

**Wirkung von Hormonen
auf die Funktion und Expression
der Creatinkinase-Isoenzyme im Rattenherzen**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Anja Schmidt

2000

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Sibylle Soboll

Korreferent: Prof. Dr. Peter Westhoff

Tag der mündlichen Prüfung: 7. November 2000

URL: <http://www.ulb.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2000/schmidt.html>

INHALT

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
2	EINLEITUNG.....	9
2.1	Die Creatinkinase.....	9
2.2	Isoformen der CK	10
2.2.1	Die cytosolischen CK-Isoenzyme.....	10
2.2.2	Die mitochondriale CK.....	11
2.3	Der „Creatin-Shuttle“.....	12
2.4	Kopplung der MtCK an die oxidative Phosphorylierung.....	14
2.5	Das Oktamer/Dimer-Verhältnis	15
2.6	Regulation der CK-Reaktion.....	16
2.7	Aminosäuresequenz und Genstruktur der CK	17
2.8	Expression der CK.....	19
2.9	Bedeutung der CK für die Pathologie des Herzens	20
2.10	Hypertrophie	21
2.11	Signaltransduktion der Hypertrophie.....	22
2.12	Schilddrüsenhormone.....	25
2.13	Wirkung der Schilddrüsenhormone auf die Genexpression.....	26
2.14	Extranukleäre Effekte der Schilddrüsenhormone	29
2.15	Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die mitochondriale Atmung.....	30
2.16	Wirkungen der Schilddrüsenhormone auf das Herz.....	31
2.17	Ziel der Arbeit.....	32
3	MATERIAL UND METHODEN	33
3.1	Bezugsnachweise der verwendeten Chemikalien.....	33
3.2	Geräte und Materialien.....	34
3.3	Versuchstiere.....	36
3.3.1	Hypothyreote Ratten.....	36
3.3.2	Hyperthyreote Ratten.....	36
3.3.3	Ratten im Hungerzustand.....	37
3.3.4	Behandlung von Ratten mit Isoprenalin.....	37
3.3.5	Schilddrüsenhormon-Rezeptor <i>knock out</i> Mäuse	37

3.4	Serumspiegel der Schilddrüsenhormone.....	37
3.5	Herzperfusion nach Langendorff [Langendorff 1895].....	38
3.6	Versuchsübersicht	39
3.6.1	Aufarbeitung der Herzen.....	39
3.6.2	Aufarbeitung der Lebern.....	40
3.7	Isolation von Mitochondrien aus Rattenherzen.....	40
3.8	Proteinbestimmung.....	41
3.9	Bestimmung des Atmungskontrollquotienten und des ADP / O-Quotienten isolierter Mitochondrien.....	41
3.10	Umwandlung der Oligomere der MtCK.....	42
3.11	Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese.....	42
3.11.1	Aktivitätsfärbung der Creatinkinase	43
3.12	Bestimmung der spezifischen CK _f -Aktivität.....	44
3.13	Bestimmung der spezifischen Aktivität des Malat-Enzyms	44
3.14	Bestimmung der Glukosekonzentration im Serum.....	44
3.15	Bestimmung der Isoenzymverteilung im Gewebehomogenat.....	45
3.16	SDS-Gelelektrophorese.....	45
3.16.1	Färbung mit Coomassie-Blau.....	46
3.17	Immunologischer Nachweis der MtCK.....	46
3.18	RNA-Isolierung aus Gewebe	47
3.19	cDNA-Synthese	48
3.20	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	48
3.20.1	5'-Endmarkierung der PCR-Primer	53
3.20.2	PCR-Auswertung.....	54
3.21	Rezeptor/DNA-Bindungsstudien (EMSA)	54
3.21.1	Versuchsübersicht über die Rezeptor/DNA-Bindungsstudien und die transiente Transfektion.....	55
3.21.2	Subclonierung.....	56
3.21.2.1	Auffüllreaktion und Ligation.....	56
3.21.2.2	Herstellen kompetenter Zellen und Transformation.....	57
3.21.2.3	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	58
3.21.2.4	Sequenzanalyse nach Sanger	59
3.21.3	Isolation und Markierung der DNA-Fragmente	59

3.21.4	<i>in vitro</i> Transkription und Translation der Kernrezeptoren.....	60
3.21.5	EMSA.....	61
3.22	Transiente Transfektion.....	61
3.22.1	Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität	62
3.22.2	Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität.....	63
4	ERGEBNISSE.....	64
4.1	Umwandlung der Oligomere der MtCK	64
4.2	Einfluss von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf den Energiestoffwechsel des Rattenherzes.....	67
4.2.1	Wirkung von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf das Körper- und Herzgewicht	68
4.2.2	Wirkung von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf die oxidative Phosphorylierung des Rattenherzens	69
4.2.3	Wirkung von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf die MtCK-Menge und das Oktamer/Dimer-Verhältnis	70
4.2.4	Wirkung von Schilddrüsenhormone auf die Expression der CK-Isoenzyme ..	70
4.2.5	Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Isoenzym-Verteilung der Creatinkinase.....	73
4.2.6	Expression der CK-Isoenzyme in Schilddrüsenhormon-Rezeptor <i>knock out</i> Mäusen.....	76
4.2.7	Isoenzym-Verteilung der CK in Schilddrüsenhormon-Rezeptor <i>knock out</i> Mäuse.....	78
4.2.8	Einfluss von cAMP auf die Expression der CK-Isoenzyme.....	80
4.2.9	Wirkung von Isoprenalin, cAMP und Hungerzustand auf die Isoenzym- Verteilung der Creatinkinase	82
4.3	Rezeptor / DNA-Bindungsstudien (EMSA)	83
4.4	Transiente Transfektion.....	84
5	DISKUSSION.....	85
5.1	Wege der intrazellulären Signalvermittlung von Schilddrüsenhormonen und Katecholaminen im hypertrophen Herzen.....	85
5.1.1	Die Signalvermittlung der Schilddrüsenhormone.....	86
5.1.2	Die Signalvermittlung der Katecholamine.....	87

5.2	Einfluss von Hormonen auf den Energiestoffwechsel des Rattenherzens	88
5.2.1	Einfluss von Schilddrüsenhormonen und Katecholaminen auf das Herzgewicht	88
5.2.2	Einfluss von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf die oxidative Phosphorylierung	89
5.3	Die Creatinkinase-Systeme	89
5.3.1	Umwandlung der Oligomere der MtCK	90
5.3.2	Genexpression der Creatinkinase-Isoenzyme	92
5.3.3	Koexpression	93
5.3.4	Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die mRNA-Konzentration der CK-Isoenzyme	94
5.3.4.1	Experimentelle Modelle	94
5.3.4.2	Regulation der Creatinkinase mRNA-Konzentration in der Hypo- und Hyperthyreose	95
5.3.4.3	TR vermittelte Regulation der CK-Genexpression	97
5.3.5	Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die spezifische Aktivität der Creatinkinase-Isoenzyme	98
5.3.6	Wirkung von Isoprenalin auf die mRNA-Konzentration und die spezifische Aktivität der Creatinkinase-Isoenzyme	99
5.3.7	mRNA-Konzentration und spezifische Aktivität der CK-Isoenzyme im Hungerzustand	100
6	ZUSAMMENFASSUNG	102
7	LITERATUR	104

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AA	Acrylamid
ADP	Adenosindiphosphat
AF	Aktivierungsdomäne nukleärer Rezeptoren („activation function“)
aFGF	„acidic fibroblast growth factor“
AMP	Adenosinmonophosphat
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
ANT	Adennukleotid-Translokator
AP5A	P1,P5-Di(adenosin-5'-)pentaphosphat
APAD	Acetylpyridinadenindinukleotid
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bFGF	„basic fibroblast growth factor“
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaM-PK	Ca ²⁺ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
cdc42	Homolog zum „cell division cycle gene 42“ der Hefe
CK	Creatinkinase
CKB	cytosolische Creatinkinase B-Form („brain“)
CKf	spezifische Aktivität der Creatinkinase (in Richtung ATP-Entstehung)
CKM	cytosolische Creatinkinase M-Form (Muskel)
Cr	Creatin
CR	Cytokin-Rezeptor
CrP	Creatinphosphat
CS	Citratsynthase
CT-1	Cardiotrophin-1
d[α ³² P]CTP	Desoxycytidin-5' [α ³² P]triphosphat
d[γ ³² P]ATP	Desoxyadenosin-5' [γ ³² P]triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DG	1,2-Diacylglycerol
DMEM	„Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium“

DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat
DR	gleichgerichtete Wiederholungssequenz („direct repeat“)
DR4	gleichgerichtete Wiederholungssequenz mit einem Abstand von vier Nukleotiden
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	[Ethylenbis-(oxyethylenitrilo)]-tetraessigsäure
EMSA	„electrophoretic mobility shift assay“
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
FCCP	Carbonylcyanid-p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon
FCS	fetales Kälberserum
fT ₃	freies 3,5,3'-Trijodthyronin
fT ₄	freies L-Thyroxin
GAP-DH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GPR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethan-Sulfonsäure
HG	Herzgewicht
HK	Hexokinase
HRE	Hormon responsives Element
i.p.	intraperitoneal
IBMX	Isobutyl-Methylxanthin
IGF	„insulin related growth factor“
IL-1 β	Interleukin 1 β
IP	invertiertes Palindrom
IP3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IP6	invertiertes Palindrom mit einem Abstand von sechs Nukleotiden
JAK	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KG	Körpergewicht
LAD	„left anterior descending coronary artery infarction“
LBD	Ligandenbindedomäne
LDH	Laktat-Dehydrogenase

MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	MAPK Kinase
MBA	N,N'-Methylenbisacrylamid
MDH	Malat-Dehydrogenase
MEK	Mitogen-aktivierte ERK aktivierende Kinase
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MHC	schwere Kette des Myosins
M-MLV	Moloney murine leukemia virus
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MtCK	mitochondriale Creatinkinase
NAD (NADH)	Nikotinsäureamidadenindinukleotid (reduzierte Form)
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
PBS	Natriumphosphatpuffer („phosphat buffered saline“)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	„platelet derived growth factor“
PEP	Phosphoenolpyruvat
PGA	3-Phosphoglycerat
PGK	3-Phosphoglyceratkinase
PIP2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-Bisphosphat
PK	Pyruvatkinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMS	Phenazinmethosulfat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTU	Propylthiouracil
PVDF	Polyvinylidendifluorid
<i>Rac</i>	Mitglied der <i>Ras</i> Superfamilie
<i>Raf</i>	MAPKK Kinase
RAR	all-trans-Vit A-Säure-Rezeptor
<i>Ras</i>	monomere GTPase („rat sarcoma“)
RCF	relative Zentrifugalkraft [g]
RSTK	Rezeptor-Serin/Threonin-Kinase

RTK	Rezeptor-Thyrosinkinase
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerasenkettenreaktion
RXR	9-cis-Vit A-Säure-Rezeptor
SAPK	„stress activated protein kinases“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEK	SAPK Kinase
SHR	spontan hypertensive Ratten
Smad	Homolog der Vertebraten zum Drosophila Mad Protein
sMtCK	sarkomere mitochondriale Creatinkinase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAT	„signal transducer and activator of transcription“
T ₃	3,5,3'-Trijodthyronin
T ₄	L-Thyroxin
TBP	T ₃ bindendes Protein
TEMED	Tetramethyldiamin
TGF	„transforming growth factor“
TK	Thymidinkinase
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor
Trap	Triethanolaminhydrochlorid-Puffer
TRE	Schilddrüsenhormon-responsives Element
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan-Puffer
TSH	Thyreidea-stimulierendes Hormon
uMtCK	ubiquitäre mitochondriale Creatinkinase
Upm	Umdrehungen pro Minute
VDR	Vitamin D-Rezeptor
VLDL	„very low density lipoproteins“

2 EINLEITUNG

2.1 Die Creatinkinase

Lebende Organismen brauchen zur Erfüllung aller biologischen Aufgaben Energie. Damit der Energieverbrauch ökonomisch und effizient erfolgen kann, sind im Allgemeinen der zelluläre Energieverbrauch und die Energiebereitstellung ausgeglichen. Die primäre Energiequelle für viele entscheidende Prozesse ist ATP. Obwohl die zelluläre ATP-Konzentration nicht sehr hoch ist, kann bei der Aktivierung der Zelle (z.B. Muskelkontraktion) meist kein signifikanter Abfall der ATP-Konzentration gemessen werden, da das ATP kontinuierlich durch das Creatinkinase-System aufgefüllt wird. Die Creatinkinase (CK) spielt daher besonders in Geweben mit hohem und teilweise stark wechselndem Energieverbrauch, wie z.B. Herz, Skelettmuskel, Gehirn, Spermien oder die Photorezeptorzellen der Retina, eine wichtige Rolle bei der Energieversorgung der Zelle.

Die CK (ATP : Creatin N-phosphoryl-transferase (EC 2.7.3.2.)) katalysiert die reversible Übertragung der Phosphorylgruppe von Creatinphosphat (CrP) auf ADP, wobei ATP entsteht [Wyss et al. 1992]:

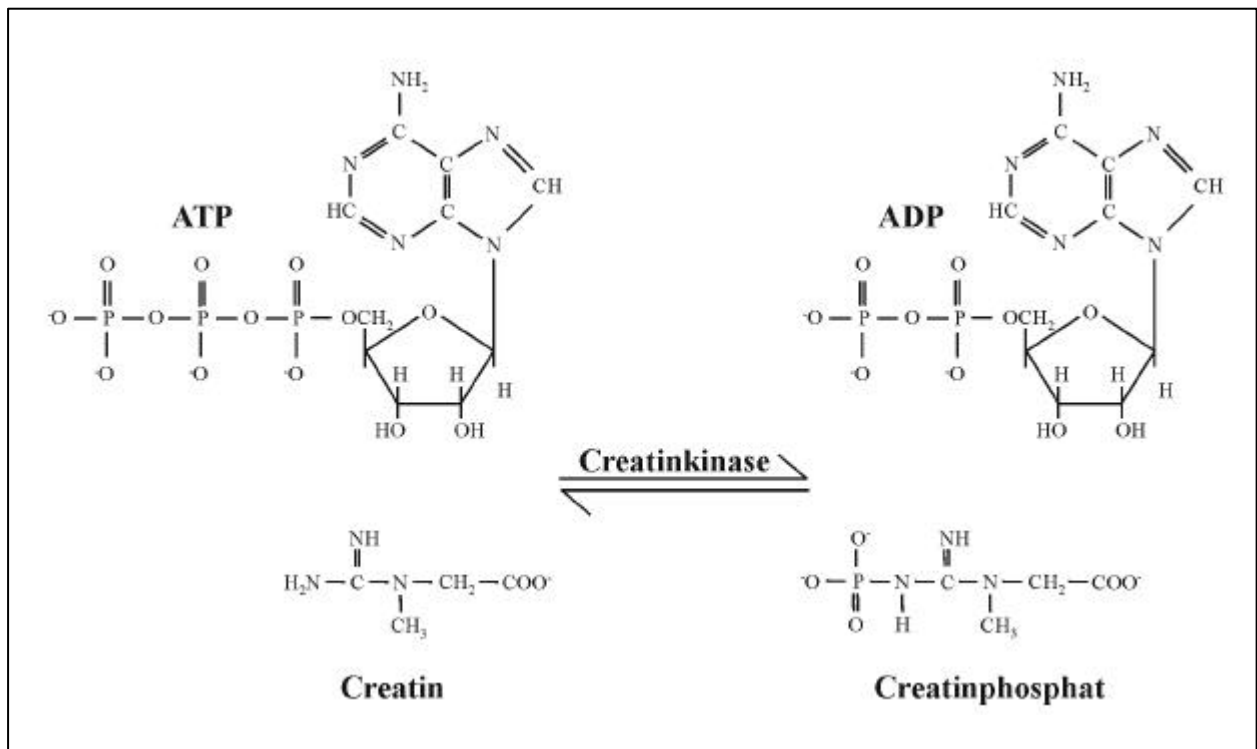
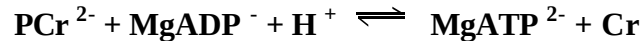


Abbildung 1: Transphosphorylierungsreaktion der Creatinkinase

2.2 Isoformen der CK

Die CK-Isoenzym-Familie ist während der Evolution vom Seeigel bis zum Menschen strukturell und funktionell sehr hoch konserviert geblieben, was auf eine generelle Wichtigkeit der CK im Metabolismus verschiedener Organismen, Organe und Zellen hinweist [Mühlebach et al. 1994, Eder et al. 1999].

In Vögeln und Säugetieren findet man fünf verschiedene, kerncodierte CK-Isoformen, die eine Multigenfamilie bilden. Drei davon befinden sich im Cytosol und zwei kommen nur in den Mitochondrien vor.

2.2.1 Die cytosolischen CK-Isoenzyme

Die drei cytosolischen CK-Isoenzyme bilden dimere Moleküle, welche CKMM, CKMB und CKBB genannt werden. Sie bestehen aus den Untereinheiten M (muscle) und B (brain), die von zwei separaten, nukleären Genen codiert werden und ein Molekulargewicht von ca. 42 kD besitzen [Dawson et al. 1967, Eppenberger et al. 1964, Khuchua et al. 1989]. Sowohl die gewebespezifische Expression als auch die subzelluläre Lokalisierung der CK-Isoenzyme ist verschieden. Die CKMM findet man hauptsächlich in reifer Skelettmuskulatur und im Herzmuskel. Die CKBB kommt vorwiegend im Gehirn und Nervengewebe vor, aber auch in embryonalen Skelett- und Herzmuskeln, sowie einer Reihe anderer Zellen (glatte Muskulatur der Blutgefäße, Photorezeptorzellen der Retina, Uterus, Epithelzellen des Intestinaltraktes, Nieren, Pankreas, Knorpel, Knochen, Makrophagen, maligne Tumoren) [Wallimann und Hemmer 1994]. Eppenberger et al. entdeckten in Vögeln zwei verschiedene Formen der CKB, welche als B_a- und B_b-CK bezeichnet werden, unterschiedliche isoelektrische Punkte besitzen und durch alternatives Spleißen eines einzigen CKB-Gens entstehen [Eppenberger et al. 1967, Quest et al. 1989, Wirz et al. 1990]. Die posttranslationale Phosphorylierung der CKB konnte durch 2D-Elektrophorese gezeigt werden [Rosenberg et al. 1981, Mahadevan et al. 1984, Quest et al. 1990, Chida et al. 1990, Hemmer et al. 1993].

Das CKMB-Heterodimer findet man sowohl im erwachsenen Herz von Säugetieren, als auch in der gestreiften Muskulatur während des entwicklungsabhängigen Übergangs von der CKBB zur CKMM [Eppenberger 1994].

Während die mitochondriale CK strikt in den Mitochondrien kompartimentiert ist, wurde lange Zeit angenommen, dass die cytosolischen CKs als „lösliche“ Enzyme im gesamten

Cytoplasma verteilt sind. Durch Methoden wie Fraktionierung und *in situ* Immunolokalisierungsstudien konnte aber gezeigt werden, dass signifikante Mengen der cytosolischen Isoformen ebenfalls mit spezifischen, subzellulären Orten assoziiert sind. Im Muskel ist z.B. ein physiologisch bedeutender Anteil der CKMM spezifisch mit der M-Bande der Myofibrillen assoziiert [Turner et al. 1973, Wallimann et al. 1984], wo die CK direkt das im Kontraktionszyklus gebildete ADP rephosphoryliert. Die funktionelle Kopplung der CKMM führt hier zu einem für die Funktion der Myofibrillen vorteilhaften, hohen, lokalen ATP/ADP-Verhältnis und einer geringen Veränderung der Protonenkonzentration [Minajeva et al. 1996]. Für die spezifische Bindung an die sarcomere M-Linie ist das C-terminale Ende der CKM verantwortlich [Eppenberger 1994, Schäfer und Perriard 1988].

Neben der Lokalisierung der CKMM in der M-Bande findet man das Isoenzym auch zusammen mit glykolytischen Enzymen locker an die I-Bande der Sarkomere gebunden [Wallimann et al. 1989]. Es gibt sogar Hinweise, dass die CK zusammen mit der Pyruvatkinase einen sogenannten „Diazym-Komplex“ bilden kann [Dillon und Clark 1990]. Des Weiteren ist die CKMM funktionell mit der Na^+/K^+ -ATPase der Plasmamembran [Sharov et al. 1977] und der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase gekoppelt [Levitsky et al. 1978]. Sie spielt somit auch eine sehr wichtige Rolle in der Ca^{2+} -Homöostase.

2.2.2 Die mitochondriale CK

Die mitochondriale CK wurde 1964 von der Klingenberg-Gruppe entdeckt [Jacobs et al. 1964]. Es gibt zwei mitochondriale Isoenzyme, die von zwei verschiedenen nukleären Genen codiert werden [Payne und Stauss 1994, Mühlebach et al. 1994]. Wie bei den cytosolischen Isoenzymen erfolgt die Expression gewebespezifisch. Die sarkomere MtCK (sMtCK) kommt nur im Herzen und der Skelettmuskulatur vor und ist somit ein Marker für sarkomere Gewebe. Das andere Isoenzym der MtCK wird im ganzen Körper in vielen Geweben, wie Gehirn, Uterus, Nieren und der Aorta, geringfügig exprimiert und dementsprechend „ubiquitär“ (uMtCK) genannt [Payne & Strauss 1994]. Die saurere uMtCK wird bei Vögeln auch als Mi_a -CK (acidic) und die basischere als sMtCK Mi_b -CK (basic) bezeichnet [Mühlebach et al. 1994]. Quantitative Elektrophoresen ergaben, dass im Herzmuskel von Mensch, Ratte, Hund, Meerschweinchen und Hamster die mitochondriale CK 21 – 45 % der gesamten zellulären CK-Aktivität repräsentiert [Scholte 1973, Saks et al. 1974].

Die MtCK wird als Vorläufer-Protein mit einem Molekulargewicht von 47 – 48 kD synthetisiert und enthält eine aminoterminal Zielsequenz für den mitochondrialen Import. Das reife Protein besitzt ein Molekulargewicht von ca. 42 kD [Haas et al. 1989, Haas und Strauss 1990, Klein et al. 1991].

Im Gegensatz zu den cytosolischen CKs bilden die zwei mitochondrialen Isoenzyme homodimere und homooktamere Moleküle, welche in einem dynamischen Oktamer / Dimer-Gleichgewicht stehen [Wallimann und Hemmer 1994] und eine molekulare Masse von 75 – 91 kD bzw. 306 – 380 kD besitzen [Wyss et al. 1992].

Durch Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die oktamere Form der MtCK aller untersuchten Spezies eine sehr ähnliche Struktur hat. Die Moleküle sind würfelförmig, mit einer Seitenlänge von 10 nm und besitzen eine zentrale Öffnung mit einem Durchmesser von 2,5 nm [Schnyder et al. 1994].

Infolge seiner identischen Ober- und Unterseite ist die oktamere MtCK in der Lage, gleichzeitig an zwei gegenüberliegende Membranen zu binden [Wyss et al. 1992, Stachowiak et al. 1996]. Die mitochondriale Creatinkinase ist im Intermembranraum der Mitochondrien entlang der äußeren Oberfläche der inneren Membran lokalisiert. Besonders konzentriert ist sie in den sogenannten „Contact Sites“, engen Berührungsstellen der inneren und äußeren Mitochondrienmembran. Rojo et al. zeigten sogar, dass die MtCK-Oktamere in der Lage sind, die Bildung von „Contact Sites“ zwischen den beiden Mitochondrienmembranen zu vermitteln [Rojo et al. 1991, Adams et al. 1989, Kottke et al. 1991].

Die Interaktion der MtCK mit den mitochondrialen Membranen scheint hauptsächlich durch elektrostatische Interaktion der positiv geladenen MtCK (Arg 19, Lys 20, und His 21) mit den negativ geladenen Phospholipiden (Cardiolipin) der Membran zu erfolgen [Cheneval und Carafoli 1988].

2.3 Der „Creatin-Shuttle“

ATP wird im Herzen vorwiegend in den Mitochondrien durch die oxidative Phosphorylierung gebildet und im Cytosol an den Myofibrillen durch Muskelkontraktion verbraucht. Um einen ausreichenden Energietransfer zwischen mitochondrialer Matrix und dem Cytosol zu gewährleisten, müssen die Bildung des ATPs (Glykolyse und oxidative Phosphorylierung) und die das ATP verbrauchenden Reaktionen (z.B. Muskelkontraktion und Ionenpumpen) effektiv gekoppelt sein.

Seit der Entdeckung des CrP im Jahr 1927 [Eggletton und Eggletton 1927], sind viele

Modelle über die Funktion des CK/CrP-Systems im Energiemetabolismus entwickelt worden.

Samuel Bessman war der Erste, der das Konzept des „Creatin-Shuttle“ formulierte [Bessman und Geiger 1981], welcher aus den mitochondrialen und cytosolischen Creatinkinasesystemen besteht und in Abbildung 2 dargestellt ist.

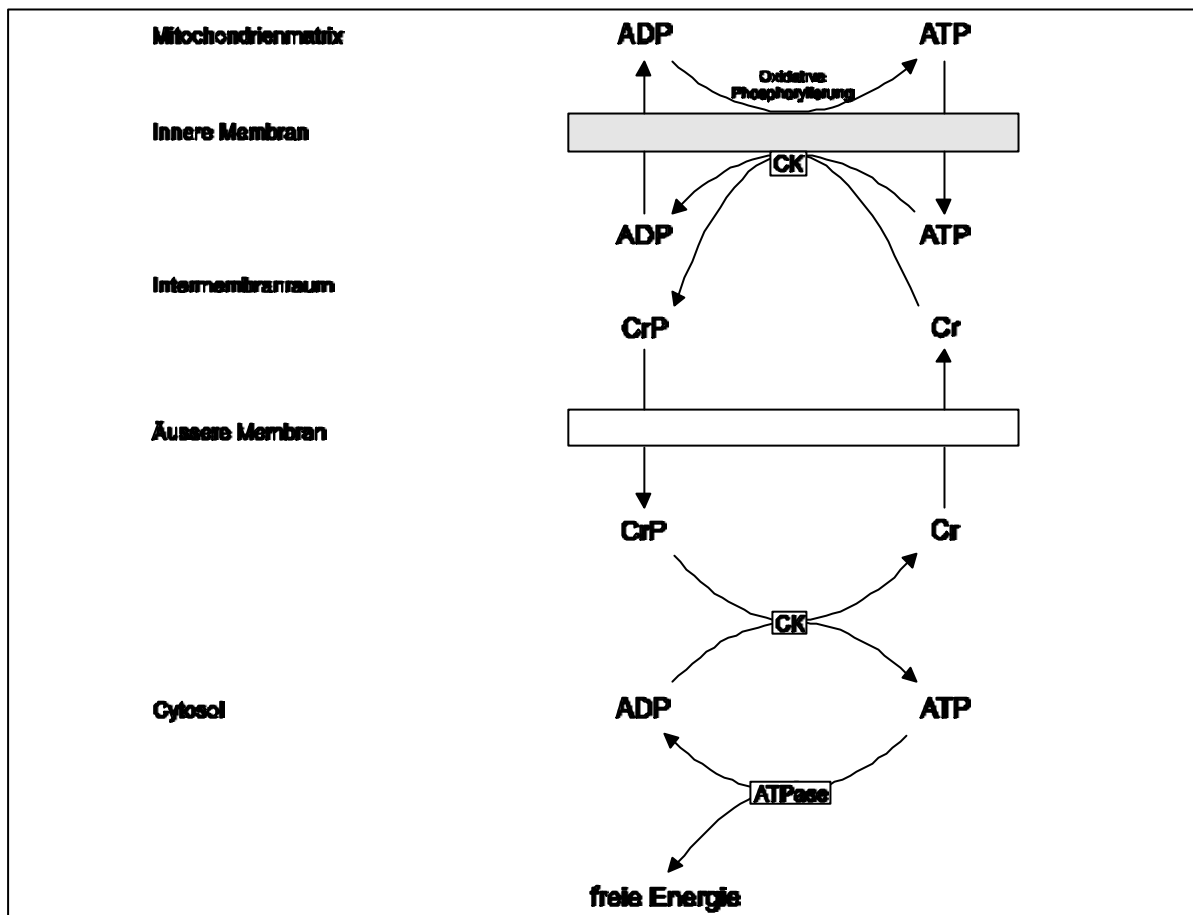


Abbildung 2: Der „Creatin-Shuttle“

Im Intermembranraum der Mitochondrien wird durch die mitochondriale Creatinkinase Creatin unter Verwendung von mitochondrialem ATP phosphoryliert. Das Creatinphosphat diffundiert ins Cytosol zu den cytosolischen Creatinkinasen, welche es zur Synthese von ATP verwenden. Das Creatin diffundiert zu den Mitochondrien zurück und schließt den Kreis des „Shuttle“.

Die Konzentrationen der Metabolite betragen im ruhenden Muskel $[ATP] = 3 - 5 \text{ mM}$, $[ADP] = 1 - 20 \text{ }\mu\text{M}$, $[CrP] = 20 - 35 \text{ mM}$ und $[Cr] = 5 - 10 \text{ mM}$ [Wallimann et al. 1992]. Im aktiven Muskel nimmt der ATP-Spiegel nur geringfügig ab, bis der größte Teil des CrP verbraucht ist. Der ADP- und der Pi-Spiegel steigen hingegen rasch an. Ebenso erhöht sich

der AMP-Spiegel unter der Wirkung der Adenylat-Kinase. Das Creatinphosphat wirkt so als „Puffer“ für ATP und vergrößert die Menge an schnell verfügbarer Energie [Wallimann et al. 1992, Stryer 1994].

Neben der Pufferwirkung hat das CrP auch eine Transportfunktion. Da die Cr-Konzentration drei Größenordnungen höher ist als die des ADP, werden entstehende Konzentrationsgradienten schneller ausgeglichen und es kommt nicht, wie beim ADP zur Diffusionslimitation. Weiterhin besitzen Cr und CrP im Vergleich zu ADP und ATP höhere Diffusionskoeffizienten, wodurch ein effizienterer Transport stattfindet [Yoshizaki et al. 1987, 1990].

Da Cr und CrP nicht wie ATP und ADP an der Regulation des Intermediärstoffwechsels beteiligt und die CK Isoenzyme subzellulär kompartimentiert sind, besteht außerdem die Möglichkeit einer gezielten Regulation des lokalen ATP/ADP-Verhältnisses [Wallimann et al. 1989, Wallimann 1992].

2.4 Kopplung der MtCK an die oxidative Phosphorylierung

Bei pH 7 beträgt die freie Energie der Hydrolyse des Creatinphosphats $-43,1$ kJ/mol, verglichen mit $-30,5$ kJ/mol für ATP. Somit ist die Änderung der freien Standardenergie bei der Bildung von ATP aus Creatinphosphat $-12,6$ kJ/mol, was einer Gleichgewichtskonstante von 162 entspricht.

$$K = \frac{[ATP][Cr]}{[ADP][CrP]} = 162$$

Durch das höhere Phosphorylierungspotential des Creatinphosphats gegenüber dem ATP, liegt das Gleichgewicht der Reaktion auf der Seite der ATP-Bildung [Stryer 1994]. Die Übertragung des energiereichen Phosphats auf das Creatin wird aber durch eine enge Kopplung der mitochondrialen Creatinkinase an die oxidative Phosphorylierung ermöglicht. In den „Contact Sites“ bilden die MtCK-Oktamere mit dem Adeninnukleotid-Translokator (ANT) und einem Porin der äußeren Membran eine funktionelle Einheit, die einen effektiven Transport der Metabolite zwischen den katalytischen Zentren der beiden Proteine erlaubt (Abbildung 3) [Schlegel et al. 1990a, Bridiczka et al. 1990]. Durch diese Mikrokompartmentierung ist die Konzentration des ATP im Bereich der CK sehr hoch und die des ADP sehr gering. Der geordnete Multienzymkomplex ist somit ein effektives Mittel, um die CK-Reaktion im Intermembranraum vom Gleichgewicht weg ablaufen zu

1985, Schlegel et al. 1988, Wyss et al. 1992, Soboll et al. 1999]. Durch die hohe Affinität der MtCK zur Mitochondrienmembran und dem mitochondrialen Porin wird zusätzlich die Bildung der Oktamere gefördert und die oktamere Form des Moleküls stabilisiert [Rojo et al. 1991, Stachowiak et al. 1996, Brdiczka et al. 1994].

In vitro ist das Gleichgewicht neben der Proteinkonzentration auch von der Ionenstärke und dem pH-Wert abhängig. 1M KCl, 1 – 8 M Harnstoff, Gleichgewichtskonzentrationen der Substrate (MgADP + MgATP + Cr + CrP) und die Bildung des „Transition-State-Analogue Complex“ (MtCK + MgADP + Cr + Nitrat) resultieren in einer schnellen Dissoziation des Oktamers [Wyss et al. 1992, Lipskaya et al. 1985, Schlegel et al. 1988].

Inwieweit die Faktoren, die das Oktamer/Dimer-Verhältnis *in vitro* beeinflussen können, auch *in vivo* zu Änderungen dieses Verhältnisses führen, muß noch untersucht werden.

Gezeigt werden konnte bereits, dass Ischemie und Reperfusion vermutlich durch Bildung von Peroxynitrit (ONOO⁻) und Induktion der Stickoxidsynthase *in vivo* zu einem verminderten Oktameranteil führen [Soboll et al. 1999].

2.6 Regulation der CK-Reaktion

Lange Zeit gab es keine überzeugenden Beweise für eine Regulation der CK-Aktivität *in vivo*. In neueren Untersuchungen konnte aber gezeigt werden, dass sowohl die CKB als auch die CKM *in vivo* phosphoryliert wird [Hemmer et al. 1993]. Die Phosphorylierung erfolgt durch die Proteinkinase C und könnte eine wichtige Rolle im zellulären Energiemetabolismus spielen, da sie den K_m-Wert für CrP erniedrigt [Quest et al. 1990, Hemmer et al. 1993]. Weiterhin konnte für eine Reihe von CK Isoenzyme eine Autophosphorylierung nachgewiesen werden [Hemmer et al. 1993, 1995].

Die AMP-aktivierte Proteinkinase hemmt durch Phosphorylierung Schlüsselenzyme in energieverbrauchenden Stoffwechselwegen, um den zellulären ATP-Spiegel aufrecht zu erhalten. Auch die CKMM wird durch diese Proteinkinase phosphoryliert und teilweise gehemmt. Die AMP-aktivierte Proteinkinase selbst wird durch eine ansteigende AMP-Konzentration und durch ein erniedrigtes CrP/Cr-Verhältnis induziert [Ponticos et al. 1998].

2.7 Aminosäuresequenz und Genstruktur der CK

Die vier CK Isoenzyme zeigen eine hohe Sequenzhomologie und Konservierung der Sekundärstruktur. Die Aminosäuresequenzen der verschiedenen Isoenzyme bestehen aus sechs homologen Bereichen, die durch sieben, weniger konservierte Regionen getrennt sind (Abbildung 4). Die hoch konservierten Bereiche sind wahrscheinlich in essentielle Funktionen des Enzyms, wie z.B. Substratbindung, katalytische Aktivität und die Bildung des Dimers, involviert. Im Gegensatz dazu sind die weniger konservierten Bereiche möglicherweise für die Isoenzym spezifischen Eigenschaften, wie die Interaktion mit subzellulären Strukturen oder die Oktamer-Bildung verantwortlich.

Sequenzvergleiche der CKs von Säugetieren und Vögeln ergaben, dass die Sequenzen der cytosolischen Isoenzyme untereinander (77 – 82 % Identität) bzw. der mitochondrialen Isoenzyme (82 – 84 %) untereinander einen höheren Grad der Homologie aufweisen, als die mitochondrialen CKs verglichen mit den cytosolischen (60 – 65 %; Tabelle 1) [Hossle et al. 1988, Payne et al. 1991, Mühlebach et al. 1994].

Tabelle 1: Aminosäuresequenzvergleich der CK von Säugetieren und Vögeln bzw. Mensch und Ratte [Mühlebach et al. 1994, Payne et al. 1991].

CKs	Grad der Identität Säugetiere / Vögel	Grad der Identität Mensch / Ratte
CKBs untereinander	88 – 98 %	92 % 87 %
CKMs untereinander	89 – 99 %	
uMtCK untereinander	91 – 98 %	
sMtCK untereinander	89 – 96 %	
uMtCK mit sMtCK	82 – 84 %	
CKB mit CKM	77 – 82 %	
MtCK mit cytosolische CK	60 – 65 %	

Während der Evolution gab es daher offensichtlich eine erste Genduplikation, welche zu einem cytosolischen und einem mitochondrialen Vorläufer-Gen führte. Weitere Genduplikationen, die zu den multiplen cytosolischen und mitochondrialen CKs führten, müssen zu einem späteren Zeitpunkt in der Evolution stattgefunden haben [Klein et al. 1991]. Verdeutlicht wird dies auch durch die Tatsache, dass die Längen der Exons und die Spleißstellen für alle cytosolische CKs einerseits und für alle mitochondrialen CKs andererseits

gleich sind. Vergleicht man hingegen die Genstruktur der mitochondrialen CKs mit der der cytosolischen, so findet man, abgesehen von einem konservierten Exon (Abbildung 4, schwarz dargestellt), so gut wie keine Homologien.

Zusätzlich zum nativen Protein kodiert die mRNA der MtCK ein aminoterminales Signalpeptid (Abbildung 4, grau dargestellt), welches nach dem Import in die Mitochondrien proteolytisch abgespalten wird [Haas et al. 1989, 1990, Hossle et al. 1988, Payne et al. 1991, Perryman et al. 1983].

Die sarkomere MtCK besitzt eine ähnliche Genstruktur des 5'-Endes wie kontraktile Proteine der Sarkomere mit zwei untranslatierten Exons (Abbildung 4, sMtCK human), die möglicherweise für die koordinierte Expression dieser Proteine verantwortlich ist [Klein et al. 1991].

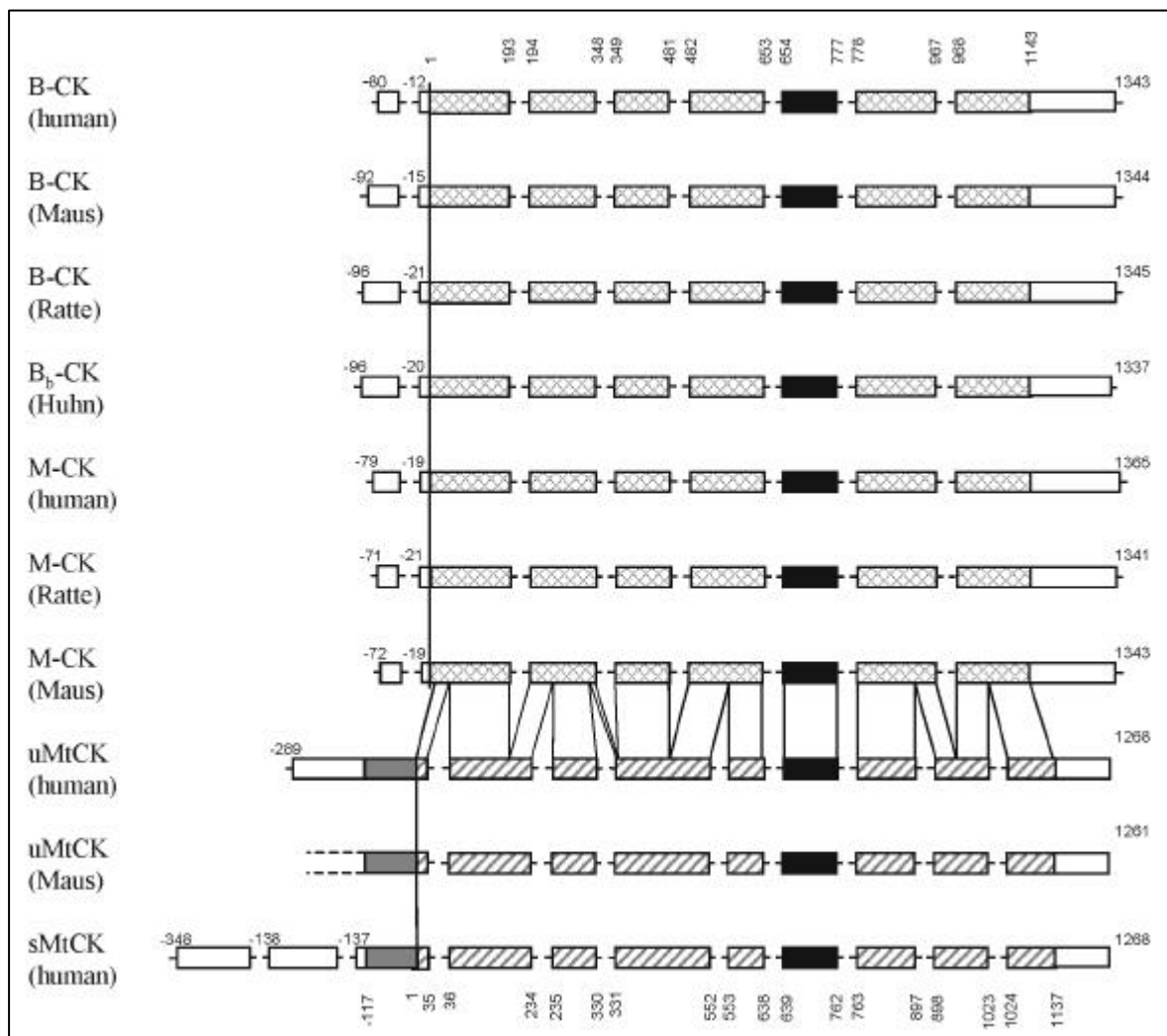


Abbildung 4: Vergleich der Genstrukturen von CK-Isoenzymen verschiedener Spezies. Ober- bzw. unterhalb der Exons sind die entsprechenden Positionen der Nukleotide innerhalb der cDNA-Sequenzen angegeben. Das in allen verglichenen Säugetieren und Vögeln konservierte Exon (sMtCK: Exon 8; cytosolische CKs: Exon 6) ist schwarz dargestellt. Die kodierende Region des Transitpeptids der MtCK ist grau dargestellt [verändert nach Mühlebach et al. 1994].

2.8 Expression der CK

Die Expression der Isoenzyme ändert sich signifikant während der prä- und postnatalen Entwicklung und ist Gewebe- und Zelltypspezifisch reguliert [Hoerter et al. 1994, Mühlebach et al. 1994, Payne und Strauss 1994]. In embryonalen Geweben überwiegt die CKB. Während der Entwicklung zum erwachsenen Zustand nimmt die Expression der CKB ab, wobei parallel dazu die Expression der CKM zunimmt. Bei den mitochondrialen CKs findet man keine Isoenzym-Verschiebung während der Entwicklung.

In adulten Geweben erfolgt eine Coexpression der jeweiligen mitochondrialen mit der entsprechenden cytosolischen CK. Die sMtCK wird dabei mit der CKM und die uMtCK mit der CKB coexprimiert [Haas und Strauss 1990, Klein et al. 1991, Payne et al. 1991].

Der Zeitpunkt der Entwicklung des CK-Systems im Muskel verschiedener Spezies variiert beträchtlich. In allen untersuchten Geweben und Tierarten erfolgt aber die Akkumulierung der MtCK Isoenzyme später als die der cytosolischen CKM und CKB, was zeigt, dass die cytosolischen und mitochondrialen CKs einem anderen regulatorischen Programm unterliegen [Wyss et al. 1992].

Die ATP-Produktion fetaler und postnataler Herzen hängt hauptsächlich von der Aktivität glykolytischer und glykogenolytischer Enzyme ab. Die Lokalisierung der CK im Cytosol ist somit für das unreife Herz optimal. Postnatal wird zunehmend die MtCK im Herzmuskel von Säugetieren exprimiert, zu einem Zeitpunkt an dem die Bindung der CKMM an die M-Bande erfolgt [Carlsson et al. 1982, 1990, Hoerter et al. 1991] und das Herz sein volles kontraktiles Potential erreicht [Baldwin et al. 1977, Khuchua et al. 1989]. Der Anteil der oxidativen Phosphorylierung an der ATP-Produktion ist stark gestiegen und die Zelle wird zu einem kompartimentierten System der Energieproduktion.

Im Gehirn von Säugetieren ist die CKBB in allen Phasen der Entwicklung das Hauptisoenzym. Ob die MtCK zum Zeitpunkt der Geburt vorhanden ist, wird in der Literatur widersprüchlich angegeben. Sie steigt aber postnatal bis zur adulten Aktivität von 15 % der totalen CK-Aktivität an [Norwood et al. 1983]. Zur gleichen Zeit entwickelt sich eine komplexe neuronale Aktivität [Wyss et al. 1992].

Die Expression der vier CK Isoformen wird während der Entwicklung auf Ebene der Transkription und möglicherweise auch auf der Ebene der Translation [Payne et al. 1993] reguliert. Die Gründe für die entwicklungsbedingten Änderungen sind noch nicht voll verstanden. Der Übergang von der B- zur M-Form der CK hat vermutlich mit der Isoenzym-

spezifischen, subzellulären Lokalisierung zu tun [Wyss et al. 1992]. Die koordinierte Expression der CK unterstützt auch die „Cr-Shuttle“-Hypothese.

2.9 Bedeutung der CK für die Pathologie des Herzens

Reaktive Sauerstoffspezies werden in Verbindung mit einer Reihe von Herzerkrankungen gebracht, besonders bei Ischemie / Reperfusionsschäden (z.B. beim Herzinfarkt), welche mit der Bildung freier Radikale einhergehen. In intakten Mitochondrien ist die MtCK ein Hauptziel für die Schädigung durch Peroxynitrit. Perfusion von Herzen mit NO-Donatoren führt zu einer Inhibierung der CK um 65 % und zu einem gleichzeitigen Abfall der kontraktile Reserve des Herzens [Gross et al. 1996]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch H_2O_2 die CKMM inaktiviert und die Aktivität der MtCK in Herzmitochondrien verringert wird [Stachowiak et al. 1998]. Die cytosolische CK, d.h. auch die am Sarkoplasmatischen Reticulum (SR) gebundene CKMM, welche funktionell mit der SR-Ca^{2+} -Pumpe gekoppelt ist, ist ebenfalls sehr sensitiv gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies, so dass eine Beeinträchtigung des CK-Systems auch die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase stört.

Ein besonderes Merkmal mitochondrialer Myopathien, besonders von mitochondrialen Encephalomyopathien, ist die Bildung sogenannter „ragged-red“ Muskelfasern, die sich durch abnorme, vergrößerte Mitochondrien auszeichnen. Diese Mitochondrien enthalten hoch geordnete, kristalline MtCK-Einschlüsse, die durch eine kompensatorische Überexpression der MtCK gebildet werden [Wyss und Wallimann 1994]. Wie wichtig das CK-System für die Funktion des Herzmuskels und der Herz-Reizleitung ist, wurde auch mit Hilfe transgener Mäuse gezeigt, die keine oder nur sehr wenig CK im Skelett- bzw. Herzmuskel exprimieren und Störungen in der Muskel- und Herzfunktion aufweisen [Steeghs et al. 1997]. Ratten, die mit dem Cr-Analog Guanidino-Propionsäure (GPA) gefüttert wurden, was den Creatinspiegel im Muskel um 80 - 90 % erniedrigt, zeigen deutliche Anzeichen einer Hypertrophierung des Herzens [Mekhfi et al. 1990] mit Störungen in der Kontraktion, sowie einen Anstieg des linksventrikulären, diastolischen Druckes (LVDP) [Kapelko et al. 1988, 1989, Zweier et al. 1991].

Cardiomyopathien können u.a. durch angeborene Defekte oder Hochdruck ausgelöst werden. Bei Kurzzeitmyopathien z.B. in Tierexperimenten durch Abbinden der Aorta induziert, steigt die totale CK-Aktivität innerhalb von vier Tagen im hypertensiven Tier. Langzeitcardiomyopathien können durch eine Stenose der Aorta, Volumenbelastung, Bluthochdruck, Erkrankungen der Koronararterien, Diabetes oder erbliche Erkrankungen

verursacht werden. Hierbei kommt es meist zu einer erniedrigten CK-Aktivität, einem erniedrigten Flux der CK-Reaktion und einem Abfall des Cr-Gehaltes.

In spontan hypertensiven Ratten, die durch eine stabil kompensierte Hypertrophie des Myokards charakterisiert sind, beobachtet man während der ersten 12 Lebensmonate keine Veränderung der totalen CK- und MtCK-Aktivität. Auch der Flux der CK-Reaktion ist normal. Zwischen dem 12. und 18. Lebensmonat erfolgt der Übergang vom stabil kompensierten Zustand zum Herzversagen. Parallel zur funktionellen Kapazität des Herzmuskels ist besonders auch die MtCK-Aktivität drastisch erniedrigt [Bittl und Ingwall 1987, Ingwall et al. 1990]. Möglicherweise ist der Verlust der MtCK-Aktivität und die Entkopplung des „Cr-Shuttles“ ein wichtiger Punkt in der Entwicklung des Herzversagens.

2.10 Hypertrophie

Herzinfarkt und plötzliches Herzversagen sind weltweit die Hauptursachen für Invalidität und Tod. Alleine in Deutschland erleiden jährlich 282000 Menschen einen Herzinfarkt, wobei 50 % der Patienten sterben. Im Säugetierherz geht normalerweise allen Formen des Herzversagens die Entwicklung einer Hypertrophie voraus. Die cardiale Hypertrophie ist eine kompensatorische oder adaptive Antwort des Herzens auf eine angestiegene Arbeitsleistung, welche aufgrund verschiedener physiologischer oder pathologischer Stimuli erfolgt. Die am besten untersuchten Ursachen für die Hypertrophie sind mechanische Überbelastung wie Bluthochdruck, Volumenbelastung und Ausdauertraining. Neurohumorale Aktivierung durch α 1-adrenerge und β -adrenerge Agonisten, Angiotensin II und Schilddrüsenhormone kann ebenfalls eine Hypertrophie verursachen. Weiterhin können auch erbliche Defekte zur Hypertrophie führen.

Erwachsene Cardiomyocyten sind vollständig differenzierte Zellen und haben die Fähigkeit zur Zellteilung verloren. Die Vergrößerung des Herzens in der Hypertrophie wird daher nur durch einen Anstieg in der Größe der Zellen verursacht, und nicht durch Teilung der Muskelzellen. Die Hypertrophie wird von unterschiedlichen qualitativen und quantitativen Änderungen der Genexpression begleitet. In Zellkulturmodellen konnte gezeigt werden, dass ein hypertropher Stimulus innerhalb von 30 Minuten zur Aktivierung der sogenannten frühen Gene („immediat-early response genes“), z.B. *erg-1*, *hsp 70*, *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* führt. Nach 6 - 12 Stunden erfolgt die Expression von „fetalen Genen“ wie die schwere Kette des β -Myosins (β -MHC), das skeletale α -Aktin (α -sk Aktin) und der atriale natriuretische Faktor (ANF). Die Hochregulierung der konstitutiv exprimierten, kontrak-

tilen Proteine, z.B. die ventrikuläre leichte Kette 2 des Myosins (MLC-2) und das α -Aktin des Herzmuskels, erfolgt in der Zellkultur nach 12 – 24 Stunden. Die Veränderungen in der Genexpression resultieren alle in einem Anstieg der Kontraktionseffizienz und einer Verminderung der Belastung der Herzwand [Schaub et al. 1997, Sugden und Clerk 1998]. Eine verminderte Expression der Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums erklärt die verlangsamte Relaxation im hypertrophierten Herz [Schwartz et al. 1993]. Diese Verlangsamung erlaubt dem Herzen eine normale maximale Spannung bei einer langsameren Rate zu erhalten [Swynghedauw 1991].

Die myocardiale Hypertrophie kann als Übergang zwischen dem normalen Zustand und dem Herzversagen angesehen werden. Klinische Studien zeigten, dass die Hypertrophie nicht nur ein adaptiver Zustand vor dem Herzversagen ist, sondern einen unabhängigen Risikofaktor darstellt. Länger andauernde Hypertrophie führt zur dilatierten Cardiomyopathie und letztendlich zum Herzversagen.

Trotz umfassender Untersuchungen der Pathogenese der humanen Cardiomyopathie ist der Mechanismus der Entwicklung dieser Krankheit noch nicht geklärt.

2.11 Signaltransduktion der Hypertrophie

Die Etablierung von Primärkulturen von Cardiomyocyten als Modell für die Hypertrophie hat die Identifizierung verschiedener Signaltransduktionswege ermöglicht [Sugden und Clerk 1998, Hefti et al. 1997]. Der Hauptsignalweg erfolgt über den Ras-Raf-MEK-MAP-Kinase-Weg. Es existieren aber alternative Signalwege, die untereinander verbunden sind und Verzweigungspunkte zu cytosolischen Zielen besitzen (Abbildung 5, offene Pfeile). Mechanischer Stress ist ein initialer Faktor für die Hypertrophierung des Herzens als Antwort auf Überlastung durch z.B. Bluthochdruck (Abbildung 5, gestrichelter Pfeil). Die Dehnung der Cardiomyocyten aktiviert „second messenger“ wie Phosphatidylinositol und Proteinkinasen, z.B. die Proteinkinase C, die Raf-1-Kinase und die durch extrazelluläre Signale regulierten Proteinkinasen (ERKs).

Das Renin-Angiotensin-System (Angiotensin II) und Endothelin-1 sind ebenfalls in die Bildung der Hypertrophie durch Druckbelastung involviert.

Neben mechanischen Faktoren induzieren auch neurohumorale Faktoren die cardiale Hypertrophie. Die Aktivierung der Proteinkinase-Kaskaden erfolgt durch Katecholamine über die Induktion der Proteinkinase A (PKA) durch β -Rezeptoren und über die Induktion der Proteinkinase C (PKC) durch α -Rezeptoren. Das Herz enthält des Weiteren eine

Anzahl an Wachstumsfaktoren, wie aFGF, bFGF und TGF β , deren Aktivität über Rezeptor-Tyrosinkinasen vermittelt wird. Diese Wachstumsfaktoren, welche das Wachstum fördern und hemmen können, sind im adulten Herz stabil reguliert. Hormonelle und mechanische Einflüsse können in die Regulation eingreifen.

Die Wirkung der Cytokine (Interleukin-1 β und Cardiotropin-1), die als Signalmoleküle der Zell-Zell-Kommunikation dienen, wird durch die Cytokin-Rezeptoren vermittelt.

Die Herzleistung kann außerdem direkt mit der Schilddrüsenhormonkonzentration im Serum korreliert werden [Hefti et al. 1997]. Die Wirkung der Schilddrüsenhormone und deren Signalweg wird in den Kapiteln 1.12 – 1.16 erklärt.

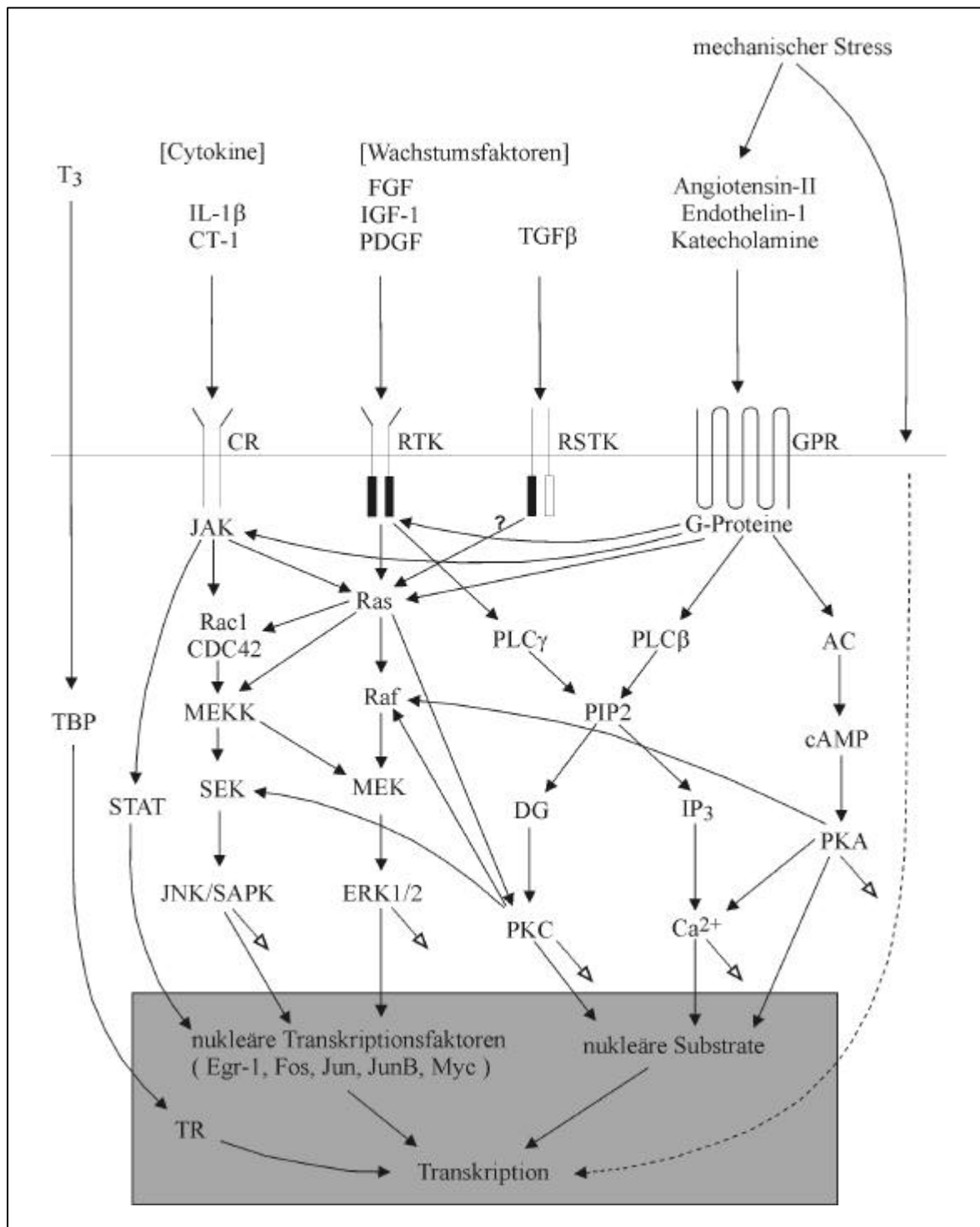


Abbildung 5: Signaltransduktionswege der cardialen Hypertrophie [verändert nach Schaub et al. 1997]

Möglicherweise werden diese Signaltransduktionswege *in vivo* selbst in der kompensierten Hypertrophie ausbalanciert. Wird diese Balance gestört, so entsteht der pathologische Phänotyp des Herzens. Die Kenntnis dieser Signalwege ist deshalb essentiell für die Entwicklung therapeutischer Strategien zur Behandlung der cardialen Hypertrophie [Schaub et al. 1997].

2.12 Schilddrüsenhormone

Das wichtigste Hormon der Schilddrüse, das 3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (Thyroxin, T₄), wurde 1915 von Kendall entdeckt [Kendall 1983]. Es ist biologisch wenig aktiv und wird im Wesentlichen extrathyreoidal durch Dejodierung des äußeren Ringes zum aktiven Hormon 3,5,3'-Triiodthyronin (T₃) umgewandelt. T₃ selbst entsteht nur in geringem Umfang (ca. 20 %) direkt in den Follikeln der Schilddrüse [Hennemann et al. 1994]. Die Dejodierung des T₄ erfolgt hauptsächlich in der Leber, den Nieren und der Schilddrüse und wird durch die Typ I-Dejodinase katalysiert [Köhrle et al. 1987].

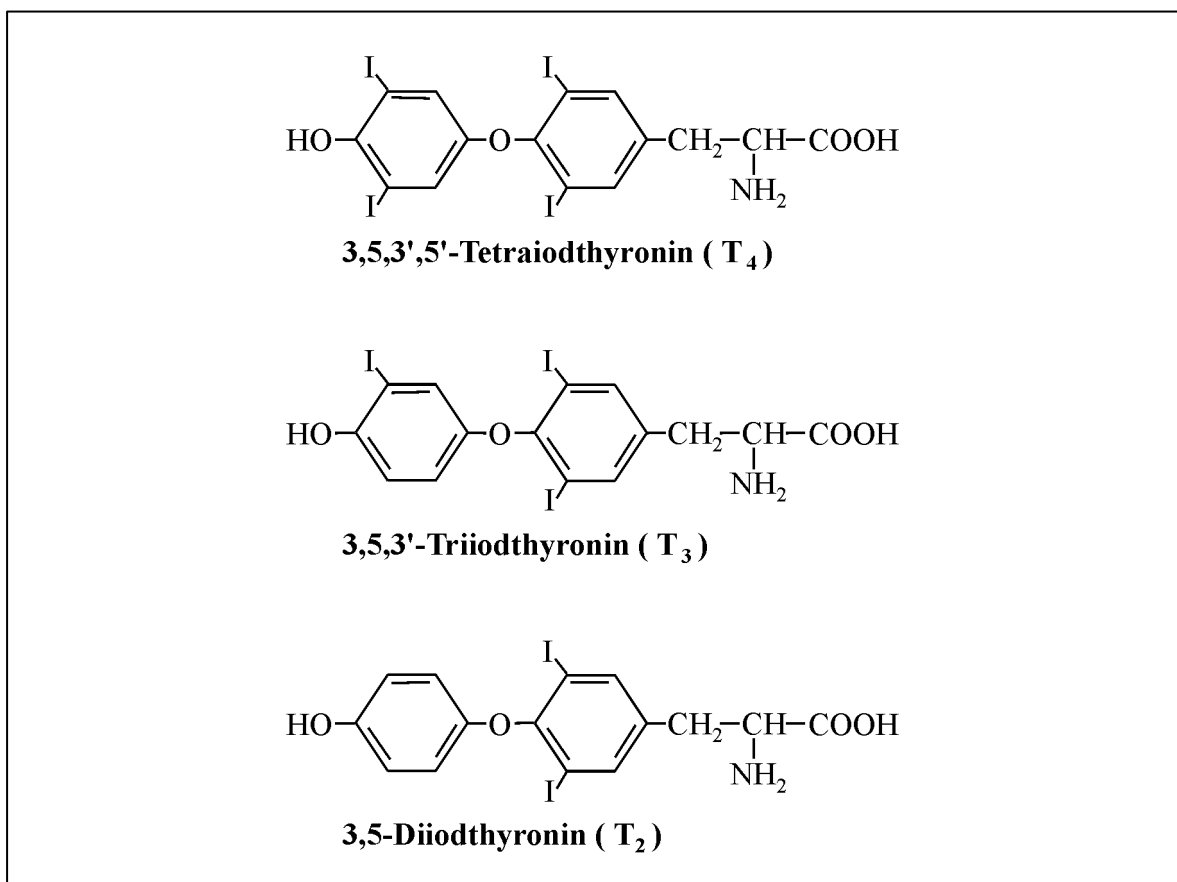


Abbildung 6: Molekülstruktur der Schilddrüsenhormone 3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (Thyroxin), 3,5,3'-Triiodthyronin und 3,5-Diiodthyronin.

Thiouracil-Derivate wie Propylthiouracil (PTU) sind spezifische Inhibitoren der Typ I-Dejodinase. PTU ist daher ein wirksames Thyreostatikum zur therapeutischen Behandlung der Überfunktion der Schilddrüse [Astwood und Van der Laan 1945, Papa et al. 1997]. In Tierexperimenten kann es durch perorale Gabe zur Erzeugung einer Hypothyreose eingesetzt werden.

Die Synthese der Schilddrüsenhormone wird durch das Thyreoidea-stimulierende Hormon (Thyreotropin, TSH) der Hypophyse kontrolliert. T_3 und T_4 regulieren wiederum die TSH-Produktion als Teil einer klassischen „feedback“-Schleife [Chatterjee 1994].

Im Blut werden die schlecht wasserlöslichen Schilddrüsenhormone fast vollständig an Plasmaproteine wie das Thyroxin bindende Globulin, das Thyroxin bindende Präalbumin und Albumin gebunden (T_4 : 99,95 %, T_3 : 99,7 %). Die Bindung an die Plasmaproteine führt neben einem erleichterten Transport auch zu einer extrem langen Halbwertszeit (18 – 24 Stunden für T_3 und 6 - 8 Tage für T_4) [Köhrle 1994]. Der Transport von T_3 und T_4 durch die Plasmamembran in vielen Zellen und Geweben erfolgt durch einen „Carrier“-vermittelten Prozess, der Temperatur- und Energie-abhängig ist [Hennemann et al. 1994]. Ein Hauptmerkmal der Schilddrüsenhormone ist die Vielfalt der zellulären Funktionen, die sie in so gut wie jedem Gewebetyp beeinflussen. Schilddrüsenhormone steuern z. B. die Entwicklungsprozesse während der Ontogenese. Sie sind deshalb für eine normale geistige und körperliche Entwicklung sehr wichtig.

Im erwachsenen Organismus regulieren sie den Grundumsatz. Die Energie wird durch Steigerung der Lipolyse, Glykogenolyse und Glykolyse bereitgestellt. Daraus resultiert eine gesteigerte basale Atmungsrate und es kommt zu einer Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs und einer gesteigerten Wärmeproduktion. Des Weiteren steigern die Schilddrüsenhormone die Glukoneogenese, den Abbau von VLDL und den Umbau von Cholesterin in Gallensäuren [Lang 1994, Motomura und Brent 1998].

2.13 Wirkung der Schilddrüsenhormone auf die Genexpression

Die Wirkung der Schilddrüsenhormone auf die Genexpression wird durch die Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) vermittelt, die von zwei Genen $TR\alpha$ und $TR\beta$ codiert werden. Alternatives Spleißen führt zu einer weiteren Variation ($TR\beta 1$, $TR\beta 2$, $TR\alpha 1$, $TR\alpha 2$, $TR\alpha 3$) [Lazar 1993]. Die Expression der TRs erfolgt abhängig vom Gewebe und vom Entwicklungsstatus. $TR\alpha 1$ und $TR\beta$ binden den Liganden T_3 und aktivieren die Transkription verschiedener Zielgene. Die Isoformen $TR\alpha 2$ und $TR\alpha 3$ binden im Gegensatz zu den anderen Isoformen keinen Liganden und bilden keine Heterodimere aus. Sie werden in fast allen Geweben exprimiert, vor allem aber im Gehirn, und können die Bindung der anderen Rezeptoren hemmen [Chatterjee 1994]. Die TRs werden aufgrund ihrer ähnlichen Struktur und Funktion mit anderen nukleären Rezeptoren zur „Kern-

rezeptor-Superfamilie“ zusammengefasst, zu denen u.a. die Rezeptoren für Vitamin D₃ (VDR), 9-cis-VitA-Säure (RXR) und all-trans-VitA-Säure (RAR) gehören. Die Primärstruktur der nukleären Rezeptoren ist modular aufgebaut (Abbildung 7). Es können vier Abschnitte unterschieden werden, denen verschiedene Funktionen zukommen: Transaktivierung, DNA-Bindung, Ligandenbindung, Dimerisierung und andere Protein-Protein-Wechselwirkungen. Weiterhin gibt es nukleäre Lokalisationssignale.

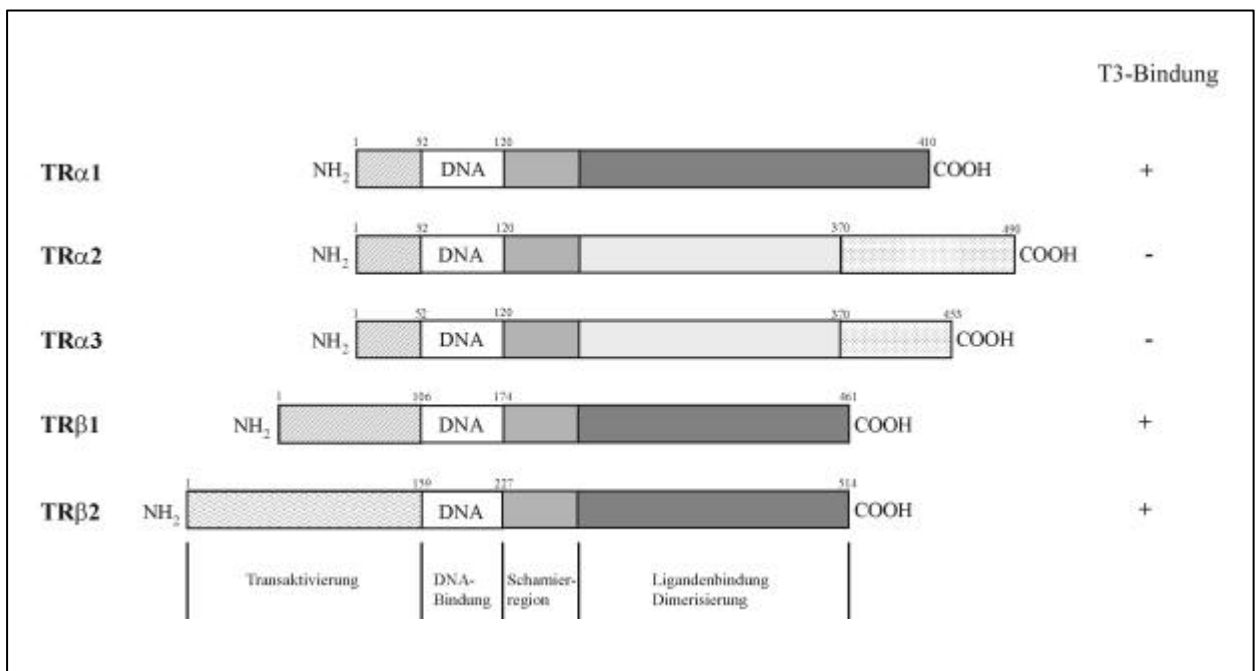


Abbildung 7: Vergleich der Isoformen des Schilddrüsenhormonrezeptors. Gleiche Graufärbung der Abschnitte zeigt homologe Aminosäuresequenzen auf [verändert nach Motomura und Brent 1998].

Die TRs können als Homodimere oder als Heterodimere zusammen mit anderen Kernproteinen wie z.B. dem RXR mit den entsprechenden DNA-Sequenzen (Hormone Responsive Elements, HREs) interagieren. Die DNA-Bindung wird durch zwei Zinkfinger-Elemente der DNA-Bindedomäne vermittelt [Evans 1988]. Die bisher bekannten HREs der nukleären Rezeptoren haben einen sehr ähnlichen Aufbau und bestehen überwiegend aus zwei Kopien einer Hexamersequenz, die im Falle der Schilddrüsenhormon-responsiven Elemente (TRE) die Konsensussequenz AGGTCA besitzen. Diese können gleichgerichtet wiederholt mit einem Abstand von vier Nukleotiden (direct repeat, DR4), spiegelsymmetrisch (palindrome, P) und umgekehrt spiegelsymmetrisch mit einem Abstand von sechs Nukleotiden (inverted palindrome, IP6) angeordnet sein (Abbildung 8) [Umesono et al.

1991]. Die Orientierung und der Abstand der Hexamersequenz führt zur selektiven Bindung der Rezeptordimere an die spezifischen responsiven Elemente.

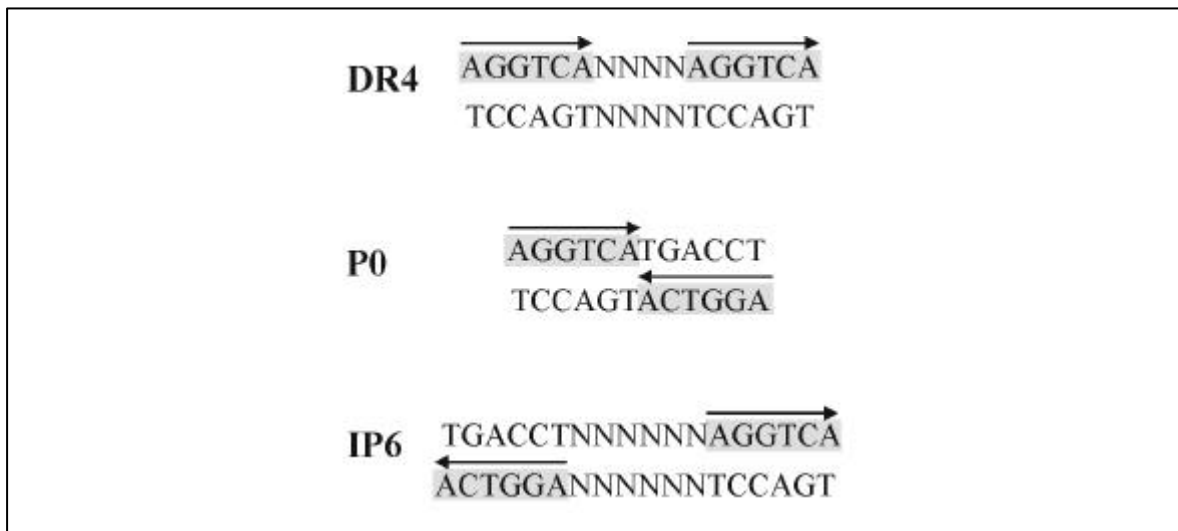


Abbildung 8: Anordnung der hexameren Konsensussequenzen in Schilddrüsenhormon-responsiven Elementen.

Die TRs können in An- und Abwesenheit des Liganden an das TRE binden. Die Bindung des TRs in Abwesenheit von T_3 an das responsive Element des Zielgens kann zu einer Verminderung der basalen Expression des Gens führen. Nach Bindung des Liganden können die TRs die Transkription steigern. Der genaue Mechanismus der Transkriptionsaktivierung ist noch nicht geklärt. In der aminoterminalen Region befindet sich eine schwache Aktivierungsdomäne AF-1 (activation function) und am carboxyterminalen Ende der Ligandbindedomäne befindet sich die stärkere Aktivierungsdomäne AF-2 [Danielian et al. 1992, Baretino et al. 1994]. Die carboxyterminale Ligandbindedomäne aller Hormonbindenden TRs ist hoch konserviert und besteht aus zahlreichen α -Helices. Durch Kristallstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Liganden an den $TR\alpha$ zu einer Konformationsänderung führt [Wagner et al. 1995].

Bei sogenannten positiven HREs können die TR-TR-Homodimere und RXR-TR-Heterodimere stromaufwärts des Transkriptionsstartpunktes binden und in Abwesenheit des Liganden die basale Transkription mit Hilfe von Korepressoren, die mit dem Transkriptions-Initiations-Komplex interagieren, hemmen. Bindung von T_3 führt zur Ablösung der Homodimere von der DNA. Die RXR-TR-Heterodimere bleiben an der DNA gebunden, wobei die Korepressoren durch Koaktivatoren ersetzt werden und die Transkription aktiviert wird. Zu den TR-aktivierten Genen gehören z. B. das Malatenzym [Mariash und

Oppenheimer 1983], die Succinatdehydrogenase [Maddaiah et al. 1981] aber auch mitochondriale Enzyme wie die Glyzerin-3-Phosphatdehydrogenase [Lee und Lardy 1965] und die Pyruvatdehydrogenase [Weinberg und Utter 1979].

Die TRs können die Transkription auch Ligand-abhängig hemmen, indem sie an negativ regulierte HREs binden. Gene, deren Transkription durch negative HREs beeinflusst werden, sind u.a. das Thyrotropin freisetzende Hormon des Hypothalamus (TRH) [Hollenberg et al. 1995] und die Schilddrüsen-stimulierenden Hormone der Hirnanhangdrüse ($TSH\alpha$ und $TSH\beta$) [Chatterjee et al. 1989, Bodenner et al. 1991].

2.14 Extranukleäre Effekte der Schilddrüsenhormone

Die Schilddrüsenhormone zeigen neben den nukleär vermittelten Wirkungen auch signifikante, nicht-genomische Effekte, die innerhalb von Minuten nach der Stimulation auftreten können. Hierbei sind im Gegensatz zur Transkriptionskontrolle T_4 und T_3 gleich wirksam.

Zu den Wirkungen gehören die Regulation der Zellatmung, Veränderungen der Zellmorphologie und die Präsentation von Proteinen an der Oberfläche, der Gefäßwiderstand und die Ionenhomöostase. An der Vermittlung dieser Effekte sind oft Komponenten anderer Signaltransduktionswege beteiligt, wie cAMP, Phosphatidylinositol und deren Proteinkinasen (PKA und PKC), die durch T_4 und T_3 stimuliert werden.

Nachfolgend werden einige Beispiele für diese extranukleären Wirkungen aufgezeigt: Neben einer Steigerung der Expression der $SR-Ca^{2+}$ -ATPase [Limas 1978] können Schilddrüsenhormone deren Aktivität auch extranukleär stimulieren. Die Calziumaufnahme in das SR von Herz- und Muskelzellen wird dadurch beschleunigt [Rudinger et al. 1984, Warnick et al. 1993].

Die Stimulierung der Ca^{2+} -ATPase der Plasmamembran und der Erythrocyten wird vermutlich durch die PKC vermittelt [Galo et al. 1981, Segal 1990, Warnick et al. 1993, Davis und Davis 1996].

Weiterhin wird die Aktivität der M_2 Isoform der Pyruvatkinase im Cytosol durch die Bindung von T_3 and das PKM_2 Monomer beeinflusst [Ashizawa et al. 1991].

T_4 stimuliert die durch Aktin vermittelte Endocytose an den Enden der Synapsen durch Regulation der Aktin-Polymerisierung [Leonard und Farwell 1997] und hemmt die Aktivität der Typ II-Dejodinase [Silva und Leonard 1985].

3,5-Dijodothyronin (T_2) bindet an die Untereinheit Va der Cytochrom c-Oxidase und hebt

damit die allosterische Hemmung der Atmung durch ATP auf [Arnold et al. 1998].

Ojamaa et al. konnten zeigen, dass Zellen der glatten Muskulatur der Rattenaorta in Kultur nach Behandlung mit T_3 relaxieren [Ojamaa et al. 1993].

2.15 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die mitochondriale Atmung

Der Anstieg der cardialen Leistung in der Hyperthyreose wird durch einen Anstieg der ATP-Produktion durch die Mitochondrien im Herz begleitet, welche die primäre Ursache für den erhöhten Sauerstoffverbrauch hyperthyreoter Gewebe und den verringerten Sauerstoffverbrauch hypothyreoter Gewebe ist [Pillar und Seitz 1997].

Der erhöhte Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien in der Hyperthyreose ist das Resultat eines angestiegenen Gehaltes an Atmungsketten-Proteinen. Des Weiteren können Schilddrüsenhormone durch eine Stimulierung des katabolischen Stoffwechsels wie z.B.

β -Oxidation und die Glykolyse die Versorgung der mitochondrialen Atmungskette mit Substraten und so die mitochondriale Energieproduktion steigern. Zusätzlich verändern Schilddrüsenhormone die Lipidzusammensetzung der Mitochondrienmembran durch Aktivierung der an Lipidsynthese und -abbau beteiligten Enzyme und bewirken einen erhöhten Anteil an ungesättigten Fettsäuren. Dies führt zu einer veränderten Aktivität der Membranproteine und zum anderen zu einer erhöhten Permeabilität der Membran für Protonen und damit zur erhöhten state 4-Atmung.

Da Schilddrüsenhormone allerdings auch die Expression der ATP-Synthase und der Atmungsketten-Komplexe erhöhen, wird trotz alledem die ATP-Synthese durch Schilddrüsenhormone verstärkt [Soboll 1993].

2.16 Wirkungen der Schilddrüsenhormone auf das Herz

Das Herz ist ein Hauptziel der Wirkung von Schilddrüsenhormonen. Hyperthyreose führt zu einer erhöhten Kontraktilität des Herzens (positiv inotrop) und einer erhöhten Schlagfrequenz (positiv chronotrop). Hypothyreose hat die gegenteiligen Effekte auf das Herz. Hierfür sind sowohl nukleäre als auch extranukleäre Effekte der Schilddrüsenhormone verantwortlich. Die Kontraktilität des Herzens wird von dem peripheren Widerstand, der Aktivität der Ca^{2+} -ATPase und der myocardialen Respiration beeinflusst [Davis and Davis 1996]. T_3 fördert die Transkription der schweren Kette des α -Myosin ($\text{MHC}\alpha$) und hemmt die Expression der schweren Kette des β -Myosin ($\text{MHC}\beta$). Im euthyreoten Herz überwiegt daher das Myosin V1, welches aus zwei $\text{MHC}\alpha$ Ketten besteht. Im hypothyreoten Rattenherz dominiert das Myosin V3, welches aus zwei $\text{MHC}\beta$ Ketten besteht und eine geringere ATPase-Aktivität besitzt. Dies führt zu der verringerten Geschwindigkeit des Herzmuskels in der Hypothyreose. Im Gegensatz dazu kommt im hyperthyreoten Herzmuskeln ausschließlich Myosin V1 vor.

Eine gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR fördert die Muskelkontraktion durch einen erhöhten SR- Ca^{2+} -Gehalt vor der Kontraktion. Die gesteigerte Aktivität der SR- Ca^{2+} -ATPase führt gleichzeitig auch zu einer schnelleren Ca^{2+} -Aufnahme aus dem Cytosol während der Diastole, so dass die Relaxation in der Hyperthyreose beschleunigt ist [Hellermann und Kahaly 1994, Suko 1971].

Die Na^+ -Aufnahme und sekundär der Na^+ - Ca^{2+} -Austausch am SR des Herzens wird durch Schilddrüsenhormone stimuliert und führt ebenfalls zur erhöhten Kontraktilität des Herzens [Davis und Davis 1996].

Schilddrüsenhormone und sympatomimetische Agentien führen zu ähnlichen physiologischen und pathophysiologischen cardialen Symptomen (Tachycardie, positive Inotropie). Die erhöhte sympatische Erregbarkeit bei Hyperthyreose wird wahrscheinlich durch einen Anstieg der Zahl an β -Rezeptoren und einem Anstieg des stimulatorischen G-Proteins bewirkt [Hellermann und Kahaly 1994]. Der durch Hyperthyreose gesteigerte periphere Gefäßwiderstand führt zum Bluthochdruck. Zusammen mit Änderungen im Energie- und Lipid-Metabolismus führt dies zur frühen Artherosklerose und zur Erkrankung der Koronararterien [Hehrmann 1994].

Die physiologischen Wirkungen der Schilddrüsenhormone auf das Herz und den vaskulären Widerstand macht man sich bei der Behandlung von Patienten mit verschiedenen Herzerkrankungen zunutze. Neben der Verstärkung der Kontraktilität können Schild-

drüsenhormone auch die Häufigkeit von Vorhofflimmern nach Herzoperationen vermindern [Klein und Ojamaa 1998, Gomberg-Maitland und Frishman 1998].

2.17 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte die hormonelle Regulation der CK-Isoenzyme im hypertrophen Rattenherzen untersucht werden. Die Hypertrophie wurde durch Veränderung des Schilddrüsenhormonstatus, sowie durch Isoprenalin-Behandlung herbeigeführt.

Als Tiermodelle eines veränderten Schilddrüsenhormonstatus dienten hypo-, eu- und hyperthyreote Ratten. Zur Aktivierung des β -adrenergen Systems des Herzens erfolgte eine Applikation von Isoprenalin an Ratten. Anhand von isoliert perfundierten Herzen und Herzen von Hungerratten sollte der mögliche Einfluss von cAMP auf die Creatinkinase-Isoenzyme gezeigt werden.

Folgende Parameter wurden in den Herzen untersucht:

- a) der Atmungskontrollquotient als funktioneller Parameter der Mitochondrien
- b) die spezifische Creatinkinaseaktivität in Abhängigkeit vom Hormonstatus
- c) das Oktamer/Dimer-Verhältnis als funktioneller Parameter der MtCK

Zur Frage, ob die Umwandlung der oktameren Form der MtCK in die dimere Form eine regulatorische Bedeutung hat, wurden Versuche durchgeführt, die die Stabilität des Oktamer/Dimer-Verhältnisses der mitochondrialen Creatinkinase in Abhängigkeit vom energetischen Zustand isolierter Mitochondrien zeigen sollten.

- d) die Expression der CK-Isoenzyme

Die Analyse der Promotorsequenz der cytosolischen CK-Isoenzyme sollte Hinweise für eine direkte, nukleär vermittelte Regulation der Expression dieser Isoenzyme durch Schilddrüsenhormone geben.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Bezugsnachweise der verwendeten Chemikalien

Enzyme, Substrate und Chemikalien	Boehringer, Mannheim Merck, Darmstadt Sigma, München
Acrylamid / N, N'-Methylenbisacrylamid (29:1, 40 %)	Serva, Heidelberg
Agarose (Type VII, low gelling temperature)	Sigma, München
Altromin-Standarddiät	Altromin, Lage/Lippe
Barbital-Puffer	Sigma, München
Desoxycytidin-5'-[α - 32 P]triphosphat	Hartmann Analytic, Braunschweig
Desoxyadenosin-5'-[γ - 32 P]triphosphat	Hartmann Analytic, Braunschweig
100 bp DNA Leiter	GibcoBRL, Eggenstein
T4-DNA-Ligase und -Puffer	Promega, Heidelberg
T7-DNA-Polymerase	Pharmacia, Freiburg
Forskolin	Calbiochem, Bad Soden
Fetales Kälberserum (FCS)	Greiner, Frickenhausen
Glykogen	Boehringer, Mannheim
Isobutyl-Methylxanthin (IBMX)	Sigma, München
Isoprenalin	Sigma, München
Klenowfragment und -puffer	Boehringer, Mannheim
Liposomales Transfektionsreagenz N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethylsulfat (DOTAP)	Boehringer, Mannheim
Maxiprep-Kit	Promega, Heidelberg
Miniprep-Kit	Promega, Heidelberg
Multicore-Puffer (10fach)	Promega, Heidelberg
Nembutal (Pentobarbital-Natrium)	Sanofi, Hannover
Nigericin	Sigma, München
2-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid	Fluka, Neu-Ulm
Oligonukleotide	Pharmacia, Freiburg
Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 / 24 / 1)	GibcoBRL, Eggenstein
primärer Antikörper (Maus Anti-CKM)	Chemicon, Temecula U.S.A.

Propylthiouracil (PTU)	Sigma, München
Referenzplasmid pCH110	Pharmacia, Freiburg
RNasin	Promega, Heidelberg
sekundärer Antikörper (Anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat)	Sigma, München
sekundärer Antikörper (Anti-Rabbit IgG Peroxidase-Konjugat)	Sigma, München
Sequenzierungs-Kit	Pharmacia, Freiburg
Taq-Polymerase, rekombinant; PCR-Puffer (10fach); 50mM MgCl ₂	GibcoBRL, Eggenstein
3,5,3',5'-Tetraiodthyronin (Thyroxin T ₄)	Sigma, München
3,5,3'-Triiodthyronin (T ₃)	Sigma, München
TRIZol [®] Reagenz	GibcoBRL, Eggenstein
Zelllinie Cos-7	American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, Maryland, U.S.A.
Zellkulturmedien	GibcoBRL, Eggenstein

3.2 Geräte und Materialien

BAS-Reader Software für Windows 3.1 und Tina 2.09	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Spockhövel
Beckman Counter LS 1801	Beckman, München
Beckman Microfuge E TM	Beckman, München
Begasungsbrutschrank 6000	Heraeus, Osterode
Bio Spin Chromatographiesäulen	BioRad, München
Bio-Imaging Analyzer BAS-1500 IP Reader	Fuji Photo Film Co., Japan
Cellulosepolyacetat-Folien	Schleicher & Schuell, Dassel
DNA Thermo Cycler 480	Perkin Elmer, Überlingen
Dünnschichtchromatographie-Folien (F 1500, Kieselgel)	Schleicher & Schuell, Dassel
ELISA-Reader Victor 1420 Multilabel Counter mit der Software: Wallac 1420 1.00/4	Wallac Oy, Turku, Finnland
Eppendorf-Filterphotometer	Eppendorf, Hamburg
Gel Documentation System Gel Doc 1000 mit Multi-Analyst PC Software	BioRad, München
Geltrockner Modell 583	BioRad, München

Imaging Plate (IP) BAS-MP	Fuji Photo Film Co., Japan
Immobilon-P Transfer-Membran (0,45 µm Porengröße)	Millipore, Bedford
IP Eraser	Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Spockhövel
Membran-Vakuumpumpe	Vacuubrand, Wertheim
Röntgenfilm BioMax MR-1	Kodak, München
Röntgenfilmentwickler Curix 60 Typ 9462/100/140	Agfa, Leverkusen
Sauerstoffmeßgerät und Clark-Sauerstoffelektrode	Bachhofer, Reutlingen
Sigma 2K15 Zentrifuge mit Rotor 12145 und 12139	Sigma, München
Sorvall Zentrifuge RC-5B mit SS34- und SM24-Rotor	Sorvall, Bad Homburg
Spannungsgeräte Power Pac 200/500/3000	BioRad, München
Spannungsgerät Pharmacia ECPS 3000/150	Pharmacia, Freiburg
Teflon-Glas-Homogenisatoren	Braun, Melsungen
Thyristor Regler	Janke u. Kunkel KG, Staufen
Trans-Blot [®] Semi-Dry Transfer-Zelle	Bio-Rad, München
Ultrascan XL Enhanced Laser Densitometer mit der Software GelScan XL 2.1	LKB/Pharmacia, Freiburg
Ultra-Turrax mit 10 mm Dispergier-Werkzeug	Janke u. Kunkel KG, Staufen
Ultrazentrifuge mit Ti 50-Rotor	Beckman, München

3.3 Versuchstiere

Für die Experimente wurden männliche Albinoratten (*rattus norvegicus*, Stamm Wistar III) verwendet. Die Tiere wurden mit Altromin-Standarddiät gefüttert und erhielten Wasser *ad libitum*.

3.3.1 Hypothyreote Ratten

Durch Zugabe von 0,05 % Propylthiouracil (PTU; 2,94 mM) ins Trinkwasser, über einen Zeitraum von vierzehn Tagen, wurde eine Hypothyreose induziert. Die PTU-Lösung wurde alle zwei Tage frisch mit Leitungswasser angesetzt. Die parallel gehaltenen Kontrolltiere erhielten reines Leitungswasser. Zu Beginn des Versuches waren die Ratten sieben Wochen alt und somit erwachsen. Das Körpergewicht der behandelten und der Kontrolltiere wurde täglich überprüft und betrug zu Beginn des Versuches 190 – 210 g. Nach vierzehntägiger Behandlung wurden die Ratten durch intraperitoneale (i.p.) Applikation von Nembutal (Pentobarbital-Natrium ca. 9 mg / 100 g Körpergewicht) narkotisiert und das Herz nach Perfusion mit eiskalter, physiologischer NaCl-Lösung entnommen.

3.3.2 Hyperthyreote Ratten

Zur Untersuchung chronischer Effekte der Schilddrüsenhormone wurde durch tägliche Injektion (i.p.) von 50 µg T₄ / 100 g Körpergewicht bei sechs Ratten eine Hyperthyreose induziert. Die Behandlung erfolgte über sieben Tage und wurde im Labor von Prof. Seitz am Universitäts-Krankenhaus Eppendorf in Hamburg durchgeführt. Das T₄ wurde täglich frisch mit physiologischer NaCl-Lösung (0,25 mg/ml) suspendiert und durch Zugabe von ca. 30 – 40 µl 1M NaOH gelöst. Vier Kontrolltieren wurde das gleiche Volumen reiner NaCl-Lösung injiziert. Zu Beginn des Versuches betrug das Körpergewicht der Tiere 190 – 205 g. 24 Stunden nach der letzten Behandlung wurden die Ratten durch Dekapitation getötet, entblutet und das Herz und die Leber entnommen.

Zur Untersuchung schneller Effekt der Schilddrüsenhormone (akutes Modell) erfolgte an sechs Ratten eine einmalige Applikation (i.p.) von 100 µg T₄ / 100 g Körpergewicht. Das T₄ wurde kurz vorher in 0,2 M NaOH gelöst (1 mg / 100 µl) und 1:10 mit physiologischer NaCl-Lösung verdünnt. Vier Kontrolltiere erhielten entsprechende Mengen des Lösungsmittels. Die Ratten wurden 24 Stunden nach der letzten Behandlung durch Applikation

(i.p.) von Nembutal narkotisiert und das Herz und die Leber nach Perfusion mit eiskalter, physiologischer NaCl-Lösung entnommen.

3.3.3 Ratten im Hungerzustand

Vier Ratten wurden 48 Stunden ohne Futter gehalten, wobei sie Trinkwasser *ad libitum* erhielten. Die Kontrollratten wurden mit Altromin-Standarddiät gefüttert. Durch Applikation (i.p.) von Nembutal wurden die Ratten narkotisiert und das Herz nach Perfusion mit eiskalter, physiologischer NaCl-Lösung entnommen. Das Körpergewicht und die Glukosekonzentration im Serum wurde zur Überprüfung des physiologischen Zustandes bestimmt.

3.3.4 Behandlung von Ratten mit Isoprenalin

Sechs Ratten wurden mit 5 mg Isoprenalin / kg Körpergewicht behandelt. Das Isoprenalin wurde in 1 ml 0,002 M HCl gelöst. Von dieser Lösung wurde 0,1 µl / 100 g Körpergewicht im Bauchbereich subcutan appliziert. Vier Kontrolltiere erhielten die gleiche Menge Lösungsmittel. Sechs Stunden später erfolgte nach Narkotisieren mit Nembutal die Entnahme der Herzen.

3.3.5 Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäuse

Die Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäuse besitzen keinen Ligand-abhängigen Rezeptor ($TR\alpha 1^{-/-}\beta^{-/-}$) [Göthe et al. 1999]. Herz- und Gehirn-Proben dieser Mäuse bzw. entsprechender Kontrolltiere wurden von Prof. Dr. Björn Vennström, Karolinska Institut Stockholm, Schweden zur Verfügung gestellt. Bei den Tieren handelte es sich jeweils um sechs ca. 17 Wochen alte, weibliche Mäuse. Die Herz- und Gehirn-Proben wurden nach Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert bzw. auf Trockeneis verschickt.

3.4 Serumspiegel der Schilddrüsenhormone

Die Blutentnahme erfolgte nach dem Narkotisieren der Ratten aus der *Vena cava posterior*. Das Blut wurde sofort abzentrifugiert und das Serum kurzfristig bis zur Messung der Schilddrüsenhormon-Konzentration bei -20°C gelagert.

Die Messung des Serumspiegels von T_3 und T_4 wurde im Labor von Prof. Reinauer,

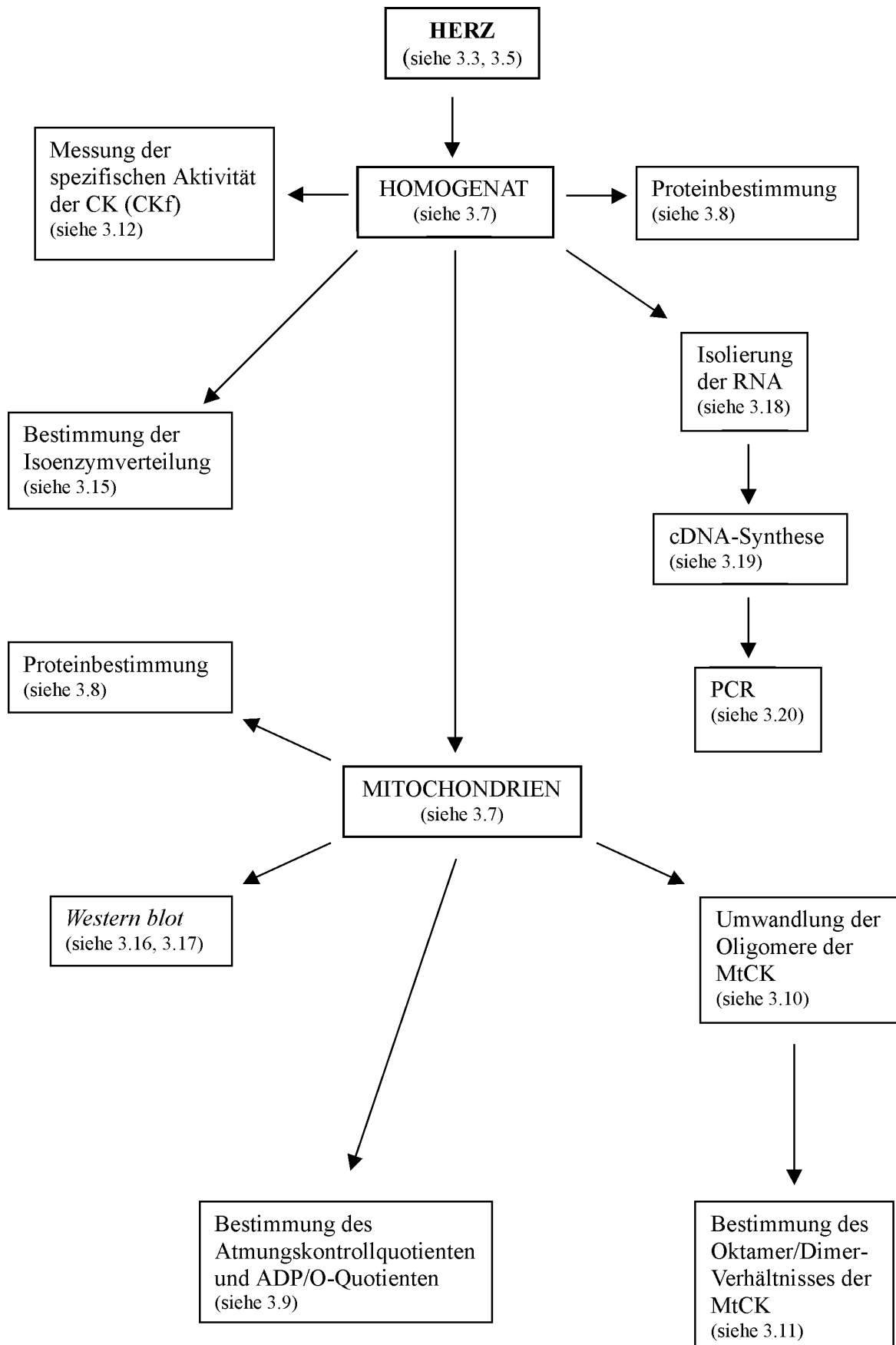
Universitätsklinik Düsseldorf, mit Hilfe eines Chemolumineszenzimmunoassays der Firma Nichols, bzw. im Zentrallabor des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg durchgeführt.

3.5 Herzperfusion nach Langendorff [Langendorff 1895]

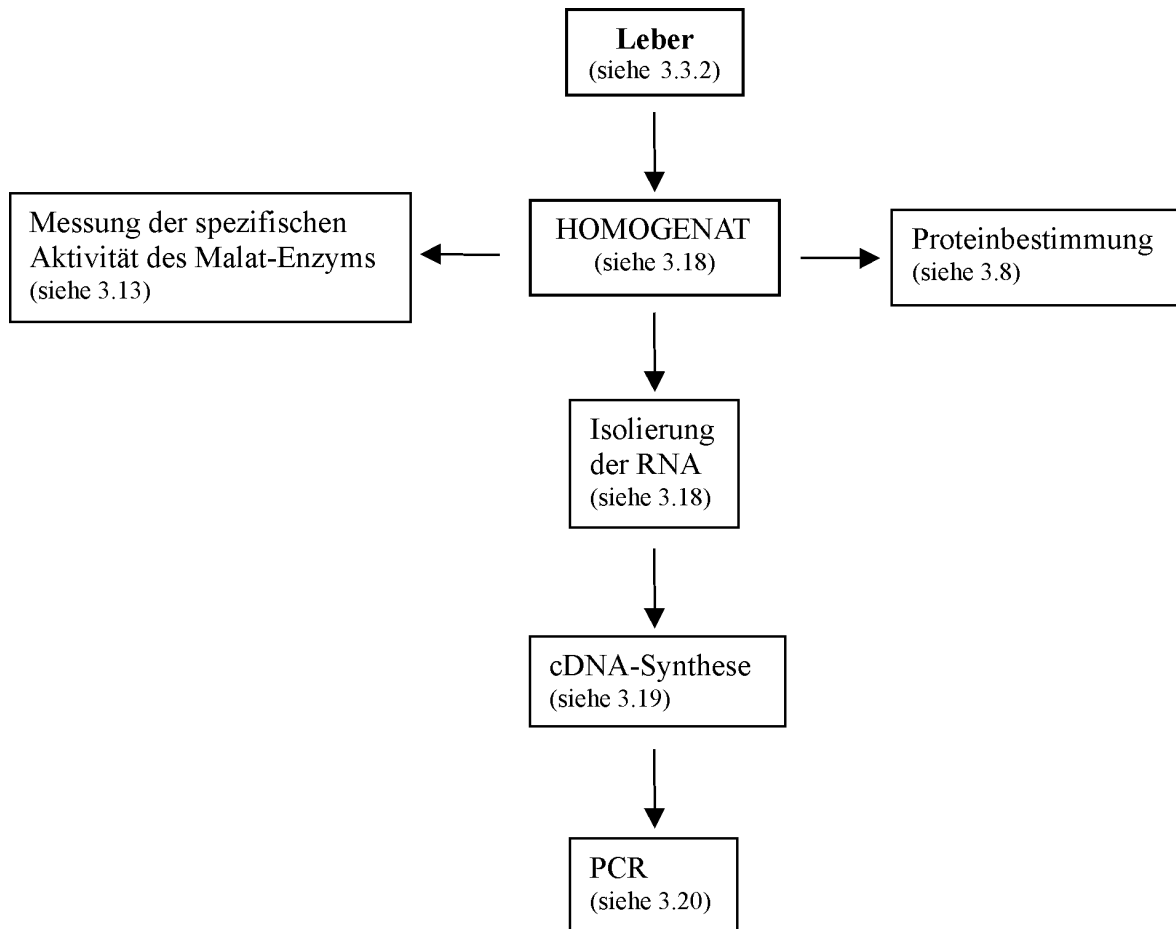
Durch Injektion (i.p.) von Nembutal wurden die Ratten (Körpergewicht ca. 200 g) narkotisiert. Der Bauchraum wurde durch seitliche Schnitte geöffnet und das Schlagen des Herzens durch Umspülen mit eiskalter NaCl unterbrochen. Nach Extraktion wurde das Herz so schnell wie möglich mit der Aorta an die Perfusionsanlage gehängt und mit 37 °C warmer, mit Carbogen (95 % Sauerstoff, 5 % Kohlendioxid v/v) begaster Krebs-Henseleit-Perfusionsslösung (0,115 M NaCl, 25 mM NaHCO₃, 5,9 mM KCl, 1,18 mM MgCl₂, 1,24 mM NaHPO₄, 1,2 mM Na₂SO₄, 1,8 mM CaCl₂, 10 mM Glukose) perfundiert. Die Perfusion fand unter konstantem Druck statt (80 cm hohe Wassersäule). Nach einer Vorperfusion von ca. 20 Minuten wurde der Perfusionslösung für fünf Minuten Forskolin (30 µM) und Isobutylmethylxanthin (IBMX; 100 µM) bzw. für die Kontrollperfusionsen das reine Lösungsmittel zugesetzt. Danach folgten weitere neunzig Minuten Perfusion mit reiner Krebs-Henseleit-Lösung. Nach Beendigung der Perfusion wurden die Herzen direkt in eiskalte, physiologische NaCl-Lösung überführt.

3.6 Versuchsübersicht

3.6.1 Aufarbeitung der Herzen



3.6.2 Aufarbeitung der Lebern



3.7 Isolation von Mitochondrien aus Rattenherzen

Nach mehrmaligem Waschen in Isolationsmedium (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 5 mM KH_2PO_4 , 20 mM KCl, 0,2 mM EDTA, pH 7,2) wurde das Herz mit einer Schere grob zerkleinert. In einem Gesamtvolumen von 4 ml Isolationsmedium wurde es anschließend mit Hilfe eines Ultra-Turrax (10 Sekunden bei 20000 Upm) und einem 15 ml Teflon-Glas-Potter (10 x bei 1000 Upm) homogenisiert. Eine Probe (200 μl) dieses Homogenats wurde für die Bestimmung der Enzymaktivitäten und für die Bestimmung der Isoenzym-Verteilung abgenommen. Ca. 3 ml des Homogenats (1 ml wurde für die RNA-Aufarbeitung (siehe 3.18) verwendet) wurden mit 3 ml Trypsinlösung (0,5 mg / 3 ml Isolationsmedium) gemischt. Nach fünf Minuten Inkubation wurde das Homogenat mit 10 ml Trypsininhibitor-Lösung (0,3 mg / ml Isolationsmedium) versetzt und mit dem Teflon-Glas- Homogenisator kurz von Hand homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zehn Minuten bei 380 x g zentrifugiert (Sigma 2K15-

Zentrifuge). Nach Filtrieren des Überstandes über vierlagigem Mull wurden die Mitochondrien bei 8000 x g für zehn Minuten sedimentiert. Das Sediment wurde in 15 ml Isolationsmedium aufgenommen und bei 8000 x g, zehn Minuten zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde noch einmal wiederholt. Die Mitochondrien wurden in ca. 150 µl Isolationsmedium aufgenommen und in einem 1 ml Teflon-Glas-Homogenisator vorsichtig von Hand homogenisiert. Die gesamte Isolation der Mitochondrien erfolgte auf Eis bzw. bei 4 °C.

3.8 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry [Lowry et al. 1951], wobei als Standard Rinderserumalbumin verwendet wurde. Die Messung der Extinktion erfolgte mit dem LKB-Photometer bei 578 nm.

3.9 Bestimmung des Atmungskontrollquotienten und des ADP / O-Quotienten isolierter Mitochondrien

Die Vitalität der Mitochondrien wurde mit Hilfe des Atmungskontrollquotienten bestimmt. Er stellt ein Maß für die Kopplung von Oxidation und Phosphorylierung dar und ist definiert als das Verhältnis zwischen Atmung im aktivierten Zustand („state-3“-Atmung) und der Atmung im kontrollierten Zustand („state-4“-Atmung).

$$Q = \frac{\text{Atmung im aktivierten Zustand (nach Zugabe von ADP)}}{\text{Atmung im kontrollierten Zustand (ohne ADP)}}$$

In einer abgeschlossenen Versuchskammer wurde der Sauerstoffverbrauch der Mitochondrien (1mg) in 1,4 ml Isolationsmedium (Raumtemperatur), mit 7 mM Glutamat und 6 mM Malat als Substrate, während der Grundatmung und der durch Zugabe von 0,14 mM ADP stimulierten Atmung gemessen. Die Messung erfolgte polarographisch mit einer Clarke-Sauerstoffelektrode [Clarke et al. 1953]. Hierbei wird Sauerstoff an einer Platinelektrode zu Wasser reduziert und der dabei fließende Strom amperometrisch gemessen. Neben dem Atmungskontrollquotienten wurde auch der ADP / O-Quotient bestimmt.

$$\text{ADP / O} = \frac{\text{Zugegebene Menge ADP}}{\text{Sauerstoffverbrauch im aktivierten Zustand}}$$

3.10 Umwandlung der Oligomere der MtCK

Zur Untersuchung der Stabilität des Oktamer/Dimer-Verhältnisses der MtCK wurden isolierte Mitochondrien mit verschiedenen Substanzen, die die oxidative Phosphorylierung beeinflussen, inkubiert. Weiterhin wurde der pH-Wert und die Cr-Konzentration im Inkubationsansatz variiert.

Die Mitochondrien (5 mg Protein / ml) wurden in 500 µl Inkubationsmedium (170 mM Saccharose, 70 mM Hepes, 5 mM KH_2PO_4 , 20 mM KCl, 0,2 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 5 mM MgCl_2 , 7,5 mM Glutamat, 5,8 mM Malat, 10 mM Creatin, 1mM ATP, pH 7,2) für jeweils eine Stunde mit den verschiedenen Substanzen (Tabelle 2) inkubiert. Zur besseren Versorgung der Mitochondrien mit Sauerstoff wurden die Ansätze (außer bei Begasen mit Stickstoff) während der Inkubationszeit in offenen Szintillationsgefäßen (25 ml) vorsichtig auf einem Schüttler geschüttelt. Parallel wurde immer eine Kontrolle mit reinem Inkubationsmedium angesetzt. Nach der Inkubation wurde das Oktamer/Dimer-Verhältnis mit Hilfe der Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese bestimmt.

Tabelle 2: Inkubationsbedingungen für die Umwandlung der Oligomere der MtCK

Substanz	Konzentration
FCCP	1 µM
CAT	2 µM
Nigericin	2 µM
KCN	357 µM
Oligomycin	23 µM
Creatin	20 mM
pH 6,5	
pH 7,5	
pH 7,8	
pH 9,2	
Begasen mit Stickstoff	

3.11 Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese

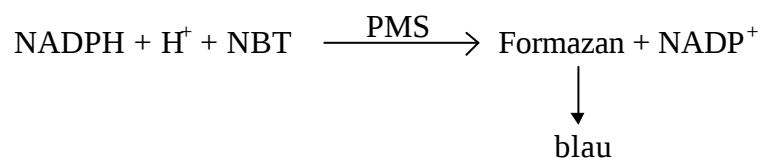
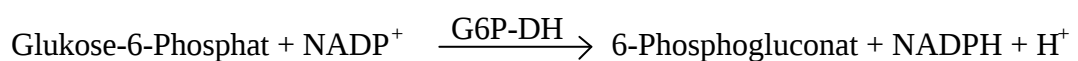
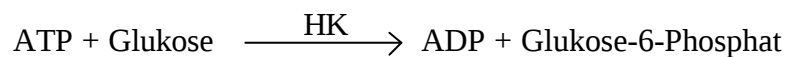
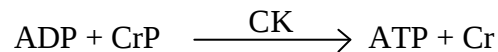
Durch native Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese können die verschiedenen Oligomere (Oktamer und Dimer) der MtCK voneinander getrennt werden. Die Cellulose-Polyacetat-Streifen wurden vor dem Einspannen für 10 Minuten mit Barbitol-Laufpuffer (67 mM

Natrium-Barbital, 13 mM Barbital, 0,01 % (v/v) β -Mercaptoethanol, pH 8,6) benetzt. Die Proben (5 mg Protein / ml) wurden zur besseren Auftrennung mit 0,1 % Triton X 100 gemischt und auf der der Anode zugewandten Seite des Streifens mit einem Stempel (ca. 0,05 μ l Suspension) aufgetragen. Bei dem pH-Wert von 8,6 ist die MtCK positiv geladen und wandert im elektrischen Feld in Richtung Kathode. Die Proben wurden bei 200 V für eine Stunde aufgetrennt. Der Nachweis der MtCK-Oligomere erfolgte durch Aktivitätsfärbung (siehe 3.11.1). Die Intensitäten der Banden wurden mit dem Laser-Densitometer der Firma LKB/Pharmacia bei 633 nm bestimmt und die relativen Verhältnisse der Isoformen über Integration mit der Software GelScan XL 2.1 ermittelt.

3.11.1 Aktivitätsfärbung der Creatinkinase

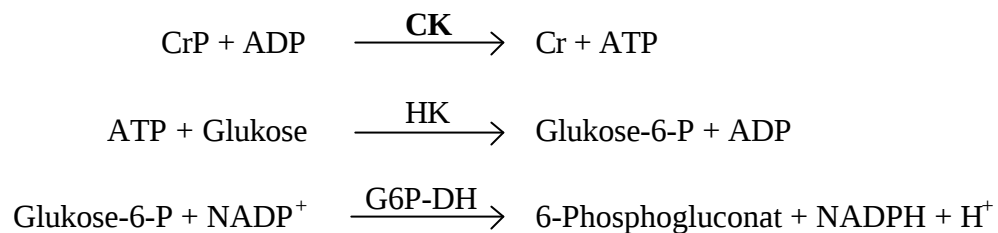
Zum nativen Nachweis der CK wurden die Substrate (20 mM Glukose, 1 mM AMP, 20 mM MgCl_2 , 1 mM NADP, 0,8 mM ADP, 4,1 mM CrP, 0,6 mM NBT, 82 μ M PMS) und Enzyme (1,25 U / ml Hexokinase (HK), 0,3 U / ml Glukose-6-P-DH (G6P-DH)) mit einer 1 %igen Agar-Lösung (61 mM TRAP, pH 7,2, 50 °C) gemischt.

Die Cellulose-Polyacetat-Streifen wurden mit der Auftragsseite für ca. 30 Minuten auf das Gel gelegt und bei 37 °C inkubiert. Durch die folgenden Reaktionen erfolgte eine Blaufärbung der Stellen, an denen sich die aktive Creatinkinase befand:



3.12 Bestimmung der spezifischen CK_f-Aktivität (in Richtung ATP-Entstehung)

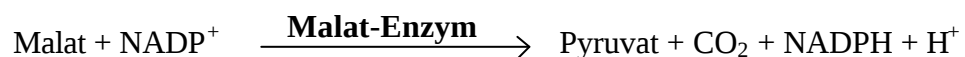
Die spezifische Aktivität der Creatinkinase in Richtung ATP-Bildung wurde durch NADPH-Zunahme in einer gekoppelten Enzymreaktion bei 334 nm (27 °C) mit einem Eppendorf-Filterphotometer gemessen [Szasz et al. 1976]. In einer Küvette wurden 700 µl Testmix (100 mM Imidazol-Puffer, pH 6,7, 30 mM CrP, 20 mM D-Glukose, 10 mM Mg-Acetat, 2mM ADP, 2 mM NADP, 20 mM N-Acetylcystein, 5 mM AMP, 10 µM AP5A) mit 7,5 U Hexokinase und 2 U Glukose-6-Phosphat-DH gemischt und die Reaktion durch Zugabe von 10 µl Mitochondriensuspension bzw. Homogenat (5 mg Protein / ml) gestartet.



Durch Zusatz von AP5A und AMP im Testmix wurde die Reaktion der Adenylatkinase gehemmt, die sonst ebenfalls das ADP im Reaktionsansatz zu ATP umgesetzt hätte.

3.13 Bestimmung der spezifischen Aktivität des Malat-Enzyms

Zum Nachweis der Hyperthyreose [Mariash 1983] wurde die Aktivität des Malat-Enzyms in Leberhomogenaten bestimmt. Die Leberhomogenate wurden bei 45000 Upm für 30 Minuten zentrifugiert und die Aktivität des Malat-Enzyms im Überstand gemessen. Für die Enzym-Reaktion wurden 950 µl Testmix (74 mM TRAP, pH 7,2, 3 mM L-Malat, 3,5 mM MnCl₂) mit 10 µl Probe (ca. 10 mg Protein / ml) gemischt und die NADPH-Zunahme bei 334 nm (25 °C) mit einem Eppendorf-Filterphotometer gemessen.

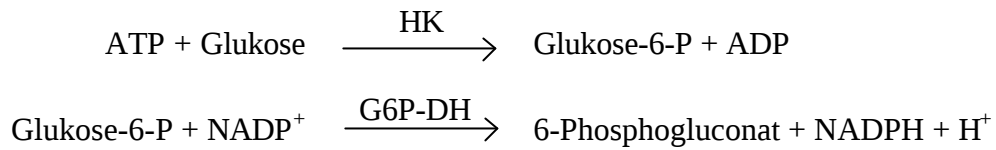


3.14 Bestimmung der Glukosekonzentration im Serum

Aus 100 µl Serum wurden die Proteine durch Fällung mit 100 µl Perchlorsäure (1,2 M) entfernt. Nach Zentrifugation bei 14000 Upm (2 Minuten) wurden 160 µl des Überstandes mit ca. 20 µl Trap / KOH (1M / 6M) neutralisiert.

Zur Bestimmung der Glukosekonzentration wurden 100 µl der Probe mit 600 µl Testmix (100 mM Trap, pH 7,6, 0,8 mM NADP, 0,8 mM ATP, 10 mM MgCl₂, 3 U G6P-DH)

gemischt und die NADPH-Zunahme nach Starten der Reaktion mit 1,6 U Hexokinase bei 334 nm gemessen.



3.15 Bestimmung der Isoenzymverteilung im Gewebehomogenat

Die Isoenzymverteilung der CKs im Herz- bzw. Gehirnhomogenat (Organpulver (siehe 3.22) in Isolationsmedium) wurde durch native Agarosegel-Elektrophorese ermittelt. Es wurde jeweils 1 µl Probe (15 – 30 µg Protein) auf ein Agarosegel (1 %) aufgetragen und unter Verwendung von Barbital-Laufpuffer (50 mM Natrium Barbital, 10 mM Barbital, 60 mM Tris, 1 mM EGTA, 0,1 % Triton X 100, 1mM DTT, pH 8,6) für neunzig Minuten bei 200 V in einer horizontalen Elektrophoresekammer (BioRad) aufgetrennt. Der Nachweis der CK-Isoenzyme erfolgte mit einer Aktivitätsfärbung. Hierfür wurde ein Filterpapier mit einer Färbelösung (22 mM MES, pH 7,4, 50 mM MgAc, 70 mM Glukose, 120 mM N-Acetylcystein, 120 mM CrP, 9 mM ADP, 9 mM NADP, 0,2 mM AP5A, 25 U Hexokinase, 20 U Glukose-6-Phosphat-DH) getränkt und für ca. 30 Minuten auf das Gel gelegt. Das durch die CK-Reaktion entstandene NADPH fluoreszierte im UV-Licht und konnte mit dem Geldokumentationssystem Gel Doc 1000 detektiert werden. Die prozentuale Verteilung der Isoenzyme wurde mit der Multi-Analyst PC Software bestimmt.

3.16 SDS-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli [Laemmli 1970]. Es wurden jeweils 30 µg Protein aufgetragen, wobei die Proben 1 : 2 mit Probenpuffer (100 mM Tris-HCL pH 6,8, 4 % SDS, 0,2 % Bromphenolblau, 20 % Glycerin, 5 % β-Mercaptoethanol) versetzt und 5 Minuten aufgekocht wurden. Für die elektrophoretische Auftrennung der Proben wurde ein 10 %iges Trenngel (10 % AA, 0,27 % MBA, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,08 % TEMED) und ein 4 %iges Sammelgel (4 % AA, 0,13 % MBA, 0,125 M Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % SDS, 0,1 % APS, 0,08 % TEMED) mit einer Dicke von 1 mm verwendet. Die Auftrennung wurde unter Verwendung von Laufpuffer (25 mM Tris, 0,2 M Glycin, 0,1 % SDS, pH 8,3) mit konstanter Stromstärke wie folgt durchgeführt:

Einlaufen der Proben ins Sammelgel	15 mA
Lauf im Sammelgel	30 mA
Lauf im Trenngel	40 mA

3.16.1 Färbung mit Coomassie-Blau

Nach Entfernen des Sammelgels wurden die Proteine im Trenngel mit einer Fixierlösung (50 % Ethanol, 10 % Eisessig; 1 Stunde) fixiert. Die Färbung der Proteinbanden erfolgte durch Färbung des Gels in der Färbelösung (0,1 % (w/v) Serva Blau R, 10 % Eisessig; 1 Stunde) und anschließender Entfärbung des Hintergrundes in einer 10 %igen Essigsäure.

3.17 Immunologischer Nachweis der MtCK

Für den immunologischen Nachweis der MtCK wurden die Proteine durch elektrophoretisches *semidry blotting* aus dem Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Immobilon-P Transfer-Membran) übertragen. Für den Transfer der Proteine wurden sechs Filterpapiere und eine PVDF-Membran in der Größe des Gels mit einem Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris (Base), 0,0375 % (w/v) SDS, 20 % Methanol) getränkt. Drei Filterpapiere, die PVDF-Membran, das Gel und weitere drei Filterpapiere wurden Luftblasenfrei auf der horizontalen Graphit-Anode der Transfer-Apparatur (Trans-Blot[®] Semi-Dry Transfer-Zelle, Bio-Rad) gestapelt und mit der Platin-Kathode abgedeckt. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA / cm².

Zur spezifischen Markierung der MtCK-Proteine wurde die PVDF-Membran zwei Stunden in Blockierungspuffer (3 % Albumin in PBS (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,3)) und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (monoklonaler Antikörper Anti-CK-M (Maus) und polyklonaler Antikörper Anti Mi-CK (Kaninchen), Verdünnung 1:100 in PBS mit 3 % Albumin und 1mM Natriumazid) inkubiert. Der Anti Mi-CK-Antikörper wurde von Prof. Theo Wallimann, Institut für Zellbiologie der Eidgenössischen Technischen Hochschule, Zürich, zur Verfügung gestellt. Nach der Inkubation wurde die Membran dreimal für zehn Minuten mit PBS (beim zweiten Waschschrift wurde dem PBS 0,05 % Tween 20 zugesetzt) gewaschen und danach mit dem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit IgG Peroxidase-Konjugat, Anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat, Verdünnung 1:1000 in PBS mit 3 % Albumin ohne Natriumazid) für zwei Stunden inkubiert. Nach dreimaligem Waschen (siehe oben) wurde die

Membran so lange in die Peroxidase-Färbelösung (0,03 % (w/v) 4-Chloro-1-Naphtol, 10 % Methanol, 0,03 % H₂O₂ in PBS) gelegt, bis die Banden gut sichtbar waren.

3.18 RNA-Isolierung aus Gewebe

Ein Herz wurde nach mehrmaligem Waschen in Isolationsmedium (0,25 M Saccharose, 10 mM Tris-HCl, 5 mM KH₂PO₄, 20 mM KCl, 0,2 mM EDTA, pH 7,2) mit einer Schere grob zerkleinert und in einem Gesamtvolumen von 4 ml Isolationsmedium mit Hilfe eines Ultra-Turrax (10 Sekunden bei 20000 Upm) und einem 15 ml Teflon-Glas-Potter (10 x bei 1000 Upm) homogenisiert (siehe 3.7).

Die Herzen und Gehirne der *knock out* Mäuse wurden im gefrorenem Zustand unter Stickstoff gemörsert.

Die Lebern wurden mit einer Schere grob zerkleinert und in einem 30 ml Teflon-Glas-Homogenisator (1000 Upm) mit 30 ml Isolationsmedium (0,25 M Saccharose, 10 mM TRAP, pH 7,0, 5 mM KH₂PO₄, 20 mM KCl, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl₂) homogenisiert. Zur Isolation der Gesamt-RNA wurde ein Teil der Homogenate (0,5 ml) mit dem zehnfachen Volumen TRIzol[®]-Reagenz gemischt und zur Dissoziation von Nukleoprotein-komplexen zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Von den Organpulvern der *knock out* Mäuse wurde jeweils eine kleine Spatelspitze mit 3 ml TRIzol[®]-Reagenz gemischt und ebenfalls zwanzig Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach der Inkubation wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (12360 x g, 10 Minuten, 4 °C) entfernt. Durch Zugabe von Chloroform (0,2 ml / 1 ml TRIzol[®]-Reagenz) erfolgte ein Extraktionsschritt, bei dem die RNA in die wässrige Phase überführt wurde. Zur besseren Phasentrennung wurde das Gemisch zentrifugiert (12360 x g, 10 Minuten, 4 °C), die obere, wässrige Phase abgenommen und die RNA durch Zugabe von Isopropanol (0,5 ml / 1 ml TRIzol[®]-Reagenz) bei -20 °C über Nacht gefällt. Die RNA wurde danach durch Zentrifugation sedimentiert, mit 75 %igem Ethanol gewaschen, zehn Minuten luftgetrocknet und in 200 µl Nuklease-freiem Wasser (H₂O bidest, mit 0,1 % (v/v) DEPC autoklaviert) gelöst.

Die RNA-Proben der *knock out* Mäuse wurden noch einmal durch eine Phenol / Chloroform-Extraktion gereinigt. Hierfür wurden die Proben mit dem gleichen Volumen Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) gemischt und fünf Minuten bei 10000 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die RNA durch Zugabe von 3 M Natriumacetat (1/10 Volumen, pH 5,2) und Ethanol (2,5 Volumen) über Nacht

gefällt. Nach Zentrifugation bei 12000 x g für 30 Minuten wurde das RNA-Sediment mit 75 % igem Ethanol gewaschen, ca. zehn Minuten luftgetrocknet und in 20 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst.

3.19 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden pro Ansatz 2 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde eine Stunde bei 37 °C mit 0,25 µM Oligo-dT-Primer (T₁₅), 0,5 mM dNTPs, 5 mM DTT, 40 U RNasin Ribonukleaseinhibitor und 200 U M-MLV Reverse Transkriptase in Reaktions-puffer (50 mM Tris-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT; pH 8,3) inkubiert. Die gebildeten RNA / DNA- Hybride wurden mit 7,5 M NH₄Ac (1/10 Volumen), 20 µg Glykogen und Ethanol (2faches Volumen) gefällt. Nach Zentrifugation bei 12000 x g (15 Minuten) wurde das Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen und 10 Minuten unter Vakuum getrocknet. Die cDNA wurde in 200 µl DNase freiem (autoklavierten) Wasser gelöst und bei -20 °C eingefroren. Für die PCR wurden die cDNA-Proben noch einmal 1 : 5 verdünnt.

3.20 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die cDNA-Sequenzen der CK- bzw. der Kontroll-Gene, die für die Konstruktion der Primer verwendet wurden, stammten aus der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI, Bethesda (MD, U.S.A.)).

Für die Standardisierung der cDNA-Proben der hyperthyreoten bzw. hypothyreoten Tiere wurde parallel eine PCR mit Primern für den ANT1 durchgeführt, da die Expression des ANT1 durch Schilddrüsenhormone nicht beeinflusst wird [Dümmeler et al. 1996]. Die Standardisierung der cDNA-Proben der anderen Versuche erfolgte mit Hilfe einer PCR, in der Primer für die GAP-DH eingesetzt wurden. Als Positivkontrolle für die Analyse der mRNA des Herzens diente der atriale natriuretische Faktor (ANF), dessen Expression durch Schilddrüsenhormonen signifikant erhöht wird [Ladenson et al. 1988].

Die als Primer eingesetzten Oligonukleotide (Tabelle 3) wurden von der Firma Pharmacia synthetisiert.

Tabelle 3: Sequenzen der für die PCR eingesetzten Primer. Die Sequenzen für den kodierenden (+) Strang und den Matrizenstrang (-) sind jeweils in 5' → 3'-Richtung angegeben.

Gen	Primersequenzen
CKM (Ratte)	+ TCACTCTGGA CGATGTCATC - TGCTCTGTCA TGCTCTTCAG
CKB (Ratte)	+ CCAGACTGGC GTAGACAATC - CTACTGCCAG CTTCTCGATG
sMtCK (Ratte)	+ CAGAAGGTAT CTGCTGATGC C - GGATGCTTCA TCAGCCTAGG
uMtCK (Ratte)	+ AATGAGGAGG ACCACACACG - CGCTCATTCC ACATGAACTC
ANF (Ratte)	+ GGTAGAAGAT GAGGTCATGC - GAAGCTGTTG CAGCCTAGTC
GAP-DH (Ratte)	+ TTGTCAGCAA TGCATCCTGC - GTCATTGAGA GCAATGCCAG
ANT1 (Ratte)	+ GGATCTGTGA ACCTGTGAAC - TTGTGAGCTG GATGATTGCC
CKM (Maus)	+ GCAGCAGCTC ATTGATGACC - CTCCTCAATC TTCTGCAGGC
CKB (Maus)	+ GCTCATTGAC GACCACTTCC - GCTTGATGTG TACACCTGCC
sMtCK (Maus)	+ AACAACTGCA TGGCTGAGTG - CATAGCGCTC ATCAAACCTGC
uMtCK (Maus)	+ CCTAGTTCCT GACTTGACCC - TAGGTCTCCT CATCTCCAGC
ANF (Maus)	+ CAGCAAACAT CAGATCGTGC - TGTTGGACAC CGCACTGTAC
GAP-DH (Maus)	+ GGCAAAGTGG AGATTGTTGC - CAGTAGACTC CACGACATAC
ANT1 (Maus)	+ ATTGCGCAGA GTGTGACAGC - GCCTCTCAGT ACATTGGACC

Von den Primer-Paaren wurden Mischungen mit einer Konzentration von jeweils 5 μM in DNase-freiem (autoklavierten) Wasser angesetzt.

Die PCR-Reaktionen erfolgten in einem Endvolumen von 20 μl , in dem 2 μl 10fach konzentrierter PCR-Puffer (200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl_2 , 0,2 mM dNTPs, 0,25 μM Primer, 10 μl der cDNA-Verdünnung und 1 U *Taq*-Polymerase enthalten waren.

Für die PCR-Reaktionen wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

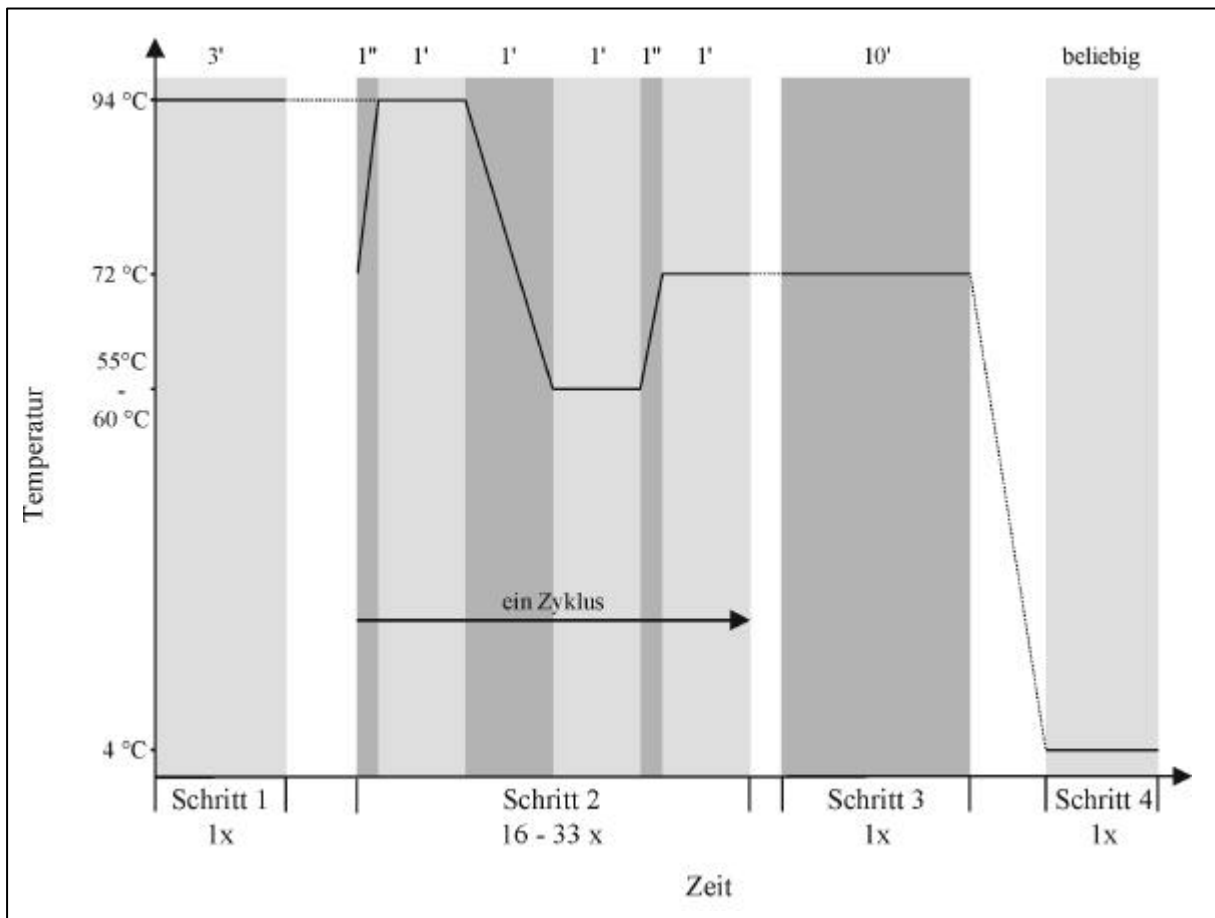


Abbildung 9: Temperaturprofil der PCR. Alle Schritte des Temperaturprofils, mit Ausnahme des zweiten Schrittes, erfolgen einmal. Schritt zwei wurde in Abhängigkeit von den Proben und Primern in der Anzahl der Zyklen und der „annealing“-Temperatur variiert.

Vor den eigentlichen PCR-Reaktionen wurden zur Optimierung der Reaktionsbedingungen die MgCl_2 -Konzentrationen und die „annealing“-Temperaturen variiert. Die optimale „annealing“-Temperatur für die einzelnen Primer-Paare wird in Tabelle 4 angegeben. Die Veränderung der MgCl_2 -Konzentrationen (1 mM, 1,5 mM, 2 mM) zeigte keine Verbesserung der Amplifizierung der entsprechenden Bande, sodass für alle Primer-Paarungen eine Konzentration von 1,5 mM verwendet wurde. Weiterhin wurden die Zyklenzahlen ausgetestet. Die Zyklenzahl, bei der die Bande im Ethidiumbromid-gefärbten (0,5 μg / ml

Ethidiumbromid in TBE-Puffer, 30 Minuten) 1,5 %igen Agarosegel gerade noch mit bloßem Auge sichtbar war, erwies sich als optimal für die Auswertung der PCR mit radioaktiv markierten Primern. Die Zyklenzahlen, die für die einzelnen Primer-Paare verwendet wurden, waren für die einzelnen Versuche unterschiedlich und sind in Tabelle 5 angegeben.

Tabelle 4: „Annealing“-Temperatur der Primer-Paare und Größe der amplifizierten Fragmente

Primer	„Annealing“-Temperatur	Größe der amplifizierten Fragmente
CKM (Ratte)	55 °C	394 bp
CKB (Ratte)	55 °C	308 bp
sMtCK (Ratte)	55 °C	323 bp
uMtCK (Ratte)	55 °C	140 bp
ANF (Ratte)	55 °C	292 bp
GAP-DH (Ratte)	58 °C	479 bp
ANT1 (Ratte)	55 °C	292 bp
CKM (Maus)	55 °C	235 bp
CKB (Maus)	55 °C	338 bp
sMtCK (Maus)	55 °C	303 bp
uMtCK (Maus)	55 °C	406 bp
ANF (Maus)	55 °C	136 bp
GAP-DH (Maus)	55 °C	223 bp
ANT1 (Maus)	55 °C	198 bp

Tabelle 5: Anzahl der Zyklen der für die einzelnen Versuche durchgeführten PCR

Primer	hypo- und hyperthyreote Ratten (akutes Modell)	hyperthyreote Ratten (chronisches Modell)	TR <i>knock out</i> Mäuse Herz	TR <i>knock out</i> Mäuse Gehirn	Isoprenalin und Forskolin / IBMX
CKM	32	32	24	nicht exprimiert	32
CKB	32	32	33	24	32
sMtCK	30	30	30	nicht exprimiert	30
uMtCK	32	32	33	33	32
ANF	25	22	21	nicht exprimiert	————
GAP-DH	30	28	24	24	28
ANT1	24	24	21	26	————

Zur Überprüfung der amplifizierten DNA-Fragmente wurden die theoretisch entstehenden Fragmente auf singuläre Restriktionsschnittstellen durchsucht und das DNA-Fragment mit einer ausgewählten Restriktionsendonuklease (Tabelle 6) inkubiert (1 Stunde, 37 °C). Das Inkubationsgemisch wurde auf einem 1,5 %igen Agarosegel mit 1 x TBE (45 mM Tris, 45 mM Borsäure, 1mM EDTA, pH 8,3) als Laufpuffer aufgetrennt und die Fragmentgröße mit Hilfe eines Längenstandards (100 bp DNA Leiter) kontrolliert.

Tabelle 6: Verwendete Restriktionsendonukleasen für die Kontrolle der durch PCR amplifizierten Fragmente und Größe der entstehenden Fragmente

Primer	Restriktionsendonuklease	Größe der entstehenden Fragmente	
CKM (Ratte)	<i>Sty I</i>	257 bp	137 bp
CKB (Ratte)	<i>SacI</i>	215 bp	93 bp
sMtCK (Ratte)	<i>Bst NI</i>	157 bp	166 bp
uMtCK (Ratte)	<i>Bst NI</i>	106 bp	34 bp
ANF (Ratte)	<i>Hinc II</i>	106 bp	186 bp
GAP-DH (Ratte)	<i>Xho I</i>	186 bp	293 bp
ANT1 (Ratte)	<i>Hind III</i>	171 bp	121 bp
CKM (Maus)	<i>Sty I</i>	165 bp	70 bp
CKB (Maus)	<i>Sau 3AI</i>	221 bp	117 bp
sMtCK (Maus)	<i>Sau 3AI</i>	197 bp	106 bp
uMtCK (Maus)	<i>Sty I</i>	58 bp	348 bp
ANF (Maus)	<i>Bst XI</i>	79 bp	59 bp
GAP-DH (Maus)	<i>Afl III</i>	59 bp	164 bp
ANT1 (Maus)	<i>Hpa II</i>	84 bp	114 bp

3.20.1 5'-Endmarkierung der PCR-Primer

Die Verwendung von radioaktiv markierten Primern ermöglicht eine sehr genaue Analyse der cDNA-Menge. In der jeweiligen PCR wurde daher ein geringer Teil der gesamten Primer durch radioaktiv markierte Primer ersetzt.

Für die Markierung wurden ca. 10 pmol der Primermischung mit 10 U T4-Polynukleotidkinase und 1,1 MBq d[γ - 32 P]ATP (spezifische Aktivität 185 TBq / mmol) in Kinasepuffer (70 mM Tris-HCl, pH 7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT) für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Primer wurden mit Hilfe von Bio-Spin Chromatographiesäulen von den nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt.

Die Aktivität der markierten Primer wurde mittels Szintillationsmessung nach Cerenkov [Johnson 1969] gemessen. Die eingesetzte Aktivität pro PCR-Ansatz betrug ca. 20 Bq.

3.20.2 PCR-Auswertung

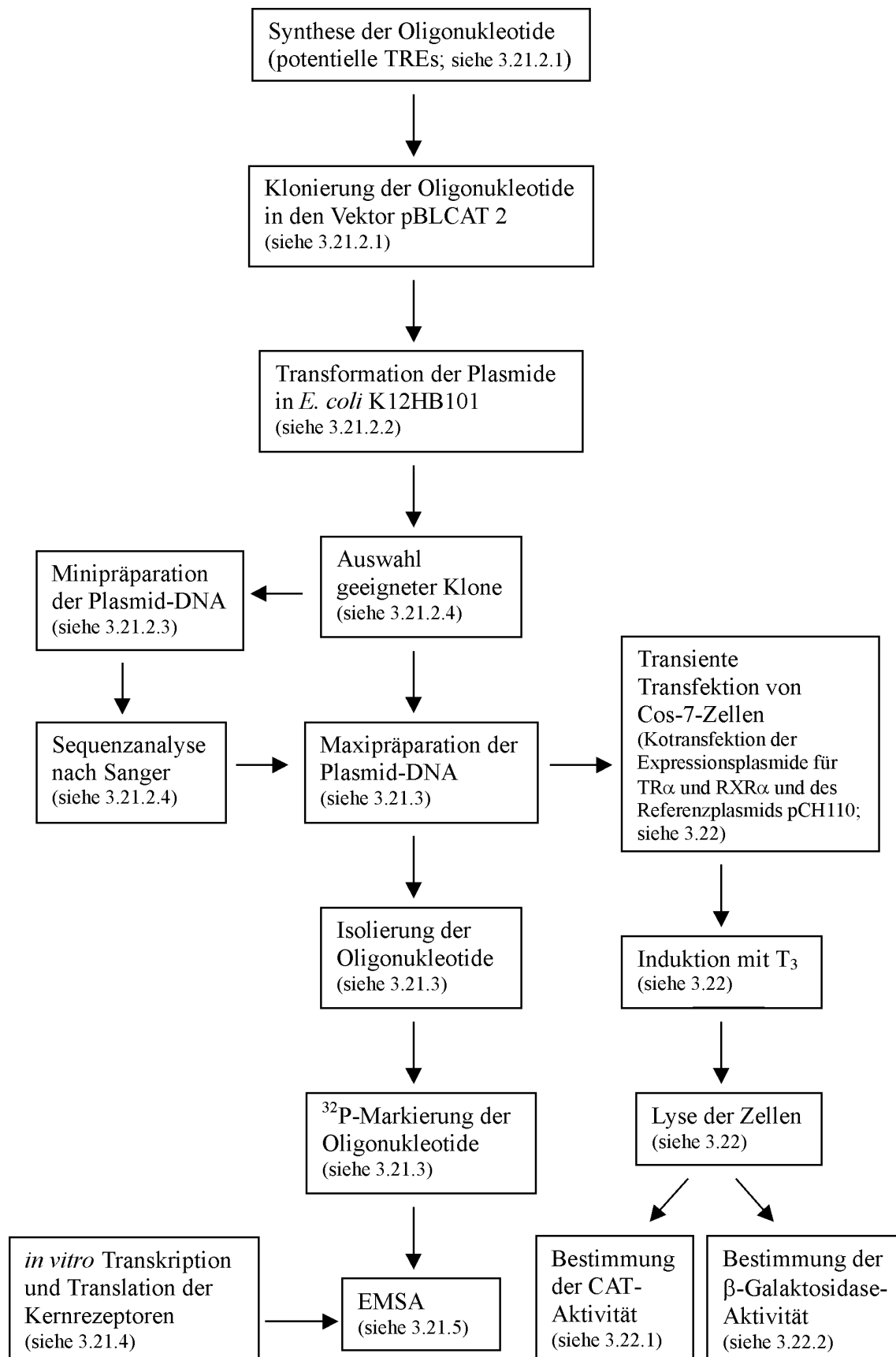
Die PCR-Proben wurden durch Gelelektrophorese mit einem 5 %igen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (5 % AA / BAA (29 : 1) in 0,5 x TBE, 3 / 500 Volumen APS (25 %), 3 / 5000 Volumen TEMED) für 25 Minuten bei 20 W (Vertikal-Gelelektrophorese-Kammer Modell V15/17) aufgetrennt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE (22,5 mM Tris, 22,5 mM Borsäure, 0,5 mM EDTA, pH 8,3) verwendet. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden jeweils 10 µl Probe mit 1 µl Probenpuffer (0,4 mg / ml Bromphenolblau, 50 % Glycerin, 0,1 M EDTA, pH 7,6) gemischt. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit einem Gelrockner unter Vakuum getrocknet (80 °C, 1 – 2 Stunden). Für die Auswertung wurde eine Imaging Plate (IP) BAS-MP exponiert und mit Hilfe des Bio-Imaging Analyzers BAS-1500 IP Reader unter Verwendung der Software BAS-Reader für Windows 3.1 und Tina 2.09 ausgewertet.

Aus dem Verhältnis der Bandenintensität der amplifizierten Fragmente zu der Gesamtsumme markierter Primer wurde die Einbaurate bestimmt. Von jeder cDNA-Probe wurden für jede Primer-Paarung mindestens drei PCRs durchgeführt und der Mittelwert berechnet. Zur Standardisierung der cDNA-Konzentration wurden die jeweiligen Mittelwerte der Einbauraten durch die Einbauraten des Kontrollgens (GAP-DH bzw. ANT 1) dividiert. Aus den so berechneten Werten wurde das Verhältnis der Genexpression der behandelten Tiere zu dem der Kontrolltiere (in %) bestimmt.

3.21 Rezeptor/DNA-Bindungsstudien (EMSA)

Für den „electrophoretic mobility shift assay“ (EMSA) wurden die von Benfield et al. [Benfield et al. 1988] bzw. Horlick und Benfield [Horlick und Benfield 1989] veröffentlichten Promotorsequenzen des CKB- und CKM-Gens der Ratte auf mögliche TREs hin untersucht. In der Promotorsequenz des CKM-Gens wurde kein potentiellles TRE gefunden. Die Promotorsequenz des CKB-Gens enthält zwei Elemente (DR4), die möglicherweise als TRE wirken könnten (Abbildung 10) und in Rezeptor/DNA-Bindungsstudien (EMSA) eingesetzt wurden.

3.21.1 Versuchsübersicht über die Rezeptor/DNA-Bindungsstudien und die transiente Transfektion



3.21.2 Subclonierung

3.21.2.1 Auffüllreaktion und Ligation

Für die Subklonierung wurden Oligonukleotide (36mer), welche jeweils ein potentielles TRE des CKB-Promotors enthalten und die dazugehörigen Primer (15mer) (Abbildung 10) synthetisiert (Pharmacia). Die Enden der Oligonukleotide enthalten die für die Ligation in das Plasmid notwendigen Restriktionsschnittstellen für *XbaI* (Abbildung 10, grau unterlegt).

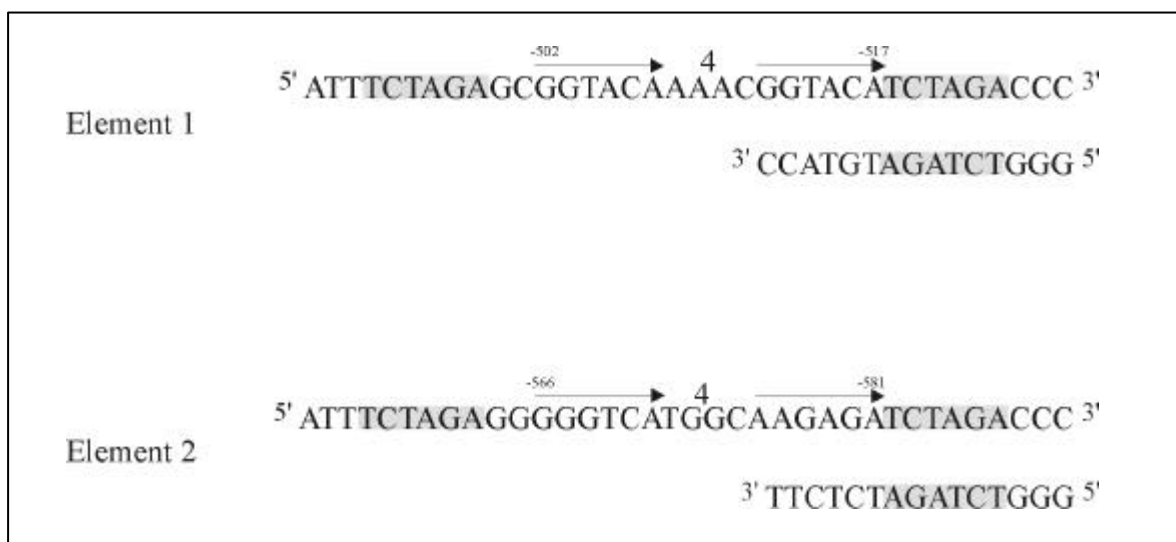


Abbildung 10: Sequenz der CKB-Promotorelemente, die in den EMSAs und transienten Transfektionen untersucht wurde. Die Restriktionsschnittstellen wurden grau unterlegt.

Für die Auffüllreaktion wurden jeweils 2,5 nmol des Oligonukleotids mit 2,5 nmol des entsprechenden Primers durch langsames Abkühlen von 75 °C auf Raumtemperatur in Multicore-Puffer (25 mM Tris-Ac, pH 7,8, 100 mM KAc, 10 mM MgAc, 1 mM DTT) hybridisiert. Durch Inkubation bei 37 °C (30 Minuten) mit dem Klenowfragment der DNA Polymerase I (2 U) und 20 pmol dNTPs wurden die restlichen Basen aufgefüllt. Durch Erhitzen auf 70 °C für 10 Minuten wurde das Enzym denaturiert.

Ein Restriktionsverdau mit *XbaI* (1 Stunde, 37 °C) erzeugte die für die Ligation notwendigen überhängenden Enden.

Durch Mischen der Probe mit dem gleichen Volumen Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol (25 / 24 / 1) wurde die DNA extrahiert und aus der wässrigen Phase durch Zugabe von Ammoniumacetat (1/10 Volumen; 7,5 M, pH 6,0) und Ethanol (2,5faches Volumen; 100 %) gefällt. Nach Waschen mit 70 %igem Ethanol wurde die DNA in 20 µl H₂O

(autoklaviert) gelöst.

Die Ligation erfolgte über Nacht bei 10 °C mit dem durch *Xba*I geschnittenen und am 5'-Ende dephosphorylierten Vektor pBLCAT2 (Abbildung 11) mit Hilfe der T4-DNA-Ligase. Der pBLCAT2-Vektor wurde von PD Dr. C. Carlberg, Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Der Vektor pBCAT wurde durch Insertion der codierenden Region des CAT-Gens und einem kurzem Fragment des Polyadenylierungssignals aus SV40 in den „high-copy“ Vektor pUC 18 konstruiert. Der TK-Promotor aus *Herpes simplex* erlaubt die Analyse der Effekte möglicher regulatorischer Elemente auf einen heterologen eukaryotischen Promotor [Luckow und Schütz 1987].

Die Insertion des DNA-Fragmentes erfolgte in der *Xba*I-Schnittstelle.

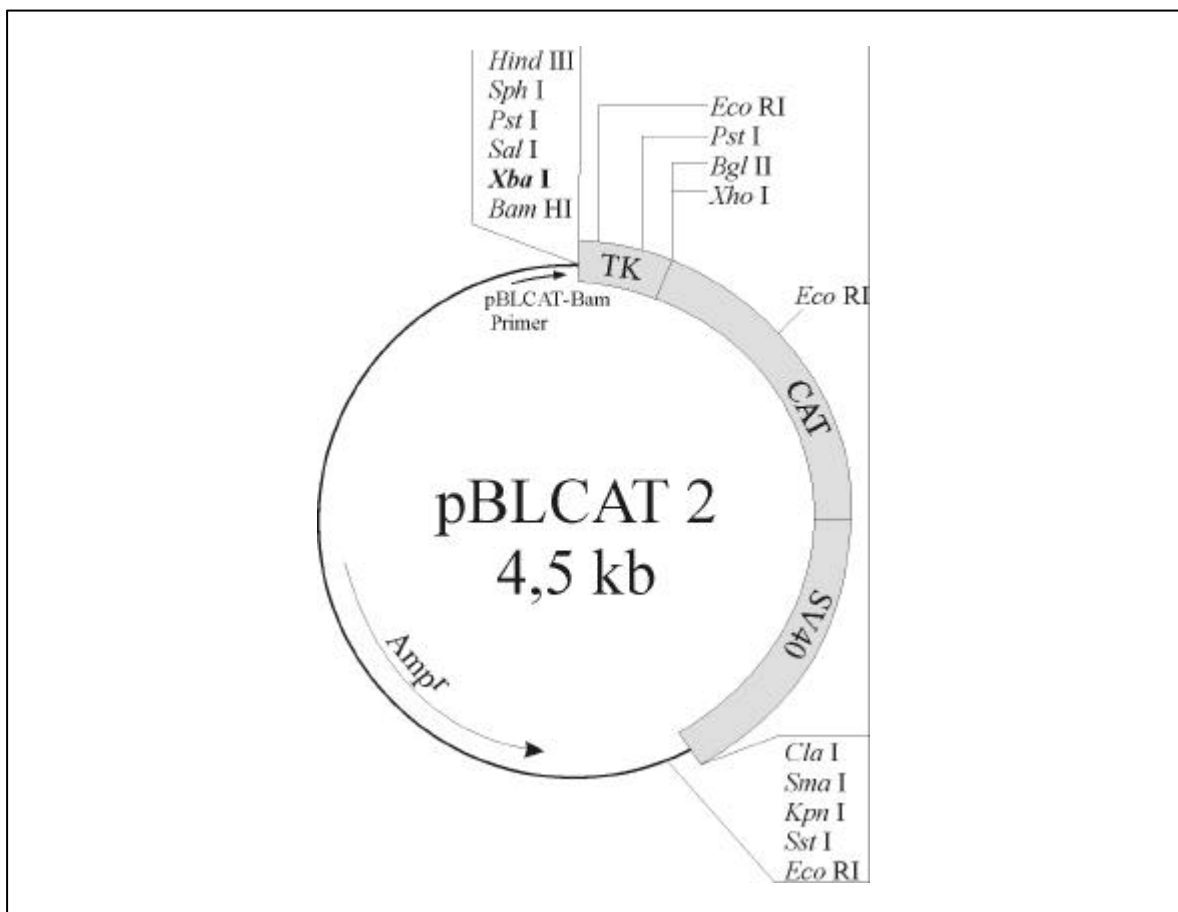


Abbildung 11: Aufbau des pBLCAT2-Plasmids [Luckow und Schütz 1987]

3.21.2.2 Herstellen kompetenter Zellen und Transformation

Für die Herstellung der kompetenten Zellen wurden die Bakterien (*Escherichia coli* K12HB101) in LB-Medium (1 % Tripton, 0,5 % Hefeextrakt, 0,5 % NaCl) bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Nach Sedimentation bei 2600 x g für fünf

Minuten wurden die Bakterien in CaCl_2 (50 mM) resuspendiert und ca. fünfzehn Minuten auf Eis inkubiert. Nach erneutem Sedimentieren (siehe oben) wurden die Zellen in 15 % Glycerin / 85 % CaCl_2 (50 mM) aufgenommen und bei -80°C eingefroren.

Für die Transformation wurden die Zellen langsam (auf Eis) aufgetaut und mit der Plasmid-DNA (0,1 μg DNA / 100 μl Zellsuspension) für eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Erwärmen auf 42°C für 60 Sekunden und schnellem Abkühlen im Eisbad für ca. drei Minuten werden die Zellen mit 1 ml LB-Medium für eine Stunde bei 37°C angezogen. Danach wurden die Zellen auf LB-Agar-Platten (1,8 % Agar in LB-Medium), die 100 μg / ml Ampicillin enthielten, ausgestrichen.

3.21.2.3 Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation der Plasmid-DNA wurde mit einem „Miniprep-Kit“ der Firma Promega durchgeführt. Hierfür wurden 1,5 ml einer Übernachtskultur (LB-Medium mit 100 μg / ml Ampicillin) bei 14000 Upm für drei Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 μl Resuspensionslösung (50 mM Tris, pH 7,5, 10 mM EDTA, 100 μg / ml RNase A) resuspendiert und nach einer Inkubation von fünf Minuten (Raumtemperatur) mit 200 μl Zellysislösung (0,2 mM NaOH, 1 % SDS) gemischt und weitere fünf Minuten inkubiert (auf Eis). Durch Zugabe von 200 μl KAc-Lösung (1,32 M, pH 4,8) wurde das Lysat neutralisiert und fünf Minuten bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 1 ml WIZARDTM Miniprep DNA-Aufreinigungsharz (enthält 7 M Guanidin-HCl) versetzt und auf einer Miniprep-Säule mit Säulenwaschlösung (84 mM NaCl, 8,4 mM Tris, pH 7,5, 2,1 mM EDTA, 55 % Ethanol) gereinigt. Durch Zugabe von 100 μl TE-Puffer (10 mM Tris, pH 7,9, 1 mM EDTA) und Zentrifugation bei 14000 Upm (2 Minuten) wurde die Plasmid-DNA eluiert.

Zur Überprüfung, ob die gewünschten Plasmide amplifiziert wurden, wurde mit einem Teil der Plasmid-DNA eine Restriktionsanalyse unter Verwendung der Restriktionsenzyme *Hind* III und *Bam* HI (1 Stunde, 37°C) durchgeführt. Die Auftrennung des Restriktionsansatzes erfolgte durch Gelelektrophorese mit einem 5%igen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (siehe 3.20.2) und 0,5 x TBE als Laufpuffer. Das Gel wurde in 0,5 μg / ml Ethidiumbromid-Lösung (in TBE) gefärbt.

3.21.2.4 Sequenzanalyse nach Sanger

Mit Hilfe der Sequenzanalyse nach Sanger [Sanger 1977] wurde die Subklonierung der Fragmente und die Orientierung der eingebauten Fragmente im Plasmid überprüft.

Es wurden ca. 1 µg DNA mit NaOH (Endkonzentration maximal 0,5 M) für 5 – 30 Minuten denaturiert. Durch Zugabe von 1/5 Volumen NH₄Ac (7,5 M) und 2,5-fachem Volumen Ethanol wurde die DNA gefällt und das Sediment mit Ethanol (70 %) gewaschen.

Die Plasmid-DNA wurde nach Resuspension in Multicore-Puffer (25 mM Tris-Ac, pH 7,8, 100 mM KAc, 10 mM MgAc, 1 mM DTT) mit ca. 1 µg Primer (pBLCAT2-Bam-Primer, wurde von PD Dr. C. Carlberg, Düsseldorf zur Verfügung gestellt) gemischt und zur Hybridisierung im Heizblock langsam von 70 °C auf Raumtemperatur abgekühlt.

Die Sequenzierung wurde mit einem Sequenzierungs-Kit der Firma Pharmacia, unter Verwendung der T7-DNA-Polymerase durchgeführt. Die radioaktive Markierung erfolgte durch Zugabe von Desoxycytidin-5'-[α-³²P]triphosphat. Nach Inkubation für 10 – 30 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe der Stopplösung (95 % Formamid, 20 mM EDTA, 0,05 % Bromphenolblau, 0,05 % Xylencyanol FF) beendet und die DNA durch Inkubation bei 95 °C (5 Minuten) denaturiert.

Die Auftrennung der Proben erfolgte für 1,5 Stunden bei 75 W mit Hilfe eines Sequenzierungsgels (7 M Harnstoff, 8 % AA / BAA (32,5 / 1) in 1 x TBE, 1/320 Volumen APS (25 %), 1/3200 Volumen TEMED / Vorlauf bei 75 W für 1 Stunde) unter Verwendung von 1 x TBE (siehe 3.20) als Laufpuffer. Nach dem Trocknen des Gels mit einem Geltrockner (80 °C, unter Vakuum) erfolgte die Exposition eines Röntgenfilmes (BioMax MR-1).

3.21.3 Isolation und Markierung der DNA-Fragmente

Die Bakterienkulturen, die Plasmide mit den Fragmenten in der richtigen Orientierung enthielten, wurden für eine Maxipräparation eingesetzt. Die Maxipräparation erfolgte mit den selben Lösungen wie die Minipräparation (siehe 3.21.2.3).

Es wurden 400 µl der Übernachtskultur (siehe 3.21.2.3) in 400 ml LB-Medium (100 µl Ampicillin / 100 ml) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Bakterien wurden nach Sedimentation (5000 Upm, 10 Minuten) in 15 ml Zellsuspensionslösung resuspendiert und mit 15 ml Zelllysislösung für einige Minuten inkubiert. Nach Zugabe von 15 ml Neutra-

lisationslösung wurde das Lysat für fünfzehn Minuten bei 9000 Upm zentrifugiert. Die DNA im Überstand wurde durch Mischen mit ca. 50 ml Isopropanol gefällt, durch Zentrifugation (15 Minuten, 9000 Upm) sedimentiert und nach 10 Minuten Lufttrocknen in 2 ml TE-Puffer aufgenommen.

Die Reinigung der DNA erfolgte analog zur Minipräparation unter Verwendung von Maxiprep-Säulen. Die Plasmid-DNA wurde mit 1,5 ml TE-Puffer eluiert.

Für die Fragmentgewinnung werden ca. 100 µg der pBLCAT2-Konstrukte mit den Restriktionendonukleasen *Hind* III und *Bam* HI für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert und wie bei der Minipräparation beschrieben elektrophoretisch aufgetrennt. Die Fragmentbanden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA-Fragmente durch Inkubation in einem Elutionspuffer (0,5 M Ammoniumacetat, 0,05 M EDTA, 0,1 % SDS, pH 6) über Nacht bei 4 °C eluiert. Die DNA wurde anschließend extrahiert, gefällt, gewaschen (siehe 3.21.2.4) und in 50 µl H₂O (autoklaviert) aufgenommen.

In einer Auffüllreaktion werden die Fragmente (ca. 10 µg) unter Verwendung des Klenow-fragments der DNA Polymerase I (20 U) mit Desoxycytidin-5'-[α-³²P]triphosphat (0,4 MBq) markiert. Die nicht eingebauten Nukleotide wurden mit Bio-Spin Chromatographiesäulen abgetrennt. Die Aktivität der markierten Primer wurde mittels Szintillationsmessung nach Cerenkov [Johnson 1969] gemessen.

3.21.4 *in vitro* Transkription und Translation der Kernrezeptoren

Die cDNAs der translatierten Kernrezeptoren TRα (Huhn) und RXRα (Mensch) lagen kloniert im Expressionsvektor pSG5 (Stratagene, Heidelberg) vor. Die Klone wurden von PD Dr. C. Carlberg, Universität Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Der Expressionsvektor pSG5 enthält einen T7-Bakteriophagenpromotor, der die *in vitro* Transkription der klonierten cDNAs ermöglicht. Nach Linearisierung der Plasmide mit der Restriktionsendonuklease *Xba* I erfolgte die mRNA-Synthese mit Hilfe der T7-RNA-Polymerase. Für die *in vitro* Translation wurden 5 µg der mRNA mit 175 µl Retikulozyten-Lysat („Rabbit Reticulocyte Lysate System“), 100 U RNasin und 20 µM Aminosäuregemisch zwei Stunden bei 30 °C inkubiert. Als Kontrolle („unprogrammiertes Lysat“) wurde parallel ein Ansatz ohne RNA angesetzt.

3.21.5 EMSA

In verschiedenen Ansätzen wurde die Bindung von TR/RXR-Heteromere und TR-Homodimere an die beiden DNA-Fragmente getestet. Als Positivkontrollen für TREs dienten Konstrukte des M-MLV (*Moloney murine leukemia virus*; DR4) [Sap et al. 1989] und des Lysozyms (Huhn; IP6) [Baniahmad et al. 1990].

Die frisch translatierten Rezeptoren wurde vor der Bindungsstudie zehn Minuten bei Raumtemperatur in 20 µl Bindungspuffer (10 mM Hepes, pH 7,9, 80 mM KCl, 1 mM DTT, 0,2 µg / µl poly (dI-dC)) vorinkubiert, sodass sich Homo- und Heterodimere bilden konnten. Für die Bindung an die DNA-Fragmente wurde ca. 1 ng ³²P-markierte DNA (ca. 10000 cpm) zum Inkubationsgemisch gegeben und weitere 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Die Protein/DNA-Komplexe wurden mit einem 5%igen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel (siehe 3.20.2) getrennt. Nach Trocknen des Geles wurde ein Röntgenfilm (BioMax MR- 1) exponiert.

3.22 Transiente Transfektion

Mit Hilfe der transienten Transfektion sollte die funktionelle Aktivität des CKB-Promotorfragments analysiert werden. Für die transiente Transfektion wurde die Zelllinie Cos-7, die von der Affennieren-Zelllinie CV-1 abstammt und mit einer *origin*-defekten Mutante des SV40-Virus transformiert wurde [Gluzman 1981] verwendet. Die Zellen wurden in DMEM (Dulbeccos' Modification of Eagle's minimal essential medium) mit 2 mM L-Glutamin und 5 % (v/v) FCS angezogen (37 °C, 5 % CO₂-haltige Atmosphäre). Für die transiente Transfektion wurden die Zellen auf sechs Schalen mit einem Durchmesser von 35 mm überführt. Als Medium wurde DMEM mit 5 % FCS⁻ verwendet. Zur Entfernung von niedermolekularen, fettlöslichen Substanzen wurde das FCS vorher mit 10 % (w/v) Aktivkohle Norit A und 1 % (w/v) Dextran35 für zwei Stunden gerührt und durch Zentrifugation, Filtration und Sterilfiltration gereinigt (FCS⁻).

Die Zellen wurden mit pBLCAT2-Konstrukten (1 µg), die die potentiellen TREs vor dem TK-Promotor enthalten (siehe 3.21.2.1) und den Expressionsplasmiden (siehe 3.21.4) für die Rezeptoren TRα und RXRα (jeweils ca. 0,3 µg) kotransfiziert. Gleichzeitige Kotransfektion des Referenzplasmids pCH110 (1 µg; Pharmacia), welches die β-Galaktosidase kodiert, ermöglichte die Überprüfung der Transfektionseffizienz.

Die Transfektion erfolgte mit Hilfe des liposomalen Transfektionsreagenz DOTAP (N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethyllsulfat, Boehringer). Das Reagenz wurde 1:7 mit Wasser verdünnt und mit der DNA gemischt. Während der Inkubation (15 Minuten, Raumtemperatur) bildeten sich Liposomen, die mit FCS-freiem Medium verdünnt zu den Zellen (100 µl Liposomen pro Platte) gegeben wurden [Carlberg 1995]. Nach vier Stunden Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurde T₃ (0,1 µM) bzw. das gleiche Volumen Lösungsmittel (alkalische Phosphatpuffer: 137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 8,4) zu den Zellen gegeben, wobei der FCS-Gehalt des Mediums gleichzeitig auf 5 % eingestellt wurde. Nach vierzig Stunden Inkubation (37 °C, 5 % CO₂) wurden die Zellen zweimal mit PBS (137 mM NaCl, 2,6 mM KCl, 6,4 mM Na₂HPO₄, 1,4 mM KH₂PO₄, pH 7,2 – 7,4) gewaschen und mit 200 µl Lysierungspuffer (Boehringer) für fünf Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Die lysierten Zellen wurden abzentrifugiert (20800 x g, 5 Minuten) und der Überstand (jeweils 80 µl) für die Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)- bzw. der β-Galaktosidase-Aktivität eingesetzt.

3.22.1 Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität

Für die Bestimmung der Chloramphenicol-Acetyltransferase-Aktivität wurde die Hälfte des Lysats (siehe 3.22) für zehn Minuten auf 70 °C erhitzt, mit [¹⁴C]-Chloramphenicol / Acetyl-CoA gemischt (0,1 mg) und vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Ethylacetat (5 Volumen) gestoppt. Durch Zentrifugation (20800 x g, 5 Minuten) wurden die Phasen getrennt und von jeder Probe das gleiche Volumen der oberen, organischen Phase abgenommen. Die Proben wurden im Vakuum-Konzentrierer getrocknet und in 7 µl Ethylacetat aufgenommen. Durch Dünnschichtchromatographie (Fließmittel: Chloroform / Methanol (95 / 5)) wird das Chloramphenicol in den Proben von den acetylierten Formen des Chloramphenicols getrennt. Für die Auswertung wurde eine Imaging Plate (IP) BAS-MP exponiert und mit Hilfe des Bio-Imaging Analyser BAS-1500 IP Reader unter Verwendung der Software BAS-Reader für Windows 3.1 und Tina 2.09 ausgewertet.

Durch Berechnung des Verhältnisses zu der jeweiligen β-Galaktosidase-Aktivität wurden die CAT-Aktivitäten standardisiert.

3.22.2 Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität

Für die Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurde die zweite Hälfte (80 μ l) des Lysats (siehe 2.22) mit dem 2,5fachen Volumen (200 μ l) einer gesättigten 2-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid-Lösung in Reaktionspuffer (50 mM Tris, 10 mM MgCl_2 , 100 mM NaCl, pH 7,9) gemischt. Nach ca. vier bis fünf Stunden Inkubation bei 37 °C wurde die Extinktionszunahme bei 405 nm mit dem ELISA-Reader Victor 1420 Multilabel Counter (Software: Wallac 1420 Version 1.00/4) quantifiziert.

4 ERGEBNISSE

4.1 Umwandlung der Oligomere der MtCK

Nach der Inkubation von isolierten Mitochondrien mit verschiedenen Substanzen, die die oxidative Phosphorylierung bzw. das Oktamer/Dimer-Verhältnis *in vitro* beeinflussen, erfolgte die Bestimmung des Oktameranteils der MtCK mit Hilfe der Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese und anschließender Aktivitätsfärbung.

Der Vorteil der Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese gegenüber der Agarosegel-Elektrophorese liegt in der klaren Trennung der dimeren Form der MtCK von der oktameren Form. Sie bietet damit die Möglichkeit der Bestimmung des Oktamer/Dimer-Verhältnisses (Abbildung 12).

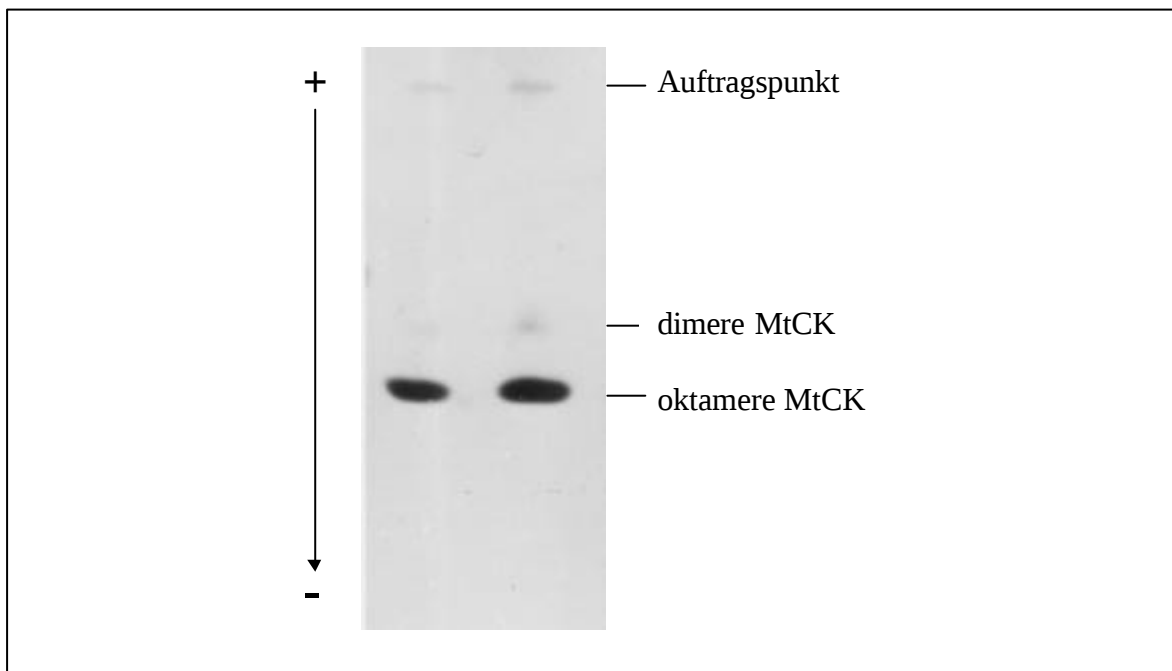


Abbildung 12: Elektrophoretische Auftrennung von isolierten Mitochondrien mit Hilfe der Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese.

Bei der Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese erscheint das MtCK-Dimer auf derselben Laufhöhe wie die CKMM. Es ist daher notwendig vor der Elektrophorese, die Mitochondrien vollständig von den cytosolischen CKs zu reinigen. Zum Nachweis der Reinheit der Bande wurde zunächst ein *Western blot* (Abbildung 13) durchgeführt. Hierfür wurden die primären Antikörper Anti-CKM und Anti Mi-CK verwendet.

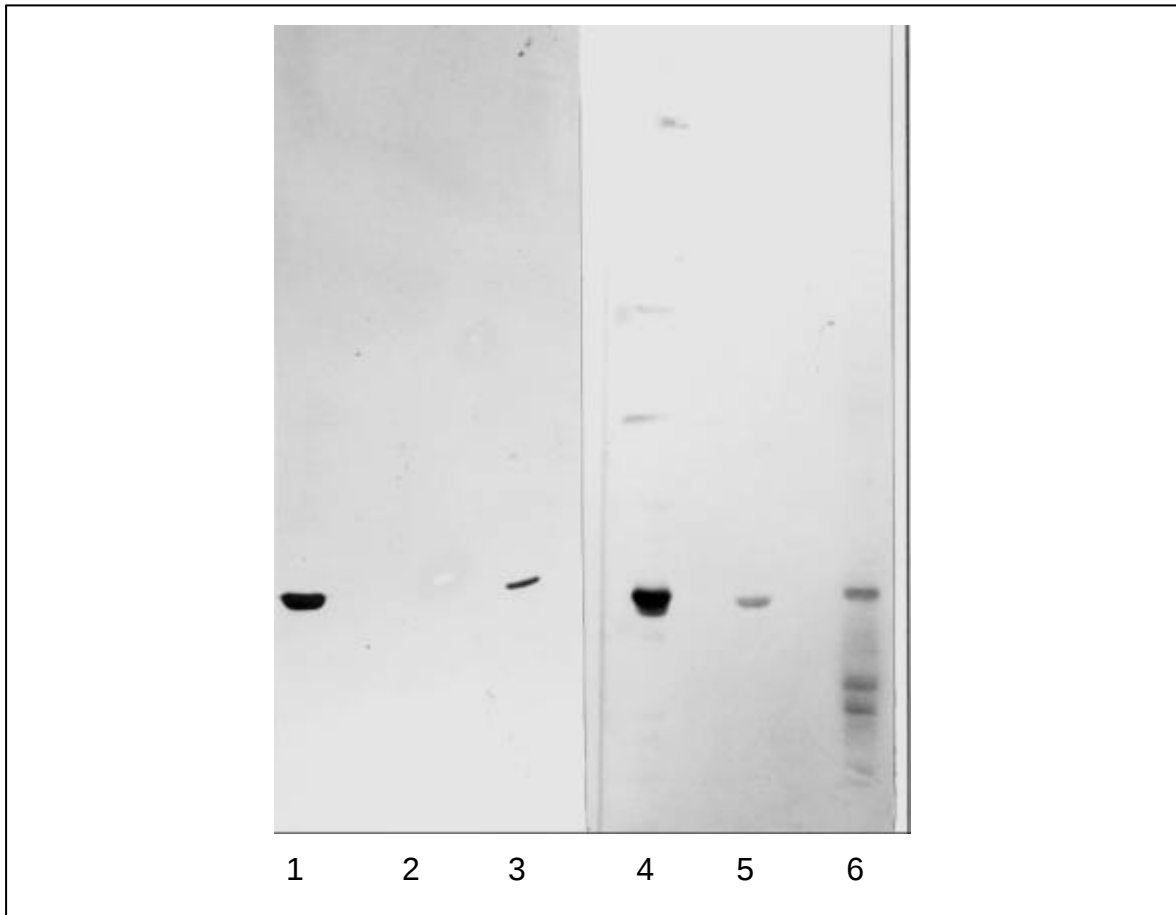


Abbildung 13: *Western blot*-Analyse von isolierten Mitochondrien (2 und 4; 10µg Protein), Cytosol-Proben (3 und 6; 16 µg Protein) und isolierter CKM aus Kaninchenmuskel (1 und 5; 1µg Protein). Für den ersten Blot (1 – 3) wurde der primäre Antikörper Anti-CKM und für den zweiten Blot (4 – 6) der primäre Antikörper Anti-Mi-CK verwendet.

In der Mitochondrienprobe (2) konnte mit dem Antikörper Anti-CKM keine cytosolische CKM detektiert werden, während der Antikörper Anti-Mi-CK eine stark positive Reaktion zeigte (4). Der polyclonale Antikörper Anti-Mi-CK führt jedoch aufgrund seiner geringeren Spezifität zu Kreuzreaktionen mit cytosolischen CKs in der Cytosolprobe (6) bzw. mit der isolierten CKM (5).

Die Mitochondrienproben enthielten somit keine detektierbare Kontamination cytosolischer CK und konnten ohne weitere Aufreinigung für die Bestimmung des Oktamer / Dimer-Verhältnisses durch Cellulose-Polyacetat-Elektrophorese eingesetzt werden.

Die Inkubation der isolierten Mitochondrien mit CAT, Nigericin, KCN, Oligomycin und Creatin ergab keine signifikante Veränderung des Oktameranteils der MtCK. Auch die Inkubation bei verschiedenen pH-Werten (pH 6,5; pH 7,5; pH 7,8; pH 9,2) und die Inkubation unter Ausschluss von Sauerstoff (Begasen mit Stickstoff) führte zu keiner Veränderung des Oktamer/Dimer-Verhältnisses.

Lediglich die Inkubation mit FCCP (1 μ M), einem Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung, ergab eine signifikante Erniedrigung des Oktameranteils um 8 % (Abbildung 14).

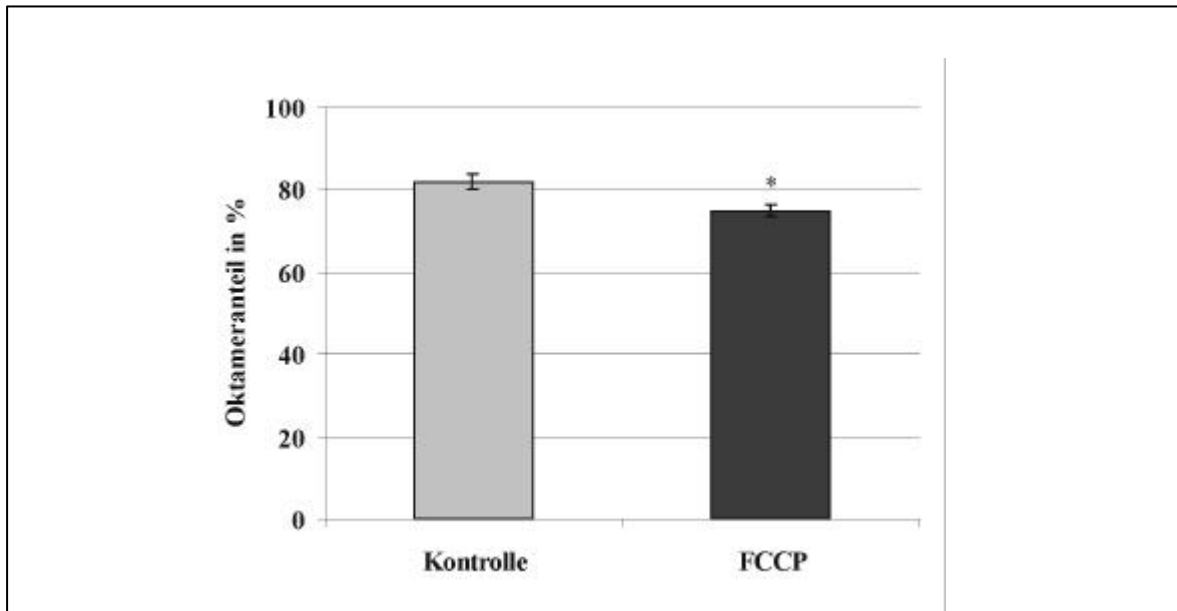


Abbildung 14: Prozentuale Abnahme des Oktameranteils der MtCK nach Inkubation mit 1 μ M FCCP ($n = 6 \pm$ SEM; * $p < 0,05$).

4.2 Einfluss von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf den Energiestoffwechsel des Rattenherzes

Zur Erzeugung der Hypothyreose bekamen sechs Ratten 0,05 % Propylthiouracil ins Trinkwasser. Die Behandlung wurde nach 14 Tagen bei konstantem Körpergewicht der Tiere beendet. Durch die Messung des freien T_3 (fT_3) und T_4 (fT_4) im Serum wurde gezeigt, dass die Ratten nach der Behandlung mit PTU hypothyreot waren. Hierbei lagen die Serumkonzentrationen von fT_3 und fT_4 aller hypothyreoten Tiere unter der Nachweisgrenze des Chemolumineszenzimmunoassays (fT_3 : $< 2,0 \text{ pg / ml}$, fT_4 : $< 0,35 \text{ ng / dl}$). Die Serumkonzentration des fT_3 der Kontrolltiere betrug $3,6 \pm 0,1 \text{ pg / ml}$ und des fT_4 $1,25 \pm 0,05 \text{ ng / dl}$. Die TSH-Konzentration im Serum der Ratten lag ebenfalls unter der Nachweisgrenze ($0,1 \text{ } \mu\text{U / ml}$) des Chemolumineszenzimmunoassays.

Zur Untersuchung schneller Effekte der Schilddrüsenhormone wurden sechs Ratten einmalig mit $100 \text{ } \mu\text{g } T_4 / 100 \text{ g Körpergewicht}$ behandelt (akutes Modell). 24 Stunden nach der Behandlung war der fT_3 -Serumspiegel ($6,7 \text{ pg / ml} \pm 0,3$) um 91 % und der fT_4 -Serumspiegel ($5,07 \text{ ng / dl} \pm 0,33$) um 290 % gegenüber dem Serumspiegel der Kontrolltiere (fT_3 : $3,5 \pm 0,1 \text{ pg / ml}$; fT_4 : $1,30 \pm 0,43 \text{ ng / dl}$) erhöht.

Zur Untersuchung chronischer Effekte der Schilddrüsenhormone wurden Ratten über einen Zeitraum von sieben Tagen mit jeweils $50 \text{ } \mu\text{g } T_4 / 100 \text{ g Körpergewicht}$ behandelt. 24 Stunden nach der letzten Injektion war der T_3 -Spiegel der Ratten im Serum ($3,6 \text{ } \mu\text{g / l} \pm 0,2$) um 227 % erhöht, der T_4 -Spiegel ($259 \text{ } \mu\text{g / l} \pm 17$) um 76 %. Die Ratten waren somit eindeutig hyperthyreot. Ein weiterer Nachweis, für die Hyperthyreose war die signifikante ($p < 0,001$) Erhöhung der spezifischen Aktivität des Malat-Enzyms im Leberhomogenat (Kontrollen: $409,1 \pm 118,3 \text{ mU / mg}$; hyperthyreote Ratten: $1457,7 \pm 94,5 \text{ mU / mg}$). Das hepatische Malat-Enzym gilt als sensibler Marker für den thyroidalen Status von hepatischen Geweben [Simat et al. 1980].

Charakteristisch für einen Nahrungsentzug ist ein erhöhter cAMP-Spiegel. Aus diesem Grunde wurden vier Ratten über einen Zeitraum von zwei Tagen ohne Futter gehalten. Der Glukosespiegel im Serum der Ratten im Hungerzustand war nach zwei Tagen gegenüber dem der Kontrolltiere um 45 % von $11 \pm 0,3 \text{ mM}$ auf $6 \pm 0,8 \text{ mM}$ signifikant erniedrigt.

4.2.1 Wirkung von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf das Körper- und Herzgewicht

Das Körper- und Herzgewicht der hypo-, eu- und hyperthyreoten Ratten ist in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Tabelle 7: Vergleich des Körper- und Herzgewichtes von hypo- und hyperthyreoten Ratten. Die Werte der Kontrolltiere sind in Klammern angegeben (n = 4 - 9 ± SEM; *p < 0,05; **p < 0,01; *p < 0,001).**

	hypothyreote Ratten	hyperthyreote Ratten akutes Modell	hyperthyreote Ratten chronisches Modell
Körpergewicht (KG) [g]	189 ± 11 (222 ± 11)	302 ± 13 (318 ± 15)	250 ± 4 (243 ± 3)
Herzgewicht (HG) [g]	0,56 ± 0,03 ** (0,77 ± 0,02)	1,08 ± 0,07 (1,04 ± 0,06)	1,0 ± 0,02 *** (0,78 ± 0)
KG / HG	341 ± 11 * (291 ± 13)	282 ± 13 (305 ± 4)	241 ± 3 *** (311 ± 5)

Die Hypothyreose über 14 Tage führte zur Abnahme des Körpergewichtes und zur ausgeprägteren, signifikanten Verringerung des Herzgewichtes um 27 %. Das Verhältnis von Körpergewicht / Herzgewicht nahm daher signifikant zu.

Die einmalig mit T₄ behandelten Ratten zeigten auf Grund der kurzen Versuchsdauer keine signifikanten Veränderungen des Herz- bzw. Körpergewichtes.

Hyperthyreose über den Zeitraum von sieben Tagen führte zu einer hoch signifikanten Zunahme des Herzgewichtes, bei nahezu gleichem Körpergewicht. Das Verhältnis Körpergewicht / Herzgewicht war daher hoch signifikant verringert (p < 0,001).

Das Körpergewicht der Ratten im Hungerzustand war signifikant verringert (Kontrolltiere: 215 ± 5 g; Ratten im Hungerzustand: 193 ± 3 g), bei unverändertem Herzgewicht.

4.2.2 Wirkung von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf die oxidative Phosphorylierung des Rattenherzens

Tabelle 8: Kontrollwerte der verschiedenen Parameter der mitochondrialen Atmung von Herzmitochondrien der Ratte.

Atmungskontrollquotient (ADP) (n = 23)	5,7 ± 0,2
ADP/O-Quotient (n = 30)	2,9 ± 0,04
Atmungskontrollquotient (Creatin) (n = 28)	1,5 ± 0,05
Sauerstoffverbrauch state 3-Atmung (n = 21)	99 ± 4 nmol/min * mg
Sauerstoffverbrauch state 4-Atmung (n = 22)	18 ± 1 nmol/min * mg

Die isolierten Mitochondrien der hypothyreoten Ratten zeigten keine Veränderung des Atmungskontrollquotienten (ADP) und des ADP/O-Quotienten. Der Atmungskontrollquotient nach Stimulierung mit Creatin und der Sauerstoffverbrauch während der state 3- und state 4-Atmung waren nicht signifikant erniedrigt.

Einmalige Behandlung mit T₄ führte zu keiner signifikanten Änderung der gemessenen Parameter.

Längere Behandlung mit T₄ hingegen führte zu einem um 28% erhöhten Atmungskontrollquotienten nach Stimulierung mit ADP (signifikant, p < 0,05) und einem nicht signifikant erhöhten Atmungskontrollquotienten nach Stimulierung mit Creatin. Der Sauerstoffverbrauch während der state 3-Atmung war nicht signifikant und während der state 4-Atmung signifikant (p < 0,05) um 13 % erhöht. Lediglich der ADP/O-Quotient blieb unverändert.

Um die Wirkung des Isoprenalins auf die Funktion und Expression der CK-Isoenzyme zu testen, wurden fünf Ratten mit Isoprenalalin (5mg / kg Körpergewicht) behandelt. Sechs Stunden nach der Behandlung der Ratten zeigten die aus den Herzen isolierten Mitochondrien keine Veränderung der gemessenen Parameter der oxidativen Phosphorylierung.

Die Perfusion isolierter Rattenherzen mit Forskolin und IBMX (erhöht zelluläres cAMP) führte zu einem erhöhten Atmungskontrollquotienten nach Stimulation mit ADP und einem erhöhten Sauerstoffverbrauch in der state 3-Atmung (30 %, signifikant; $p < 0,05$) bzw. state 4-Atmung (nicht signifikant) der Mitochondrien.

4.2.3 Wirkung von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf die MtCK-Menge und das Oktamer/Dimer-Verhältnis

Die Erhöhung bzw. Erniedrigung der CK-Aktivität kann durch Regulation der Aktivität des vorhandenen Enzyms, z.B. durch Phosphorylierung, oder durch Veränderung der Proteinkonzentration des Enzyms erfolgen. Da das Oktamer/Dimer-Verhältnis *in vitro* von der Konzentration des Enzyms selbst abhängig ist, könnte die Proteinkonzentration der MtCK in Bezug auf das Oktamer/Dimer-Verhältnis eine regulatorische Bedeutung haben. Durch *Western blot*-Analysen der Herzhomogenate unter Verwendung des primären Antikörpers Anti Mi-CK wurde deshalb die Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Proteinkonzentration der MtCK untersucht. Es wurde weder bei den hypothyreoten Ratten noch bei den sieben Tage mit T_4 behandelten Ratten eine Veränderungen der MtCK-Proteinkonzentration im Herzhomogenat gemessen.

Der Oktameranteil war in allen Fällen gegenüber der Kontrolle unverändert (90 - 100 %).

4.2.4 Wirkung von Schilddrüsenhormone auf die Expression der CK-Isoenzyme

Mit Hilfe der RT-PCR wurde der mRNA-Gehalt der CK-Isoenzyme in Herzhomogenaten von hypo- und hyperthyreoten Ratten bestimmt. Weiterhin wurde der mRNA-Gehalt der Isoenzyme in Herz- und Gehirnhomogenaten der Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäuse mit dem der entsprechenden Kontrolltiere verglichen.

Abbildung 15 zeigt eine Autoradiographie der durch PCR amplifizierten Fragmente der CK-Isoenzyme und der Negativkontrolle (T_3) ANT1 in cDNA-Proben der hypothyreoten Ratten und der dazu gehörigen Kontrollen:

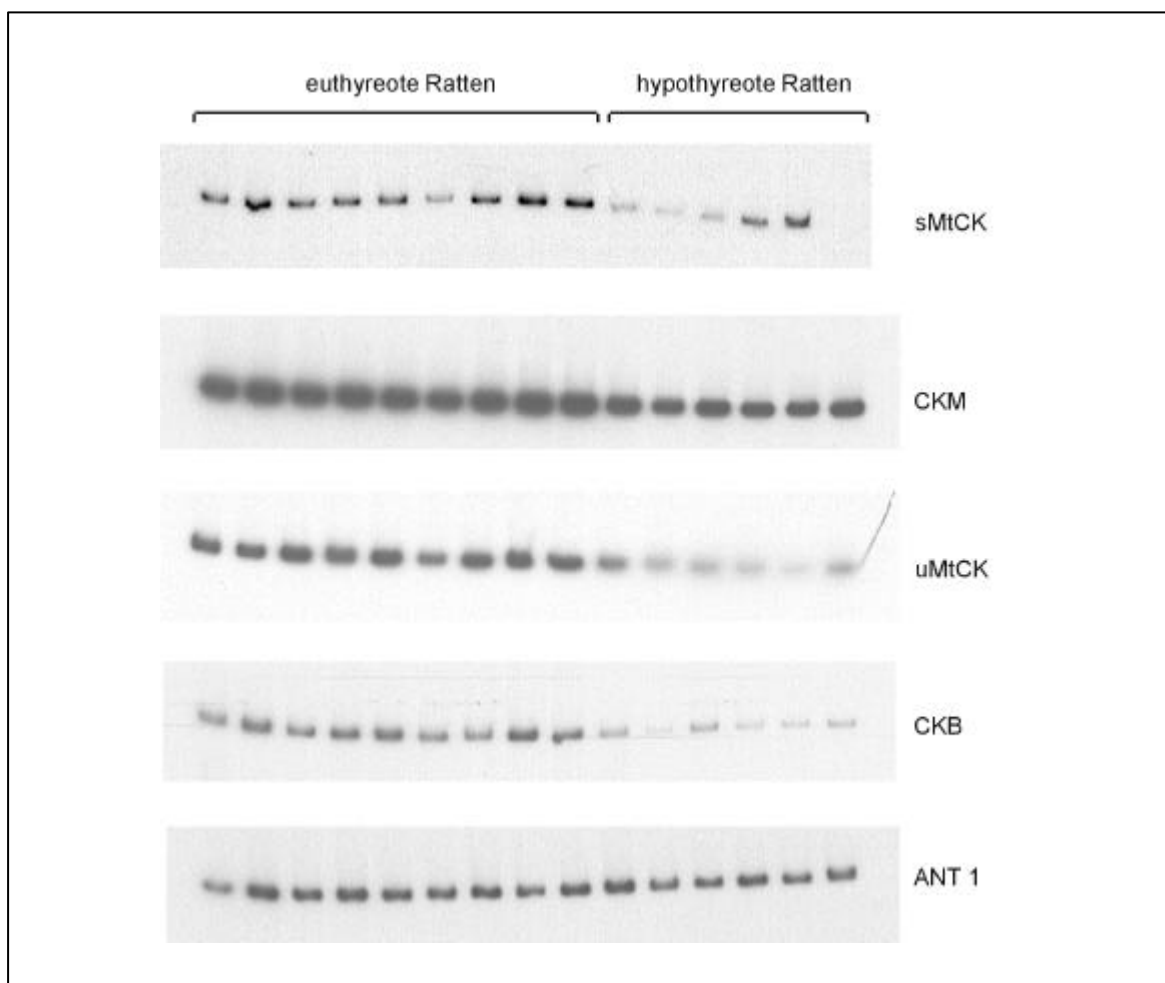


Abbildung 15: Amplifizierte Fragmente der CK- und des ANT1-Gens von eu- und hypothyreoten Ratten.

Für jedes Versuchstier wurde der relative Einbau radioaktiv markierter Primer in die PCR-Produkte der einzelnen PCR-Reaktionen bestimmt. Die Mittelwerte wurden mit denen des Kontrollgens ANT1 standardisiert und sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Tabelle 9: Analyse der aus Herzhomogenaten von hypo-, eu- und hyperthyreoten Ratten isolierten RNA. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben, wobei die Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde (n = 4 - 9 ± SEM).

	hypothyreote Ratten	hyperthyreote Ratten akutes Modell	hyperthyreote Ratten chronisches Modell
CKB	45 ± 3	107 ± 10	114 ± 7
CKM	88 ± 4	128 ± 5	100 ± 11
sMtCK	72 ± 5	122 ± 10	113 ± 14
uMtCK	56 ± 4	106 ± 5	123 ± 3
ANF	38 ± 8	112 ± 15	236 ± 21
GAP-DH	74 ± 4	103 ± 8	100 ± 1

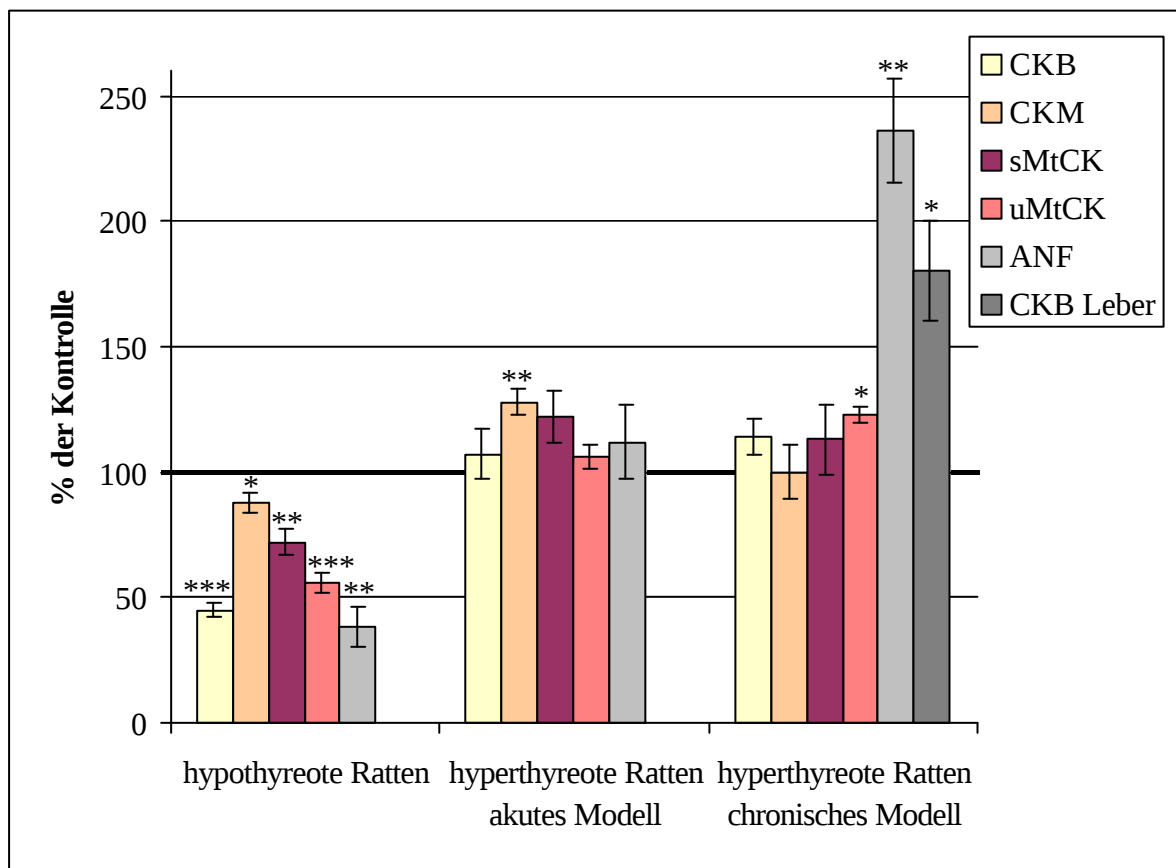


Abbildung 16: Analyse der aus Herzhomogenaten von hypo-, eu- und hyperthyreoten Ratten isolierten RNA. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt (n = 4 - 9 ± SEM; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Die Hypothyreose führte zu einer signifikanten Verringerung der mRNA aller CK-Isoenzyme im Herzhomogenat, wobei die Abnahmen bei der CKB (45 % der Kontrolle) und der uMtCK (56 % der Kontrolle) am stärksten waren. Die Positivkontrolle ANF zeigte eine Abnahme der mRNA gegenüber der Kontrolle um 62 %.

Einmalige Behandlung der Ratten mit T₄ (akutes Modell) führte zur signifikanten Erhöhung der mRNA der CKM und der sMtCK.

In der chronischen Hyperthyreose (7d 50 µg / 100 g KG) war die mRNA der Positivkontrolle ANF gegenüber der Kontrolle stark um 136 % ($p < 0,01$) angestiegen. Die mRNA der CKB und uMtCK war gegenüber der Kontrolle erhöht, die mRNA-Konzentration der Isoenzyme CKM und sMtCK nahezu unverändert.

Des Weiteren wurde aus dem Leberhomogenat der hyperthyreoten Ratten (7 d 50 µg/100 g KG) die mRNA isoliert und eine RT-PCR durchgeführt. Die Behandlung der Ratten mit Schilddrüsenhormonen (7 Tage 50 µg / 100 g KG) bewirkte einen signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der CKB-mRNA um 80 % gegenüber den Kontrolltieren.

Die mRNA-Konzentration der GAP-DH im Herzen von hypo-, eu- und hyperthyreoten Ratten wurde ebenfalls verglichen. Es zeigte sich, dass die Expression der GAP-DH auch vom Schilddrüsenhormonstatus abhängig ist. Zur Standardisierung der cDNA-Proben wurde daher für die Schilddrüsenhormon-Versuche ein Fragment des ANT1 verwendet, da dieses Gen nicht durch Schilddrüsenhormone reguliert wird [Dümmeler et al. 1996].

4.2.5 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die Isoenzym-Verteilung der Creatinkinase

Die prozentuale Verteilung der CK-Isoenzyme im Herzhomogenat der hypo-, eu- und hyperthyreoten Ratten und der *knock out* Mäuse wurde durch Agarosegel-Elektrophorese bestimmt.

Die Abbildung 17 zeigt die Auftrennung der CK-Isoenzyme der Herzhomogenatprobe einer hypothyreoten Ratte und einer Kontrollratte:

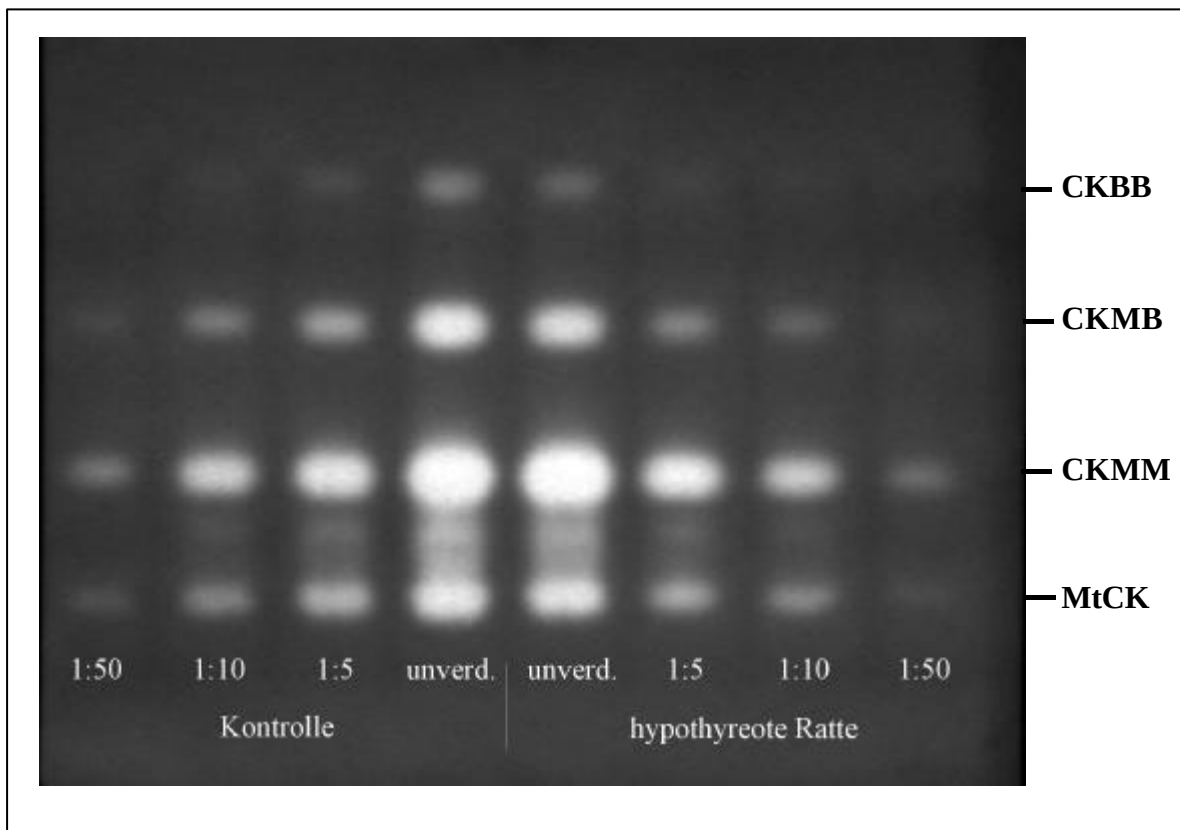


Abbildung 17: Analyse der CK-Isoenzyme in der Herzhomogenatprobe einer hypothyreoten Ratte und einer dazugehörigen Kontrolle durch Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Aktivitätsfärbung.

Nach Bestimmung der prozentualen Verteilung der CK-Isoenzyme wurde die prozentuale spezifische Aktivität der einzelnen Isoenzyme mit Hilfe der Gesamtaktivität der Creatinkinase (CKf) im Herzhomogenat berechnet.

In der folgenden Tabelle ist die spezifische CK-Gesamtaktivität der einzelnen Homogenatproben zusammengefasst:

Tabelle 10: Spezifische Gesamtaktivität der Creatinkinase (CKf) im Herzhomogenat von hypo- und hyperthyreoten Ratten und im Herzhomogenat der *knock out* Mäuse (n = 4 – 9 ± SEM).

	hypothyreote Ratten	hyperthyreote Ratten akutes Modell	hyperthyreote Ratten chronisches Modell	knock out Mäuse
Kontrollen [mU / mg]	3050 ± 213	3251 ± 155	3671 ± 365	2697 ± 75
behandelte Tiere [mU / mg]	2805 ± 286	3480 ± 351	3737 ± 383	2314 ± 54 **

In Tabelle 11 und Abbildung 18 ist die spezifische Aktivität der einzelnen CK-Isoenzyme in den Homogenatproben wiedergegeben:

Tabelle 11: Spezifische Aktivität der CK-Isoenzyme im Herzhomogenat von hypo-, eu- und hyperthyreoten Ratten, sowie im Herzhomogenat von Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäusen. Die Werte der Kontrolltiere sind in Klammern angegeben ($n = 4 - 9 \pm \text{SEM}$).

	hypothyreote Ratten	hyperthyreote Ratten akutes Modell	hyperthyreote Ratten chronisches Modell
CKBB [mU / mg]	83 $\pm$ 6 (209 $\pm$ 18)	56 $\pm$ 4 (37 $\pm$ 6)	75 $\pm$ 16 (27 $\pm$ 5)
CKMB [mU / mg]	550 $\pm$ 55 (657 $\pm$ 62)	633 $\pm$ 47 (439 $\pm$ 27)	840 $\pm$ 27 (525 $\pm$ 75)
CKMM [mU / mg]	3264 $\pm$ 112 (2481 $\pm$ 100)	2875 $\pm$ 145 (3417 $\pm$ 282)	3213 $\pm$ 114 (3508 $\pm$ 204)
MtCK [mU / mg]	594 $\pm$ 106 (650 $\pm$ 75)	604 $\pm$ 76 (687 $\pm$ 93)	930 $\pm$ 130 (918 $\pm$ 41)

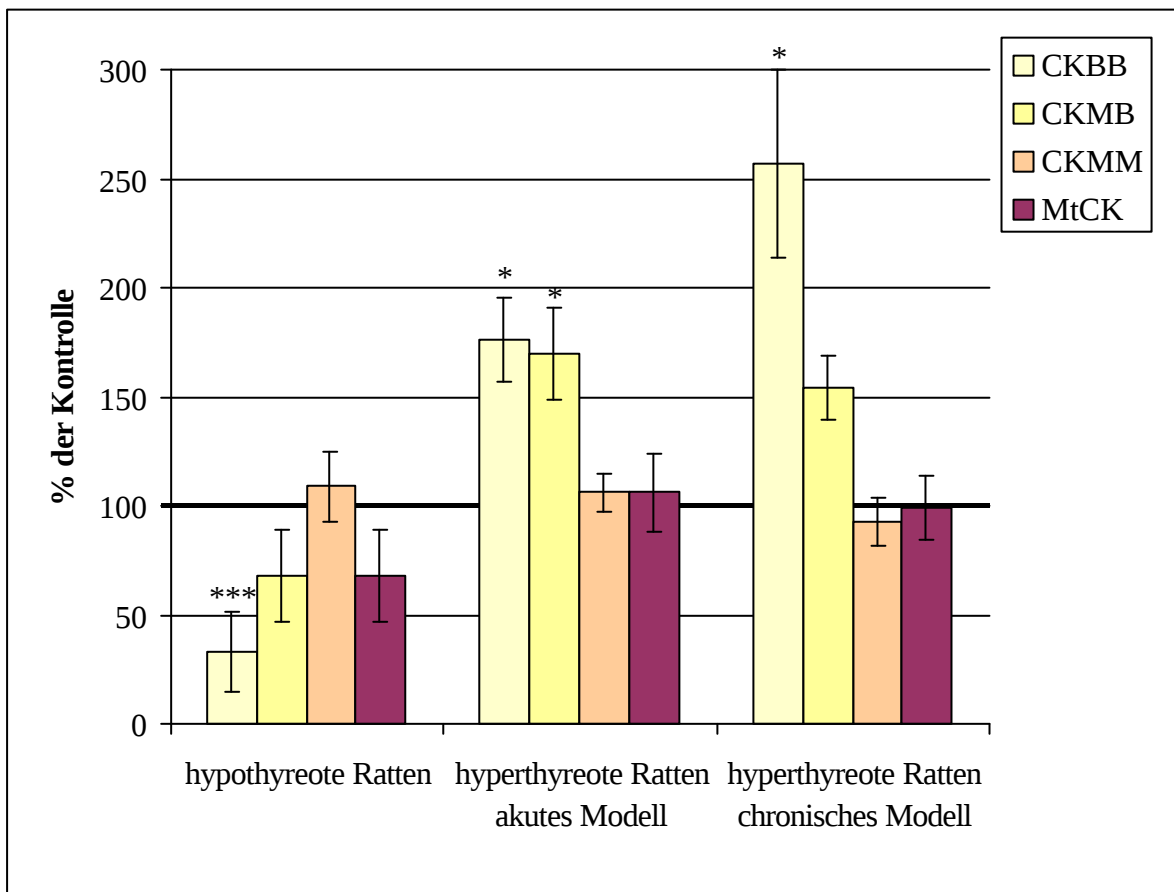


Abbildung 18: Spezifische Aktivität der CK-Isoenzyme im Herzhomogenat von hypo-, eu- und hyperthyreoten Ratten. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben, wobei die Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde ($n = 4 - 9 \pm \text{SEM}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Durch Behandlung der Ratten mit PTU nahm die spezifische Aktivität der CKBB, CKMB und MtCK ab.

Die Hyperthyreose der Ratten resultierte in einer deutlichen, signifikanten Zunahme der spezifischen Aktivität der CKBB und CKMB.

4.2.6 Expression der CK-Isoenzyme in Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäusen

Die RNA aus den Herz- und Gehirnhomogenaten der Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäuse wurde ebenfalls isoliert und mit Hilfe der RT-PCR analysiert. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt und in der Abbildung 19 grafisch dargestellt.

Tabelle 12: Analyse der aus Herz- und Gehirnhomogenaten von Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäusen isolierten RNA. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben, wobei die Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde (n = 6 ± SEM).

	Herzhomogenat	Gehirnhomogenat
CKB	110 ± 7	88 ± 6
CKM	92 ± 4	nicht exprimiert
sMtCK	100 ± 8	nicht exprimiert
uMtCK	110 ± 9	79 ± 2
ANF	69 ± 5	nicht exprimiert
GAP-DH	67 ± 5	75 ± 4

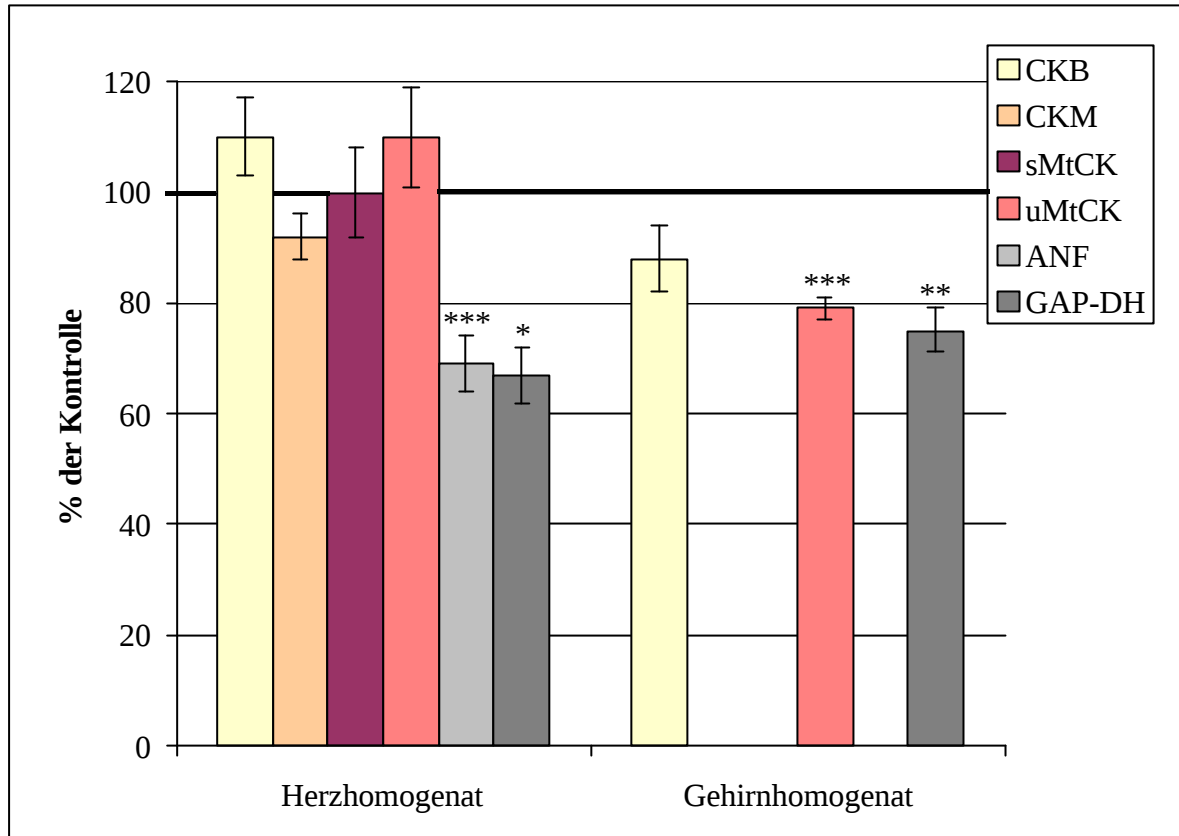


Abbildung 19: Analyse der aus Herz- und Gehirnhomogenaten von Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäuse isolierten RNA. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben, wobei die Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde ($n = 6 \pm \text{SEM}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Im Herzhomogenat der *knock out* Mäuse wurde eine nicht signifikante, 10 %ige Erhöhung der CKB- und der uMtCK-mRNA gegenüber dementsprechenden mRNA-Konzentrationen im Herzhomogenat der Kontrollmäuse gemessen. Die sMtCK-mRNA war unverändert, während die mRNA der CKM um 8 % (nicht signifikant), die der Positivkontrolle ANF um 31 % (signifikant, $p < 0,001$) und die der GAP-DH um 33 % (signifikant, $p < 0,05$) vermindert war.

Im Gehirn werden nur die CK-Isoenzyme CKB und uMtCK exprimiert. Die mRNA dieser Isoenzyme war um 12 % (nicht signifikant) bzw. 21 % (signifikant, $p < 0,001$) verringert. Die mRNA-Konzentration der GAP-DH war im Gehirnhomogenat der *knock out* Mäuse signifikant ($p < 0,01$) um 25 % erniedrigt. Das Gen des ANFs wird im Gehirn nicht exprimiert.

4.2.7 Isoenzym-Verteilung der CK in Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäuse

Die folgende Abbildung zeigt die Agarosegel-Elektrophorese einer Herzhomogenatprobe und einer Gehirnhomogenatprobe in verschiedenen Verdünnungen:

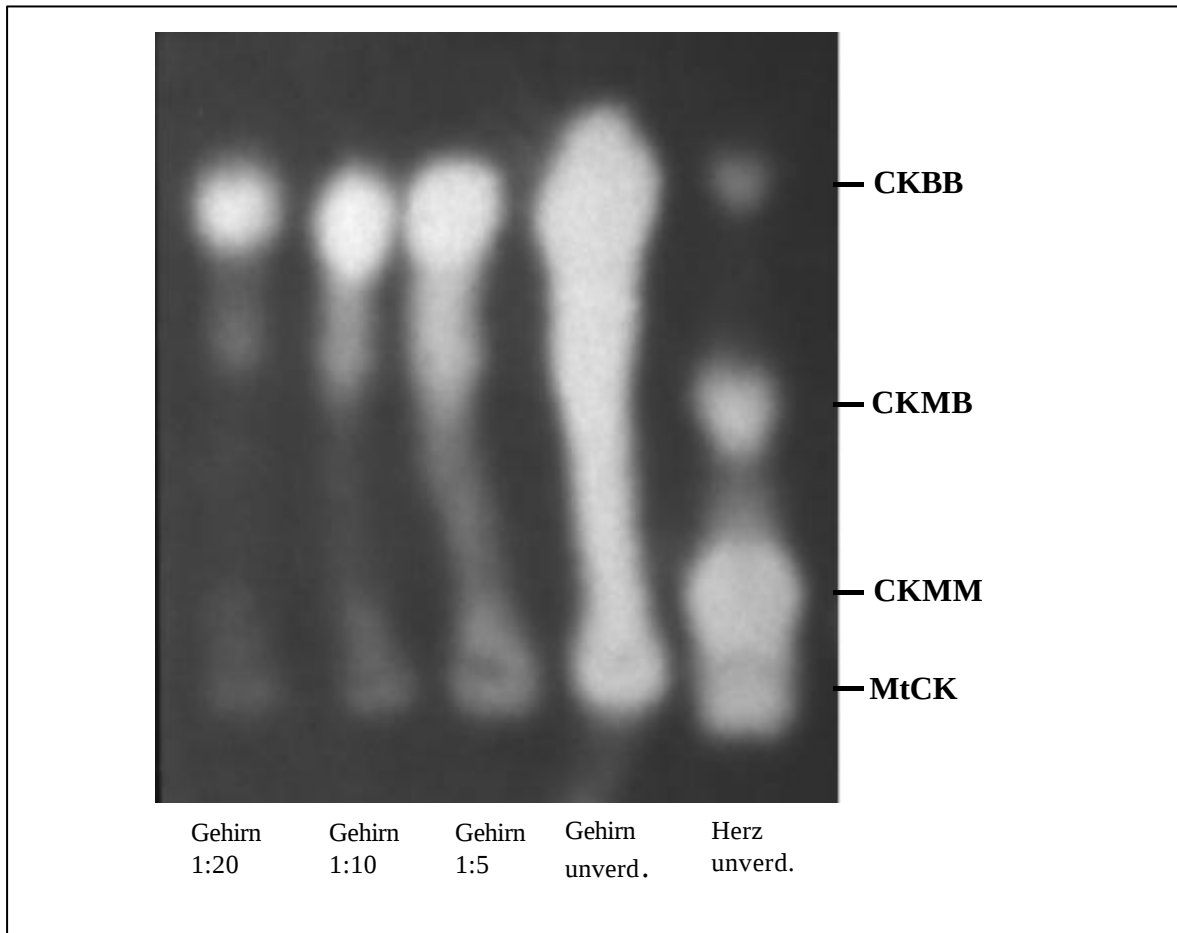


Abbildung 20: Analyse der CK-Isoenzyme in der Gehirn- und Herzhomogenatprobe einer Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Maus durch Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Aktivitätsfärbung

Im Gehirn der Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäuse wurden nur die Isoenzyme CKBB und MtCK detektiert (Abbildung 20), wobei die Aktivität der MtCK im Homogenat der Kontrollmäuse ca. 17 % der Gesamtaktivität ausmacht.

Die Veränderungen der spezifischen Aktivität der CK-Isoenzyme im Herzhomogenat der *knock out* Mäuse sind in der Tabelle 13 wiedergegeben:

Tabelle 13: Spezifische Aktivität der CK-Isoenzyme im Herzhomogenat von Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäusen. Die Werte der Kontrolltiere sind in Klammern angegeben (n = 4 - 9 ± SEM).

	<i>knock out</i> Mäuse
CKBB [mU / mg]	87 ± 5 (64 ± 8)
CKMB [mU / mg]	244 ± 11 (263 ± 24)
CKMM [mU / mg]	1770 ± 46 (2172 ± 57)
MtCK [mU / mg]	213 ± 17 (198 ± 12)

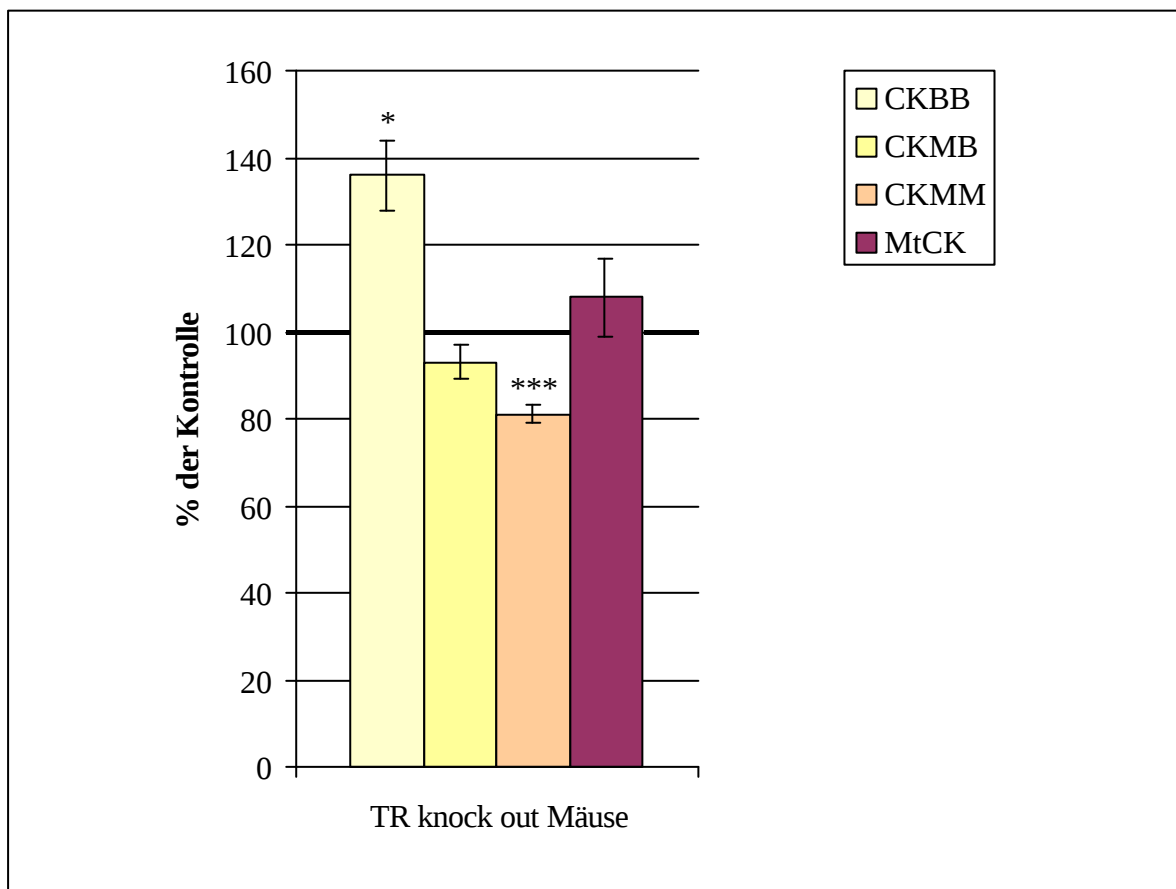


Abbildung 21: Spezifische Aktivität der CK-Isoenzyme im Herzhomogenat von Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäusen. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben, wobei die Kontrolle auf 100 % gesetzt wurde (n = 4 - 9 ± SEM; *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

Im Herzhomogenat der Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäuse wurde eine signifikante Erhöhung der spezifischen Aktivität der CKBB gemessen. Die spezifische Aktivität der CKMM war hoch signifikant erniedrigt.

4.2.8 Einfluss von cAMP auf die Expression der CK-Isoenzyme

Aus den Herzhomogenaten der mit Isoprenalin behandelten Ratte, der mit Forskolin/IBMX perfundierten Herzen und der Ratten im Hungerzustand wurde ebenfalls die RNA isoliert und mit Hilfe der RT-PCR analysiert. Die Standardisierung erfolgte mit dem Kontrollgen GAP-DH. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle 14: Analyse der isolierten RNA aus Herzhomogenaten von mit Isoprenalin behandelten Ratten, der mit Forskolin / IBMX perfundierten Herzen und aus dem Herz- bzw. der Leberhomogenat von Ratten im Hungerzustand. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt (n = 4 -5 ± SEM).

	Isoprenalin	Forskolin / IBMX	Hungerzustand
CKB	136 ± 12	107 ± 8	53 ± 4
CKM	101 ± 8	135 ± 4	82 ± 4
sMtCK	104 ± 13	158 ± 17	101 ± 1
uMtCK	88 ± 11	75 ± 7	88 ± 2
CKB Leber	—————	—————	67 ± 12

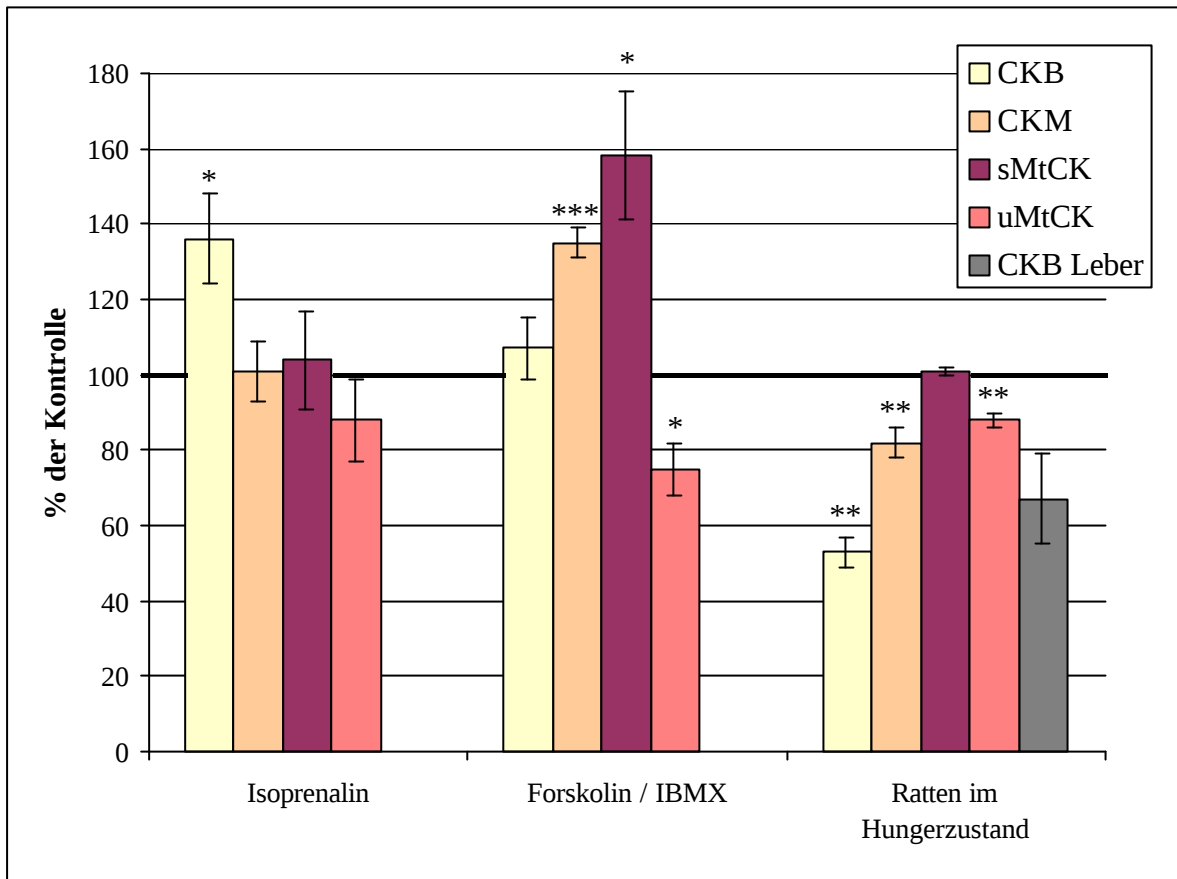


Abbildung 22: Analyse der isolierten RNA aus Herzhomogenaten von mit Isoprenalin behandelten Ratten, der mit Forskolin / IBMX perfundierten Herzen und aus dem Herz- bzw. Leberhomogenat von Ratten im Hungerzustand. Die Werte sind in % der Kontrolle angegeben. Die Kontrolle wurde auf 100 % gesetzt ($n = 4 - 5 \pm \text{SEM}$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; * $p < 0,001$).**

Die mRNA der CKB nahm im Herzhomogenat der mit Isoprenalin behandelten Ratten signifikant zu, bei gleicher mRNA-Menge der CKM und sMtCK. Die mRNA der uMtCK hingegen war leicht verringert.

Perfusion von isolierten Herzen mit Forskolin / IBMX führte zu einer signifikanten Zunahme der mRNA-Menge der CKM und sMtCK im Homogenat. Die mRNA der CKB war in diesen Proben gegenüber den Kontrollen leicht (nicht signifikant) angestiegen, während die mRNA der uMtCK signifikant vermindert war.

Der Nahrungsentzug der Ratten führte zu einer signifikanten Erniedrigung der mRNA der CKB, CKM und uMtCK, bei gleichbleibender mRNA-Konzentration der sMtCK. Die mRNA der CKB im Leberhomogenat dieser Ratten war ebenfalls um 33% verringert.

4.2.9 Wirkung von Isoprenalin, cAMP und Hungerzustand auf die Isoenzym-Verteilung der Creatinkinase

Die prozentuale Verteilung der CK-Isoenzyme wurde durch Agarosegel-Elektrophorese bestimmt und die prozentuale spezifische Aktivität der einzelnen Isoenzyme mit Hilfe der Gesamtaktivität der Creatinkinase (CKf) im Herzhomogenat berechnet. Die Gesamtaktivität der CK in den Homogenatproben ist in Tabelle 15 und die spezifische Aktivität der einzelnen Isoenzyme ist in Tabelle 16 angegeben:

Tabelle 15: Spezifische Gesamtaktivität der Creatinkinase im Herzhomogenat der mit Isoprenalin behandelten Ratten, der mit Forskolin / IBMX perfundierten Herzen sowie im Herzhomogenat von Ratten im Hungerzustand (n = 4 - 5 ± SEM).

	Isoprenalin	Forskolin / IBMX	Hungerzustand
Kontrollen [mU / mg]	4477 ± 135	5759 ± 417	3093 ± 322
behandelte Tiere [mU / mg]	4967 ± 228	5811 ± 341	3034 ± 236

Tabelle 16: Spezifische Aktivität der CK-Isoenzyme im Herzhomogenat der mit Isoprenalin behandelten Ratten, der mit Forskolin / IBMX perfundierten Herzen sowie im Herzhomogenat von Ratten im Hungerzustand (n = 4 - 5 ± SEM).

	Isoprenalin	Forskolin / IBMX	Hungerzustand
CKBB [mU / mg]	263 ± 22 (220 ± 19)	244 ± 12 (243 ± 18)	37 ± 9 (36 ± 11)
CKMB [mU / mg]	940 ± 90 (910 ± 30)	808 ± 63 (789 ± 93)	553 ± 104 (497 ± 88)
CKMM [mU / mg]	2762 ± 267 (2704 ± 212)	3591 ± 272 (3461 ± 313)	2475 ± 109 (2358 ± 140)
MtCK [mU / mg]	702 ± 65 (769 ± 52)	1168 ± 44 (1265 ± 57)	978 ± 68 (794 ± 148)

Die spezifische Aktivität der CK-Isoenzyme zeigte in allen drei Ansätzen keine signifikante Änderung.

4.3 Rezeptor / DNA-Bindungsstudien (EMSA)

Die Methode des EMSA (electrophoretic mobility shift assay) beruht auf der veränderten elektrophoretischen Mobilität von DNA-Fragmenten, an die Proteine wie Rezeptoren bzw. Rezeptorkomplexe gebunden sind.

Die Experimente wurden mit *in vitro* translatierten Rezeptoren und ^{32}P -markierten DNA-Fragmenten (potentielle TREs) durchgeführt. Als Kontrollansatz („unprogrammiertes Lysat“) wurde anstelle der *in vitro* translatierten Rezeptoren Retikulozytenlysat eingesetzt, das analog zu den Translationsansätzen aber ohne entsprechende RNA inkubiert wurde (Negativkontrolle).

Die Bindungsfähigkeit der translatierten Rezeptoren wurde durch ihre Affinität zu bekannten Schilddrüsenhormon responsiven Elementen (Konstrukte des M-MLV (DR4-Element) und Lysozym (IP6-Element)) nachgewiesen.

Abbildung 23 zeigt die EMSA-Analyse der beiden Fragmente des CKB-Promotors und der Positivkontrollen:

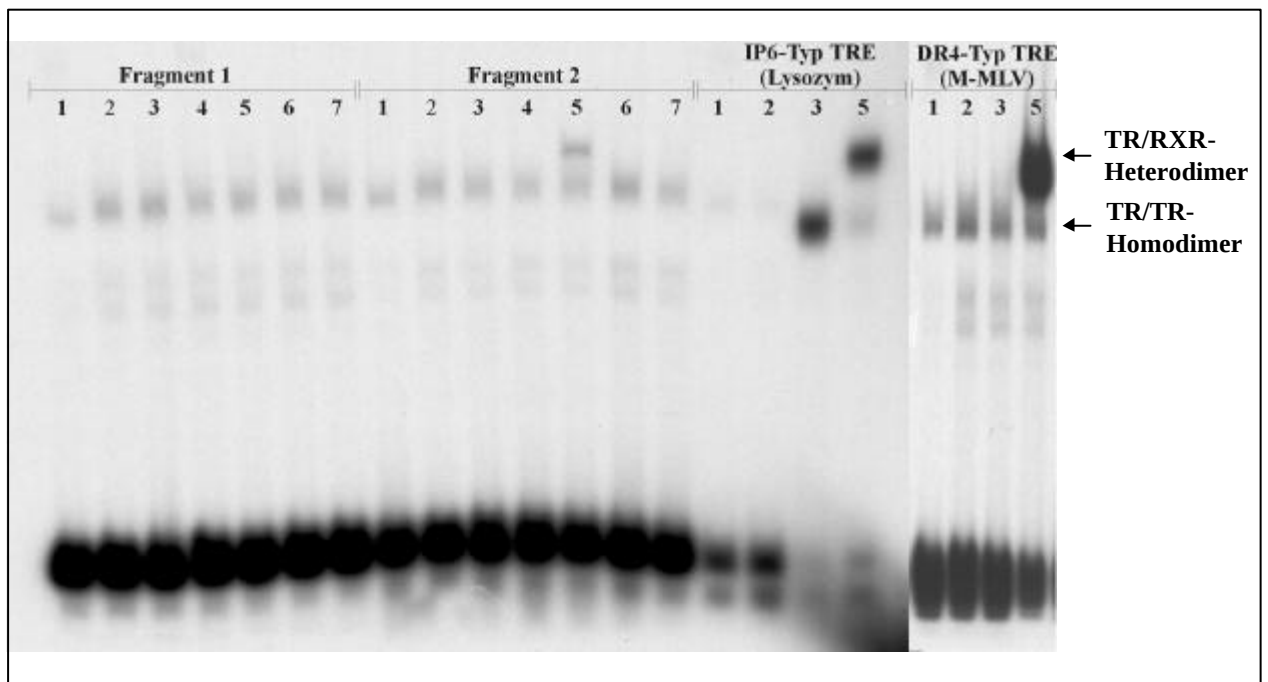


Abbildung 23: Analyse der Bindungsfähigkeit verschiedener Rezeptoren an die möglichen TREs des CKB-Promotors und an die Kontrollelemente der Positivkontrollen aus dem Lysozym-Promotor (IP6-Typ-TRE) und des M-MLV (DR4-Typ-TRE).

1: unprogrammiertes Lysat; 2: RXRa; 3: TRa; 4: VDR; 5: TRa/RXRa; 6: VDR/RXRa;

In keiner der durchgeführten EMSA-Analysen konnte eine Affinität der Rezeptoren zum Fragment 1 des CKB-Promotors nachgewiesen werden (Abbildung 23, 1 – 7). Drei unabhängige EMSA-Analysen mit dem Fragment 2 des CKB-Promotors ergaben hingegen eine Bindung des RXR α / TR α -Heterodimers von 7 %. Parallel dazu durchgeführte Ansätze mit dem IP6 Typ-TRE aus dem Lysozympromotor zeigten eine deutliche Bindung des TR α -Homodimers und eine etwa 10-fach bessere Bindung des RXR α / TR α -Heterodimers. Die Analyse des DR4-Typ-TREs des M-MLV ergab eine Bindung des RXR α / TR α -Heterodimers von 71 %.

4.4 Transiente Transfektion

In weiteren Untersuchungen sollte die funktionelle Aktivität des Fragmentes 2 des CKB-Promotors in transient transfizierten Zellen analysiert werden.

Für die transiente Transfektion wurde das pBLCAT2-Konstrukt, in dem das Fragment 2 des CKB-Promotors vor den TK-Promotor des CAT-Reportergens kloniert ist, eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde ein analoges Konstrukt mit dem DR4-Typ-TRE des M-MLV verwendet. Cos-7 Zellen wurden mit diesen CAT-Reportergenkonstrukten, den Expressionsplasmiden für TR α und RXR α und dem Referenzplasmid pCH110 kotransfiziert und mit dem Liganden T₃ (0,1 μ M) bzw. Lösungsmittel inkubiert.

In den Cos-7 zeigt die Inkubation mit 0,1 μ M T₃ eine Stimulation der CAT-Aktivität über das CKB-Promotorfragment auf ca. 160 %. Die parallele Analyse des DR4-Typ-TREs aus M-MLV zeigte eine deutlich stärkere Induktion der CAT-Aktivität nach Inkubation mit T₃ auf ca. 485 %.

5 DISKUSSION

5.1 Wege der intrazellulären Signalvermittlung von Schilddrüsenhormonen und Katecholaminen im hypertrophen Herzen

Das Herz ist ein Hauptziel der Wirkung von Schilddrüsenhormonen. So sind in der Hyperthyreose Herzfrequenz, Schlagvolumen und Sauerstoffverbrauch gesteigert.

Die Katecholamine haben einen ähnlichen Einfluss auf die Funktion des Herzens.

Adrenalin bewirkt eine Zunahme der Kontraktionskraft und der Herzfrequenz und führt zu einer Erhöhung des Herzminutenvolumens mit Steigerung des systolischen Blutdrucks.

Gleichzeitig wird der Sauerstoffverbrauch erhöht.

Die folgende Abbildung stellt die möglichen Signaltransduktionswege dar, deren Beteiligung an der Signalvermittlung von Schilddrüsenhormonen und Isoprenalin gezeigt wurde:

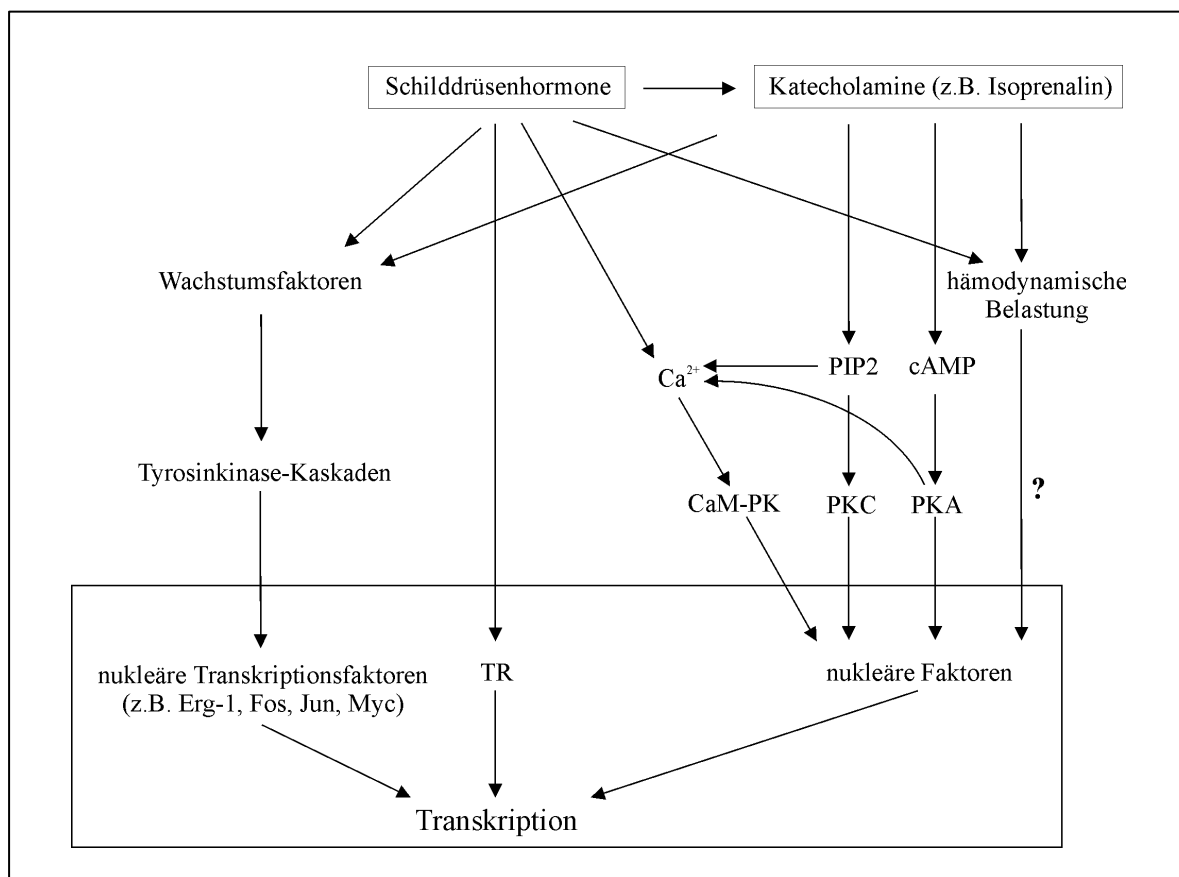


Abbildung 24: Übersicht über die Signaltransduktionswege von Schilddrüsenhormonen und Isoprenalin (chronischer Effekt).

5.1.1 Die Signalvermittlung der Schilddrüsenhormone

Die Wirkungsweise der Schilddrüsenhormone kann in zwei Gruppen unterteilt werden: Schilddrüsenhormon-Rezeptor (TR) vermittelte (nukleäre) und nicht TR vermittelte Effekte.

Die TR vermittelten Einflüsse der Schilddrüsenhormone auf das Myocard werden durch Bindung des Hormons an die nukleären Rezeptoren TR α und TR β vermittelt. Hierbei ist ausschließlich T₃ wirksam. Diese nukleären Effekte resultieren in einer gesteigerten Transkription und Translation spezifischer Proteine, deren vermehrte Synthese zu einer reversiblen Hypertrophie des Myokards und zur gesteigerten Kontraktilität des Herzens führt. Zu den direkten, nukleären Effekten zählt z.B. die Modulation der Expression der Gene für die schwere Kette des Myosins und der SR Ca²⁺-ATPase [Ojamaa et al. 1992]. Obwohl dieser nukleäre Signalweg für die Langzeitwirkung der Schilddrüsenhormone verantwortlich ist, erfolgt die veränderte Transkription zum Teil sehr schnell. Die Initiation der Transkription der S14 mRNA der Rattenleber *in vitro* z.B. kann innerhalb von fünf Minuten nach der Applikation von T₃ und die der mRNA der SR Ca²⁺-ATPase im Herz nach zwei Stunden detektiert werden. Die Transkriptionsinitiation anderer Gene wiederum benötigt mehrere Stunden bis Tage, wie z.B. die des Cytochrom c [Soboll 1993]. Die Geschwindigkeit der Transkriptionsinduktion ist somit nicht immer ein zuverlässiger Indikator eines nukleären Effektes der Schilddrüsenhormone.

Die nicht TR vermittelten Effekte der Schilddrüsenhormone sind im Allgemeinen schnell und erfolgen neben T₃ auch aufgrund der Wirkung anderer Schilddrüsenhormon-Metabolite wie T₄ und T₂. Diese Effekte dauern auch nicht so lange an wie die TR vermittelten, nukleären Effekte. Die durch T₃ ausgelöste erhöhte Aufnahme von Ca²⁺ in die Zelle z.B., welche zur verstärkten Kontraktilität des Herzens führt, erfolgt *in vivo* nach zwei Minuten, nimmt aber auch schon nach 10 – 20 Minuten wieder ab [Segal et al. 1996]. Neben der Wirkung auf den Ca²⁺-Transport sind als nicht Rezeptor vermittelte Effekte der Schilddrüsenhormone auch ein veränderter Transport von Na⁺ und Glukose, die Stimulation der mitochondrialen Atmung, aber auch eine Veränderung der Aktivität einiger Kinasen bekannt. Für einige extranukleäre Wirkungen der Schilddrüsenhormone konnte neben der Aktivierung von Proteinkinasen, wie z.B. die PKC auch die Beteiligung von Calmodulin und Phosphatidylinositol gezeigt werden [Segal 1990, Davis und Davis 1996].

Zu den indirekten, nicht TR vermittelten Effekten der Schilddrüsenhormone zählen aber auch die erhöhte Ansprechbarkeit gegenüber Katecholaminen durch Zunahme der Zahl der β -adrenergen Rezeptoren und stimulierender Guanin-Nukleotid-Regulator-Proteine. Des Weiteren wurde anhand von nicht belasteten, heterotop transplantierten Herzen die indirekte Stimulation der cardialen Proteinsynthese durch Schilddrüsenhormone über eine erhöhte hämodynamische Belastung gezeigt [Ojamaa et al. 1992, Klein 1990] (Abbildung 24).

TR vermittelte und nicht TR vermittelte Wirkungen der Schilddrüsenhormone können auch gemeinsame Ziele haben, wie z.B. die SR Ca^{2+} -ATPase, deren Expression durch T_3 stimuliert und deren Aktivität durch T_3 und T_4 extranukleär gesteigert wird.

5.1.2 Die Signalvermittlung der Katecholamine

Isoprenalin ist ein adrenalinhomologes Katecholamin, welches eine fast ausschliesslich β -sympathomimetische Wirkung bei kaum nachweisbarer α 1-Affinität besitzt. Unter physiologischen Bedingungen spielt das sympathische Nervensystem eine zentrale Rolle in der Antwort des Herzens auf akuten Stress. Alle bekannten β -Rezeptoren sind über stimulierende G-Proteine mit dem Adenylatcyclase-System gekoppelt und steigern somit den zellulären cAMP-Gehalt.

Durch Herzperfusion mit Forskolin und IBMX sollte Rezeptor unabhängig die cAMP-Konzentration im Herz gesteigert werden. Forskolin, aus der indischen Pflanze *Coleus forskoli*, greift direkt, d.h. ohne Interaktion mit exogenen Rezeptoren, am katalytischen Zentrum der Adenylatcyclase an und aktiviert das Enzym auf diese Weise.

Hemmstoffe der Phosphodiesterase erhöhen ebenfalls die zelluläre Konzentration von cAMP. Sie vermindern den Abbau von cAMP zu inaktivem 5'-AMP durch Hemmung eines oder mehrerer von vier Phosphodiesterase-Isoenzymen. Klassische Hemmstoffe sind die Methylxanthine, wie das Isobutyl-Methylxanthin (IBMX), die alle Isoenzyme gleich stark hemmen.

β -adrenerge Agonisten wie Isoprenalin induzieren *in vivo* eine cardiale Hypertrophie.

In die durch Katecholamine induzierte Hypertrophie sind sowohl α - als auch β -Rezeptoren involviert. So können sowohl durch cAMP vermittelt als auch über die MEK/MAPK-Signalkaskaden Effekte auf Transkriptionsebene erfolgen [Bogoyevitch et al. 1991,

Simpson et al. 1991].

Die Aktivierung des MEK/MAPK-Signalweges durch Isoprenalin ist von der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration abhängig, während Substanzen wie Forskolin und IBMX, die die Adenylatcyklase ohne Beteiligung der β -adrenergen Rezeptoren stimulieren, nicht in der Lage sind, die MAPK zu aktivieren. Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt daher vermutlich auf Grund der Mobilisierung des Ca^{2+} [Bogoyevitch et al. 1996].

Isoprenalin induziert die für die cardiale hypertrophe Antwort typischen Änderungen wie z.B. eine gesteigerte Proteinsynthese und die Expression von *c-fos* und *c-jun* [Bogoyevitch et al. 1996]. Protooncogene wie *c-fos*, *c-jun*, *c-myc* und die frühen „growth response“-Gene (z.B. *erg-1*) können eine wichtige Rolle in der Regulation des cardialen Wachstums und der Transkription von Herz spezifischen Genen spielen. Komponenten dieses Programmes der frühen Gene sind eventuell in der direkten oder indirekten Stimulation der Reexpression der fetalen Gene in der Hypertrophie involviert [Zimmer et al. 1995].

5.2 Einfluss von Hormonen auf den Energiestoffwechsel des Rattenherzens

5.2.1 Einfluss von Schilddrüsenhormonen und Katecholaminen auf das Herzgewicht

Im Allgemeinen reagiert das Herz auf eine chronische Mehrbelastung, wie sie auch durch Schilddrüsenhormone und adrenerge Stimulation (z.B. länger andauernde Applikation von Isoprenalin) hervorgerufen wird, mit einer Zunahme des Herzgewichtes. Diese Gewichtszunahme kann im Falle der Hyperthyreose 30 – 50 % betragen. [Cohen et al. 1966, Hellermann und Kahaly 1994, Mohr-Kahaly et al. 1996]. Verschiedene Studien zeigten, dass eine erhöhte Proteinsynthese die Ursache der Vergrößerung des Herzens ist. Dieser Prozess erfolgt relativ schnell. Signifikante Änderungen des Herzgewichtes konnten schon nach vier Tagen der Behandlung mit Schilddrüsenhormonen beobachtet werden [Klein 1988]. In dieser Arbeit erfolgte nach siebentägiger Behandlung der Ratten mit T_4 ebenfalls eine deutliche, hoch signifikante Hypertrophierung des Herzgewebes (Tabelle 7).

Die Hypothyreose, die durch Zusatz von PTU im Trinkwasser der Ratten über 14 Tage induziert wurde, führte im Gegensatz zur Hyperthyreose zu einer signifikanten Verminderung des Herzgewichtes um 27 %.

5.2.2 Einfluss von Schilddrüsenhormonen und cAMP auf die oxidative Phosphorylierung

In hyperthyreoten Ratten (chronisches Modell) war die state 4-Atmung signifikant erhöht. Ob der erhöhte Sauerstoffverbrauch durch Schilddrüsenhormone auf eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zurückzuführen ist, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten war der ADP/O-Quotient in allen drei Gruppen unverändert, in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Hafner und Brand [Hafner und Brand 1988], was gegen eine Entkopplung spricht. Auch der signifikant erhöhte Atmungskontrollquotient (ADP) der isolierten Mitochondrien aus den hyperthyreoten Herzen spricht gegen eine Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung.

In der akuten Hyperthyreose wurde keine Veränderungen der gemessenen Parameter nachgewiesen. Der Behandlungszeitraum reichte anscheinend nicht aus, um messbare Effekte auf die Mitochondrien zu bewirken.

Eine Erhöhung der cAMP-Konzentration im Herzen führt zu einer Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase, welche neben anderen Proteinen den L-Typ Ca^{2+} -Kanal phosphoryliert und dadurch den Ca^{2+} -Einstrom erhöht. Der erhöhte Einstrom von Ca^{2+} in die myocardialen Muskelfasern steigert die Kontraktilität des Herzens. Die Stimulation einiger mitochondrialer Dehydrogenasen durch Ca^{2+} hat einen Anstieg des mitochondrialen $[\text{NADH} / \text{NAD}^+]$ -Verhältnisses zur Folge und führt zur Aktivierung der oxidativen Phosphorylierung [Heinemann und Balaban 1990, Denton und McCormack 1990]. Durch Perfusion isolierter Herzen mit Forskolin und IBMX wurde die state3-Atmung der Herzmitochondrien signifikant erhöht. Der dadurch erhöhte Atmungskontrollquotient (ADP) impliziert eine bessere Kopplung der ATP-Synthese an die oxidative Phosphorylierung. Die Stimulation der state3-Atmung und die geringfügige Erhöhung des Atmungskontrollquotienten durch cAMP wurde auch von Yamazaki in Lebermitochondrien gefunden [Yamazaki 1975, Halestrap 1978].

5.3 Die Creatinkinase-Systeme

Die Identifikation der molekularen Ursachen von Herzerkrankungen ist ein wichtiges Ziel der klinischen Kardiologie. Uns interessierte besonders die Frage, ob bei starker Beanspruchung des Herzens (z.B. Hyperthyreose oder Dauerstress), bei der langfristig eine Hypertrophie entwickelt wird, eine Regulation der Expression der CK-Isoenzyme erfolgt.

Im normalen Herzmuskel sind die Raten des ATP-Verbrauchs und der ATP-Synthese ausgeglichen, sodass die ATP-Konzentration konstant ist. Die schnellste an der ATP-Synthese beteiligte Reaktion ist die der CK. Sie ist etwa zehnfach schneller als die Rate der ATP-Synthese durch die oxidative Phosphorylierung [Ingwall et al. 1990], was auf ihre Rolle als Puffersystem für das zelluläre ATP hinweist. Unter normalen Bedingungen dürften daher die *cytosolischen* CK's nicht limitierend sein.

Die Aufgabe der *mitochondrialen* CK ist es, die Rephosphorylierung des Creatin sicherzustellen, was entgegen dem thermodynamischen Gleichgewicht erfolgt. Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Assoziation der oktameren Form in den „Contact Sites“ dem effizienteren Transfer von energiereichem Phosphat aus der oxidativen Phosphorylierung zum Creatin und damit dessen Rephosphorylierung dient. So wurde in Sättigungstransfer-Experimenten in isolierten Rattenherzmitochondrien gezeigt, dass die Aktivität der MtCK *in situ* die V_{max} des freien Enzyms in Lösung übersteigen kann. In Rinderherzen konnte unter identischen Bedingungen dieses Phänomen nicht beobachtet werden. Das bedeutet, dass die Verbesserung der Leistung der MtCK durch Lokalisation des Oktamers in einem funktionellen Kompartiment nur in Situationen erhöhter oxidativer Aktivität zum Tragen kommt, wie es im Rattenherzen der Fall ist [Jahnke 1999].

Die dimere Form der MtCK vermag nicht gut zwischen innerer und äußerer Membran zu binden, kann also nicht zu einem effizientem Energietransfer zwischen Mitochondrien und Myofibrillen beitragen.

5.3.1 Umwandlung der Oligomere der MtCK

Die „Contact Sites“ stellen dynamische Strukturen dar, die die Aktivität der Mitochondrien reflektieren. Die Zahl der „Contact Sites“ ändert sich z.B. mit der durch Katecholamine bewirkten Veränderung des Energiestatus des Herzens [Knoll und Brdiczka 1983, Brdiczka et al. 1990, Brdiczka 1991, Bakker et al. 1994, Brdiczka und Wallimann 1994]. Die Umwandlung der Oligomere der MtCK ist sowohl von der Anzahl der „Contact Sites“ abhängig, als auch von der Menge der exprimierten CK [Wyss 1992].

Die Inkubation von isolierten Mitochondrien mit verschiedenen Hemmstoffen und Entkopplern der oxidativen Phosphorylierung sollte zeigen, ob der Oktamer-Anteil der MtCK durch den energetischen Status der Mitochondrien beeinflusst wird.

Der Entkoppler FCCP hebt durch Kurzschluss im Protonengradienten die enge Kopplung

zwischen dem Elektronentransport und der oxidativen Phosphorylierung auf. Es erfolgt ein normaler Elektronentransport vom NADH zum O₂, während die mitochondriale ATPase kein ATP erzeugt, da die protonenmotorische Kraft an der inneren Mitochondrienmembran zerstört wird. Eine einstündige Inkubation der isolierten Mitochondrien mit FCCP (1µM) führte zu einer signifikanten Verringerung des Oktamer-Anteils der MtCK um 8 %. Die signifikante Abnahme der „Contact Sites“ nach teilweiser oder totaler Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung wurde von Bakker et al. gezeigt [Bakker et al. 1994].

Möglicherweise ist die Reduzierung der „Contact Sites“ die Ursache der Destabilisierung des Oktamers, da hier die oktamere MtCK zwischen der inneren Mitochondrienmembran und einem Porin der äusseren Membran assoziiert ist [Brdiczka et al. 1990].

Nigericin ist ein Ionophor, der durch den Austausch von Protonen gegen K⁺ den Protonengradienten zerstört. Diese Änderung wird durch das Membranpotential kompensiert, so dass die protonenmotorische Kraft konstant bleibt [Reed 1979].

KCN vermindert als Hemmstoff der Cytochromoxidase die maximale ATP-Synthese der Mitochondrien, muss aber nicht zum totalen Kollaps der protonenmotorischen Kraft führen.

Die Hemmung des Adeninnukleotid-Translokators durch Carboxyatractylosid führt zu einer erhöhten ATP-Konzentration in den Mitochondrien und einer Verarmung des extramitochondrialen Raumes an ATP. Es wurde gezeigt, dass Carboxyatractylosid die Bildung der „Contact Sites“ zwischen den beiden Mitochondrienmembranen erhöht [Bücheler et al. 1991].

In weiteren Versuchen wurde der Einfluss des pH-Wertes, der Oxygenierung der Mitochondrien, sowie der Creatinkonzentration getestet. Diese Bedingungen führen bei isolierter MtCK zu einer Erniedrigung des Oktamer-Anteils [Stachowiak et al. 1998, Wyss et al. 1992]. Sauerstoffmangel sollte durch eine Verminderung der ATP-Synthese der Mitochondrien einen ähnlichen Effekt haben, wie die Hemmung der Atmung durch KCN.

Keine der genannten Bedingungen führte zu einer Veränderung des Oktamer/Dimer-Verhältnisses. Wir vermuten, dass die oktamere Form der CK in den Mitochondrien durch die Stellung zwischen den beiden Membranen stabilisiert wird. Lediglich eine Entkopplung der Mitochondrien über einen Zeitraum von einer Stunde bewirkte eine geringfügige aber signifikante Verringerung des Oktamer-Anteils.

Dagegen wird in intakten, ischämischen Herzen (Langendorff-Perfusion) und in Herzen nach einem Infarkt (LAD-Ratten) die Beeinträchtigung des mitochondrialen Energiemeta-

bolismus und der Herzfunktion mit einem Anstieg des Dimer-Anteils der MtCK beobachtet [Soboll et al.1998]. Als mögliche Mediatoren werden freie Radikale diskutiert. So zeigten neuere Studien, dass die MtCK ein primäres Ziel von reaktiven Sauerstoffspezies wie H_2O_2 und Peroxynitrit ist [Stachowiak et al. 1998]. Isolierte oktamere MtCK dissoziiert durch Inkubation mit Peroxynitrit zu Dimeren. Weiterhin verhindert Peroxynitrit die Reoktamerisierung der dimeren MtCK [Soboll et al. 1999]. Dies könnte erklären, warum eine Verminderung des Oktamers in isolierten, hypoxischen Mitochondrien nicht beobachtet wurde. Hier ist kein NO vorhanden.

Die Veränderung des Oktamer/Dimer-Verhältnisses scheint somit eher eine pathologische als eine regulatorische Bedeutung zu haben. Dies würde sich auch mit der Beobachtung decken, dass erst im teilweise nekrotischen Gewebe eines Herzens, dessen Perfusion mit Forskolin zum Herzversagen führte, der Oktamer-Anteil der MtCK um 16 % vermindert war (nicht gezeigt). Bei allen anderen Perfusionen mit Forskolin zeigte sich dagegen kein Effekt.

Die Erhöhung der Expression der mitochondrialen CK-Isoenzyme in Rattenherzen durch z.B. Hyperthyreose (siehe Kapitel 4.2.4.) hatte ebenfalls keine Erhöhung des Oktameranteils der MtCK zur Folge, obwohl in *in vitro* Versuchen gezeigt wurde, dass die Oktamerisierung auch von der Konzentration des Enzyms abhängig ist [Wyss et al. 1992]. Dies liegt vermutlich daran, dass in der Ratte der Oktamer-Anteil sehr hoch ist. Dieser hohe Oktamer-Anteil korreliert mit der hohen oxidativen Leistung des Rattenherzmuskels. So hat dieser bei einer Herzfrequenz von etwa 250 Schlägen / Minute einen Oktameranteil von 90 - 100 %, während z.B. der Rinderherzmuskel mit 60 – 80 Schlägen / Minute nur einen Oktamer-Anteil von 75 % hat [Jahnke 1999].

5.3.2 Genexpression der Creatinkinase-Isoenzyme

Während der Entwicklung des neonatalen Rattenherzens erfolgt die Expression der einzelnen CK-Isoenzyme zu einem unterschiedlichen Zeitpunkt, wobei das fetale cytosolische Isoenzym CKB durch das für das adulte sarkomere Gewebe typische Isoenzym CKM ersetzt wird. Die mitochondrialen Isoenzyme zeigen keinen solchen „Isoenzym-Switch“ und werden erst nach der Geburt exprimiert. Die Faktoren, die im Herz an dieser Regulation beteiligt sind, konnten bisher nicht nachgewiesen werden. Die meisten Studien verfolgen die Regulation im Skelettmuskel, da es hier im Gegensatz zu adulten Herzmuskel-

zellen stabile Zelllinien gibt. Während der Differenzierung von skeletalen Myoblasten konnte gezeigt werden, dass die Transkription der CKB zum gleichen Zeitpunkt reduziert wird, an dem die Transkription der CKM zunimmt. Die Expression dieser beiden Gene scheint von der Konzentration bestimmter Wachstumsfaktoren abzuhängen. Kim et al. untersuchten als erste die Regulation eines embryonalen Gens durch den bFGF (basic fibroblast growth factor), der die Myogenese inhibiert. Es zeigte sich, dass der bFGF die DNA-Protein-Interaktion eines Transkriptionsfaktors über einen Tyrosinkinase-Signalweg beeinflusst (cAMP und PKC sind wahrscheinlich nicht involviert) wodurch die Transkription der CKB induziert wird. Gleichzeitig bewirkt der bFGF aber auch eine Phosphorylierung der Bindedomäne von bHLH (basic helix-loop-helix)-Transkriptionsfaktoren und hemmt dadurch die Expression Muskel-spezifischer Gene wie die CKM [Kim et al. 1997].

5.3.3 Koexpression

Frühere Studien, die die gewebespezifische Expression der CKs, sowie die Expression unter den Bedingungen der Drucküberbelastung des Herzens untersucht haben, zeigten eine koordinierte Expression der CKM und sMtCK einerseits, bzw. der CKB und uMtCK andererseits [Payne und Strauss 1994]. Die Gene der CK-Isoenzyme sind auf vier unterschiedlichen Chromosomen lokalisiert. Beim Menschen befindet sich das sMtCK-Gen auf Chromosom 5, das uMtCK-Gen auf Chromosom 15, das CKM-Gen auf Chromosom 19 und das CKB-Gen auf Chromosom 14. Es müssen daher gemeinsame *trans*-wirkende Faktoren existieren, um eine koordinierte Expression dieser Gene zu ermöglichen.

Da die beiden gestreiften Muskelzelltypen, Skelett- und Herzmuskel, gleiche Muskel spezifische Gene, wie die CKM und sMtCK exprimieren und gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit T₃ die terminale Muskeldifferenzierung fördert, was in einem Anstieg des bHLH-Transkriptionsfaktors MyoD in myogenen Zelllinien resultiert [Muscat et al. 1994], wäre es denkbar, dass T₃ im Herzen die koordinierte Expression der CKM und sMtCK durch bHLH-Transkriptionsfaktoren reguliert.

Die CKB wird in einer viel grösseren Zahl von Geweben exprimiert, als die CKM. Die Expression der CKB wird unter anderem durch Östrogen, Vitamin D und Wachstums-hormonen erhöht. Der Tumorsuppressor p53 unterdrückt die Expression der CKB [Hamburg et al. 1990, Chen et al. 1995].

Über die Transkriptionskontrolle der uMtCK gibt es nur wenig Informationen. Ähnlich wie

die CKB wird das uMtCK-Gen durch Östrogen reguliert [Payne und Strauss 1994]. Der Mechanismus, der zur koordinierten Expression des uMtCK- und des CKB-Gens führt, ist bisher unbekannt [Qin et al. 1998].

5.3.4 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die mRNA-Konzentration der CK-Isoenzyme

5.3.4.1 Experimentelle Modelle

Für die Versuche, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, wurden ausschließlich erwachsene Tiere verwendet, da die Expression der CK-Isoenzyme auch von der Entwicklung abhängig ist.

Die Analyse der mRNA-Gehalte erfolgte mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR) unter Verwendung von zum Teil radioaktiv markierten Primern. Diese Methode ist besonders gut geeignet, um auch geringfügige Mengen von RNA zu detektieren.

Die Konzentrationen der cDNA wurde durch Analyse der mRNA des ANT1 standardisiert, dessen Expression nicht von Schilddrüsenhormonen beeinflusst wird [Dümmeler et al. 1996]. Einige Arbeitsgruppen verwenden für die Standardisierung der cDNA die GAP-DH. In dem Versuch mit hypothyreoten Ratten zeigte sich aber, dass die Expression der GAP-DH im Herzen offensichtlich vom Schilddrüsenhormonstatus abhängig ist. Durch Applikation von T_4 wurde zwar keine erhöhte Expression bewirkt, in der Hypothyreose war die mRNA-Konzentration jedoch um 26 % vermindert. Die Abhängigkeit der Expression der GAP-DH von Schilddrüsenhormonen wurde bisher nur für die Rattenleber veröffentlicht [Ness und Pendleton 1991].

Eine von Schilddrüsenhormonen regulierte Genexpression des atrialen natriuretischen Faktors (ANF) wurde von Ladenson et al. beschrieben [Ladenson et al. 1988]. Sie geben eine um 31 %ige bzw. 178 %ige mRNA-Konzentration in den Ventrikeln von hypo- bzw. hyperthyreoten Ratten im Vergleich zu euthyreoten Ratten an. Die Quantifizierung der ANF-mRNA konnte somit als Positivkontrolle für den hypo- bzw. hyperthyreoten Zustand der Versuchstiere dienen. Nach siebentägiger Behandlung der Ratten mit T_4 war die mRNA-Konzentration des ANF hoch signifikant um den Faktor 2,4 erhöht und in der Hypothyreose hoch signifikant um den Faktor 2,6 vermindert.

Zur Untersuchung der Wirkung von Schilddrüsenhormonen wurden in dieser Arbeit neben der Hypothyreose zwei verschiedene Modelle der Hyperthyreose erzeugt. Das akute

Modell (einmalige Applikation von T_4) sollte die schnellen Effekte der Schilddrüsenhormone auf das CK-System zeigen. Das chronischen Modell (siebentägige Behandlung der Ratten mit T_4) diene dem Nachweis der langfristigen Effekte, wie sie in der durch Schilddrüsenhormone verursachten Hypertrophie des Herzens auftreten.

5.3.4.2 Regulation der Creatinkinase mRNA-Konzentration in der Hypo- und Hyperthyreose

In der Hypothyreose war die mRNA aller vier Isoenzyme signifikant vermindert, analog zur Positivkontrolle ANF. Es wurde daher zunächst angenommen, dass dieser Effekt TR vermittelt ist.

Dagegen sieht man sowohl in der akuten als auch in der chronischen Hyperthyreose nur eine geringe Erhöhung der mRNA einiger CK-Isoenzyme. Dies könnte daran liegen, dass schon in der Euthyreose eine sehr hohe „basale“ Expression der CK-Enzyme erfolgt. In der Leber, die nur eine marginale CKB-Expression zeigt, ist in der chronischen Hyperthyreose die mRNA um 80 % erhöht (Abbildung 16).

Der Schilddrüsenhormonstatus beeinflusst jedoch die Expression des jeweiligen CK-Isoenzyms unterschiedlich (Abbildung 16). So ist in der Hypothyreose die signifikante Verringerung der mRNA-Konzentration der CKB und der uMtCK wesentlich stärker ausgeprägt, als die der CKM und sMtCK. Dagegen erfolgte in der akuten Hyperthyreose eine Erhöhung der mRNA-Konzentration der CKM und sMtCK, bei nahezu unveränderter Genexpression der CKB und uMtCK. Im chronischen Modell hyperthyreoter Ratten war die CKB nicht signifikant und die uMtCK signifikant erhöht (Abbildung 16).

Zimmer und Pfeffer zeigten, dass innerhalb von 12 Stunden nach T_3 -Applikation der cAMP-Spiegel ansteigt und für 48 Stunden erhöht bleibt [Zimmer und Pfeffer 1986]. Die Steigerung der Expression der CKM und sMtCK nach einmaliger Applikation von T_4 könnte somit auch durch eine sehr schnelle indirekte Wirkung der Schilddrüsenhormone über einen Anstieg der cAMP-Konzentration vermittelt sein (siehe auch Kapitel 5.3.6).

Die Regulation der Expression der einzelnen CK-Isoenzyme durch Schilddrüsenhormone unterliegt demnach unterschiedlichen Mechanismen, wobei die Regulation der CKM und sMtCK bzw. der CKB und uMtCK koordiniert erfolgt (siehe Kapitel 5.3.3).

Um zwischen TR vermittelten Wirkungen und anderen Mechanismen zu unterscheiden, erfolgte eine Untersuchung von Schilddrüsenhormon-Rezeptor *knock out* Mäusen; Herz-

und Gehirnproben wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Björn Vennström, Karolinska Institut Stockholm, Schweden zur Verfügung gestellt. Ein Hauptmerkmal dieser *knock out* Mäuse ist ein 20 – 40 fach erhöhter Schilddrüsenhormonspiegel im Blut bei gleichzeitig erhöhtem TSH-Spiegel. Normalerweise ist die Synthese der Schilddrüsenhormone strikt durch einen „feedback“ Mechanismus reguliert, wobei die TSH-Produktion durch erhöhte Schilddrüsenhormonkonzentrationen unterdrückt wird. Die fehlende Regulation der Synthese der Schilddrüsenhormone zeigt die Bedeutung der Schilddrüsenhormon-Rezeptoren TR α 1 und TR β für die negative Kontrolle der TSH-Produktion auf [Göthe et al. 1999].

Die TR *knock out* Mäuse stellen somit ein TR-Hypothyreose-Modell und ein T₃/T₄-Hyperthyreose-Modell dar.

Das CK mRNA-Muster des Herzens der TR *knock out* Mäuse ist völlig verschieden von dem der hypothyreoten Rattenherzen (Abbildung 16 und 19). Es ist sehr ähnlich dem der hyperthyreoten Rattenherzen. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass sowohl die verminderte CK-Expression in der Hypothyreose, als auch die erhöhte Expression der CKB und uMtCK in der chronischen Hyperthyreose nicht TR vermittelt sind. Sie müssen vielmehr auf die veränderten T₃- und T₄-Spiegel im Blut zurückgeführt werden.

Die verminderte Genexpression des ANF und der GAP-DH hingegen ist durch die nukleär vermittelte Regulation dieser Gene durch Schilddrüsenhormone erklärbar.

Im Gehirn der Maus kann nur die mRNA der CKB und uMtCK-Isoform detektiert werden (Abbildung 19). Auch der atriale natriuretische Faktor wird im Gehirn nicht exprimiert. Daher wurde als Positivkontrolle hier die GAP-DH gewählt.

Im Gehirn der *knock out* Mäuse ist die mRNA-Konzentration der beiden Isoenzyme CKB und uMtCK, sowie der GAP-DH erniedrigt. Offensichtlich ist die Regulation der CK-Isoenzyme durch Schilddrüsenhormone im Gehirn TR vermittelt.

Die gesteigerte Expression der CKB und uMtCK könnte charakteristisch für die erhöhte Belastung des Herzens und die damit verbundenen Hypertrophie sein: Wie schon für andere Proteine, wie z.B. die schwere Kette des β -Myosins und das skeletale α -Aktin gezeigt wurde, ist ein Merkmal der Hypertrophie die Expression der fetalen Isoformen dieser Proteine [Ghatpande et al. 1999]. Das CK-System zeigte in der chronischen Hyperthyreose und im Herz der *knock out* Mäuse ebenfalls diese Veränderung, hin zur verstärkten Expression der fetalen Isoform CKB und der koordiniert exprimierten uMtCK. Im adulten, euthyreoten Rattenherz ist der Anteil der CKB und uMtCK an der Gesamtaktivität nur sehr

klein. Durch vermehrte Expression der CKB und uMtCK in der Hyperthyreose gewinnen daher diese Isoformen an Bedeutung, da die Affinität des CrP für diese Isoenzyme höher ist, als zu den entsprechenden sarkomeren Isoenzymen [Neubauer et al. 1998, Basson et al. 1985, Schlegel et al. 1988]. Somit nutzt das adulte hyperthyreote Herz die inaktive fetale Kapazität zur verstärkten Energiebereitstellung.

An der Vermittlung des nicht TR vermittelten Effektes auf die CK könnten sämtliche Signaltransduktionswege, die durch Schilddrüsenhormone aktiviert werden, beteiligt sein. Hierzu gehören z.B. die Erhöhung der zellulären Ca^{2+} -Konzentration und die Aktivierung der PKA und PKC, die ihrerseits Transkriptionsfaktoren beeinflussen (Abbildung 24). Mit adulten Cardiomyocyten von Ratten durchgeführte Experimente zeigten, dass T_3 permissiv für die Wirkung der Wachstumsfaktoren bFGF und IGF I ist [Hefti et al. 1997] (siehe Abbildung 5, Wachstumsfaktoren). Es wäre möglich, dass T_3 auf diesem Weg die Expression der CKB in der chronischen Hyperthyreose fördert. Auch die Stimulation der Proteinsynthese über die durch die Schilddrüsenhormone ausgelöste hämodynamische Mehrbelastung des Herzens ist möglich [Segal et al. 1996, Klein und Hong 1986, Segal 1990, Davis und Davis 1996].

5.3.4.3 TR vermittelte Regulation der CK-Genexpression

Neben der nicht TR vermittelten Wirkung der Schilddrüsenhormone kann aber eine zusätzliche TR vermittelte Wirkung auf die Expression des CKB-Gens nicht ausgeschlossen werden.

Da die Promotorsequenzen der cytosolischen Isoenzyme der Ratte bereits veröffentlicht wurden [Benfield et al. 1988, Horlick und Benfield 1989], bestand die Möglichkeit, die Sequenzen auf potentielle regulative Elemente hin zu untersuchen. Die Analyse des CKM-Promotors ergab kein mögliches TRE.

Im CKB-Promotor hingegen wurde bei Position -517 und Position -581 ein mögliches DR4-Typ responsives Element gefunden.

EMSA-Analysen der beiden Elemente ergaben eine Bindung des RXR α /TR α -Heterodimers an die Sequenz $\overrightarrow{\text{GGGGGTCATGGCAAGAGA}}$ des zweiten Fragmentes (Position -581). Die funktionelle Charakterisierung des ausgewählten regulatorischen Elementes in der transienten Transfektion sollte Hinweise auf die Bedeutung dieses Elementes als Regulator der Promotoraktivität geben. Das Element wurde dazu vor den TK-Promotor des

Plasmids pBLCAT2 kloniert. Nach Transfektion des Konstruktes kann man auf Grund der enzymatischen Aktivität des Reportergens Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) Rückschlüsse auf die Effekte des DR4-Typ-Elementes auf die TK-Promotoraktivität ziehen. Die Transfektion der Ziellinie Cos-7 und die anschließende Inkubation mit T_3 ergab eine 1,6fache Aktivierung des TK-Promotors. Diese Ergebnisse zeigen eine möglicherweise funktionelle Bedeutung des beschriebenen potentiellen TREs im Promotor der CKB der Ratte auf. Es wäre demnach möglich, dass neben den nicht-genomischen Regulationsmechanismen der Expression der CKB auch eine direkte nukleäre Regulation über das potentielle TRE erfolgt.

5.3.5 Wirkung von Schilddrüsenhormonen auf die spezifische Aktivität der Creatinkinase-Isoenzyme

Eine Veränderung der Genexpression eines Proteins muss nicht notwendigerweise parallele Änderungen in der spezifischen Aktivität zur Folge haben. Hier ist auch der mögliche Einfluss auf die Translation, sowie posttranslationale Modifikationen, wie die Proteinphosphorylierung, zu berücksichtigen. Es wurde daher nach Auftrennung der Isoenzyme durch Agarosegel-Elektrophorese die spezifische Aktivität der Isoenzyme durch Aktivitätsfärbung ermittelt.

Im Gegensatz zu den deutlichen Veränderungen in der Genexpression der einzelnen Isoenzyme, konnte keine signifikante Veränderung der spezifischen Gesamtaktivität der CK hypo- und hyperthyreoter Rattenherzen gezeigt werden. Insgesamt gesehen zeigten die hypothyreoten Tiere aber eine Tendenz zu einer erniedrigten spezifischen Aktivität, vor allem in der Mitochondrienfraktion, während bei der chronischen Hyperthyreose die Werte leicht erhöht waren.

Relativ hohe Schwankungen der Messwerte sind besonders bei Tierversuchen mit Hormonen nicht ungewöhnlich, da jede Veränderung der äußeren Bedingungen einen Einfluss auf den Hormonstatus der Tiere haben kann. Deshalb ist es oft schwierig, signifikante Veränderungen der gemessenen Parameter nachzuweisen.

Eine Ausnahme macht hier die Aktivität der CKB im Herzen, die sowohl in der akuten, wie auch in der chronischen Hyperthyreose signifikant erhöht war. Das Ausmaß des Effektes übersteigt bei weitem die bei der mRNA beobachtete Erhöhung und legt daher eine posttranslationale Modifikation nahe. Hierbei wäre die Phosphorylierung durch die

PKC denkbar, da die nicht-genomische Aktivierung der PKC durch T_3 gezeigt wurde [Chida 1990, Lin et al. 1996, Lawrence et al. 1989, Davis und Davis 1996].

Die Phosphorylierung der CKB durch die PKC wurde schon für verschiedene Tierspezies nachgewiesen. Des Weiteren wurde isolierte CKB *in vitro* durch die gereinigte Proteinkinase C phosphoryliert, nicht aber durch die cAMP-abhängige Kinase oder Caseinkinase II [Chida et al. 1990b]. Die Phosphorylierung der CKB kann im zellulären Energiemetabolismus eine wichtige Rolle spielen, da die phosphorylierte CKB eine höhere Affinität für CrP hat und somit auch bei geringeren CrP-Konzentrationen eine ausreichende Phosphorylierung des ADP gewährleisten kann [Sömjen et al. 1987, Quest et al. 1990, Hemmer et al. 1993].

5.3.6 Wirkung von Isoprenalin auf die mRNA-Konzentration und die spezifische Aktivität der Creatinkinase-Isoenzyme

Wie in der chronischen Hyperthyreose, war auch nach Applikation von Isoprenalin die mRNA-Konzentration und die spezifische Aktivität der fetalen Isoform CKB signifikant erhöht. Auch in der durch Isoprenalin induzierten Hypertrophie nutzt demnach das Herz die inaktive fetale Kapazität, um eine ausreichende Energieversorgung des Herzens bei erhöhter Belastung zu gewährleisten. In beiden Versuchen scheint der gemeinsame Nenner, der zur Reexpression der fetalen CKB-Isoform führt, die Induktion der hypertrophen Antwort zu sein. Die Induktion kann dabei über verschiedene oder gemeinsame Signalwege erfolgen. Beiden Hormonen gemeinsam ist die Mobilisierung des Ca^{2+} und die MAPK-Kaskade. Auch eine Signalvermittlung über Wachstumsfaktoren wurde für beide Hormone gezeigt. Es wäre möglich, dass der TGF β Teil der Signaltransduktion ist, die für die Erhöhung der mRNA der CKB nach Applikation von Isoprenalin verantwortlich ist.

Die Perfusion isolierter Herzen mit Forskolin und IBMX führte dagegen zu einer signifikant gesteigerten mRNA-Konzentration der sarkomeren Isoenzyme CKM und sMtCK. Die Induktion der Expression der CKB mRNA, wie sie bei Behandlung von humanen U87 Glioblastoma Zellen mit Forskolin und IBMX induziert wird [Kuzhikandathil und Molloy 1994], erfolgt im Herzen nicht. Dies zeigt die gewebespezifische Regulation der Expression der CK-Isoenzyme in diesen beiden Organen, wie sie auch schon im Falle der *knock out* Mäuse deutlich wurde.

Dagegen war die spezifische Aktivität der CK trotz erhöhter mRNA-Konzentration der

sarkomeren Isoenzyme unverändert. Herzperfusionen können nur über einen relativ kurzen Zeitraum erfolgen. Die Versuchsdauer (90 Minuten) war daher eventuell zu kurz, um Effekte auf Proteinebene zeigen zu können.

Die Geschwindigkeit, mit der die Erhöhung der mRNA-Konzentration erfolgt, weist auf einen möglicherweise direkten nukleären Effekt von cAMP auf die Expression der CKM und sMtCK hin. Claycomb et al. zeigten, dass die Proliferation und Differenzierung von Herzmuskelzellen durch adrenerge Innervation, mit Noradrenalin und cAMP als Mediatoren, kontrolliert wird. Während der späten fetalen und frühen neonatalen Entwicklung des Rattenherzens steigt die cAMP-Konzentration allmählich an [Claycomb 1976].

Möglicherweise wird die Expression der Gene für die CKM und sMtCK, die erst während der terminalen Entwicklung des Herzens an Bedeutung gewinnen, von cAMP koordiniert reguliert. Es wurde schon in Kapittel 5.3.4.2 gezeigt, dass die Änderungen in der Expression der CKM und sMtCK in der akuten Hyperthyreose ebenfalls cAMP-vermittelt sein können.

Die Applikation von Isoprenalin führt dagegen nicht zu dieser Steigerung der mRNA-Konzentration der sarkomeren Isoenzyme. Demnach ist vermutlich die nukleäre Regulation durch cAMP nicht an der Regulation der Expression der CK-Isoenzyme im chronischen Stessmodell (Applikation von Isoprenalin) beteiligt. Studien mit isoliert perfundierten Herzen zeigten, dass in der akuten Steigerung der Proteinsynthese durch adrenerge Agonisten eher die Phosphatidylinositol vermittelte Signaltransduktion involviert ist, als der mit der Adenylatcyclase und cAMP verbundene Signalweg. cAMP führte hier zu keiner akuten Stimulation der Proteinsynthese [Bogoyevitch et al. 1993]. Die durch Forskolin und IBMX gesteigerte mRNA-Konzentration der CKM und sMtCK reflektiert daher eher eine selektive Induktion der Expression von muskelspezifischen Proteinen, als eine Induktion der Proteinsynthese, wie sie in der Katecholamin induzierten Hypertrophie des Herzens erfolgt.

5.3.7 mRNA-Konzentration und spezifische Aktivität der CK-Isoenzyme im Hungerzustand

Der Hungerzustand der Ratten führt, im Gegensatz zu den anderen beiden Modellen, in deren Signalvermittlung cAMP ebenfalls involviert ist, zu einer signifikant verminderten mRNA-Konzentration der CK-Isoenzyme mit entsprechenden Änderungen der spezi-

fischen Aktivität. Eine Verringerung der Expression der CK-Isoenzyme im Hunger ist daher nicht durch eine Erhöhung des cAMP erklärbar (siehe Herzperfusion). Die Veränderungen im Hungerzustand sind vielmehr denen in der Hypothyreose ähnlich. Möglicherweise ist im Hungerzustand der erniedrigte Schilddrüsenhormonspiegel die Ursache für die verminderte mRNA-Konzentration der CK-Isoenzyme. Harris et al. konnten zeigen, dass bereits zwei Tage Nahrungsentzug zu einer Abnahme der T_3 - und T_4 -Konzentration im Serum von Ratten führt. Des Weiteren führt der Hungerzustand zu einer verminderten Konzentration von T_3 -Rezeptoren [Dillmann und Oppenheimer 1979]. Die Hypothyreose wird als Teil der metabolischen Adaption zur Reduzierung des basalen Energieverbrauches im Hungerzustand betrachtet [Harris et al. 1978, Müller und Seitz 1981].

6 ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die funktionelle Anpassung der Creatinkinase-Systeme an den Energiebedarf des Herzens untersucht.

- Die Versuche an isolierten Mitochondrien zeigten, dass die oktamere Form der Creatinkinase durch ihre Stellung zwischen die beiden mitochondrialen Membranen stabilisiert wird und vor allem pathologische Veränderungen des intakten Herzgewebes zu einem erniedrigten Oktamer-Anteil führen. Hieran sind möglicherweise reaktive Sauerstoffspezies wie NO und Peroxynitrit beteiligt, welche in isolierten Mitochondriensuspensionen nicht vorhanden sind.
- Die Creatinkinase-Isoenzyme zeigen eine entsprechend ihrer Verteilung und Funktion im differenzierten Gewebe unterschiedliche hormonelle Regulation der Expression.
- Sowohl die Aktivierung des β -adrenergen Systems des Herzens durch Isoprenalin als auch die chronische Steigerung der Kontraktilität des Herzens durch Schilddrüsenhormone, führt zur Hypertrophie des Herzens. Ein Merkmal der Hypertrophie ist die Reexpression der fetalen Isoformen verschiedener Proteine. Das Creatinkinase-System zeigte nach Behandlung mit Isoprenalin und in der chronischen Hyperthyreose ebenfalls diese Veränderung, hin zur verstärkten Expression der fetalen Isoform CKB.
- Die Expression der CK-Isoenzyme erfolgt in der durch Schilddrüsenhormone und Katecholamine ausgelösten cardialen Hypertrophie koordiniert, und zwar werden die CKM und die sMtCK einerseits und die CKB und die uMtCK andererseits koordiniert exprimiert.
- Die durch Hypo- und Hyperthyreose hervorgerufenen Veränderungen der Creatinkinase mRNA-Muster sind nicht Schilddrüsenhormon-Rezeptor (TR) vermittelt. Dies ergaben Vergleiche mit TR *knock out* Mäusen. Sie sind vielmehr die Folge indirekter, T_3 und T_4 vermittelter Effekte, wie z.B. eine transiente Erhöhung des cAMP-Spiegels, oder reflektieren Anpassungsmechanismen bei der Ausbildung der cardialen Hypertrophie: So wird in der Herzperfusion bei kurzzeitiger Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels (Forskolin / IBMX) eine signifikante koordinierte Erhöhung der CKM- und der sMtCK-mRNA beobachtet, die eine Korrelation in der akuten Hyperthyreose (Erhöhung), sowie in der Hypothyreose (Senkung) findet.

- Auf der anderen Seite konnte in der durch Katecholamine induzierten cardialen Hyperthrophie (Isoprenalin) eine vermehrte Expression der fetalen CKB gezeigt werden, die ihre Parallele in der Hyperthyreose findet.
- Eine Erhöhung der Aktivität der CKB erfolgt auch auf posttranslationaler Ebene. So war in allen Modellen mit erhöhtem Energiebedarf, wie chronische und akute Hyperthyreose, Katecholamin induzierte cardiale Hyperthrophie und Herzen von TR *knock out* Mäusen, die Aktivität der CKB in einem Maße erhöht, das kein Korrelat in der Genexpression fand. Es wird diskutiert, dass der Mechanismus eine in der Literatur beschriebene, Ca^{2+} aktivierte Phosphorylierung der CKB durch die Proteinkinase C ist.

Die aufgezeigten Änderungen der Expression der CK-Isoenzyme sind das Ergebnis verschiedener Regulationswege, die sich gegenseitig überlagern, verstärken und antagonistisch wirken. Die genaue Kenntnis der Signaltransduktionswege die an der Regulation beteiligt sind, könnte essentiell für die Entwicklung therapeutischer Strategien sein.

7 LITERATUR

- Adams, V., Bosch, W., Schlegel, J., Wallimann, T., Brdiczka, D. (1989):**
Further characterization of contact sites from mitochondria of different tissues: topology of peripheral kinases.
Biochim. Biophys. Acta 981: 213 – 225.
- Arnold, S., Goglia, F., Kadenbach, B. (1998):**
3,5-Diiodothyronine binds to subunit Va of cytochrome-c oxidase and abolishes the allosteric inhibition of respiration by ATP.
Eur. J. Biochem. 252: 325 – 330.
- Ashizawa, K., McPhie, P., Lin K., Cheng, S. (1991):**
An in vitro novel mechanism of regulating the activity of pyruvate kinase M₂ by thyroid hormone and fructose 1,6-bisphosphate.
Biochemistry 30: 7105 - 7111.
- Astwood, E.B., Van der Laan, W.P. (1945):**
Thiouracil derivatives of greater activity for the treatment of hyperthyroidism.
J. Clin. Endocrinol. 5: 424 – 430.
- Bakker, A., Bernaert, I., De Bie M., Ravingerova, T., Ziegelhöffner, A., Van Belle, H., Jacob, W. (1994):**
The effect of calcium on mitochondrial contact sites: a study on isolated rat hearts.
Biochim. Biophys. Acta 1224: 583 – 588.
- Baldwin, K.M., Cooke, D.A., Cheadle, W.G. (1977):**
Enzyme alterations in neonatal heart muscle during development.
J. Mol. Cell. Cardiol. 9: 651 – 660.
- Baniahmad, A., Steiner, C., Kohne, A.C., Renkawitz, R. (1990):**
Modular structure of a chicken lysozyme silencer: involvement of an unusual thyroid hormone receptor binding site.
Cell 61: 505 – 514.
- Barettino, D., Ruiz, M.D.M.V., Stunnenberg, H.G. (1994):**
Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid-hormone receptor.
EMBO J. 13: 3039 – 3049.
- Basson, C.T., Grace, A.M., Roberts, R. (1985):**
Enzyme kinetics of a highly purified mitochondrial creatine kinase in comparison with cytosolic forms.
Mol. Cell. Biochem. 67: 151 – 159.
- Benfield, P.A., Graf, D., Korolkoff, P.N., Hobson, G., Pearson, M.L. (1988):**
Isolation of four rat creatine kinase genes and identification of multiple potential promoter sequences within the rat brain creatine kinase promoter region.
Gene 63: 227 – 243.

Bessman, S.P., Geiger, P.J. (1981):

Transport of energy in muscle: The Phosphoryl-Creatine-Shuttle.
Science 211: 448 – 452.

Biermans, W., Bernaert, I., De Bie, M., Nijs, B., Jacob, W. (1989):

Ultrastructural localisation of creatine kinase activity in the contact site between inner and outer mitochondrial membranes of rat myocardium.
Biochim. Biophys. Acta 974: 74 – 80.

Bittl, J.A., Ingwall, J.S. (1987):

Intracellular high-energy phosphate transfer in normal and hypertrophied myocardium.
Circulation 75: I96 - I101.

Bodenner, D.L., Mroczynski, M.A., Weintraub, B.D., Radovick, S., Wondisford, F.E. (1991):

A detailed functional and structural analysis of a major thyroid hormone inhibitory element in the human thyrotropin beta-subunit gene.
J. Biol. Chem. 266: 21666 – 21673.

Bogoyevitch, M.A., Andersson, M.B., Gillespie-Brown, J., Clerk, A., Glennon, P.E., Fuller, S.J., Sugden, P.H. (1996):

Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy.
Biochem. J. 314: 115 – 121.

Bogoyevitch, M.A., Fuller, S.J., Sugden, P.H. (1991):

Effects of catecholamines on protein synthesis and cyclic AMP concentrations in the isolated working heart.
Biochem. Soc. Trans. 19: 276S

Bogoyevitch, M.A., Fuller, S.J., Sugden, P.H. (1993):

cAMP and protein synthesis in isolated adult rat heart preparations.
Am. J. Physiol. 265: C1247 – C 1257.

Brdiczka, D. (1991):

Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer.
Biochim. Biophys. Acta 1071: 291 – 312.

Brdiczka, D., Bücheler, K., Kottke, M., Adams, V., Nalam, V.K. (1990):

Characterization and metabolic function of mitochondrial contact sites.
Biochim. Biophys. Acta 1018: 234 – 238.

Brdiczka, D., Kaldis, P., Wallimann, T. (1994):

In vitro complex formation between the octamer of mitochondrial creatine kinase and porin.
J. Biol. Chem. 269: 27640 – 27644.

Brdiczka, D., Wallimann, T. (1994):

The importance of the outer mitochondrial compartment in regulation of energy metabolism.

Mol. Cell. Biochem. 133/134: 69 – 83.

Bücheler, K., Adams, V., Brdiczka, D. (1991):

Localization of the ATP/ADP translocator in the inner membrane and regulation of contact sites between mitochondrial envelope membranes by ADP. A study on freeze-fractured isolated liver mitochondria.

Biochim. Biophys. Acta 1056: 233 - 242.

Carlberg, C. (1995):

Highly reproducible transient transfection of drosophila SL-3 and human MCF-7 cell lines using DOTAP.

Biochemica 2: 19 – 20.

Carlsson, E., Grove, B.K., Wallimann, T., Eppenberger, H.M. Thornell, L.-E. (1990):

Myofibrillar M-band proteins in rat skeletal muscles during development.

Histochemistry 95: 27 – 35.

Carlsson, E., Kjöll, U., Thornell, L.E. Lambertsson, A., Strehler, E. (1982):

Differentiation of the myofibrils and the intermediate filament system during postnatal development of the rat heart.

Eur. J. Cell. Biol. 27: 62 – 73.

Chatterjee, V.K.K. (1994):

Thyroid hormone receptors: molecular and functional aspects.

in: The Thyroid and Tissues. Merck European Thyroid Symposium, Strasbourg 1994, February 3 – 5. Herausgeber: Orgiazzi, J., Leclère J., Schattauer Verlag, Stuttgart

Chatterjee, V.K.K., Lee, J.-K., Rentoumis, A., Jameson, J.L. (1989):

Negative regulation of the thyroid-stimulating hormone α gene by thyroid hormone: receptor interaction adjacent to the TATA box.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 9114 - 9118.

Chen, L., Roberts, R., Friedman, D.L.:

Expression of brain-type creatine kinase and ubiquitous mitochondrial creatine kinase in the fetal rat brain: evidence for a nuclear energy shuttle.

J. Comp. Neurol. 363: 389 – 401.

Cheneval, D., Carafoli, E. (1988):

Identification and primary structure of the cardiolipin-binding domain of mitochondrial creatine kinase.

Eur. J. Biochem. 171: 1 – 9.

Chida, K., Kasahara, K., Tsunenaga, M., Kohno, Y., Yamada, S., Ohmi, S., Kuroki, T. (1990):

Purification and identification of creatine phosphokinase B as a substrate of protein kinase C in Mouse skin *in vivo*.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 173: 351 – 357.

- Clarke, L.C.J., Wolf, R., Granger, D., Taylor, Z. (1953):**
Continuous recording of blood oxygen tension by polarography.
J. Appl. Physiol. 6: 189 – 193.
- Claycomb, W.C. (1976):**
Biochemical aspects of cardiac muscle differentiation.
J. Biol. Chem. 251: 6082 – 6089.
- Cohen, J., Aroesty, J.M., Rosenfeld, M.G. (1966):**
Determinants of thyroxine-induced cardiac hypertrophy in mice.
Circ. Res. 18: 388 – 397.
- Conrad, A., Gruwel, M.L.H., Soboll, S. (1995):**
In vitro determination of creatine kinase substrate fluxes using ^{31}P nuclear magnetic resonance.
Biochim. Biophys. Acta 1243: 117 – 123.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A., Parker, M.G. (1992):**
Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors.
EMBO J. 11: 1025 – 1033.
- Davis, P.J., Davis, F.B. (1996):**
Nongenomic actions of thyroid hormone.
Thyroid, 6 (5): 497 – 504.
- Dawson, D.M., Eppenberger, H.M., Kaplan, N.O. (1967):**
The comparative enzymology of creatine kinases. II. Physical and chemical properties.
J. Biol. Chem. 242: 210 – 217.
- Denton, R.M. und McCormack, J.G. (1990):**
 Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues.
Annu. Rev. Physiol. 52: 451 – 466.
- Dillmann, W.H., Oppenheimer, J.H. (1979):**
Glucagon influences the expression of thyroid hormone action: discrepancy between nuclear triiodothyronine receptor number and enzyme responses.
Endocrinology 105: 74 – 79.
- Dillon, P.F., Clark, J.F. (1990):**
The theory of diazymes and functional coupling of pyruvate kinase and creatine kinase.
J. Theo. Biol. 143: 275 – 284.
- Dümmeler, K., Müller, S., Seitz, H.J. (1996):**
Regulation of adenine nucleotide translocase and glycerol 3-phosphate dehydrogenase expression by thyroid hormones in different rat tissues.
Biochem. J. 317: 913 – 918.
- Eder, M., Schlattner, U., Becker, A., Wallimann, T., Kabsch, W., Fritz-Wolf, K. (1999):**
Crystal structure of brain-type creatine kinase at 1,41 Å resolution.
Protein Sci. 8: 2258 – 2269.

Eggleton, P., Eggleton, G.P. (1927):

The inorganic phosphate and a labile form of organic phosphate in the gastrocnemius of the frog.

Biochem. J. 21, 190 – 195.

Eppenberger, H.M. (1994):

A brief summary of the history of the detection of creatine kinase isoenzymes.

Mol. Cell. Biochem. 133/134: 9 – 11.

Eppenberger, H.M., Eppenberger, M., Richterich, R., Aebi, H. (1964):

The ontogeny of creatine kinase isoenzymes.

Dev. Biol. 10: 1 – 16.

Eppenberger, M.E., Eppenberger, H.M., Kaplan, N.O. (1967):

Evolution of creatine kinase.

Nature 214: 239 – 241.

Evans, R.M. (1988):

The steroid and thyroid hormone receptor superfamily.

Science 240: 889 – 895.

Forster, G., Bernt, E., Bergmeyer, H.U. (1974):

Methoden der enzymatischen Analyse.

Bergmeyer, H.U.: ed.: 813 – 816, Verlag Chemie, Weinheim.

Galo, M.G., Unates, L.E., Farias, R.N. (1981):

Effect of membrane fatty acid composition on the action of thyroid hormones on (Ca^{2+} + Mg^{2+})-adenosine triphosphatase from rat erythrocytes.

J. Biol. Chem. 256: 7113 – 7114.

Ghatpande, S., Goswami, S., Mascareno, E., Siddiqui, M.A.Q. (1999):

Signal transduction and transcriptional adaptation in embryonic heart development and during myocardial hypertrophy.

Mol. Cell. Biochem. 196: 93 – 97.

Gluzman, Y. (1981)

SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants.

Cell 23: 175 – 182.

Gomberg-Maitland, M., Frishman, W.H. (1998):

Thyroid hormone and cardiovascular disease.

Am. Heart J. 135: 187 – 196.

Göthe, S., Wang, Z., Ng, L., Kindblom, J.M., Barros, A.C., Ohlsson, C., Vennström, B., Forrest, D. (1999):

Mice devoid of all known thyroid hormone receptors are viable but exhibit disorders of the pituitary-thyroid axis, growth, and bone maturation.

Genes Dev. 13: 1329 – 1341.

Gross, W.L., Bak M.I., Ingwall J.S., Arstall M.A., Smith T.W., Balligand J.L., Kelly R.A. (1996):

Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve.
Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 5604 – 5609.

Haas, R.C., Korenfeld, C., Zhang, Z., Perryman, B., Roman, D., Strauss, A.W. (1989):
Isolation and characterization of the gene and cDNA encoding human mitochondrial creatine kinase.

J. Biol. Chem. 264: 2890 – 2897.

Haas, R.C., Strauss, A.W. (1990):

Separate nuclear genes encode sarcomere-specific and ubiquitous human mitochondrial creatine kinase isoenzymes.

J. Biol. Chem. 265: 6921 – 6927.

Hafner, R.P., Brand, M.D. (1988):

Hypothyroidism in rats does not lower mitochondrial ADP/O and H^+ /O ratios.

Biochem. J. 250: 477 – 484.

Halestrap, A.P. (1978):

Stimulation of the respiratory chain of rat liver mitochondria between cytochrome c_1 and cytochrome c by glucagon treatment of rats.

Biochem. J. 172: 399 – 405.

Hamburg, R.J. (1990):

Muscle creatine kinase isoenzyme expression in adult human brain.

J. Biol. Chem. 265: 6403 – 6409.

Harris, A.R.C., Fang, S.L., Azizi, F., Lipworth, L., Vagenakis, A.G., Braverman, L.E. (1978):

Effect of starvation on hypothalamic-pituitary-thyroid function in the rat.

Metabolism 27: 1074 – 1083.

Hefti, M.A., Harder, B.A., Eppenberger, H.M., Schaub, M.C. (1997):

Signaling pathways in cardiac hypertrophy: review article.

J. Mol. Cell. Cardiol. 29: 2873 – 2892.

Hehrmann, R. (1994):

Risk/benefit of thyroid hormone treatment in hypothyroidism and in the elderly.

in: The Thyroid and Tissues. Merck European Thyroid Symposium, Strasbourg 1994, February 3 – 5. Herausgeber: Orgiazzi, J., Leclère J., Schattauer Verlag, Stuttgart

Heineman, F.W. und Balaban, R.S. (1990):

Control of mitochondrial respiration in the heart *in vivo*.

Annu. Rev. Physiol. 52: 523 – 542.

Hellermann, J.P., Kahaly, G.J. (1994):

Thyroid hormones and the heart. A short synopsis.

in: The Thyroid and Tissues. Merck European Thyroid Symposium, Strasbourg 1994, February 3 – 5. Herausgeber: Orgiazzi, J., Leclère J., Schattauer Verlag, Stuttgart

- Hemmer, W., Furter-Graves, E.M., Frank, G., Wallimann, T., Furter, R. (1995):**
Autophosphorylation of creatine kinase: characterization and identification of a specifically phosphorylated peptide.
Biochim. Biophys. Acta 1251: 81 – 90.
- Hemmer, W., Skarli, M., Perriard, J.C., Wallimann, T. (1993):**
Effect of okadaic acid on protein phosphorylation patterns of chicken myogenic cells with special reference to creatine kinase.
FEBS 327: 35 – 40.
- Hennemann, G., De Jong, M., Everts, M.E., Docter, R., Krenning, E.P. (1994):**
Cellular transport of thyroid hormones: pathophysiological significance.
in: The Thyroid and Tissues. Merck European Thyroid Symposium, Strasbourg 1994, February 3 – 5. Herausgeber: Orgiazzi, J., Leclère J., Schattauer Verlag, Stuttgart
- Hoerter, J., Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A. (1994):**
Compartmentation of creatine kinases during perinatal development of mammalian heart.
Mol. Cell. Biochem. 133/134: 277 - 286.
- Hoerter, J.A., Kuznetsov, A., Ventura-Clapier, R. (1991):**
Functional development of the creatine kinase system in perinatal rabbit heart.
Circ. Res. 69: 665 – 676.
- Hollenberg, A.N., Monden, T., Flynn, T.R., Boers, M.E., Cohen, O., Wondisford, F.E. (1995):**
The human thyrotropin-releasing hormone gene is regulated by thyroid hormone through two distinct classes of negative thyroid hormone response elements.
Mol. Endocrinol. 9: 540 – 550.
- Horlick, R.A., Benfield, P.A. (1989):**
The upstream muscle-specific enhancer of the rat muscle creatine kinase gene is composed of multiple elements.
Mol. Cell. Biol. 9: 2396 – 2413.
- Hossle, J.P., Schlegel, J., Wegmann, G., Wyss, M., Böhlen, P., Eppenberger, H.M., Wallimann, T., Perriard, J.C. (1988):**
Distinct tissue specific mitochondrial creatine kinases from chicken brain and striated muscle with a conserved CK framework.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 151: 408 – 416.
- Ingwall, J.S. (1984):**
The hypertrophied myocardium accumulates the MB-creatine kinase isozyme.
Eur. Heart J. 5 (Suppl. F): 129 – 139.
- Ingwall, J.S., Atkinson, D.E., Clarke, K., Feters, J.K. (1990):**
Energetic correlates of cardiac failure: changes in the creatine kinase system in the failing myocardium.
Eur. Heart J. 11 (Suppl. B): 108 – 115.

Jacobs, H., Heldt, H.V., Klingenberg, M. (1964):

High activity of creatine kinase in mitochondria from muscle and brain and evidence for a separate mitochondrial isoenzyme of creatine kinase.

Biochem. Biophys. Res. Comm. 16: 516 – 521.

Jahnke, D. (1999):

Untersuchungen zur Funktion und Kinetik der mitochondrialen Creatinkinase.

Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Johnson, M.K. (1969):

Counting of Cerenkov radiation from ^{32}P in nonaqueous media.

Anal. Biochem. 29: 348 – 350.

Kapelko, V.I., Kupriyanov, V.V., Novikova, N.A., Lakomkin, V.L., Steinschneider, A.Ya., Severina, M.Y., Veksler, V.I., Saks, V.A. (1988):

The cardiac contractile failure induced by chronic creatine and phosphocreatine deficiency. J. Mol. Cell. Cardiol. 20: 465 – 479.

Kapelko, V.I., Saks, V.A., Novikova, N.A., Golikov, M.A., Kupriyanov, V.V., Popovich, M.I. (1989):

Adaptation of cardiac contractile function to conditions of chronic energy deficiency.

J. Mol. Cell. Cardiol. 21 (Suppl. 1): 79 – 83.

Kendall, E.C. (1983):

Landmark article, June 19, 1915. The isolation in crystalline form of the compound containing iodine, which occurs in the thyroid. Its chemical nature and physiologic activity. JAMA 250: 2045 – 2046.

Khuchua, Z.A., Ventura-Clapier, R., Kuznetsov, A.V., Grishin, M.N., Saks, V.A. (1989):

Alterations in the creatine kinase system in the myocardium of cardiomyopathic hamsters.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 165: 748 – 757.

Kim, L., Collins, M., Fu, J., Ritchie, M. (1997):

bFGF induces BCK promoter-driven expression in muscle via increased binding of a nuclear protein.

Am. J. Physiol. 273: C223 – C229.

Klein, I. (1988):

Thyroxine-induced cardiac Hypertrophy: time course of development and inhibition by propranolol.

Endocrinology 123: 203 – 210.

Klein, I. (1990):

Thyroid hormone and the cardiovascular system.

Am. J. Med. 88: 631 – 637.

Klein, I., Hong, C. (1986):

Effects of thyroid hormone on cardiac size and myosin content of the heterotopically transplanted rat heart.

J. Clin. Invest. 77: 1694 – 1698.

Klein, I., Ojamaa, K. (1998):

Thyroid hormone treatment of congestive heart failure.
Am. J. Cardiol. 81: 490 – 491.

Klein, S.C., Haas, R.C., Perryman, M.B., Billadello, J.J., Strauss, A.W. (1991):

Regulatory element analysis and structural characterisation of human sarcomeric mitochondrial creatine kinase gene.
J. Biol. Chem. 266: 18058 – 18065.

Knoll, G., Brdiczka, D. (1983):

Changes in freeze-fractured mitochondrial membranes correlated to their energetic state.
Dynamic Interactions of the boundary membranes.
Biochim. Biophys. Acta 733: 102 – 110.

Köhrle, J. (1994):

Pharmacokinetics and metabolism of thyroid hormones.
in: The Thyroid and Tissues. Merck European Thyroid Symposium, Strasbourg 1994,
February 3 – 5. Herausgeber: Orgiazzi, J., Leclère J., Schattauer Verlag, Stuttgart

Köhrle, J., Brabant, G., Hesch, R.-D. (1987):

Metabolism of the thyroid hormones.
Hormone Res. 26: 58 – 78.

Kottke, M., Adams, V., Wallimann, T., Nalam, V.K., Brdiczka, D. (1991):

Location and regulation of octameric mitochondrial creatine kinase in the contact sites.
Biochim. Biophys. Acta 1061: 215 – 225.

Kuzhikandathil, E.V., Molloy, G.R. (1994):

Transcription of the brain creatine kinase gene in glial cells is modulated by cyclic AMP-dependent protein kinase.
J. Neurosci. Res. 39: 70 – 82.

Ladenson, P.W., Bloch, K.D., Seidman, J.G. (1988):

Modulation of atrial natriuretic factor by thyroid hormone: messenger ribonucleic acid and peptide levels in hypothyroid, euthyroid, and hyperthyroid rat atria and ventricles.
Endocrinology 123: 652 – 657.

Laemmli, U.K. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680 – 685.

Lang, F. (1994):

Physiologie der Hormone.
in: Physiologie, Deetjen, P., Speckmann, E.J., 2. Auflage, Urban & Schwarzenberg, München.

Langendorff, O. (1895):

Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen.
Arch. Ges. Physiol. 61: 291 – 332.

- Lawrence, W.D., Schoenl, M., Davis, P.J. (1989):**
Stimulation *in vitro* of rabbit erythrocyte cytosol phospholipid-dependent protein kinase kinase activity.
J. Biol. Chem. 264: 4766 – 4768.
- Lazar, M.A. (1993):**
Thyroid hormone receptors: multiple forms, multiple possibilities.
Endocrine Rev. 14: 184 – 193.
- Lee, Y.P., Lardy, H.A. (1965):**
Influence of thyroid hormones on L- α -glycerophosphate dehydrogenase and other dehydrogenases in various organs of the rat.
J. Biol. Chem. 240: 1427 – 1436.
- Leonard, J.L., Farwell, A.P. (1997):**
Thyroid hormone-regulated actin polymerization in brain.
Thyroid 7: 147 – 151.
- Levitsky, D.O., Levchenko, T.S., Saks, V.A., Sharov, V.G., Smirnov, V.N. (1978):**
The role of creatine phosphokinase in supplying energy for the calcium pump system of heart sarcomeric reticulum.
Membr. Biochem. 8: 81 – 96.
- Limas, C.J. (1978):**
Calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum in experimental hyperthyroidism.
Am. J. Physiol. 235: H745 – H751.
- Lin, H.Y., Thacore, H.R., Davis, F.B., Davis, P.J. (1996):**
Potentiation by thyroxine of interferon- γ -induced antiviral state requires PKA and PKC activities.
Am. J. Physiol. 271: C1256 – C1261.
- Lipskaya, T.Yu., Kedishvili, N.Yu., Kalenova, M.E. (1985):**
Conditions of interconversion of oligomeric forms of heart mitochondrial creatine kinase.
Biokhimiya 50: 1339 – 1348.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.C., Randall, R.J. (1995):**
Protein measurement with the folin reagent.
J. Biol. Chem. 193: 265 – 275.
- Luckow, B., Schütz, G. (1987):**
CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eukaryotic promoters and regulatory elements.
Nucleic Acids Res. 15: 5490.
- Maddaiah, V.T., Clejan, S., Palekar, A.G., Collipp, P.J. (1981):**
Hormones and liver mitochondria: effects of growth hormone and thyroxine on respiration, fluorescence of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate and enzyme activities of complex I and II of submitochondrial particles.
Arch. Biochem Biophys. 210: 666 – 677.

- Mahadevan, L.C.,** Whatley, S.A., Leung, T.K.C., Lim, L. (1984):
The brain isoform of a key ATP-regulating enzyme, creatine kinase, is a phosphoprotein.
Biochem. J. 222: 139 – 144.
- Mariash, C.N.,** Oppenheimer, J.H. (1983):
Molecular Basis of Thyroid Hormone Action.
Academic Press, 266 – 292
- Mekhf, H.,** Hoerter, J., Lauer, C., Wisnewsky, C., Schwartz, K., Ventura-Clapier, R. (1990):
Myocardial adaptation to creatine deficiency in rats fed with beta-guanidinopropionic acid, a creatine analogue.
Am. J. Physiol. 258: H1151 – H1158
- Minajeva, A.,** Ventura-Clapier, R., Veksler, V. (1996):
Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum ATPase in situ strongly depends on bound creatine kinase.
Pflügers Arch. 432: 904 – 912.
- Mohr-Kahaly, S.,** Kahaly, G., Meyer, J. (1996):
Kardiovaskuläre Wirkungen von Schilddrüsenhormonen.
Z Kardiologie. 85: 219 – 231.
- Motomura, K.,** Brent, G.A. (1998):
Mechanisms of thyroid hormone action. Implications for the clinical manifestation of thyrotoxicosis.
Endocrinol. Metab. Clin. North Am. 27: 1 – 23.
- Mühlebach, S.M.,** Gross, M., Wirz, T., Wallimann, T., Perriard, J.C., Wyss, M. (1994):
Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase isoenzymes.
Mol. Cell. Biochem. 133/134: 245 – 262.
- Müller, M.J.,** Seitz, H.J. (1981):
Starvation-induced changes of hepatic glucose metabolism in hypo- and hyperthyroid rats *in vivo*.
J. Nutr. 111: 1370 – 1379.
- Muscat, G.E.O.,** Mynett-Johnson, L., Dowhan, D., Downes, M., Griggs, R. (1994):
Activation of myoD gene transcription by 3,5,3'-triiodo-L-thyronine: a direct role for the thyroid hormone and retinoid X receptors.
Nucleic Acids Res. 22: 583 – 591.
- Ness, G.C.,** Pendleton, L.C. (1991):
Thyroid hormone increases glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase gene expression in rat liver.
FEBS 288: 21 – 22.
- Neubauer, S.,** Frank, M., Hu, K., Remkes, H., Laser, A., Horn, M., Ertl, G., Lohse, M.J. (1998):
Changes of creatine kinase gene expression in rat heart post-myocardial infarction.
J. Mol. Cell. Cardiol. 30: 803 – 810.

- Norwood**, W.I., Ingwall, J.S., Norwood, C.R., Fossel, E.T. (1983):
Developmental changes of creatine kinase metabolism in rat brain.
Am. J. Physiol. 244: C205 – C210.
- Ojamaa**, K., Balkman, C., Klein, I.L. (1993):
Acute effects of triiodothyronine on arterial smooth muscle cells.
Ann Thorac Surg 56: 61 – 67.
- Ojamaa**, K., Samarel, A.M., Kupfer, J.M., Hong, C., Klein, I. (1992):
Thyroid hormone effects on cardiac gene expression independent of cardiac growth and protein synthesis.
Am. J. Physiol. 263: E534 – E540.
- Papa**, A., Cammarota, G., Tursi, A., Certo, M., Montalto, M., Capelli, G., de Rosa, G., Cuoco, L., Dedeli, G., Gasbarrini, G. (1997):
Effects of propylthiouracil on intestinal transit time and symptoms in hyperthyroid patients.
Hepatogastroenterology 44: 426 – 429.
- Payne**, M.R., Friedman, D.L., Grant, J.W., Perryman, M.B., Strauss, A.W. (1993):
Creatin Kinase isoenzymes are highly regulated during pregnancy in rat uterus and placenta.
Am. J. Physiol. 265: E624 – 635.
- Payne**, R.M., Haas, R.C., Strauss, A.W. (1991):
Structural characterization and tissue-specific expression of the mRNAs encoding isoenzymes from two rat mitochondrial creatine kinase genes.
Biochim. Biophys. Acta 1089: 352 – 361.
- Payne**, R.M., Strauss, A.W. (1994):
Expression of the mitochondrial creatine kinase genes.
Mol. Cell. Biochem. 133/134: 235 – 243.
- Perryman**, M.B., Strauss, A.W., Olson, J., Roberts, R. (1983):
In vitro translation of canine mitochondrial creatine kinase messenger RNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 110: 967 – 972.
- Pillar**, T.M., Seitz, H.J. (1997):
Thyroid hormone and gene expression in the regulation of mitochondrial respiratory function.
Eur. J. Endocrinol. 136: 231 – 239.
- Ponticos**, M., Lu, Q.L., Morgan, J.E., Hardie, D.G., Partridge, T.A., Carling, D. (1998):
Dual regulation of the AMP-activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle.
EMBO J. 17: 1688 – 1699.
- Qin**, W., Khuchua, Z., Cheng, J., Boero, J., Payne, R.M., Strauss, A.W. (1998):
Molecular characterization of the creatine kinases and some historical perspectives.
Mol. Cell. Biochem. 184: 153 – 167.
- Quest**, A.F., Eppenberger, H.M., Wallimann, T. (1989):
Purification of brain-type creatine kinase (B-CK) from several tissues of the chicken: B-CK subtypes.
Enzyme 41: 33 – 42.

Quest, A.F., Soldati, T., Hemmer, W., Perriard, J.C., Eppenberger, H.M., Wallimann, T. (1990):

Phosphorylation of chicken brain-type creatine kinase affects a physiologically important kinetic parameter and gives rise to protein microheterogeneity *in vivo*.
FEBS Lett. 269: 457 – 464.

Reed, P.W. (1979):

Ionophores

Methods Enzymol. 55: 435 – 454.

Rajo, M., Hovius, R., Demel, R.A., Nicolay, K., Wallimann, T. (1991)

Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes.
J. Biol. Chem. 266: 20290 – 20295.

Rosenberg, U.B., Eppenberger, H.M., Perriard, J.C. (1981):

Occurrence of heterogenous forms of the subunits of creatine kinase in various muscle and nonmuscle tissues and their behaviour during myogenesis.

Eur. J. Biochem. 116: 87 – 92.

Rudinger, A., Mylotte, K.M., Davis, P.J., Davis, F.B., Blas, S.D. (1984):

Rabbit myocardial membrane Ca^{2+} -adenosine triphosphatase activity: stimulation *in vitro* by thyroid hormone.

Arch. Biochem. Biophys. 229: 379 – 385.

Saks, V.A., Chernousova, G.B., Gukovsky, D.E., Smirnov, V.N., Chazov, E.I. (1975):

Studies of energy transport in heart cells. Mitochondrial isozyme of creatine kinase: kinetic properties and regulatory action of Mg ions.

Eur. J. Biochem. 57: 273 – 290.

Saks, V.A., Chernousova, G.B., Voronkov, Y.I., Smirnov, V.N., Chazov, E.I. (1974):

Study of energy transport mechanism in myocardial cells.

Circ. Res. 34 – 35 (Suppl III): 138 – 149.

Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977):

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 5463 – 5467.

Sap, J., Muñoz, A., Schmitt, J., Stunnenberg, H., Vennström, B. (1989):

Repression of transcription mediated at a thyroid hormone response element by the a v-erb-A oncogene product.

Nature 340: 242 – 244.

Schäfer, B.W., Perriard, J.C. (1988):

Intracellular targeting of isoproteins in muscle cytoarchitecture.

J. Cell. Biol. 106: 1161 – 1170.

Schaub, M.C., Hefti, M.A., Harder, B.A., Eppenberger, H.M. (1997):

Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes.

J. Mol. Med. 75: 901 – 920.

- Schlegel, J., Wyss, M., Eppenberger, H., Wallimann, T. (1990a):**
Functional studies with the octameric form of mitochondrial creatine kinase.
J. Mol. Biol. 230: 1159 – 1170.
- Schlegel, J., Wyss, M., Eppenberger, H.M., Wallimann, T. (1990b):**
Functional studies with the octameric and dimeric form of mitochondrial creatine kinase.
Differential pH-dependent association of the two oligomeric forms with the inner mitochondrial membrane.
J. Biol. Chem. 265: 9221 – 9227.
- Schlegel, J., Wyss, M., Schürch, U., Schnyder, T., Quest, A., Wegmann, G., Eppenberger, H.M., Wallimann, T. (1988):**
Mitochondrial creatine kinase from cardiac muscle and brain are two distinct isoenzymes but both form octameric molecules.
J. Biol. Chem. 263: 16963 – 16969.
- Schlegel, J., Zurbriggen, B., Wegmann, G., Wyss, M., Eppenberger, H.M., Wallimann, T. (1988):**
Native mitochondrial creatine kinase forms octameric structures. I. Isolation of two interconvertible mitochondrial creatine kinase forms, dimeric and octameric mitochondrial creatine kinase: characterization, localization, and structure-function relationships.
J. Biol. Chem. 263: 16942 – 16953.
- Schnyder, T., Rojo, M., Furter, R., Wallimann, T. (1994):**
The structure of mitochondrial creatine kinase and its membrane binding properties.
Mol. Cell. Biochem. 133/134: 2115 – 123.
- Scholte, H.R. (1973):**
On the triple localization of creatine kinase in heart and skeletal muscle cells.
Biochim. Biophys. Acta. 305: 413 – 427.
- Schwartz, K., Chassagne, C., Boheler, K.R. (1993):**
The molecular biology of heart failure.
J. Am. Coll. Cardiol. 22 (Suppl. A): 30 A – 33 A.
- Segal, J. (1990):**
Calcium is the first messenger for the action of thyroid hormone at the level of the plasma membrane: first evidence for an acute effect of thyroid hormone on calcium uptake in the heart.
Endocrinology 126: 2693 – 2702.
- Segal, J., Ingbar, S.H. (1990):**
3,5,3'-Triiodothyronine enhances sugar transport in rat thymocytes by increasing the intrinsic activity of the plasma membrane sugar transporter.
J Endocrinol. 124: 133 – 140.
- Segal, J., Masalha, S., Schwalb, H., Merin, G., Gorman, J.B., Uretzky, G. (1996):**
Acute effect of thyroid hormone in the rat heart: role of calcium.
J. Endocrin. 149: 73 – 80.

Sharov, V.G., Saks, V.A., Smirnov, V.N., Charzov, E.I. (1977):

An electron microscopic histochemic investigation of the localization of creatine phosphokinase in heart cells.

Biochim. Biophys. Acta 468: 495 – 501.

Silva, J.E., Leonard, J.L. (1985):

Regulation of rat cerebrocortical and adenohipophyseal type II 5'-deiodinase by thyroxine, triiodothyronine, and reverse triiodothyronine.

Endocrinology 116: 1627 – 1635.

Simat, B.M., Towle, H.C., Schwartz, H.L., Oppenheimer, J.H. (1980):

Difference between thyroidectomized and hypophysectomized animals in their hepatic ribonucleic acid response to thyroid hormone.

Endocrinology 107: 1338 – 1344.

Simpson, P.C., Kariya, K., Karns, L.R., Long, C.S., Krliner, J.S. (1991):

Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth.

Mol. Cell. Biochem. 104: 35 – 43.

Soboll, S. (1993):

Thyroid hormone action on mitochondrial energy transfer.

Biochim. Biophys. Acta 1144: 1 – 16.

Soboll, S., Brdiczka, D., Jahnke, D., Schulze, K., Schmidt, A., Schlattner, U., Wendt, S., Wallimann, T. (1998):

Octamer-dimer transitions of mitochondrial creatine kinase in heart disease.

J. Mol. Cell Cardiol. 31: 857 – 866.

Sömjen, D., Zor, U., Kaye, A.M., Harell, A., Binderman, I. (1987):

Parathyroid hormone induction of creatine kinase activity and DNA synthesis is mimicked by phospholipase C, diacylglycerol and phorbol ester.

Biochim. Biophys. Acta 931: 215 – 223.

Stachowiak, O., Dolder, M., Wallimann, T., Richter, C. (1998):

Mitochondrial creatine kinase is a prime target of peroxynitrite-induced modification and inactivation.

J. Biol. Chem. 273: 16694 – 16699.

Stachowiak, O., Dolder, M., Wallimann, T. (1996):

Membrane-binding and lipid vesicle crosslinking kinetics of the mitochondrial creatine kinase octamer.

Biochemistry 35: 15522 – 15528.

Stachowiak, O., Schlattner, U., Dolder, M., Wallimann, T. (1998):

Oligomeric state and membrane binding behaviour of creatine kinase isoenzymes:

Implications for cellular function and mitochondrial structure.

Mol. Cell. Biochem. 184: 141 – 151.

Steeghs, K., Benders, A., Oerlemans, F., de Haan, A., Heerschap, A., Ruitenbeek, W., Jost, C., van Deursen, J., Perryman, B., Pette, D., Bruckwilder, M., Koudijs, J., Jap, P, Veerkamp, J., Wieringa, B. (1997):

Altered calcium homeostasis in muscles with combined mitochondrial and cytosolic CK deficiencies.

Cell 89: 93 – 103.

Stryer, L. (1994):

Biochemie

3. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg

Sugden, P.H., Clerk, A. (1998):

Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy.

J. Mol. Med. 76: 725 – 746.

Suko, J. (1971):

Alterations of Ca^{2+} -uptake and Ca^{2+} -activated ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum in hyper- and hypothyroidism.

Biochim. Biophys. Acta 252: 324 – 327.

Swynghedauw, B. (1991):

Remodeling of the heart in chronic pressure overload.

Basic Res. Cardiol. 86 (Suppl. 1): 99 – 105.

Szasz, G., Gruber, W., Bernt, E. (1976):

Creatine kinase in serum: 1. Determination of optimum reaction conditions.

Clin. Chem. 22: 650 – 656.

Trask, R.V., Billadello, J.J. (1990):

Tissue-specific distribution and developmental regulation of M and B creatine kinase mRNAs.

Biochim. Biophys. Acta 1049: 182 – 188.

Turner, D.C., Wallimann, T., Eppenberger, H.M. (1973):

A protein that binds specifically to the M-line of skeletal muscle is identified as the muscle form of creatine kinase.

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70: 702 – 705.

Umesono, K., Murakami, K.K., Thompson, C.C., Evans, R.M. (1991):

Direct repeats as selective response elements for the thyroid hormone, retinoic acid, and vitamin D₃ receptors.

Cell 65: 1255 – 1266.

Wagner, R.L., Apriletti, J.W., McGrath, M.E., West, B.L., Baxter, J.K., Fletterick, R.J. (1995):

A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor.

Nature 378: 690 – 697.

Wallimann, T., Hemmer, W. (1994):

Creatine kinase in non-muscle tissues and cells.

Mol. Cell. Biochem. 133/134: 193 - 220.

Wallimann, T., Schlösser, T., Eppenberger, H.M. (1984):

Function of M-line bound creatine kinase as intramyofibrillar ATP regenerator at the receiving end of the phosphorylcreatine shuttle in muscle.

J. Biol. Chem. 259: 5238 – 5246.

Wallimann, T., Schnyder, T., Schlegel, J., Wyss, M., Wegmann, G., Rossi, A.M., Hemmer, W., Eppenberger, H.M., Quest, A.F.G. (1989):

Subcellular compartmentation of creatine kinase isoenzymes, regulation of CK and octameric structure of mitochondrial CK: import aspects of the phosphoryl-creatine circuit.

Progr. Clin. Biol. Res. 315: 159 – 176.

Wallimann, T., Wyss, M., Brdiczka, D., Nicolay, K., Eppenberger, H.M. (1992):

Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the „phosphocreatine circuit“ for cellular energy homeostasis.

Biochem. J. 281: 21 – 40.

Warnick, P.R., Davis, P.J., Davis, F.B., Cody, V., Galindo, J., Blas, S.D. (1993):

Rabbit skeletal muscle sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase activity: stimulation in vitro by thyroid hormone analogues and bipyridines.

Biochim. Biophys. Acta 1153: 184 – 190.

Weinberg, M.B., Utter, M.I. (1979):

Effect of thyroid hormone on the turnover of rat liver pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase.

J. Biol. Chem. 254: 9492 – 9499.

Wirz, T., Brändle, U., Soldati, T., Hossle, Jp, Perriard, JC (1990):

A unique chicken B-creatine kinase gene gives rise to two B-creatine kinase isoproteins with distinct N termini by alternative splicing.

J. Biol. Chem. 265: 11656 – 11666.

Wyss, M., Smeitink, J., Wevers, R.A., Wallimann, T. (1992):

Mitochondrial creatine kinase: a key enzyme of aerobic energy metabolism.

Biochim. Biophys. Acta 1102: 119 – 166.

Wyss, M., Wallimann, T. (1994):

Creatine metabolism and the consequences of creatine depletion in muscle.

Mol. Cell. Biochem. 133/134: 51 – 66.

Yamazaki, R.K. (1975):

Glucagon stimulation of mitochondrial respiration.

J. Biol. Chem. 250: 7924 – 7930.

Yoshizaki, K., Nishikawa, H., Watari, H. (1987):

Diffusivities of creatine phosphate and ATP in an aqueous solution studied by pulsed field gradient ^{31}P NMR.

Jap. J. Physiol. 37: 923 – 928.

Yoshizaki, K., Watari, H., Radda, G.K. (1990):

Role of phosphocreatine in energy transport in skeletal muscle of bullfrog studied by ^{31}P NMR.

Biochim. Biophys. Acta 1051: 144 – 150.

Zimmer, H.G., Irlbeck, M., Kolbeck-Rühmkorff, C. (1995):

Response of the rat heart to catecholamines and thyroid hormones.

Mol. Cell. Biochem. 147: 105 – 114.

Zimmer, H.G., Pfeffer, H. (1986):

Metabolic aspects of the development of experimental cardiac hypertrophy.

Basic Res. Cardiol. 81: 127 – 137.

Zweier, J.L., Jacobus, W.E., Korecky, B., Brandeys-Barry, Y. (1991):

Bioenergetic consequences of cardiac phosphocreatine depletion induced by creatine analogue feeding.

J. Biol. Chem. 266: 20296 – 20304.

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. S. Soboll danke ich sehr herzlich für die Überlassung des interessanten Themas, ihre Anregungen sowie die freundliche Betreuung meiner Dissertation.

Herzlich danken möchte ich auch Herrn Prof. Dr. P. Westhoff für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Prof. Dr. H. Sies danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Dr. Jaquelin Hoerter danke ich für die Möglichkeit, einige Experimente in ihrer Arbeitsgruppe durchführen zu dürfen und ihre nette Hilfsbereitschaft. Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts „Cardiologie Cellulaire et Moléculaire, INSERM U446 an der Université Paris-Sud“ danke ich für die freundliche Atmosphäre während meiner Zeit im Institut.

Herrn Prof. Dr. H. J. Seitz, Universitäts-Krankenhaus Eppendorf in Hamburg danke ich für die freundliche Unterstützung bei der Durchführung des Experimentes der chronischen Hyperthyreose.

Für die Überlassung der Gewebeproben der *knock out* Mäuse danke ich Herrn Prof. Dr. Björn Vennström, Karolinska Institut Stockholm, Schweden.

Der Arbeitsgruppe von PD Dr. C. Carlberg danke ich für die freundliche Hilfe bei der Durchführung der molekularbiologischen Experimente. Besonders möchte ich mich bei PD Dr. Carsten Carlberg für seine Ratschläge und anregenden Diskussionen bedanken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Physiologische Chemie I und besonders bei meiner Arbeitsgruppe für die nette Zusammenarbeit und das gute Arbeitsklima bedanken. Sonja Gründel und Anke Stock danke ich sehr herzlich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und die schönen gemeinsamen Stunden im Labor.

Ganz besonders möchte ich meinen Eltern, Michael und Frank für ihre liebevolle Unterstützung danken, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.