erfolgte anschließend eine Filtrierung des Materials durch Polyamidgaze mit 150 µm Porengröße (NeoLab, Heidelberg, Deutschland). Der Proteinverlust durch die Filtrierung betrug etwa 5 %. Aliquots von je 100 µl wurden umgehend in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C eingelagert. Je 50 µl Homogenat diente zur Proteinbestimmung. Die Homogenisierung des Gewebes zerstört die Zellmembranen der Myozyten. In dem Schutzpuffer bilden sich aus den SR-Membranfragmenten spontan Vesikel, von denen mindestens 90 % eine Membranorientierung wie in der intakten Zelle haben. ATPase- und Ca<sup>2+</sup>-Bindungsstelle der SERCA2a sind so dem Ca<sup>2+</sup>-Transportmedium frei zugänglich (Abb. 6 im Kap. 5.8).

### 5.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte in einer modifizierten Version nach Lowry und Mitarbeitern (58). 50 µl Homogenat wurden in 0.5 ml bidestilliertem Wasser aufgenommen. Im ersten Schritt wurde jeweils 2.5 ml des Lowry-Reagenz (2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in 0.1n NaOH, 0.02 % K-Na-Tatrat, 0.01 % CuSO<sub>4</sub> x 5H<sub>2</sub>O) zugegeben. Nach 10 min folgte die Zugabe von 0.25 ml des Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz, welches vorher 1:1 mit bidestilliertem Wasser verdünnt worden war. 45 min danach schloß sich die photometrische Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 585 nm am Spektrophotometer UV-1202 (Shimadzu, Tokio, Japan) an. Gleichzeitig mit den Proben wurde mit Standardprotein eine Eichkurve im Bereich von 0 bis 100 µg ermittelt. Als Bezugslösung diente eine Stammlösung in der Konzentration 5 mg/ml Ovalbumin. Alle Eichwerte sind Duplikate. Die erhaltenen Absorptionswerte wurden durch lineare Regression mit Hilfe des Programms Ligand (G.A. McPherson, Elsevier-Biosoft, Cambridge, GB) in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

### 5.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Elektrotransfer

Die Homogenate wurden in Eiswasser aufgetaut und entsprechend ihrer Proteinkonzentration mit Saccharose/Histidin-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM Histidin) auf 2 mg/ml verdünnt. Bei einer Temperatur von 22 °C und einer Schüttelfrequenz von 1000/min (Eppendorf-Thermomixer 5436, Hamburg, Deutschland) wurden die Proben in 4fach konzentriertem Probenpuffer 1:4 verdünnt und für 30 min solubilisiert (Endkonzentration: 1.5 % Natrium Dodecyl Sulfat (SDS), 62.5 mM Tris-HCl, 7.5 % Glycerol, 5% Mercaptoethanol, 0.1 %

Pyronin, 0.04 % Bromphenolblau, pH 6.8). Die elektrophoretische Auftrennung der solubilisierten Proteine erfolgte in einer Mini Elektrophorese Kammer (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA). Der Zusatz von 4 M Harnstoff in die Trenngelpolymerisationslösung (Acrylamid-bis-Acrylamidmonomerkonzentration T=7.5 %, Vernetzerkonzentration C=2.7 %, 375 mM Tris pH 8.8, 0.1 % SDS, 0.05 % Ammonium-Persulfat, 4 M Harnstoff, 0.05 % Tetramethylethyldiamin (TEMED)) modifizierte die Vorschrift nach Laemmli (46). Das Trenngel wurde sofort nach dem Gießen mit einem dünnen Wasserfilm überschichtet. Nach Polymerisation desselben (etwa 30 min) ließ sich mit Filterpapier der Wasserfilm entfernen. Es folgte die Herstellung des Sammelgels mit 4 % Acrylamid, 125 mM Tris pH 6.8, 0.01 % SDS, 0.005 % Ammonium-Persulfat, 0.1 % TEMED (T=4 %, C=2.7 %). Hier dauerte es wiederum etwa 30 min bis zum Aushärten. Pro Minigel (1.5 mm x 10 cm x 8 cm) wurden 15 Proben mit je 3 µg Protein im elektrischen Feld aufgetrennt. In die erste Bahn erfolgte die Auftragung eines Molekulargewichtsstandards. Die beiden Gekassetten wurden in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt. In den Puffertank wurde Elektrodenpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 1 % SDS, pH 8.3, Temperatur 4 °C) gefüllt. Die angelegte Spannung (Bio-Rad Power supply 1000/500, Richmond, USA) betrug 100 V für 0.5 h und 150 V für eine weitere Stunde bei einer Stromstärke von 500 mA.

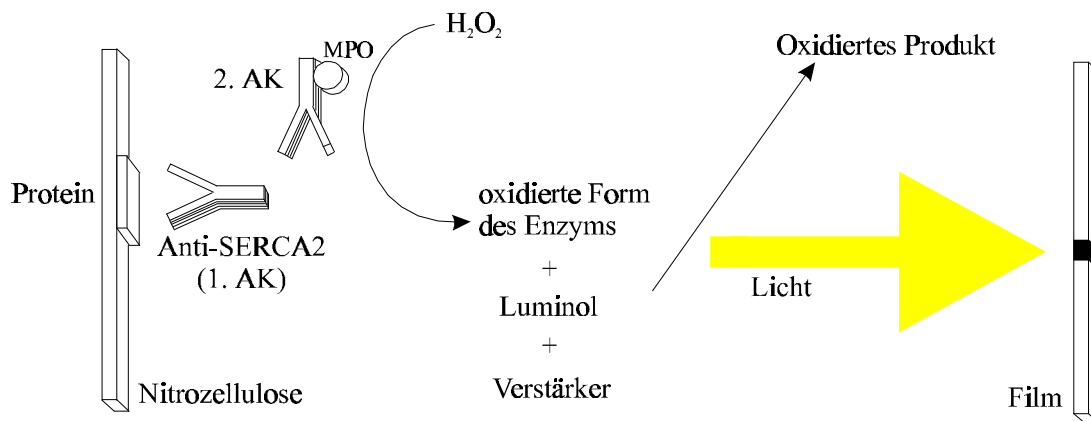
Anschließend erfolgte der Elektrotransfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulosemembran BA 85 (Schleicher & Schuell, Dassel) in einer Mini Trans-Blot Kammer (Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA) für 1.1 h bei 100 V und 4 °C. Der Transferpuffer enthielt 25 mM Tris, 192 mM Glycin pH 8.3, 20 % Methanol und 0.01 % SDS. Daran schloß sich eine 10minütige Färbung der auf Nitrocellulose übertragenen Proteine mit Ponceaurot an. Bis zur Verarbeitung am nächsten Tag lagerten die Membranen bei -20 °C. Zur Kontrolle eines vollständigen Proteintransfers wurde das Gel mit Coomassie Brilliant Blau G250 nach Standardprozedur angefärbt.

### 5.7 Quantitativer immunchemischer SERCA2a-Nachweis

Die bei -20 °C gelagerten und mit Ponceaurot angefärbten Membranen wurden zur Entfärbung in 0.5 l TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7.4) für 10 min bei Raumtemperatur gewaschen.

---

Anschließend erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen der Nitrozellulose in 100 ml 0.05 % TBST (TBS mit Tween-20) und 3% Ovalbumin für 1.5 h. Dann wurde dreimal je 10 Minuten in 0.5 l TBST gewaschen, bevor die Inkubation mit dem primären SERCA2a-Antikörper erfolgte. Die Membranen wurden für 1.5 h in 10 ml TBS mit 1 % Rinderserumalbumin, 1:5000 verdünntem Kaninchen anti-SERCA2a anti-Serum in verschließbaren 50 ml Polypropylenzentrifugenröhrchen auf einem Kipproller (Stuart Scientific, Surrey, GB) inkubiert. Danach folgte mehrmaliges Waschen: zweimal je 10 min in TBST, 5 min in 100 ml 3%iger Ovalbuminlösung (gleicher Ansatz wie oben) und zweimal je 10 min in TBS. Die Nitrozellulose wurde dann für 1 h mit Anti-Kaninchen IgG-Meerretich-Peroxidasekonjugat (Verdünnung 1:5000) in 10 ml TBS mit 0.1 % Ovalbumin inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit 0.5 l TBST und 0.5 l TBS für jeweils 10 min in einer Kunststoffschale. Alle weiteren Schritte zur Sichtbarmachung des immunoreaktiven SERCA2a-Proteins mit Hilfe eines *Enhanced Chemoluminescence Analysis Kit* (ECL) sind in der Dunkelkammer durchgeführt worden. Bei der ECL-Reaktion kommt es unter alkalischen Bedingungen zur Peroxidase/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-katalysierten Oxidation des zyklischen Diacylhydrazids Luminol (Abb. 5). Dabei befindet sich Luminol kurzzeitig in einem angeregten Zustand. Im Beisein von chemischen Verstärkern wird unter Emission von Lichtquanten dieser Zustand wieder verlassen. Durch Auflegen eines Röntgenfilms auf den mit ECL-Kit behandelten Blot kommt es zur Schwärzung. Die Intensität des emittierten grünen Lichts ist dabei proportional der SERCA2a-Antigenmenge, so daß nach Scannen des entwickelten, belichteten Röntgenfilms relative Veränderungen zwischen untersuchten Proben quantitativ erfaßt werden können.



**Abb. 5: Prinzip der Chemolumineszenz**

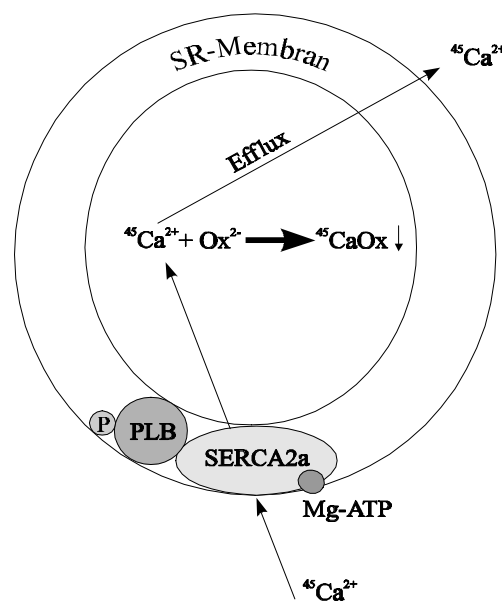
AK, Antikörper; MPO, Meerrettich-Peroxidase; aus: Produktbeilage der Firma Amersham, Little Chalfont, GB

Der 1. AK bindet spezifisch an die SERCA2a-Proteinbande auf der Nitrozellulose. Daran heftet sich der mit der MPO konjugierte 2. AK. In einer MPO/ $H_2O_2$  katalysierten Reaktion wird Luminol oxidiert und zur Emission von Lichtquanten angeregt. Dieses Licht schwärzt einen aufgelegten Röntgenfilm

In der vorliegenden Arbeit betrug die Expositionszeit der Membranen mit dem ECL-Kit 1 min, während die Belichtungszeit für den mittelempfindlichen Film (NIF 18x24 cm, Segrate, Italien) je nach Signalstärke zwischen 10 s und 70 s variierte. Die optische Dichte der immunoreaktiven Banden wurde durch einen Scanner (Modell DNA 35, PDI, Huntington Station, NY, USA) digitalisiert und mit dem Programm Quantity One (PDI, Huntington Station, NY, USA) quantifiziert. Die erhaltenen Werte entsprechen der optische Dichte pro  $mm^2$  ( $OD \times mm^2$ ). Um die Linearität zwischen Proteinkonzentration und Intensität des optischen Signals zu überprüfen, wurden in einem separaten Versuch definierte Mengen von Homogenat (1.5-6  $\mu g$  Protein pro Bahn) aufgetragen und ausgewertet.

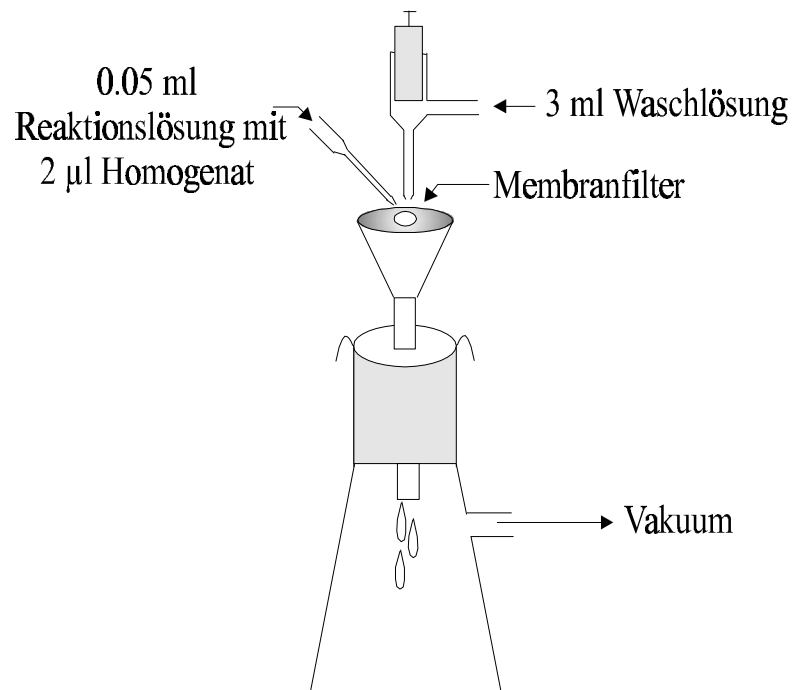
### 5.8 Oxalat-stimulierte $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Membranvesikel des sarkoplasmatischen Retikulums

Bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagerte Homogenate wurden in Eiswasser aufgetaut und sofort für  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmessungen eingesetzt. Der von der SERCA2a-katalysierte ATP-abhängige Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  in SR-Membranvesikel wurde als Oxalat-stimulierte  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme nach einer von Will und Mitarbeitern beschriebenen Methode gemessen (100). Das  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmemedium mit einem Ansatzvolumen von  $250\text{ }\mu\text{l}$  enthielt  $40\text{ mM}$  Imidazol,  $5\text{ mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $100\text{ mM}$  KCl,  $10\text{ mM}$   $\text{NaN}_3$ ,  $0.2\text{ mM}$  EGTA,  $6\text{ mM}$  Kreatinphosphat,  $5\text{ mM}$  Tris-ATP,  $0.1\text{ mM}$   $^{45}\text{CaCl}_2$  (spez. Aktivität:  $\sim 5\text{ }\mu\text{Ci/mol}$ ) und  $10\text{ mM}$  K-oxalat. Nach Vorinkubation der Reaktionslösung bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  für  $2\text{ min}$  startete die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in die Vesikel durch schnelle Zugabe von  $10\text{ }\mu\text{l}$  Homogenat zu  $240\text{ }\mu\text{l}$  Aufnahmemedium. Das in das Lumen des Vesikels transportierte radioaktive  $\text{Ca}^{2+}$  wird dort von passiv aufgenommenen Oxalatanionen gebunden und als schwer lösliches Kalziumsalz zur Ausfällung gebracht (Abb. 6).



**Abb. 6:** Schema zur Oxalat-stimulierten Aufnahme von  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  in Membranvesikel des SR. SERCA2a, sarko(endo)plasmatische Retikulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase; PLB, Phospholamban; P, Phosphorylierung; Mg-ATP, Magnesium-Adenosintriphosphat; Ox, Oxalatanion; SR, sarkoplasmatisches Retikulum;  $\text{CaOx}\downarrow$ , präzipitiertes Kalziumoxalat. Netto  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme = SERCA2a-katalysierte  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme -  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux

Durch die Präzipitation dieses Salzes bleibt die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Vesikel niedrig, so daß der Efflux von  $\text{Ca}^{2+}$  vernachlässigbar klein ist. Die pro Zeiteinheit aufgenommene  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge ist folglich ein Maß für die SERCA2a-katalysierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des SR. Durch die Wirkung des Oxalats wird der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport etwa 100fach verstärkt, was die Transportmessungen in Homogenaten erst ermöglicht. Nach 0,5, 1, 1,5 und 2 min wurde von der Reaktionslösung jeweils 0,05 ml abgenommen und durch einen 0,45  $\mu\text{m}$  Membran-Filter (Schleicher & Schuell, Dassel) unter Benutzung einer Vakuumpumpe filtriert (Abb. 7).



**Abb. 7: Versuchsaufbau zur Messung der Oxalat-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme**  
Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die mit  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  angereicherten Vesikel blieben als Filtrerrückstand zurück. Zweimaliges Waschen mit je 3 ml einer eiskalten Waschlösung (100 mM KCl, 2 mM EGTA, 40 mM Imidazol, 1,25 mM  $\text{NaN}_3$ , pH 7,0) entfernte unspezifisch gebundenes  $\text{Ca}^{2+}$  von den Filtern. Die Raten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme sind zusätzlich durch Messungen in Anwesenheit von 2  $\mu\text{M}$  katalytischer Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) und durch Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  eines spezifischen inhibitorischen Peptids der Proteinkinase (PKI) ergänzt worden. Alle Meßwerte sind Doppelbestimmungen. Die Filter wurden anschließend in Szintillations-Meßküvetten

---

überführt und bei 60 °C für 30 min getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Szintillatorlösung Rotiszint erfolgte die Messung der  $\beta$ -Strahlung im Flüssigkeits-Szintillationszähler Wallac System 1400 (Pharmacia, Turku, Finnland). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate ließ sich durch lineare Regression der zu vier verschiedenen Zeitpunkten ermittelten transportierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Mengen berechnen (Abb. 11, Kap. 6.5). Die ermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten sind in nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein/min angegeben.

### 5.9 Statistik

Die statistische Überprüfung der Meßwerte aus den drei Gruppen SO, MI und Etomoxir erfolgte mit Hilfe des Programms Graph-Pad InStat (San Diego, CA, USA). Um die Signifikanz der Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen zu prüfen, erfolgte zuerst eine Varianzanalyse für unabhängige Stichproben (ANOVA). Bei  $p < 0.05$  wurden Gruppenunterschiede mit dem Student-Newman-Keuls-Test statistisch geprüft. Für nicht-normalverteilte Stichproben kam der Kruskal-Wallis-Test zum Einsatz. Die linearen Regressionsanalysen erfolgten mit Hilfe des parametrischen Pearson-Tests. Statistische Signifikanz wurde angenommen bei  $p < 0.05$ . Wenn nicht ausdrücklich gekennzeichnet, sind alle Werte in der vorliegenden Arbeit als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere

Die allgemeinen Charakteristika der Versuchstiere sind in Tab. 3 dargestellt. Sechs Wochen nach Ligatur der linken Koronararterie konnte planimetrisch ein transmuraler Infarkt von ca. 40 % des linksventrikulären Myokards beobachtet werden. Die Behandlung der Versuchstiere mit 8 mg/kg KG/d (+) Etomoxir reduzierte die Infarktgröße signifikant auf etwa 30 %. Die Größe des infarzierten Areals im linken Ventrikel wies eine Variabilität zwischen 1 und 45 % auf. Da in diesem Tiermodell moderate Infarkte unter 20 % hämodynamisch stumm sind und keine kompensatorische Hypertrophie aufweisen (siehe Kap. 4.3), sind in dieser Arbeit nur Tiere mit einer Mindestinfarktgröße von 20 % berücksichtigt worden.

Hinsichtlich ihres Körpergewichtes wichen die Tiere sechs Wochen nach Infarkt nicht signifikant voneinander ab. Auffällig ist die signifikante Zunahme des Ventrikelgewichtes (LV+RV-Gewicht) um 27 % in der MI-Gruppe und um 40 % bei den mit Etomoxir behandelten Tieren. Betrachtet man das Gewicht von rechtem und linkem Ventrikel getrennt, trat nur bei der Etomoxir-Gruppe eine signifikante Gewichtszunahme der linken Herzkammer um 28 % auf. Die linksventrikuläre Gewichtszunahme von 18 % in der unbehandelten Infarktgruppe war gegenüber der Kontrollgruppe nicht signifikant. Die rechtsventrikuläre Gewichtszunahme betrug 95 % (MI-Gruppe) und 82 % (Etomoxir-Gruppe). Als deutliches Merkmal einer Hypertrophie zeigte sich der Anstieg des relativen Herzgewichtes, also der Quotient aus Ventrikelgewicht in mg und Körpergewicht in g. Die Zunahme betrug 32 % in der MI-Gruppe und 48 % in der Etomoxir-Gruppe. Das relative linksventrikuläre Herzgewicht nahm unter CPT-1-Inhibition um 35 % zu, während das relative rechtsventrikuläre Herzgewicht in der unbehandelten Gruppe um 105 % und im Etomoxir-Kollektiv um 93 % anstieg. Der absolute linksventrikuläre Gesamtproteingehalt veränderte sich vergleichbar der Massenzunahme des linken Ventrikels. Allerdings wurde aufgrund der großen Streuung keine Signifikanz erreicht. Der spezifische Proteingehalt war dagegen zwischen den Versuchsgruppen vergleichbar.

**Tab. 3: Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere.**

Parameter	SO	MI	MI+Etomoxir
Zahl der Versuchstiere (n)	6	8	12
Infarktgröße (%)	0	38±4	31±7 <sup>+</sup>
KG (g)	375±25	362±34	356±22
Ventrikelgewicht (mg)	998±75	1271±190 *	1395±277 **
LV-Gewicht (mg)	785±56	928±140 <sup>1)</sup>	1008±178 *
RV-Gewicht (mg)	213±53	415±141 * <sup>1)</sup>	387±156 *
Ventrikelgewicht/KG (mg/g)	2.67±0.11	3.53±0.59 *	3.95±0.91 **
LV-Gewicht/KG (mg/g)	2.1±0.13	2.63±0.38 <sup>1)</sup>	2.84±0.53 **
RV-Gewicht/KG (mg/g)	0.57±0.12	1.17±0.39 * <sup>1)</sup>	1.1±0.49 *
absol. LV-Proteingehalt (mg) <sup>2)</sup>	96±15	111±29	122±22
rel. LV-Proteingehalt (mg/g FG) <sup>2)</sup>	121±14	120±13	122±14

Alle Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt. SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; KG, Körpergewicht; LV, linker Ventrikel; RV, rechter Ventrikel; FG, Feuchtgewicht;

\* p<0.05 vs. SO; \*\* p<0.01 vs. SO; <sup>+</sup>p<0.05 vs. MI; <sup>1)</sup> n=6; <sup>2)</sup> Werte beziehen sich ausschließlich auf überlebendes Myokard.

## 6.2 Hämodynamik- und Frequenzmessung

Sechs Wochen nach Infarkt wurden bei den Versuchstieren in Narkose hämodynamische Messungen durchgeführt und über das EKG die Herzfrequenz abgeleitet. Einer der hämodynamischen Parameter ist der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP). Er wird beeinflusst von der Wandspannung des linken Ventrikels, die nach Infarkt durch den Verlust vitalen Gewebes kompensatorisch ansteigt. Wie in Abb. 8 dargestellt, wies der LVEDP in der MI-Gruppe eine Steigerung um 146 % gegenüber der scheinoperierten Gruppe auf. In der Etomoxir-Gruppe fiel dieser Wert annähernd auf den Ausgangswert zurück. Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ( $+dP/dt_{max}$ ), ein Parameter für die Kontraktilität des Herzens, sank in der MI-Gruppe deutlich. Keine signifikante Änderung zeigte sich zwischen Etomoxir-Behandlung und der scheinoperierten Gruppe. Die maximale Druckabfallgeschwindigkeit ( $-dP/dt_{min}$ ), die über die Relaxationsfähigkeit des Myokards Aussagen zulässt, unterschied sich in der MI-Gruppe hoch signifikant von den Kontrolltieren. Es kam zu einer Reduzierung dieses Parameters um fast die Hälfte. Gleichfalls war eine Abnahme der Druckabfallgeschwindigkeit zwischen SO-Gruppe und Etomoxir-Gruppe zu erkennen.

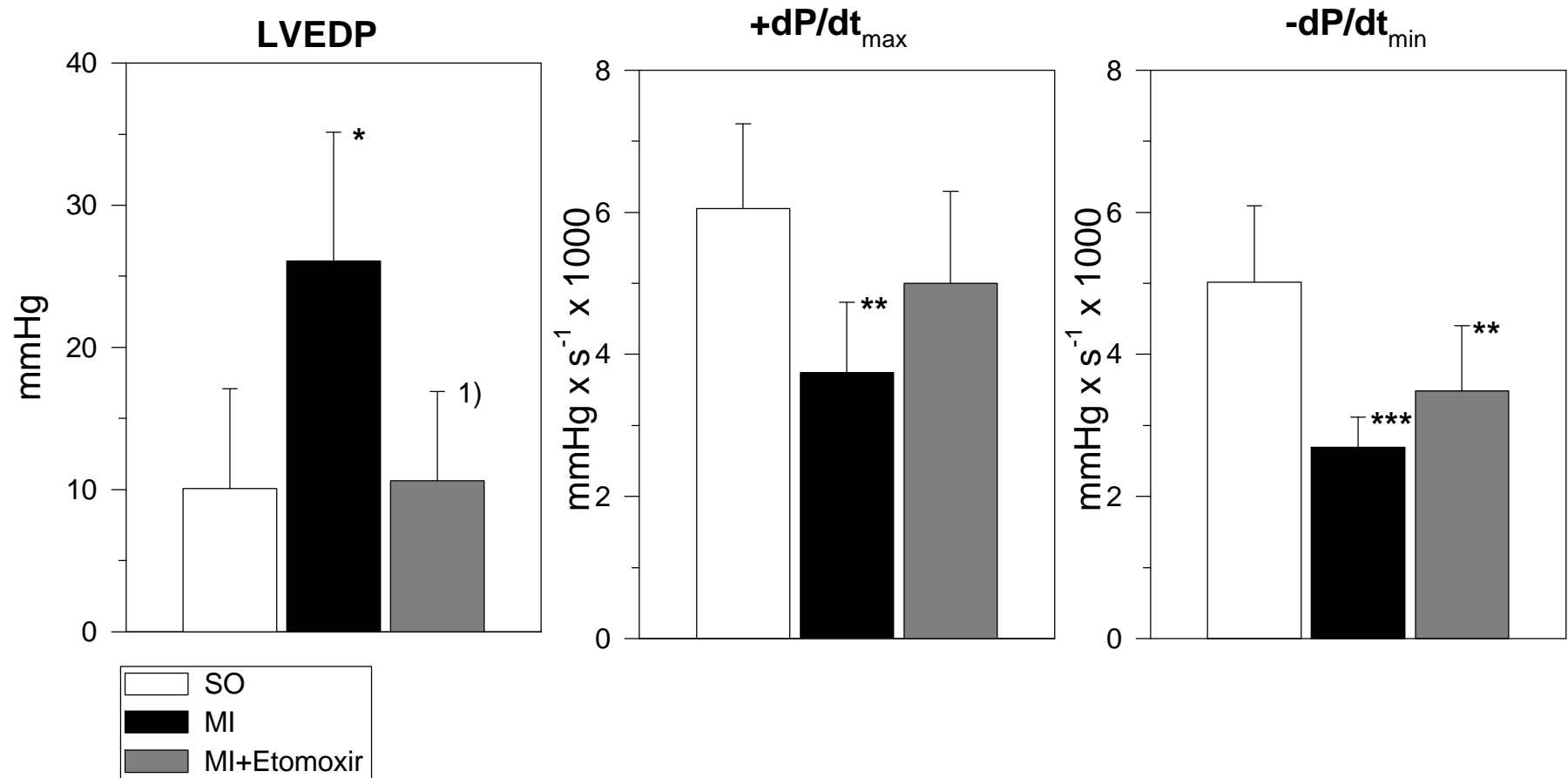
Die Ableitung der Herzfrequenz ergab sich aus der EKG-Registrierung. Es traten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf (Tab. 4). Der aortale Blutfluß wurde ebenso wie die hämodynamischen Parameter unter Narkose bestimmt. Hier zeigten sich keine signifikanten Differenzen zwischen den verschiedenen Behandlungsmustern.

**Tab. 4: Darstellung von Herzfrequenz (HF) und aortalem Blutfluß (AF).**

Parameter	SO	MI	MI+Etomoxir
HF (1/min)	191±17	201±33	214±31
AF (ml/min)	20±4	18±8	21±10

Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt. SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; n=6-12; Die Parameter wurden unter Ketamin/Xylazin-Narkose (siehe Methodik) im Labor der Inneren Medizin an der Charité gemessen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß der infarzierte Ventrikel ohne sechswöchige Behandlung mit einem starken Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks reagierte. Dieser Anstieg unterblieb in der Etomoxir-Gruppe. Desweiteren änderten sich der kontraktile Parameter ( $+dP/dt_{max}$ ) und der lusitrope Parameter ( $-dP/dt_{min}$ ) in der MI-Gruppe signifikant. Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit zeigte keine signifikante Änderung in der Etomoxir-Gruppe.



**Abb. 8: Veränderte linksventrikuläre hämodynamische Parameter sechs Wochen nach experimentellem Myokardinfarkt**  
 Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n=6-12). SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; LVEDP, linksventrikulärer enddiastolischer Druck; +dP/dt<sub>max</sub>, maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit; -dP/dt<sub>min</sub>, maximale Druckabfallgeschwindigkeit; Die Parameter wurden unter Ketamin/Xylazin-Narkose im Labor der Inneren Medizin an der Charité gemessen.  
 \* p<0.05 vs. SO; \*\*p<0.01 vs. SO; \*\*\* p<0.001 vs. SO; <sup>1)</sup> p<0.05 vs. MI

### 6.3 Relaxationsverhalten von Papillarmuskelpräparaten nach Myokardinfarkt

In der Diastole jedes Herzzyklus muß die Interaktion zwischen den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin inaktiviert werden. Für eine schnelle Erschlaffung der Herzmuskelzelle ist vor allem die rasche Rückbindung des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  in das Lumen des SR von Bedeutung. Zur Charakterisierung der kardialen kontraktilen Funktion in dieser Hinsicht wurden Papillarmuskeln aus dem linken Ventrikel von chronisch infarzierten Rattenherzen unter isometrischen Bedingungen untersucht. Die Papillarmuskeln wurden Tieren derselben Versuchsserie entnommen. Herzmuskelgewebe dieser Versuchstiere stand für die biochemische Analyse der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion nicht zur Verfügung. Es wurden nur Ratten berücksichtigt, die sechs Wochen nach MI eine Mindestinfarktgröße von 40 % aufwiesen. Um die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückbindung auf indirektem Wege zu analysieren, wurden folgende drei Parameter herangezogen, die exemplarisch für die isometrische Myokardrelaxation sind:

- 1) Die Zeit T, gemessen vom Beginn der Relaxation bis zum Erreichen der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit ( $T[\text{dF}/\text{dt}_{\text{min}}]$ ).
- 2) Die Zeit, die vom Beginn der Relaxation vergeht, bis die entwickelte Kraft halbmaximal geworden ist ( $\text{RT}_{50}$ ).
- 3) Der Quotient aus maximaler Relaxationsgeschwindigkeit und der zu diesem Zeitpunkt entwickelten Kraft ( $[\text{dF}/\text{dt}_{\text{min}}]/F$ ).

Die ermittelten Ergebnisse sind in Tab. 5 dargestellt. Es zeigte sich, daß die Relaxationsgeschwindigkeit in der unbehandelten und der behandelten Gruppe nach Infarkt erst später ihr Maximum erreichte. Die Gabe von Etomoxir vermochte keine Änderung dieser Größe herbeizuführen. Die  $\text{RT}_{50}$  war in ähnlicher Weise verändert. Die Zeit bis zum Erreichen von 50 % der Maximalkraft war länger. Wiederum gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen MI und Etomoxir-Gruppe. Der Quotient aus maximaler Relaxationsgeschwindigkeit und der zugehörigen Kraft erbrachte keine statistische Änderung zwischen den drei Tierkollektiven.

Demnach führte eine Schädigung des Papillarmuskels durch Infarkt im linken Ventrikel zu einer verlangsamten Relaxation. Sechswöchige Behandlung mit Etomoxir blieb ohne signifikanten Einfluß.

**Tab. 5: Relaxationsparameter von linksventrikulären Papillarmuskelpräparaten chronisch infarzierter Ratten**

Parameter	SO	MI	MI+Etomoxir
Anzahl (n)	22	21	16
T(dF/dt <sub>min</sub> ) (ms)	66±10	76±12 *	76±10 *
RT <sub>50</sub> (ms)	80±10	90±12 *	88±9 *
(dF/dt <sub>min</sub> )/F (1/s)	13.9±1.9	13.4±1.9	14±2.3

Werte sind als Mittelwert ± SD dargestellt. SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; Erläuterungen der Parameter siehe Text. In den Gruppen MI und MI+Etomoxir sind nur Tiere mit einer Infarktgröße von mindestens 40 % eingegangen. Die Messungen erfolgten im Institut für Physiologie der Charité nach einer bereits früher beschriebenen Methode (47).

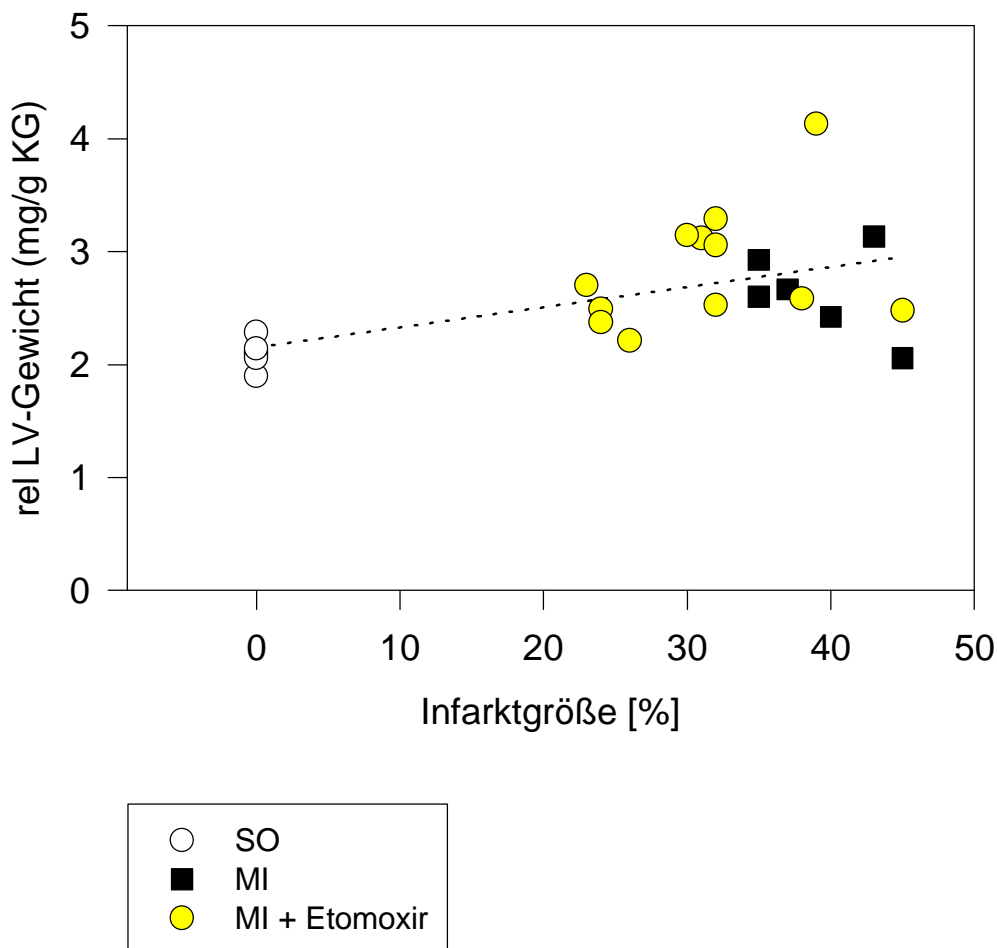
\* p<0.05 vs. SO

#### 6.4 Beziehung zwischen Infarktgröße und Hypertrophiegrad

Da der Infarkt-bedingte Untergang von Myozyten von einer kompensatorischen Hypertrophie überlebender Herzmuskelzellen begleitet ist, wurde die Beziehung zwischen Infarktgröße und Hypertrophiegrad eingehender analysiert. Aus Abb. 9 läßt sich ersehen, daß zwischen Infarktgröße und relativem linksventrikulärem Gewicht keine Korrelation bestand. Auffällig ist die deutlich geringer ausgeprägte Infarktgröße unter Therapie mit dem CPT-1-Inhibitor Etomoxir. Eine entsprechende Reduktion der kompensatorischen Hypertrophie in der Etomoxir-behandelten Gruppe ist dabei nicht zu beobachten. Bei der eingezeichneten gestrichelten Geraden handelt es sich nicht um eine Korrelationskurve. Es wird lediglich demonstriert, daß es zwischen scheinoperierten Tieren und den beiden anderen Gruppen zu einem Anstieg des relativen linksventrikulären Gewichtes kam.

Über eine Vielzahl von bekannten und vermuteten zirkulierenden Wachstumsfaktoren wird nach linksventrikulärem Infarkt die Massenzunahme in der rechten Herzkammer stimuliert. Die Korrelation zwischen relativem rechtsventrikulärem Gewicht und Infarktgröße kommt in Abb. 10 zur Darstellung. Auch hier repräsentiert die eingezeichnete Kurve keine Korrelationsgleichung. Für den rechten Ventrikel ergab sich ein Korrelationskoeffizient

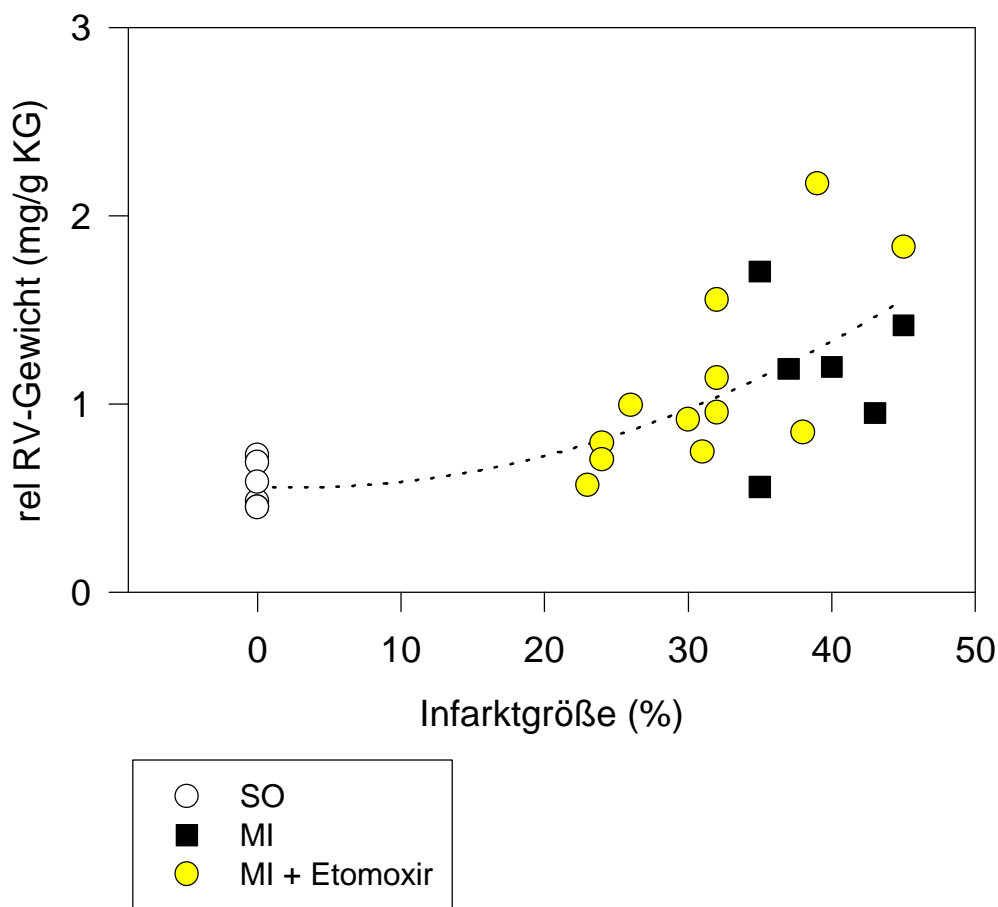
zwischen Infarktgröße (MI- und Etomoxir-Gruppe) und dem relativen rechtsventrikulären Herzgewicht von  $r=0.56$ .



**Abb. 9: Beziehung zwischen Infarktgröße und relativem linksventrikulärem Gewicht**

KG, Körpergewicht; SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; Gerade über alle Werte; Korrelationskoeffizient für Werte der unbehandelten und behandelten Tiere mit Myokardinfarkt:  $r=0.07$ ;  $p>0.05$ ;

Eine Korrelation zwischen Infarktgröße und relativem Ventrikelgewicht ergab sich mit den vorliegenden Meßwerten nicht.



**Abb. 10: Korrelation zwischen Größe des linksventrikulären Infarkts und relativem rechtsventrikulärem Gewicht**

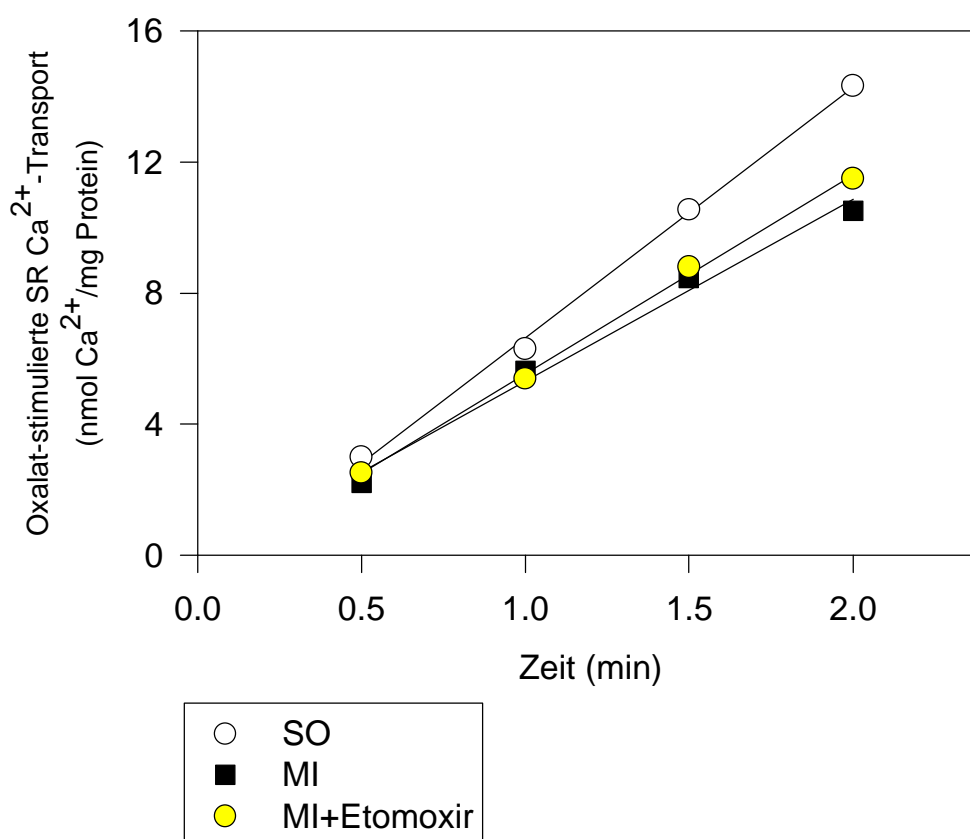
KG, Körpergewicht; SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; Kurve über alle Werte; Korrelationskoeffizient für Werte der unbehandelten und behandelten Tiere mit Myokardinfarkt:  $r=0.56$ ;  $p<0.05$ ;  $n=6-12$

## 6.5 $Ca^{2+}$ -Transport in Membranvesikel des sarkoplasmatischen Retikulums

### 6.5.1 Transportaktivität der SERCA2a in Herzmuskelhomogenaten

Da Störungen des SERCA2a-katalysierten  $Ca^{2+}$ -Rücktransportes ein charakteristisches Kennzeichen bei adaptiver Hypertrophie infolge hämodynamischer Überlastung sind, wurde diese  $Ca^{2+}$ -Transportfunktion des sarkoplasmatischen Retikulums in den verschiedenen

Versuchsgruppen untersucht. Dazu dienten aus linksventrikulärem Gewebe präparierte Homogenate. Für drei repräsentative Proben wird in Abb. 11 die Zeitabhängigkeit des Oxalat-stimulierten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports gezeigt. In 0.5 min Intervallen wurden, nach Zugabe von homogenisiertem Herzgewebe, Proben aus dem  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Reaktionsgemisch entnommen und der bis zu diesem Zeitpunkt erfolgte Transport für  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  bestimmt.



**Abb. 11: Zeitabhängigkeit des Oxalat-stimulierten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes**

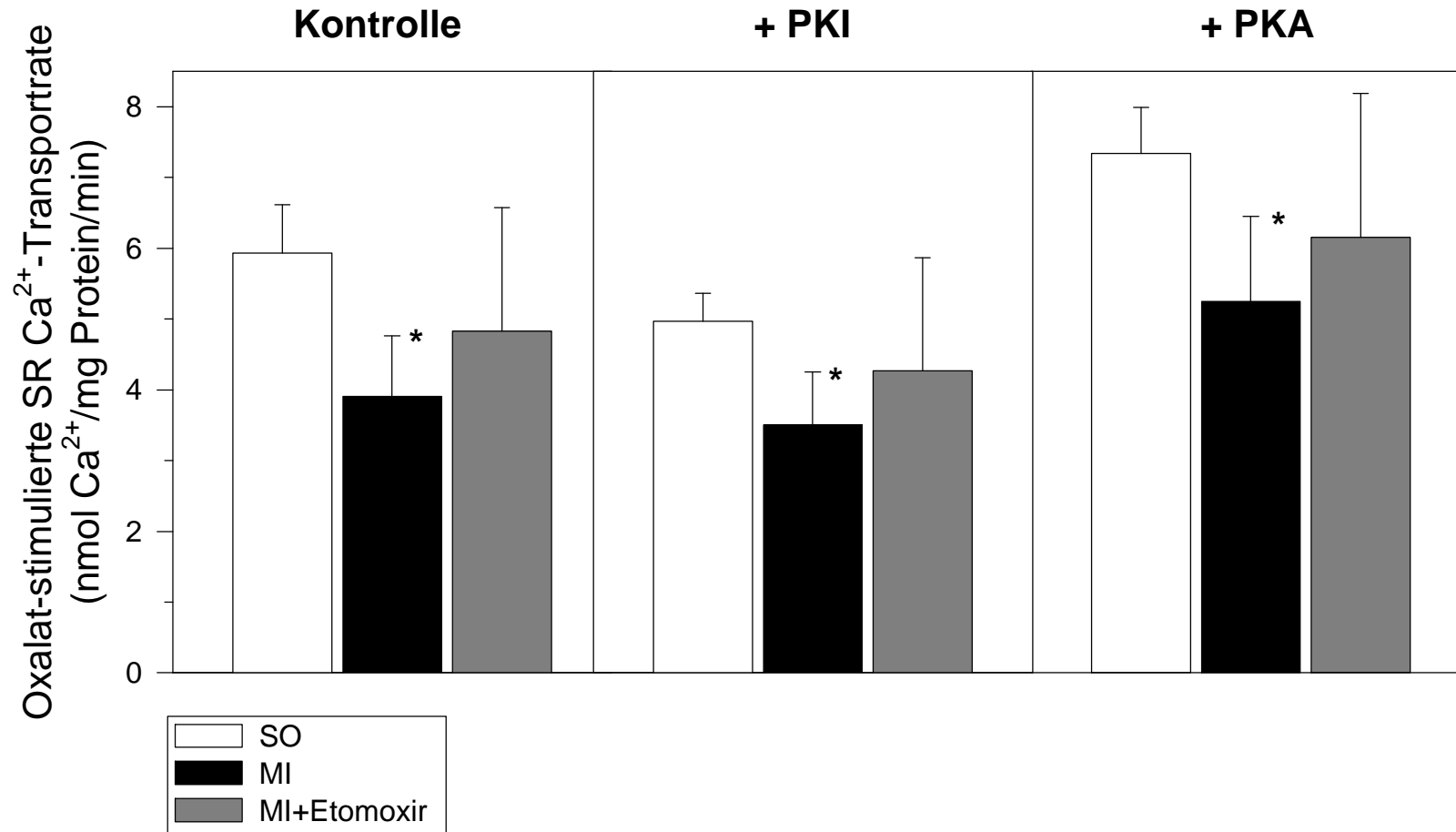
Drei repräsentative Proben aus den Versuchsgruppen. SO, scheinoperiertes Tier; MI, Tier mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tier mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; die Punkte repräsentieren Mittelwerte aus Doppelbestimmungen. Dargestellte Messung erfolgte unter PKA-Einfluß.

Er stieg bei zunehmender Reaktionszeit linear an. Dieser lineare Reaktionsverlauf konnte in allen untersuchten Proben der drei Versuchsgruppen beobachtet werden. In Gegenwart des

---

membranpermeabilisierenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophores A23187 wurde kein Anstieg des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals gemessen. Daran zeigte sich, daß  $\text{Ca}^{2+}$  tatsächlich in Membranvesikel aufgenommen wurde (Ergebnis nicht dargestellt). Darüber hinaus ist zu erkennen, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportwerte in der unbehandelten und behandelten Infarktgruppe deutlich unter den Kontrollwerten des SO-Kollektivs lagen. Dies trifft insbesondere für die Messwerte zu, die 1.5min und 2.0min nach Zugabe des Homogenates zur  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -haltigen Reaktionslösung ermittelt wurden. Die Transportwerte bei den unbehandelten MI-Tieren und unter Etomoxir-Behandlung lagen dagegen eng beieinander. Aus diesen Einzelwerten ließ sich durch lineare Regressionsanalyse die Geschwindigkeit des  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transportes in Membranvesikel des SR bestimmen.

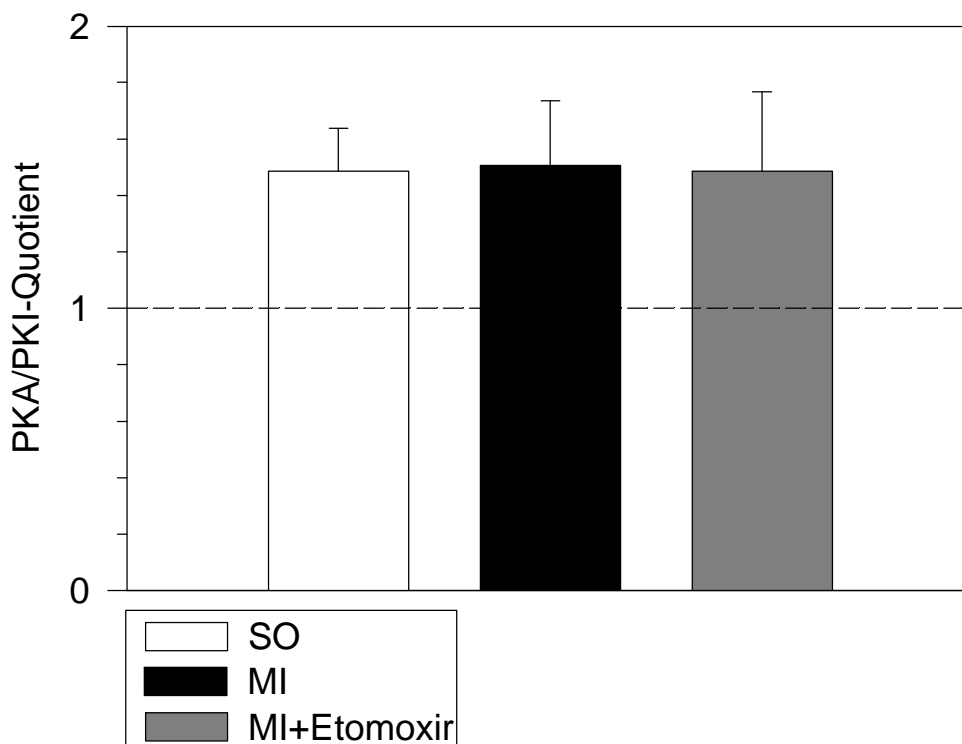
Abb. 12 verdeutlicht, wie sich die oxalatstimulierten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten unter Kontrollbedingungen und nach Zugabe des Peptidinhibitors der Proteinkinase A (PKI) oder Zugabe der katalytischen Untereinheit der Proteinkinase A (PKA) verhalten haben. Der Transport bezieht sich auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge, die pro Milligramm Protein und pro Minute aufgenommen wurde. Unter allen drei Bedingungen war eine deutliche Abnahme der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität in der MI-Gruppe zu sehen. Durch Etomoxirbehandlung konnte dieser verminderte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport nicht signifikant verbessert werden. Auffällig ist jedoch, daß die Streuung der Meßwerte in der Behandlungsgruppe mit einem Variationskoeffizienten von 37.6 % (unter PKI-Zusatz) am größtem war.



**Abb. 12: SR Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivität unter Kontrollbedingungen sowie in Gegenwart von 10  $\mu$ M Peptidinhibitor (PKI) der Proteinkinase A und 2  $\mu$ M katalytischer Untereinheit der Proteinkinase A (PKA)**

Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n=6-12). SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an;

\* p<0.05 vs. SO



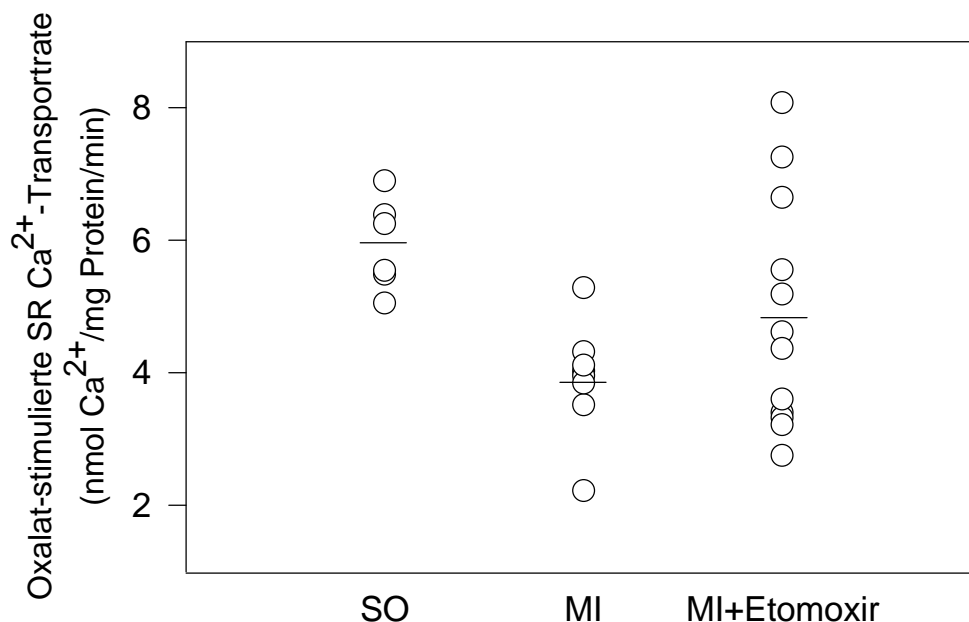
**Abb. 13: Stimulierung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes durch Proteinkinase A-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban**

Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  SD dargestellt. (n=6-12); PKA, 2  $\mu\text{M}$  katalytische Untereinheit der Proteinkinase A; PKI, 10  $\mu\text{M}$  Peptidinhibitor der Proteinkinase A; SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an.

Die Stimulierbarkeit des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes durch die katalytische Untereinheit der Proteinkinase A ist in Abb. 13 dargestellt. Diese Stimulierung erfolgt über PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban. Dadurch wird der inhibitorische Einfluß von nicht-phosphoryliertem Phospholamban auf die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase aufgehoben. Die katalytische PKA-Aktivität der zugegebenen exogenen C-Untereinheit der PKA ist dafür verantwortlich. Durch den Einsatz der enzymatisch aktiven katalytischen Untereinheit der PKA konnte auf den Zusatz des PKA-Aktivators cAMP in der Reaktionslösung verzichtet werden. Endogene, in Homogenaten enthaltene Aktivität ist unter diesen Bedingungen von untergeordneter Bedeutung. Diese in den Homogenaten enthaltene aktivierte PKA kann durch einen PKA-spezifischen Inhibitor ausgeschaltet werden.

Der PKA/PKI-Quotient ist ein Maß für die maximale Zunahme der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate durch PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB *in vitro*. Dieser Wert betrug in allen drei Gruppen nahezu 50%, d.h. unter den gewählten Bedingungen nahm die Geschwindigkeit des Transportes für  $\text{Ca}^{2+}$  in SR-Vesikel beträchtlich zu.

Wegen der auffällig großen Streuung der Meßwerte vor allem in der Etomoxir-behandelten Gruppe, sind in Abb. 14 die Einzelmeßwerte für die Oxalat-stimulierte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate der jeweiligen Gruppen einander gegenübergestellt. Während die Werte in der scheinoperierten Gruppe relativ eng beieinander liegen, nimmt die Streubreite über MI-Gruppe bis zur Etomoxir-Gruppe stark zu.



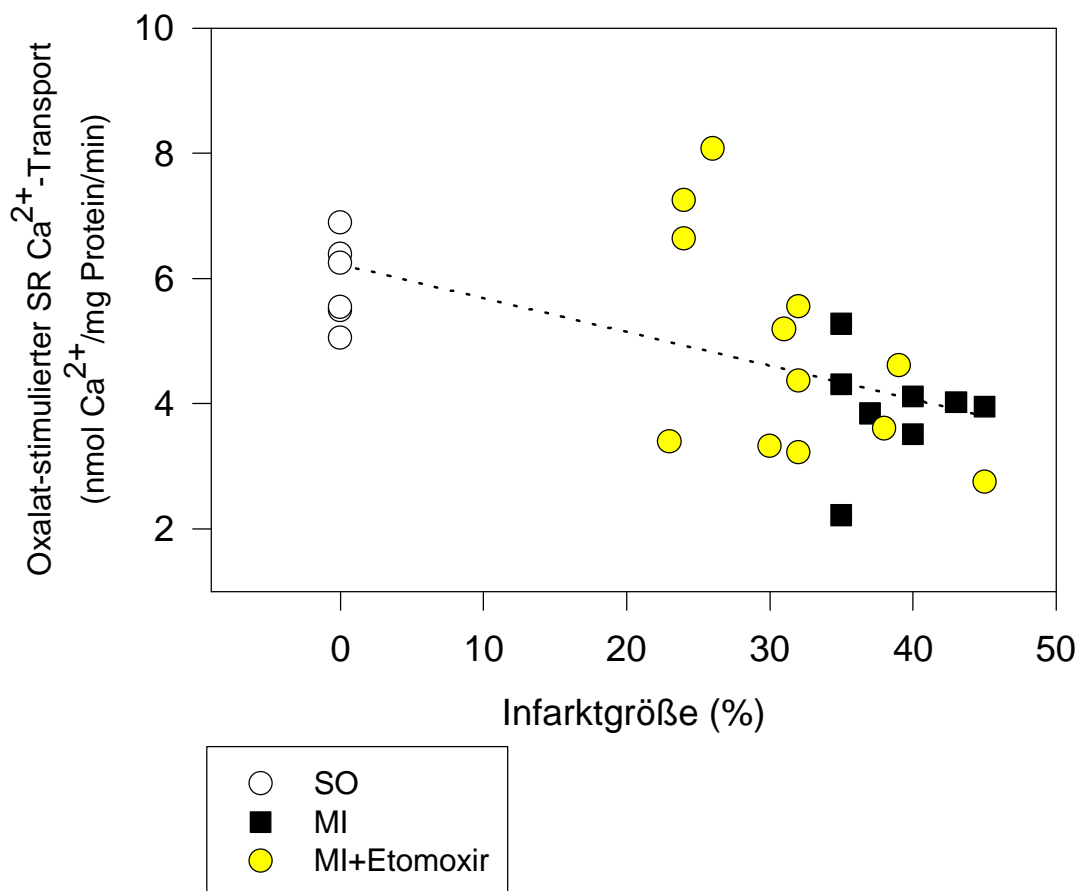
**Abb. 14: Einzelwertdarstellung der Oxalat-stimulierten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportgeschwindigkeit**

Querbalken zeigt den Mittelwert an. SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an. Die  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Reaktionslösung enthielt kein PKA oder PKI.

Bei 5/12 der Infarkttiere konnte durch Etomoxirbehandlung eine MI-bedingte Verminderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität verhindert werden. Dagegen sprachen 7/12 der infarzierten Tiere nicht auf eine Behandlung an.

### **6.5.2 Beziehung zwischen Infarktgröße und $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das sarkoplasmatische Retikulum**

Es wurde vermutet, daß das Ausmaß der kompensatorischen Hypertrophie von der Größe des infarzierten Areals abhängt. Der Hypertrophiegrad kann gegebenenfalls in Beziehung zu den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportveränderungen stehen. Dieser Umstand wurde daher näher untersucht. Die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate war tatsächlich in Abhängigkeit von der Größe des infarzierten Gewebes vermindert. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 15 wiedergegeben. Aufgezeigt sind die Werte unter Kontrollbedingungen, also ohne Zusatz von PKA oder PKI. Je größer das Infarktareal, desto weniger  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  wurde in die SR-Vesikel des überlebenden Myokards gepumpt. In die Grafik eingezeichnet ist eine Gerade, die den Abfall des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes von den scheinoperierten Tieren zu den beiden Infarktgruppen demonstriert. Die Korrelation zwischen Infarktgröße und  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate für die beiden Gruppen MI und MI+Etomoxir ergibt einen Koeffizienten von  $r=0.55$ .

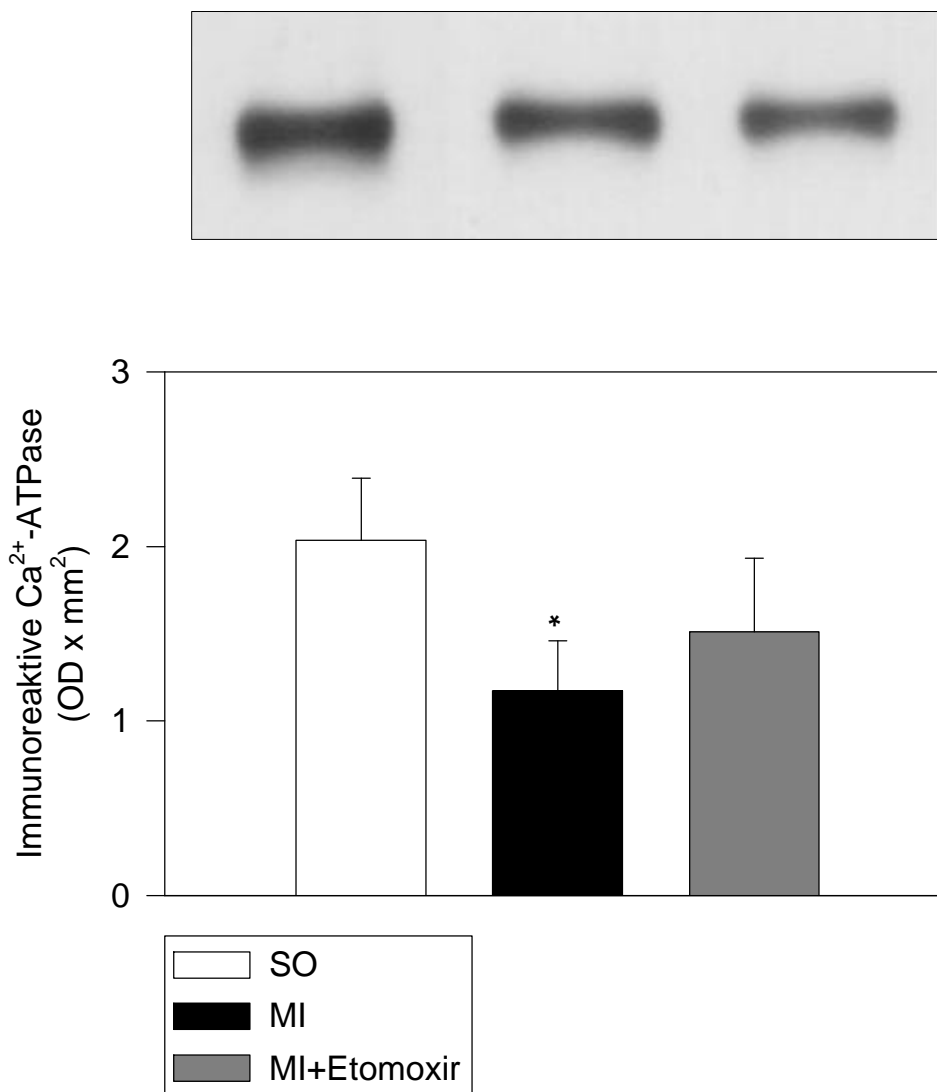


**Abb. 15: Korrelation zwischen Infarktgröße und Oxalat-stimuliertem SR Ca<sup>2+</sup>-Transport**  
 SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; Die <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Reaktionslösung enthielt kein PKA oder PKI.  
 Gerade über alle Werte; Korrelationskoeffizient für Werte der unbehandelten und behandelten Tiere mit Myokardinfarkt:  $r=0.55$ ;  $p<0.05$ ,  $n=6-12$

### 6.6 Western-Blot Analyse der SERCA2a

Um zu prüfen, ob die beobachteten Ca<sup>2+</sup>-Transportveränderungen in Abb. 12 durch eine Veränderung der Ca<sup>2+</sup>-ATPasendichte bedingt war, wurde SERCA2a-Protein detektiert. Diese quantitative Untersuchung erfolgte in der Western-Blot Technik. Eine Bande auf der Nitrozellulose bei 110 kDa wurde mit Hilfe des Molekulargewichtstandards als SERCA2a-Bande identifiziert. An dieser Stelle der NC haftete der polyklonale Antikörper gegen das SERCA2a-Protein. Das Ergebnis dieser quantitativen Messung ist in Abb. 16 dargestellt. Das

immunoreaktive SERCA2a-Signal, vermittelt über die Bindung des zweiten Antikörpers, war in der MI-Gruppe signifikant vermindert. Unter Etomoxir-Behandlung ließen sich keine signifikanten Änderungen, verglichen mit der scheinoperierten Gruppe und der unbehandelten MI-Population, zeigen.



**Abb. 16: Western-Blot Analyse der SERCA2a in Homogenaten**

Oben: Exemplarischer Western-Blot der immunreaktiven SERCA2a. Detektion mittels ECL-Kit. Dargestellt sind drei repräsentative Banden aus den unten aufgezeigten Gruppen.

Unten: Immunreaktives SERCA2a-Signal. Alle Werte sind als Mittelwert  $\pm$  SD dargestellt (n=5-7). SO, scheinoperierte Tiere; MI, Tiere mit unbehandeltem Myokardinfarkt; MI+Etomoxir, Tiere mit Myokardinfarkt und Etomoxir-Behandlung vom ersten postoperativen Tag an; OD, optische Dichte.

\* p<0.01 vs. SO

---

Im vorliegenden Kapitel zu den Ergebnissen wird folgendes deutlich:

Die Infarktgröße zwischen der unbehandelten und mit Etomoxir-behandelten Gruppe mit Myokardinfarkt unterschied sich signifikant. Nach Infarkt kam es sowohl in der MI-Gruppe, als auch in der Etomoxir-Gruppe zu einer Steigerung verschiedener Herzgewichtsparameter im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren. Der relative und absolute Proteingehalt des linken Ventrikels veränderte sich dagegen nicht signifikant. Hämodynamisch betrachtet reagierte das infarzierte, unbehandelte Herz mit einer Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Drucks, während der Kontraktilitätsparameter  $+dP/dt_{\max}$  und der Lusitropieparameter  $-dP/dt_{\min}$  deutlich absanken. Unter sechswöchiger Etomoxir-Behandlung war eine signifikante Änderung gegenüber der SO-Gruppe nur bei der Druckabfallgeschwindigkeit zu ermitteln.

Die qualitative Untersuchung der SR  $Ca^{2+}$ -ATPase als wichtigstem Transporter für die Rückbindung von  $Ca^{2+}$  in der Diastole zeigte eine deutliche Abnahme der  $Ca^{2+}$ -Transportrate im überlebenden Myokard der MI-Gruppe. Eine gleichartige Aussage ließ sich für die Etomoxir-Gruppe nicht treffen.

Abschließend wurde gezeigt, daß die verminderte Transportrate für  $Ca^{2+}$  mit einer Abnahme des SERCA2a-Proteinspiegels korrelierte.

## 7 DISKUSSION

Nach Myokardinfarkt kommt es kompensatorisch zu einer Hypertrophie des überlebenden Herzmuskelgewebes. Bislang sind eine Reihe von Mechanismen und Faktoren bekannt, die dafür verantwortlich sind. Der Übergang einer kompensierten Hypertrophie zur Entwicklung des klinischen Bildes einer Herzinsuffizienz stellt eine vitale Bedrohung für das Individuum dar. Daher sind verschiedene Strategien sinnvoll, die diesen Übergang entweder verhindern oder möglichst lange hinauszögern. Eine Möglichkeit ist der in der vorliegenden Arbeit untersuchte Effekt von chronischer Verschiebung der Substratoxidation von Fettsäuren nach Glukose. Zum einen wurde geprüft, ob das myokardiale „Remodeling“ nach MI durch 6-wöchige Inhibition der Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1 verändert ist. Darüber hinaus wurde untersucht, ob die kontraktile Funktion des linken, infarzierten Ventrikels unter Etomoxir-Behandlung verbessert werden kann. Als weiterer sehr wichtiger Punkt erfolgte die Analyse der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des sarkoplasmatischen Retikulums. Hierbei stand die Beantwortung der Frage im Vordergrund, ob es durch Behandlung mit Etomoxir zu einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen-Dichte und damit verbesserten diastolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückbindung in das SR kommt. Im weiteren Vorgehen werden die Kapitel des Ergebnisteils aufgegriffen und im Zusammenhang mit bereits bekannten Studien betrachtet.

### 7.1 Allgemeine Charakteristika der Versuchstiere

Die Größe des infarzierten Gewebes im linken Ventrikel ist determinierend für die Entwicklung einer Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz. Je umfangreicher der Verlust an vitalem Gewebe, desto stärker muß das verbleibende Myokard kompensatorisch hypertrophieren, desto größer ist allerdings auch die Gefahr für die Entwicklung des klinischen Bildes einer Herzinsuffizienz. Im untersuchten Tiermodell unterschieden sich die Infarktgrößen zwischen den beiden infarzierten Kollektiven deutlich. Bei Berücksichtigung der relativ kleinen Fallzahl kann eine protektive Funktion von Etomoxir auf das Überleben nicht irreversibel geschädigten Myokards postuliert werden. Gerade im ischämisch geschädigten Herzgewebe mit verminderter oxidativer Stoffwechselleistung, könnte eine verstärkte Glukoseoxidation für diesen Effekt verantwortlich sein. In einer Untersuchung verwendeten Litwin und Mitarbeiter anstelle von Etomoxir den weniger wirksamen CPT-1-Hemmstoff Tetracylglyzidat (TDGA). Diese 24 h bzw. 4h vor Infarktinduktion erfolgte Behandlung ergab keine Differenzen im prozentualen

---

Anteil des infarzierten Areals (53). Daraus ist abzuleiten, daß erst die chronische Hemmung der CPT-1 für das Überleben des ischämisch nicht irreversibel geschädigten Myokards verantwortlich ist. Lopaschuk und Mitarbeiter haben gezeigt, daß Etomoxir nach einer Ischämiephase eine erhöhte Glukoseoxidation und einen erhöhten glykolytischen Flux, d.h. eine gesteigerte Utilisation von Glukose, im isolierten, reperfundierten Herzen bewirkt. Darüber hinaus berichtete die Arbeitsgruppe über verringerte Spiegel von langkettigem Acylcarnitin und langkettigem Acyl-Coenzym A nach Myokardinfarkt (55). Diese beiden Fettsäurederivate fallen nach MI verstärkt an und sind für ihre schädigenden Effekte auf mechanische und metabolische Funktionen am Herzen bekannt (38). Die Behandlung mit Etomoxir setzte bei der vorliegenden Arbeit am ersten postoperativen Tag ein. Die Ischämiephase am isolierten Rattenherzen im Versuchsaufbau von Lopaschuk dauerte 25 min. Der CPT-1-Hemmstoff wurde dem Perfusionsmedium entweder kurz vor oder gegen Ende der Ischämiephase zugegeben. Das bedeutet, daß in beiden zum Vergleich herangezogenen Studien der akute Effekt von Etomoxir im Vordergrund stand, während in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung der Langzeitwirkung erfolgte. Eine einfache Übertragung der Resultate ist demnach nicht möglich.

Das Körpergewicht der Versuchstiere variierte vor Infarzierung zwischen 250 g und 350 g. Sechs Wochen nach dem Eingriff ließ sich kein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen SO, MI und Etomoxir feststellen. Bei Untersuchungen von Zimmer und Mitarbeitern wurde die Körpermasse der Ratten vier Wochen nach Infarkt ermittelt. Bei Tieren mit großem Infarkt, der über einen Abfall der linksventrikulären Funktion definiert wurde, kam es zu einem signifikanten Abfall des Körpergewichtes (104). Eine andere Studie ergab hinsichtlich des Körpergewichtes von infarzierten Ratten fünf Wochen nach Infarkt keinerlei Unterschiede zwischen SO- und unbehandelter Myokardinfarkt-Gruppe (80).

Das Herzgewicht der Versuchstiere gilt als Marker für erfolgte myokardiale Zellhypertrophie. Ursache für die Massenzunahme ist eine gesteigerte Proteinbiosynthese und/oder veränderte Degradation von Proteinen (60). Das Zellvolumen kann sich in Herzen, die durch einen großen Infarkt geschädigt wurden, fast verdoppeln (104). In vorliegender Studie nahm das Ventrikelgewicht sowohl in der unbehandelten Gruppe mit MI- als auch in der Etomoxir-Gruppe deutlich zu. Etomoxir vermag die Massenzunahme beider Kammern gegenüber der Nicht-Behandlung nochmals zu steigern. Der Prozeß der Herzvergrößerung ist, wie aus der Literatur zu entnehmen, nur bei größeren Infarkten zu beobachten (104); (80). Erst wenn eine

ausgedehnte Narbe vorliegt, hypertrophiert das Herz signifikant und versucht, den entstandenen Schaden zu kompensieren.

Um der Frage nachzugehen, ob nur der geschädigte linke Ventrikel in den Prozeß der Hypertrophie eingeschlossen war, sind zusätzlich das Gewicht des linken und rechten Ventrikels getrennt ermittelt worden. Eine signifikante Zunahme der LV-Herzmasse ergab sich nur in der Etomoxir-Gruppe. Dies ist deshalb bemerkenswert, da trotz kleinerem Infarktareal unter CPT-1-Hemmung eine stärkere Hypertrophie des LV zu sehen war. Das läßt mit hoher Sicherheit feststellen, daß diese deutliche Hypertrophie auf die 6-wöchige Stoffwechsellumstellung von Fettsäure- auf Glukoseoxidation zurückzuführen ist.

Interessant ist die besonders ausgeprägte Hypertrophieentwicklung des rechten Ventrikels. Die Masse nahm in der unbehandelten Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe noch stärker zu als im Etomoxir-Kollektiv. Verständlich ist, daß der geschädigte LV kompensatorisch hypertrophiert. Eine massive Zunahme des rechtsventrikulären Gewichtes mag Zeichen einer sich entwickelnden pulmonalen Hypertonie sein, die sich begleitend zu ausgedehnten Infarkten offenbart (74). Dafür mitverantwortlich scheint ein erhöhter LVEDP, der zu einem Rückstau von Blut in den kleinen Kreislauf führt und dem rechten Ventrikel einen erhöhten Auswurfwiderstand entgegensetzt. Damit steigt zwangsläufig der Druck im Lungenkreislauf, der in der Folge zu einer Hypertrophie des RV führt. Der MI-bedingte Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Drucks konnte durch die Etomoxir-Behandlung stark vermindert werden (siehe Kap. 7.2). Es ist denkbar, daß unter diesen Bedingungen über einen verminderten Rückstau im kleinen Kreislauf eine Herabsetzung des Auswurfwiderstandes erfolgte. Ein auf diese Weise abgeschwächter hämodynamischer Hypertrophiestimulus kann die verminderte RV-Hypertrophie der Etomoxir-behandelten Tiere erklären.

Bei Relativierung der ermittelten Ventrikelgewichtsdaten durch Bezug auf die Körpermasse, ergaben sich in der vorliegenden Arbeit gleichartige Ergebnisse wie für die absoluten Gewichtsparameter. Bei Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zeigten sich für den LV voneinander abweichende, für den RV gleichartige Ergebnisse wie in dieser Arbeit. Hypertrophie im RV bei ausgedehnten Infarkten wurde von mehreren Autoren beschrieben (2); (53); (104); (80). Auch unter chronischer Inhibition der CPT-1 mit TDGA ließen sich diese Ergebnisse verifizieren (53).

Zur LV-Hypertrophie liegen in den gleichen Studien unterschiedliche Ergebnisse vor. Das Gewichtsverhalten des LV zeigte in der Arbeit von Litwin in der unbehandelten MI-Gruppe eine Abnahme der linksventrikulären Masse (53). In der Untersuchung von Zimmer ergab sich

eine Abnahme des LV-Gewichtes bei Ratten mit großem Infarkt (104), bei Rubin zeigte sich bei Infarkten > 30 % eine Zunahme der Masse der linken Herzkammer (80). In der Arbeit von Afzal und Dhalla nahm vier Wochen nach Induktion eines MI das LV-Gewicht signifikant ab, acht Wochen nach Unterbindung der Koronararterie blieb es konstant und 16 Wochen nach Infarkt stieg die Masse der linken Herzkammer deutlich (2). Wie ist dieses unterschiedliche Reagieren des LV zu erklären? Zum einen bestimmt sicherlich der Zeitpunkt der Messung nach MI die Größe der bis dahin erfolgten Gewichtszunahme. Zum anderen beeinflusst der Umfang des infarzierten Gewebes wesentlich die Ausbildung einer Hypertrophie. Nicht bei allen Untersuchungen wurden Tiere mit direkt vergleichbaren Infarktarealen herangezogen. Außerdem kann es wichtig sein, ob das Gewicht des LV mit dem Septum oder getrennt von diesem gemessen wurde. Nicht in allen Arbeiten ist dies klar herausgestellt worden.

Der absolute Proteingehalt im linken Ventrikel (mg Protein pro g Feuchtgewicht x LV-Gewicht) zeigte in vorliegender Arbeit eine Tendenz zu steigenden Werten von der SO- über die MI- zur Etomoxir-Gruppe. Diese Ergebnisse waren allerdings nicht signifikant. Ein indirekter Nachweis für eine tatsächlich erfolgte Zunahme des Proteingehaltes ist der deutliche Anstieg des LV-Gewichtes im Etomoxir-Kollektiv. Mit hoher Sicherheit ist anzunehmen, daß dieses durch eine gesteigerte Proteinsynthese verursacht worden ist. Bei Betrachtung der Proteinkonzentration, also dem Bezug des Proteingehaltes pro Gramm Feuchtgewicht der linken Herzkammer, läßt sich eine Gewichtszunahme der Herzkammer durch Flüssigkeitseinlagerung oder nicht-proteinhaltiges Material weitgehend ausschließen. In allen drei Gruppen war der relative Proteingehalt nämlich konstant.

Abschließend kann insbesondere festgehalten werden, daß die Infarktgröße nach chronischem Infarkt zwischen MI-Gruppe und Etomoxir-Behandlung einen signifikanten Unterschied zeigte. Eine 6-wöchige Behandlung mit Etomoxir hat demzufolge vermutlich einen protektiven Effekt auf das durch den Infarkt nicht irreversibel zerstörte Myokard. Deutlich ist in den beiden Kollektiven mit Infarkt die erfolgte myokardiale Hypertrophie des RV nachweisbar, während die Hypertrophie im LV nur unter CPT-1-Inhibition signifikant war.

## 7.2 Hämodynamik- und Frequenzmessung

Die Charakterisierung der Hämodynamik geschieht in der vorliegenden Arbeit durch vier repräsentative Parameter. Zum einen ist dies der LVEDP, welcher bei einer gestörten  $Ca^{2+}$ -Homöostase in der Diastole ansteigt. Als Folge kommt es zu erhöhter Steifigkeit des

Ventrikels, die eine Ursache für diastolische Funktionsstörungen ist (18). Ein Kontraktilitäts- bzw. Inotropieparameter des Herzens ist die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, während die Druckabfallgeschwindigkeit die Lusitropie des Myokards charakterisiert. Im infarzierten Herzen ist ein Teil des Arbeitsmyokards irreversibel geschädigt. Die Narbe nimmt nicht mehr an der Auswurfarbeit teil, die überlebenden Myozyten können sich dementsprechend nicht adäquat kontrahieren und relaxieren. Als Folge treten systolische und diastolische Funktionsstörungen auf. Der aortale Blutfluß, der als vierter hämodynamischer Parameter gemessen wurde, liefert eine Aussage über das Herzminutenvolumen. Der im aufsteigenden Teil der Aorta ermittelte AF nimmt ab, wenn der geschädigte Ventrikel außerstande ist, für einen ausreichenden Blutausschlag zu sorgen und folglich eine konstante Strömung in der Hauptschlagader nicht mehr gewährleistet wird.

Das insuffiziente Herz steht unter dem Einfluß einer verstärkten sympathischen Stimulation. Einerseits wird dadurch die Kontraktilität des Myokards gesteigert, andererseits die Herzfrequenz erhöht. Letzteres führt zu einer verminderten Systolen- und Diastolendauer, was sich negativ auf die Herzfunktion auswirken kann. Insbesondere bei ischämisch vorgeschädigten Herzen kann eine verstärkte  $\beta$ -Stimulation mit einem erhöhten  $O_2$ -Verbrauch kritisch sein (79).

In dieser Studie war der LVEDP in der MI-Gruppe sechs Wochen nach Infarkt deutlich erhöht. Diese Steigerung unterblieb dagegen im Etomoxir-behandelten Kollektiv. Der CPT-1-Hemmstoff vermag demnach zu verhindern, daß eine pathologische diastolische Druckbelastung des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt auftritt. Als Ursache kommt die niedrigere Infarktgröße bei den Etomoxir-behandelten Tieren in Betracht, da bei einem kleinen Infarktareal weniger mit dem Entstehen einer Insuffizienz zu rechnen ist. Der verhinderte Anstieg des LVEDP ist daher nur ein indirekter Nachweis für eine Wirkung des CPT-1-Inhibitors am Herzen. Im Vergleich der vorliegenden Arbeit mit Studien anderer Arbeitsgruppen ergaben sich hinsichtlich des LVEDP Gemeinsamkeiten. In verschiedenen Studien zeigten sich vier bis sechzehn Wochen nach MI eine Zunahme des LVEDP um den Faktor drei bis neun verglichen mit dem Kontrollwert (2); (53); (104); (20); (19). Unter chronischer Hemmung der Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1 durch Gabe von 20 mg/kg KG/d TDGA konnte der LVEDP deutlich gegenüber der MI-Population gesenkt werden (53). Von Etomoxir, einem wesentlich potenteren Hemmstoff, reichten 8 mg/kg KG/d aus, um einen gleichartigen Effekt zu erhalten.

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit war nur in der MI-Gruppe gegenüber den scheinoperierten Tieren signifikant vermindert. Es läßt sich feststellen, daß systolische Funktionsstörungen unter chronischer CPT-1-Hemmung nicht auftreten. Dagegen sank die maximale Druckabfallgeschwindigkeit sowohl in der MI-Gruppe, als auch bei den Etomoxir-behandelten Tieren. Folglich kann davon ausgegangen werden, daß nach Infarkt eine Dysfunktion der myokardialen Relaxation vorliegen muß. Gestützt wird diese Vermutung durch die Messung verschiedener muskelmechanischer Relaxationsparameter, die an linksventrikulären Papillarmuskelpräparaten von infarzierten Rattenherzen aus der gleichen Versuchsserie durchgeführt wurden (Kap. 6.3). Bei einer Infarktgröße von größer 40 % verlängerte sich die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit ( $T[dF/dt_{\min}]$ ) in der unbehandelten und Etomoxir-behandelten Gruppe gegenüber der scheinoperierten Gruppe signifikant. Außerdem nahm die Zeit bis zur halbmaximalen Kraftrelaxation  $RT_{50}$ , in beiden Kollektiven gegenüber der SO-Gruppe ebenso deutlich zu. Es ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Gruppen mit Myokardinfarkt feststellen. Für den Quotienten aus maximaler Relaxationsgeschwindigkeit und der zu diesem Zeitpunkt entwickelten Kraft ( $[dF/dt_{\min}]/F$ ) ergab sich keine Änderung zwischen den drei Tierkollektiven. Die verlangsamte Relaxation der Papillarmuskel aus dem linken Ventrikel sind Anzeichen dafür, daß eine rasche Rückbindung systolisch freigesetzten  $Ca^{2+}$  in das SR gestört ist. Dadurch bedingt wird die Interaktion zwischen den kontraktile Proteinen Aktin und Myosin erst später beendet. Eine diastolische Funktionsstörung des Myokards ist die Folge. Verminderte  $+dP/dt_{\max}$  und  $-dP/dt_{\min}$  zwischen SO und unbehandeltem Kollektiv mit MI bestätigten eine Reihe von früheren Publikationen (2); (53); (104); (20); (19). Einen Kontrast zu den ermittelten Ergebnissen zeigte die Arbeit von Litwin. Unter TDGA-Behandlung trat hier ein Abfall von  $+dP/dt_{\max}$  auf. Allerdings begann die Therapie erst am dritten Tag nach Infarzierung für eine Dauer von zehn Tagen. Zur maximalen Druckabfallgeschwindigkeit gibt es in der Studie von Litwin keine Angaben (53).

Der aortale Blutfluß zeigte in der vorliegenden Studie keine Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Dem entspricht ein ähnlicher Blutausswurf des linken Ventrikels in allen beobachteten Kollektiven. Es ist deshalb anzunehmen, daß es bei den untersuchten Tieren nach dem Infarkt zu keiner Dekompensation des LV gekommen ist. Einschränkend muß auf den Umstand hingewiesen werden, daß die Messung des AF in Narkose erfolgte. Dadurch waren die Tiere keiner körperlichen Belastung ausgesetzt. Der linke Ventrikel war somit unter Ruhebedingungen in seiner Auswurfarbeit nicht beeinträchtigt. Wie sich dieser Parameter unter

Belastung verhalten hätte, bleibt offen. Messungen an wachen Tieren, die tatsächliche (patho)-physiologische Bedingungen besser widerspiegeln, wurden wegen zusätzlicher starker Belastung der Tiere unterlassen.

Die Herzfrequenz ist ein verlässlicher Indikator für die vegetative Innervation des Herzens. Eine erhöhte Stimulation durch den Sympathikus konnte über die Messung der Herzfrequenz nicht nachgewiesen werden. In allen drei Gruppen zeigte die mittels EKG ermittelte Frequenz keine signifikanten Unterschiede. Zu beachten ist, daß auch die EKG-Ableitung in Narkose durchgeführt wurde. Es ist bekannt, daß verwendetes Xylazin einen kardiodepressiven Effekt hat. Ketamin dagegen erhöht die sympathische Aktivität, mit der Folge einer gesteigerten Herzfrequenz und einem Anstieg des Blutdrucks (93). Es ist nicht auszuschließen, daß sich die gegenteiligen Effekte der zwei Substanzen in der vorliegenden Studie aufheben. In der Arbeit von Zimmer änderte sich die HF auch bei schweren Infarkten nicht (104). In drei weiteren Untersuchungen ergab sich keine Änderung dieses Parameters vier und acht Wochen nach Infarkt (2); (20); (19). Hervorzuheben ist, daß auch durch 10tägige CPT-1-Inhibition mittels TDGA die HF nach MI nicht signifikant beeinflusst wurde (53). Im Gegensatz zu diesen Daten wurde 16 Wochen nach Infarkt eine Verminderung der HF gefunden (2); (20); (19).

Zusammenfassend läßt sich festhalten, daß eine Etomoxir-bedingte Stoffwechselumstellung von Fettsäure- nach Glukoseoxidation über einen Zeitraum von sechs Wochen zu einer deutlichen Verbesserung der kontraktile Funktion infarzierter Herzen führte. Das trifft insbesondere für die myokardiale diastolische Wandspannung und  $+dP/dt_{max}$  im LV zu, während die Veränderung von  $-dP/dt_{min}$  nicht signifikant war. Herzfrequenz und aortaler Fluß zeigten keine signifikanten Veränderungen zwischen den drei Gruppen. Gerade der nicht veränderte AF läßt auf einen hämodynamisch weitgehend stummen Verlauf des „Remodeling“ schließen.

### **7.3 Beziehung zwischen Infarktgröße und Hypertrophie**

Mit zunehmender Größe des Infarktareals muß immer mehr Myokard funktionell ersetzt werden. Ein guter Parameter für eine erfolgte myokardiale Hypertrophie ist die Massenzunahme des Herzens bezogen auf das Körpergewicht (KG). Deshalb wurde untersucht, ob es eine Wechselbeziehung zwischen den relativen Herzgewichten und der Infarktgröße gab. Eine statistisch signifikante Korrelation konnte nur zwischen dem RV-Gewicht pro KG und der Infarktgröße gezeigt werden. Einschränkend ist festzustellen, daß bei

dieser Studie nur Infarktgrößen von 20-45 % berücksichtigt wurden. Diese Spannbreite scheint zu gering, um eine eindeutige Wechselbeziehung zwischen den Ventrikelgewichten pro KG und der prozentualen Größe des infarzierten Gewebes nachzuweisen. Darüber hinaus wurden in der MI-Gruppe aus technischen Gründen nur sechs statt acht Meßwerte für den rechten und linken Ventrikel ermittelt.

Literaturbefunde zeigen, daß es als Kompensationsmechanismus nach MI zur Hypertrophie und damit Gewichtszunahme des linken und auch rechten Ventrikels kommt. Allerdings wird in der ersten Zeit nach Infarkt das Narbengewebe funktionell ersetzt, bevor es im weiteren Verlauf zu einer ausgedehnten Hypertrophie beider Kammern kommt (19).

#### **7.4 Ca<sup>2+</sup>-Transport in das sarkoplasmatische Retikulum und Western-Blot Analyse**

In das Zytosol freigesetztes Ca<sup>2+</sup> wird wieder in die intrazellulären Speicherkompartimente gepumpt und über das Sarkolemm aus der Zelle befördert. Der mit Abstand größte Teil wird in einem energieabhängigen Prozeß in das SR zurückgepumpt, der von der Ca<sup>2+</sup>-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums katalysiert wird. Im Rattenmyokard sind das fast 90 % der gesamten bewegten Ca<sup>2+</sup>-Menge im Verlauf eines Herzzyklus. Dabei spielt das Modulatorprotein Phospholamban eine wichtige Rolle, da dessen inhibitorischer Einfluß auf die SERCA2a durch Phosphorylierung/Dephosphorylierung kontrolliert wird. Die Phosphorylierung von Phospholamban erfolgt in erster Linie durch Proteinkinase A am Serinrest 16. In vorliegender Arbeit wurde die Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivität des SR durch Messung des Oxalat-stimulierten SR Ca<sup>2+</sup>-Transportes in Homogenaten bestimmt. Damit der gemessene Oxalat-stimulierte SR Ca<sup>2+</sup>-Transport tatsächlich die SR Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivität charakterisiert, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Um die Geschwindigkeit des Transportes von Ca<sup>2+</sup> in SR-Vesikel zu bestimmen, wurden die Meßwerte im linearen Teil der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahmekurve erfaßt. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen war die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahmekurve über vier bis fünf Minuten linear. Die Messungen vorliegender Arbeit erfolgten 0.5 bis 2 min nach Zugabe des Homogenates zur Reaktionslösung. Die in den Homogenaten vorliegende Ca<sup>2+</sup>-abhängige ATPase-Aktivität der Mitochondrien wurden durch den Zusatz des Hemmstoffs NaN<sub>3</sub> ausgeschaltet. Kontrolluntersuchungen hatten zudem gezeigt, daß eine Inhibition der Ca<sup>2+</sup>-Pumpe des Sarkolemmes keinen signifikanten Einfluß auf die gemessenen Ca<sup>2+</sup>-Transportraten bewirkte.

Mehrere Faktoren können für eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität verantwortlich sein. Zum einen kann eine reduzierte Phospholambanaktivität und/oder eine reduzierte Phospholamban-Phosphorylierung durch Proteinkinasen Ursache herabgesetzter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten sein. Ebenso denkbar sind Einflüsse toxischer Metabolite, die nach MI verstärkt anfallen und eine Störung der Lipid/Protein-Wechselwirkung zur Folge haben. Diese Möglichkeit der Einflußnahme kann in der vorliegenden Arbeit nicht ausgeschlossen werden. Letztlich ist neben vielen noch unklaren Mechanismen auch die verminderte Expression von SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasemolekülen in Betracht zu ziehen. Um aufzuzeigen, daß die verminderte Transportaktivität bedingt ist durch eine reduzierte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasekonzentration, erfolgte die Western-Blot Analyse zur quantitativen Bestimmung dieses Transporters.

In der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, daß ein deutlicher Abfall des Oxalat-stimulierten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes in der unbehandelten MI-Gruppe auftrat. Auch bei Inhibition der endogenen Proteinkinase A-Aktivität bzw. Zugabe von katalytischer Untereinheit der PKA nahm die Transportrate signifikant ab. Nach MI kommt es demnach vermutlich zu einer verminderten Expression der SERCA2a. Dafür spricht, daß die verminderte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate in der MI-Gruppe mit einem Abfall der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Konzentration korrelierte.

Unter der Behandlung mit Etomoxir ließ sich für keine Bedingung eine signifikante Änderung der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität im Vergleich zur SO-Gruppe feststellen. Für den durch Western-Blot Analyse ermittelten Proteinspiegel zeigte sich im Etomoxir-behandelten Kollektiv kein signifikanter Abfall. Hemmung der CPT-1 über mehrere Wochen ging also mit einer erhöhten Konzentration an SERCA2a einher. Das Ergebnis ist folgendermaßen zu interpretieren: Unter der 6-wöchigen Inhibition der CPT-1 kam es anscheinend zu einer verstärkten Expression von SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmolekülen, deren Konzentration aber nicht die in der Vergleichsgruppe SO erreichte. Die unter Etomoxir-Behandlung erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Konzentration erklärt die beobachteten verbesserten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten. Allerdings muß einschränkend gesagt werden, daß die Einzelwerte für die Transportraten gerade im Etomoxir-Kollektiv einer starken Streuung unterworfen waren. Die Ursache hierfür ist unklar. Eventuell reagierte das Myokard der Versuchstiere individuell auf die Gabe von Etomoxir. Darüber hinaus ist nochmals auf die geringere Infarktgröße in der Etomoxir-Gruppe hinzuweisen. Ein weniger geschädigter Herzmuskel vermag eine größere Menge  $\text{Ca}^{2+}$  pro Zeiteinheit in das SR zu pumpen, wie eindrucksvoll in einer Studie nachgewiesen werden konnte (2). In vorliegender

Arbeit ließ sich die Wechselbeziehung zwischen Infarktgröße und Oxalat-stimulierter SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate deutlich zeigen (Abb. 15).

Darüber hinaus konnte in allen drei Gruppen kein Unterschied in der maximalen Stimulation des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes durch Zugabe von katalytischer Untereinheit der Proteinkinase A gesehen werden. Es wird deutlich, daß die Proteinkinase A einen wesentlichen Faktor für die Phosphorylierung von Phospholamban und der Aktivierung der SERCA2 darstellt. Mögliche Schädigungen der Signaltransduktion nach Myokardinfarkt scheinen demzufolge keinen Einfluß auf die Regulation der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpfunktion durch PKA-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban zu haben.

Im folgenden soll beschrieben werden, wie sich der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport und die semiquantitative Bestimmung der SERCA2a verglichen mit anderen Publikationen darstellen. Hinzu kommt die Betrachtung von in dieser Arbeit nicht ermittelten SERCA2a-mRNA-Spiegel. In dem Modell der linksventrikulären Drucküberlastung, das nicht ohne weiteres übertragbar ist auf das Infarktmodell, kam es nach kurzer Zeit zu einer Hypertrophie der linken Herzkammer (15). Einen Monat nach Operation sank der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in stark hypertrophierten Herzen im Vergleich zur SO-Gruppe signifikant. Damit korrelierte ein erniedrigter SERCA2a-mRNA-Spiegel, dem als Ursache vermutlich eine verminderte Expression des die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase kodierenden Gens zugrunde lag. Daneben war der SERCA2a-Proteinspiegel deutlich abgesunken. Bei gemäßigter Hypertrophie, die definiert wurde für alle Tiere mit einem LV/KG-Quotienten kleiner 2,6, erfolgte keine Änderung im Protein- und mRNA-Spiegel. Lediglich die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate zeigte geringere Werte. Es kann der Schluß gezogen werden, daß nur bei starker Hypertrophie des Myokards eine verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate mit einem erniedrigten SERCA2a-mRNA-Spiegel einhergeht.

Das gleiche Hypertrophiemodell wurde in einer anderen Studie zur Untersuchung der Wirkung von Etomoxir herangezogen (81). Hierbei ergab sich unter 12-13wöchiger Behandlung mit Etomoxir ein Wiederanstieg der gesunkenen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -stimulierten ATPase-Aktivität. Die Hemmung der CPT-1 steigerte die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Aktivität von unbehandelten, drucküberlasteten Herzen auf fast den dreifachen Wert. Zarain-Herzberg und Mitarbeiter berichteten über eine Steigerung der kardialen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nach acht Wochen Behandlung mit Etomoxir im Vergleich zu drucküberlasteten Tieren ohne Behandlung. Ebenso deutlich fiel das Ergebnis für die Untersuchung der SERCA2a-mRNA aus (103). Inhibition der CPT-1

bewirkt diesen beiden Arbeiten zufolge in drucküberlasteten Herzen eine erhöhte Expression der SERCA2a.

Das Modell der linksventrikulären Drucküberlastung ist allerdings, wie schon oben bemerkt, nur bedingt übertragbar auf die kompensatorische Massenzunahme des Herzens nach Myokardinfarkt. Es ist weitgehend unklar, ob die myokardialen Wachstumsfaktoren in beiden Modellen die gleichen sind. Daher stellt sich folgende Frage: Wie verhält sich die für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase so wichtige SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase nach chronischem Infarkt? Zwei Studien versuchten darauf eine Antwort zu geben (102); (2). In beiden Arbeiten sind Messungen vier, acht und sechzehn Wochen nach Infarkt durchgeführt worden. Bei Afzal und Dhalla war in allen LV-Homogenaten mit einer LV-Mindestinfarktgröße von 15 % die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme signifikant vermindert (2). Die Arbeit von Zarain-Herzberg enthält die Darstellung der SERCA2a-mRNA- und Proteinspiegel. Der Ribonukleinsäurespiegel nahm schon nach vier Wochen merklich ab und blieb auch acht und sechzehn Wochen nach MI vermindert. Dagegen war die Proteinkonzentration nur nach acht und sechzehn Wochen signifikant gesenkt (102). Es scheint, daß die Analyse der mRNA sowie der Transportrate für  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR ein sensitiverer Marker für eine Schädigung des Myokards ist als der SERCA2a-Proteinspiegel. Warum die Proteinkonzentration längere Zeit nach MI erhöht bleibt ist nicht bekannt. Nach dem bisherigen Kenntnisstand in der Literatur ist die Langzeitwirkung von Etomoxir auf die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Aktivität bei infarziertem Myokard bislang nicht untersucht worden.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückbindung in das SR unter 6-wöchiger Behandlung mit Etomoxir verbessert werden konnte. Dies zeigte sich in einem höheren SERCA2a-Proteinspiegel und verbesserten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten, jeweils im Vergleich zu dem unbehandelten Kollektiv mit Myokardinfarkt.

## 8 ZUSAMMENFASSUNG

Zur Charakterisierung der myokardialen SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität nach experimentellem Myokardinfarkt wurde 10-15 Wochen alten Ratten die linke Koronararterie unterbunden und sechs Wochen später die Funktion und Expression der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums untersucht. Ein Teil der Tiere wurde mit dem Carnitin-Palmitoyl-Transferase-1-Inhibitor Etomoxir behandelt, der die mitochondriale Oxidation von langkettigen Fettsäuren hemmt und dadurch verstärkt Glukoseoxidation bewirkt. Diese Stoffwechsellage sollte die Schädigung der myokardialen Funktion und die gestörte zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase nach Myokardinfarkt vermindern.

Die mit Etomoxir behandelten Tiere wiesen nach sechs Wochen eine deutlich verminderte Infarktgröße auf. Durch die CPT-1-Hemmung entstand eine starke biventrikuläre Hypertrophie. Darüber hinaus ergaben sich Hinweise auf den Erhalt einer normalen Wandspannung des linken Ventrikels und einer verbesserten Kontraktilität gegenüber der unbehandelten Gruppe.

Unter Etomoxir zeigte die für die diastolische  $\text{Ca}^{2+}$  Senkung verantwortliche ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückbindung in das SR verbesserte Transportraten. Damit korrelierte der immunchemisch gemessene erhöhte SERCA2a-Proteinspiegel.

Die Ergebnisse lassen vermuten, daß es infolge einer Behandlung mit Etomoxir nach Myokardinfarkt zu einer verbesserten Zellstoffwechsellage des ischämisch nicht irreversibel geschädigten Myokards kommt. Dafür scheint die verstärkte Glukoseoxidation bei Hemmung der Oxidation langkettiger Fettsäuren im Herzmuskel verantwortlich zu sein. Die Größe des infarzierten Areals wird begrenzt, dadurch lassen sich zum Teil verbesserte hämodynamische Parameter und gesteigerte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten und SERCA2a-Proteinspiegel erklären. Auf die Hämodynamik hat sicherlich auch die durch Etomoxir erfolgte myokardiale Hypertrophie einen wesentlichen Einfluß.

Für weitere Studien bleibt abzuklären, durch welchen Mechanismus Etomoxir seine verbessernde Wirkung nach Myokardinfarkt entfaltet. Außerdem ist zu prüfen, ob nach akutem Myokardinfarkt beim Menschen mit dem Prinzip der chronischen Verschiebung der myokardialen Substratverwertung von Fettsäure- nach Glukoseoxidation eine verbesserte Überlebensrate und das Hinauszögern bzw. Verhindern einer Dekompensation des Herzens zu erreichen ist.

---

## 9 LITERATURVERZEICHNIS

- (1) Adams, R.J., Cohen, D.W., Gupte, S., Johnson, J.D., Wallick, E.T., Wang, T., und Schwartz, A. (1979). In vitro effects of palmitylcarnitine on cardiac plasma membrane Na,K-ATPase, and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase and Ca<sup>2+</sup> transport. *J. Biol. Chem.* 254 (24): 12404-12410.
- (2) Afzal, N. und Dhalla, N.S. (1992). Differential changes in left and right ventricular SR calcium transport in congestive heart failure. *Am. J. Physiol.* 262 (3 Pt 2): H868-874.
- (3) Anger, M., Samuel, J.L., Marotte, F., Wuytack, F., Rappaport, L., und Lompré, A.M. (1994). In situ mRNA distribution of sarco(endo)plasmic reticulum Ca(2+)-ATPase isoforms during ontogeny in the rat. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26: 539-550.
- (4) Anversa, P., Beghi, C., Kikkawa, Y., und Olivetti, G. (1985a). Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am. J. Pathol.* 118 (3): 484-492.
- (5) Anversa, P., Loud, A.V., Levicky, V., und Guideri, G. (1985b). Left ventricular failure induced by myocardial infarction. *Am. J. Physiol.* 248: H883-H889.
- (6) Anversa, P., Beghi, C., Kikkawa, Y., und Olivetti, G. (1986). Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ. Res.* 58 (1): 26-37.
- (7) Anversa, P., Capasso, J.M., Sonnenblick, E.H., und Olivetti, G. (1990). Mechanisms of myocyte and capillary growth in the infarcted heart. *Eur. Heart J.* 11 (Suppl B): 123-132.
- (8) Bers, D.M., Bassani, J.W., und Bassani, R.A. (1993). Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes. *Cardiovasc. Res.* 27 (10): 1772-1777.

- 
- (9) Brandl, C.J., Green, N.M., Korczak, B., und MacLennan, D.H. (1986). Two Ca<sup>2+</sup> ATPase genes: homologies and mechanistic implications of deduced amino acid sequences. *Cell* 44 (4): 597-607.
- (10) Braunwald, E. (1988). Pathophysiology of heart failure. In: Heart disease. Hrsg.: E. Braunwald. Philadelphia PA, USA: *Saunders*, 426-448.
- (11) Brilla, C.G. und Maisch, B. (1994). Regulation of the structural remodeling of the myocardium: from hypertrophy to heart failure. *Eur. Heart J.* 15 (Suppl D): 45-52.
- (12) Carafoli, E. (1985). The homeostasis of calcium in heart cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 17: 203-212.
- (13) Carré, F., Rannou, F., Sainte Beuve, C., Chevalier, B., Moalic, J.M., Swynghedauw, B., und Charlemagne, D. (1993). Arrhythmogenicity of the hypertrophied and senescent heart and relationship to membrane proteins involved in the altered calcium handling. *Cardiovasc. Res.* 27: 1784-1789.
- (14) Chien, K.R., Knowlton, K.U., Zhu, H. und Chen, S. (1991). Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* 5: 3037-3046
- (15) De La Bastie, D., Levitsky, D., Rappaport, L., Mercadier, J.J., Marotte, F., Wisnewsky, C., Brovkovich, V., Schwartz, K., und Lompré, A.M. (1990). Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca<sup>2+</sup>-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ. Res.* 66: 554-564.
- (16) Dhalla, N.S., Dixon, I.M., Rupp, H., und Barwinsky, J. (1991). Experimental congestive heart failure due to myocardial infarction: sarcolemmal receptors and cation transporters. *Basic Res. Cardiol.* 86 (Suppl 3): 13-23.
- (17) Dhalla, N.S., Elimban, V., und Rupp, H. (1992). Paradoxical role of lipid metabolism in heart function and dysfunction. *Mol. Cell. Biochem.* 116 (1-2): 3-9.

- 
- (18) Dietz, R. (1992). Ätiologie und Pathogenese. In: Herzinsuffizienz. Hrsg.: R. Dietz. Berlin, Heidelberg: *Springer-Verlag*, 17-23.
- (19) Dixon, I.M., Lee, S.L., und Dhalla, N.S. (1990). Nitrendipine binding in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Circ. Res.* 66 (3): 782-788.
- (20) Dixon, I.M., Hata, T., und Dhalla, N.S. (1992). Sarcolemmal calcium transport in congestive heart failure due to myocardial infarction in rats. *Am. J. Physiol.* 262: H1387-H1394.
- (21) Duerr, R.L., McKirman, M.D., Gim, R.D., Clark, R.G., Chien, K.R., und Ross, J. (1996). Cardiovascular effects of insulin-like growth factor-1 and growth hormone in chronic left ventricular failure in the rat. *Circulation* 93 (12): 2188-2196.
- (22) Ebashi, S. (1961). Calcium binding activity of vesicular relaxing factor. *J. Biochem.* 50: 236-244.
- (23) Eistetter, K. und Wolf, H.P.O. (1986). Etomoxir. *Drugs of the Future* 11: 1034-1036.
- (24) Erdmann, E. und Böhm, M. (1989). Positive inotropic stimulation in the normal and insufficient human myocardium. *Basic Res. Cardiol.* 84 (Suppl 1): 125-133.
- (25) Ertl, G., Gaudron, P., Eilles, C., und Kochsiek, K. (1993). Epidemiologie und Prognose des Myokardinfarktes und der chronischen Herzinsuffizienz. *Herz.* 18 (Suppl 1): 406-415.
- (26) Fabiato, A. und Fabiato, F. (1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J. Physiol. Lond.* 249 (3): 469-495.
- (27) Feldman, A.M., Weinberg, E.O., Ray, P.E., und Lorell, B.H. (1993). Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ. Res.* 73: 184-192.

- 
- (28) Fisher, R.B. und Williamson, J.R. (1961). The effect of insulin, adrenaline and nutrients on the oxygen uptake of the perfused rat heart. *J. Physiol.* 158: 102-112.
- (29) Fletcher, P.J., Pfeffer, J.M., Pfeffer, M.A., und Braunwald, E. (1981). Left ventricular diastolic pressure-volume relations in rats with healed myocardial infarction. Effects on systolic function. *Circ. Res.* 49 (3): 618-626.
- (30) Fritz, I., Kaplan, E., und Yue, K. (1962). Specificity of carnitine action on fatty acid oxidation by heart muscle. *Am. J. Physiol.* 202: 117-121.
- (31) Gillum, R.F. (1987). Heart failure in the United States 1970-1985 [editorial]. *Am. Heart J.* 113 (4): 1043-1045.
- (32) Gwathmey, J.K. und Morgan, J.P. (1993). Sarcoplasmic reticulum calcium mobilization in right ventricular pressure-overload hypertrophy in the ferret: relationships to diastolic dysfunction and a negative treppe. *Pflugers Arch.* 422 (6): 599-608.
- (33) Hasenfuss, G., Reinecke, H., Studer, R., Meyer, M., Pieske, B., Holtz, J., Holubarsch, C., Posival, H., Just, H., und Drexler, H. (1994). Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res.* 75: 434-442.
- (34) Hasselbach, W. und Makinose, M. (1961). Die Kalciumpumpe der 'Erschlaffungsgranula' des Muskels und ihre Abhängigkeit von der ATP-Spaltung. *Biochem. Z.* 333: 518-528.
- (35) Hess, P. (1988). Elementary properties of cardiac calcium channels: a brief review. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 66 (9): 1218-1223.
- (36) Hicks, M.J., Shigekawa, M., und Katz, A.M. (1979). Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res.* 44 (3): 384-391.

- 
- (37) Higgins, A.J., Faccini, J.M., und Greaves, P. (1985). Coronary hyperemia and cardiac hypertrophy following inhibition of fatty acid oxidation. Evidence of a regulatory role for cytosolic phosphorylation potential. *Adv. Myocardiol.* 6: 329-338.
- (38) Idell Wenger, J.A., Grotyohann, L.W., und Neely, J.R. (1978). Coenzyme A and carnitine distribution in normal and ischemic hearts. *J. Biol. Chem.* 253 (12): 4310-4318.
- (39) Inesi, G., Sumbilla, C., und Kirtley, M.E. (1990). Relationships of molecular structure and function in Ca<sup>2+</sup>-transport ATPase. *Physiol. Rev.* 70 (3): 749-760.
- (40) Johns, T.N.P. und Olson, B. (1954). Experimental myocardial infarction. A method of coronary occlusion in small animals. *Ann. Surg.* 140: 675-682.
- (41) Johnson, R.A. und Palacios, I. (1982). Dilated cardiomyopathies of the adult (first of two parts). *N. Engl. J. Med.* 307 (17): 1051-1058.
- (42) Jorgensen, A.O., Broderick, R., Somlyo, A.P., und Somlyo, A.V. (1988). Two structurally distinct calcium storage sites in rat cardiac sarcoplasmic reticulum: An electron microprobe analysis study. *Circ. Res.* 63: 1060-1069.
- (43) Kanamaru, T., Shinagawa, S., Asai, M., Okazaki, H., Sugiyama, Y., Fujiita, T., Iwatsuka, H., und Yoneda, M. (1985). Emeriamine, an antidiabetic beta-aminobetaine derived from a novel fungal metabolite. *Life. Sci* 37: 217-223.
- (44) Kannel, W.B. (1987). Epidemiology and prevention of cardiac failure: Framingham Study insights. *Eur. Heart J.* 8 (Suppl F): 23-26.
- (45) Kirchberger, M.A., Tada, M., und Katz, A.M. (1974). Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249: 6166-6177.
- (46) Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

- 
- (47) Lammerich, A., Günther, J., Pfitzer, G., Storch, E., und Vetter, R. (1995). Alterations of cardiac contractile function are related to changes in membrane calcium transport in spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertension* 13: 1313-1324.
- (48) Le Peuch, C.J., Haiech, J., und Demaille, J.G. (1979). Concerted regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport by cyclic adenosine monophosphate dependent and calcium--calmodulin-dependent phosphorylations. *Biochemistry* 18 (23): 5150-5157.
- (49) Lee, S.M., Tutwiler, G., Bressler, R., und Kircher, C.H. (1982). Metabolic control and prevention of nephropathy by 2-tetradecylglycidate in the diabetic mouse (db/db). *Diabetes* 31: 12-18.
- (50) Lee, S.M., Bahl, J.J., und Bressler, R. (1985). Prevention of the metabolic effects of 2-tetradecylglycidate by octanoic acid in the genetically diabetic mouse (db/db). *Biochem. Med.* 33 (1): 104-109.
- (51) Lindpaintner, K., Niedermaier, N., Drexler, H. und Ganten, D. (1992). Linksventrikuläres Remodeling nach Myokardinfarkt: Spielt das Renin-Angiotensin-System eine Rolle? In: Gefäß- und Herzhypertrophie. Hrsg.: D. Ganten und G. Mall. Stuttgart-New York: Schattauer-Verlag, 155-168.
- (52) Litwin, S.E., Raya, T.E., Gay, R.G., Bedotto, J.B., Bahl, J.J., Anderson, P.G., Goldman, S., und Bressler, R. (1990). Chronic inhibition of fatty acid oxidation: new model of diastolic dysfunction. *Am. J. Physiol.* 258 (1 Pt 2): H51-56.
- (53) Litwin, S.E., Raya, T.E., Anderson, P.G., Litwin, C.M., Bressler, R., und Goldman, S. (1991). Induction of myocardial hypertrophy after coronary ligation in rats decreases ventricular dilatation and improves systolic function. *Circulation* 84 (4): 1819-1827.
- (54) Lompré, A.M., Anger, M., und Levitsky, D. (1994). Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26: 1109-1121.

- 
- (55) Lopaschuk, G.D., Wall, S.R., Olley, P.M., und Davies, N.J. (1988). Etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase I inhibitor, protects hearts from fatty acid-induced ischemic injury independent of changes in long chain acylcarnitine. *Circ. Res.* 63 (6): 1036-1043.
- (56) Lopaschuk, G.D., McNeil, G.F., und McVeigh, J.J. (1989). Glucose oxidation is stimulated in reperfused ischemic hearts with the carnitine palmitoyltransferase 1 inhibitor, Etomoxir. *Mol. Cell. Biochem.* 88: 175-179.
- (57) Lopaschuk, G.D., Belke, D.D., Gamble, J., Itoi, T., und Schönekeß, B.O. (1994). Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1213: 263-276.
- (58) Lowry, O.H., Rosebrough, A.L., Farr, A.L., und Randall, J. (1951). Protein measurements with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- (59) MacLennan, D.H., Brandl, C.J., Korczak, B., und Green, N.M. (1987). Calcium ATPases: contribution of molecular genetics to our understanding of structure and function. *Soc. Gen. Physiol. Ser.* 41: 287-300.
- (60) Magid, N.M., Borer, J.S., Young, M.S., Wallerson, D.C., und DeMonteiro, C. (1993). Suppression of protein degradation in progressive cardiac hypertrophy of chronic aortic regurgitation. *Circulation* 87 (4): 1249-1257.
- (61) Mercadier, J.J., Lompré, A.M., Wisnewsky, C., Samuel, J.L., Bercovici, J., Swynghedauw, B., und Schwartz, K. (1981). Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* 49: 525-532.
- (62) Mercadier, J.J., Lompré, A.M., Duc, P., Boheler, K.R., Fraysse, J.B., Wisnewsky, C., Allen, P.D., Komajda, M., und Schwartz, K. (1990). Altered sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J. Clin. Invest.* 85 (1): 305-309.

- 
- (63) Morgan, J.P. (1991). Mechanisms of disease - abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 325: 625-632.
- (64) Murthy, M.S. und Pande, S.V. (1987). Malonyl-CoA binding site and the overt carnitine palmitoyltransferase activity reside on the opposite sides of the outer mitochondrial membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (2): 378-382.
- (65) Nagai, R., Zarain-Herzberg, A., Brandl, C.J., Fuji, J., Tada, M., MacLennan, D.H., Alpert, N.R., und Periasamy, M. (1989). Regulation of myocardial Ca<sup>2+</sup> ATPase and phospholamban mRNA expression in response to pressure overload and thyroid hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 2966-2970.
- (66) Naudin, V., Oliviero, P., Rannou, F., SainteBeuve, C., und Charle-Magne, D. (1991). The density of ryanodine receptors decreases with pressure overload-induced rat cardiac hypertrophy. *FEBS Lett.* 285: 135-138.
- (67) Oliver, M.F., Kurien, V.A., und Greenwood, T.W. (1968). Relation between serum-free-fatty acids and arrhythmias and death after acute myocardial infarction. *Lancet* 1 (545): 710-714.
- (68) Olivetti, G., Capasso, J.M., Meggs, L.G., Sonnenblick, E.H., und Anversa, P. (1991). Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Circ. Res.* 68 (3): 856-869.
- (69) Opie, L.H. (1975). Metabolism of free fatty acids, glucose and catecholamines in acute myocardial infarction. Relation to myocardial ischemia and infarct size. *Am. J. Cardiol.* 36 (7): 938-953.
- (70) Opie, L.H. (1991). Fuels: Carbohydrates and Lipids. In: *The heart: physiology and metabolism*. 2. Auflage. Hrsg.: L.H. Opie. New York: *Raven Press*, 208-246.
- (71) Osterziel, K.J. (1992). Epidemiologie. In: *Herzinsuffizienz*. Hrsg.: R. Dietz. Berlin, Heidelberg: *Springer-Verlag*, 17-23.

- 
- (72) Pelouch, V., Dixon, I.M., Sethi, R., und Dhalla, N.S. (1993). Alteration of collagenous protein profile in congestive heart failure secondary to myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 129: 121-131.
- (73) Perreault, C.L., Shannon, R.P., Komamura, K., Vatner, S.F., und Morgan, J.P. (1992). Abnormalities in intracellular calcium regulation and contractile function in myocardium from dogs with pacing- induced heart failure. *J. Clin. Invest.* 89: 932-938.
- (74) Pfeffer, M.A., Pfeffer, J.M., Fishbein, M.C., Fletcher, P.J., Spadaro, J., Kloner, R.A., und Braunwald, E. (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ. Res.* 44 (4): 503-512.
- (75) Pfeffer, M.A. und Braunwald, E. (1990). Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 81 (4): 1161-1172.
- (76) Pschyrembel Klinisches Wörterbuch (1986). 255. Auflage. Hrsg.: W. Pschyrembel. Berlin-New York: *Walter de Gruyter*, 684.
- (77) Raeymaekers, L., Hofmann, F., und Casteels, R. (1988). Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem. J.* 252 (1): 269-273.
- (78) Randle, P.J., Garland, P.B., Hales, C.N., und Newsholme, E.A. (1963). The glucose fatty acid cycle: its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* 1: 785-789.
- (79) Richardt, G. und Schömig, A. (1992). Pathophysiologie - Adrenerges System: sympathische Aktivität. In: Herzinsuffizienz. Hrsg.: R. Dietz. Berlin, Heidelberg: *Springer-Verlag*, 123-135.
- (80) Rubin, S.A., Fishbein, M.C., und Swan, H.J. (1983). Compensatory hypertrophy in the heart after myocardial infarction in the rat. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1 (6): 1435-1441.

- 
- (81) Rupp, H., Elimban, V., und Dhalla, N.S. (1992). Modification of subcellular organelles in pressure-overloaded heart by etomoxir, a carnitine palmitoyltransferase I inhibitor. *FASEB J.* 6 (6): 2349-2353.
- (82) Schier, J.J. und Adelstein, R.S. (1982). Structural and enzymatic comparison of human cardiac muscle myosins isolated from infants, adults, and patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Clin. Invest.* 69 (4): 816-825.
- (83) Schwinger, R.H., Böhm, M., Schmidt, U., Karczewski, P., Bavendiek, U., Flesch, M., Krause, E.G., und Erdmann, E. (1995). Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced  $\text{Ca}^{2+}$  uptake and  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* 92 (11): 3220-3228.
- (84) Selye, H., Bajusz, E., Grasso, S., und Mendell, P. (1960). Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology* 11: 398-407.
- (85) Simmerman, H.K.B., Collins, J.H., Theiber, J.L., Wegener, A.D., und Jones, L.R. (1986). Sequence analysis of phospholamban. Identification of phosphorylation sites and two major structural domains. *J. Biol. Chem.* 261 (28): 13333-13341.
- (86) Simpson, P., McGrath, A., und Savion, S. (1982). Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ. Res.* 51: 787-801.
- (87) Statistisches Bundesamt (1996). Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublik Deutschland. Stuttgart: Metzler-Poeschel
- (88) Tada, M., Kirchberger, M.A., Repke, D.I., und Katz, A.M. (1974). The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 249: 6174-6180.
- (89) Tada, M., Yamamoto, T., und Tonomura, Y. (1978). Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol. Rev.* 58: 1-79.

- 
- (90) Tada, M. und Katz, A.M. (1982). Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu. Rev. Physiol.* 44: 401-423.
- (91) Taegtmeier, H., Hems, R., und Krebs, H.A. (1980). Utilization of energy-providing substances in the isolated working rat heart. *Biochem. J.* 186: 701-711.
- (92) Takahashi, T., Allen, P.D., und Izumo, S. (1992). Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ. Res.* 71 (1): 9-17.
- (93) Trevor, A.J. und Miller, R.D. (1989). General Anesthetics. In: Basic and clinical pharmacology. 4. Auflage. Hrsg.: B.G. Katzung. Norwalk: *Appleton & Lange*, 312-313.
- (94) Turek, Z., Grandtner, M., Kubat, K., Ringnalda, B., und Kreuzer, F. (1978). Arterial blood gases, muscle fiber diameter and intercapillary distance in cardiac hypertrophy of rats with an old myocardial infarction. *Pflügers Arch.* 376: 209-215.
- (95) Van Bilsen, M., Chien, K.R. (1993). Growth and hypertrophy of the heart: towards an understanding of cardiac specific and inducible gene expression. *Cardiovasc. Res.* 27 (7): 1140-1149
- (96) Vetter, R., Kott, M., und Rupp, H. (1995). Differential influences of carnitine palmitoyltransferase-1 inhibition and hyperthyroidism on cardiac growth and sarcoplasmic reticulum phosphorylation. *Eur. Heart J.* 16 (Suppl C): 15-19.
- (97) Vetter, R. und Rupp, H. (1994). CPT-1 inhibition by etomoxir has a chamber-related action on cardiac sarcoplasmic reticulum and isomyosins. *Am. J. Physiol.* 267 (6 Pt 2): H2091-2099.
- (98) Vik Mo, H. und Mjos, O.D. (1981). Influence of free fatty acids on myocardial oxygen consumption and ischemic injury. *Am. J. Cardiol.* 48 (2): 361-365.

- 
- (99) Weber, K.T., Sun, Y., und Katwa, L.C. (1996). Wound healing following myocardial infarction. *Clin. Cardiol.* 19 (6): 447-455.
- (100) Will, H., Küttner, I., Vetter, R., Will-Shahab, L., und Kemsies, C. (1983). Early presence of phospholamban in developing chick heart. *FEBS Lett.* 155 (2): 326-330.
- (101) Wolf, H.P.O., Eistetter, K., und Ludwig, G. (1982). Phenylalkyloxirane carboxylic acids, a new class of hypoglycaemic substances: hypoglycaemic and hypoketonaemic effects of sodium 2-[5-(4-chlorophenyl)-pentyl]-oxirane-2-carboxylate (B807-27) in fasted animals. *Diabetologia* 22: 456-463.
- (102) Zarain-Herzberg, A., Afzal, N., Elimban, V., und Dhalla, N.S. (1996a). Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum  $Ca^{2+}$ -pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol. Cell. Biochem.* 163/164: 285-290.
- (103) Zarain-Herzberg, A., Rupp, H., Elimban, V., und Dhalla, N.S. (1996b). Modification of sarcoplasmic reticulum gene expression in pressure overload cardiac hypertrophy by etomoxir. *FASEB J.* 10: 1303-1309.
- (104) Zimmer, H.G., Gerdes, A.M., Lortet, S., und Mall, G. (1990). Changes in heart function and cardiac cell size in rats with chronic myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22 (11): 1231-1243.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich eidesstattlich, daß die vorgelegte Arbeit von mir eigenständig und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig aufgeführt sind.

Berlin, den 06.08.97

Dominik Geil

## VERÖFFENTLICHUNGEN

### Postervortrag

63. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung  
1997:

D. Geil, S. Strube, D. Romberg, H. Theres, G. Baumann, R. Vetter:

Reduzierte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität und SERCA2a-Proteinspiegel nach experimentellem  
Myokardinfarkt

64. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie - Herz- und Kreislaufforschung  
1998:

K.D. Wagner, D. Geil, G. Pfitzer, I. Schimke, H. Theres, R. Vetter, J. Günther

Verminderte Empfindlichkeit von infarktbedingt hypertrophiertem Rattenmyokard gegenüber  
 $\text{O}_2$ -Mangel und Reoxygenierung

### Journal

D. Geil, S. Strube, D. Romberg, H. Theres, G. Baumann, R. Vetter:

Reduzierte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität und SERCA2a-Proteinspiegel nach experimentellem  
Myokardinfarkt (Abstract)

Kardiologie (1997) 86 (Suppl 2): 21

K.D. Wagner, D. Geil, I. Schimke, H.M. Stauß, A. Lammerich, H. Theres, G. Pfitzer,

R. Vetter, J. Günther:

Decreased susceptibility of contractile function to hypoxia/reoxygenation in chronic infarcted  
rat hearts

J Mol Cell Cardiol (im Druck)

## DANKSAGUNG

Ich möchte Herrn Dr. R. Vetter herzlich danken für die Bereitstellung des interessanten Themas, seiner umfangreichen Unterstützung bei allen großen und kleinen Problemen, sowie für die anregenden Gespräche und konstruktiv kritischen Anmerkungen.

Frau C. Kemsies danke ich für die gründliche Einweisung in die verschiedenen verwendeten Methoden. Für technische Fragen zum Arbeitsablauf war sie immer ansprechbar.

Herrn Prof. Dr. P. B. Persson möchte ich vielmals danken für die Möglichkeit, daß die vorliegende Studie in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physiologie durchgeführt werden konnte.

Den Mitarbeitern im Labor der Inneren Medizin der Charité unter Leitung von Herrn Dr. med. H. Theres sei für die Durchführung der experimentellen Infarkte, für die Überlassung der hämodynamischen Meßparameter und Gewichtsdaten vielmals gedankt.

Herrn Dr. J. Günther spreche ich meinen Dank aus für befruchtende Vorträge zum Verständnis der molekularen Mechanismen im Herzen. Herrn Dipl. Ing. E. Storch möchte ich danken für seine erfrischende Art, die immer für ein gutes Arbeitsklima sorgte. Herrn K. D. Wagner danke ich für seine prompte Hilfe bei kleinen Unklarheiten. Der ganzen Arbeitsgruppe gilt mein Dank für die freundliche Überlassung der muskelmechanischen Relaxationsparameter.

Allen weiteren Mitarbeitern in der Molekularen Kardiologie des Max-Delbrück-Centrums danke ich für anregende Tips.

Darüber hinaus gilt insbesondere meinen Eltern und Freunden, die mir die Arbeit möglich gemacht und mich in dieser Zeit begleitet haben, herzlicher Dank.