

Aus dem Diabetes-Forschungsinstitut
Abteilung für Klinische Biochemie
an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. H. Reinauer

**Einfluß des Streptozotocin-Diabetes und des Carnitin
Palmitoyltransferase I-Hemmers Etomoxir auf die
myokardiale Genexpression**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Karsten Thomas Müssig

2000

„Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.“

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dieter Häussinger
Dekan

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Peter Rösen

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Schulz

Meinen Eltern in tiefer Dankbarkeit gewidmet.

Mein Dank gilt

Herrn *Prof. Dr. med. Hans Reinauer* für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in der Abteilung für Klinische Biochemie des Diabetes Forschungsinstitutes an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf und den damit verbundenen ausgezeichneten Möglichkeiten zum wissenschaftlichen Arbeiten, Herrn *Prof. Dr. rer. nat. Peter Rösen* für die Gelegenheit, in seiner Arbeitsgruppe tätig sein zu dürfen, und für die hervorragende Betreuung, Herrn *Univ.-Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Schulz* für seine großzügige Bereitschaft, als Korreferent meiner Arbeit sowie als Prüfer zu fungieren, Herrn *PD Dr. med. Christian Perings* für seine freundliche Bereitschaft, die mündliche Prüfung durchzuführen, und für die sehr gute klinische Anleitung während des internistischen Tertials des Praktischen Jahres in der Klinik für Kardiologie, Pneumologie und Angiologie an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Herrn *Dr. rer. nat. Thomas Ballhausen*, Frau *Dr. rer. nat. Barbara Hirsch* und insbesondere Herrn *Dr. rer. nat. Carsten Hönack* für ihre große Unterstützung beim Erlernen der molekularbiologischen und proteinbiochemischen Methoden, Herrn *Dr. med. Zhiyong Wang*, Herrn *Dr. rer. nat. Jürgen Weiss* und Frau *Dr. med. Li Zhang* für ihre wertvollen Hinweise und Ratschläge, Frau *Margaretha Kempf* für die Durchführung der β -Hydroxybutyrat-Konzentrationsbestimmungen, den Damen des Klinischen Labors am Diabetes-Forschungsinstitut für die Durchführung der Glukose- und Triglyzerid-Konzentrationsbestimmungen, meinem guten Freund *Erich Anton (Toni) Laufer* für die sehr gute Zusammenarbeit und für seine einzigartige Loyalität, meinem Schwager *Prof. Dr. Ing. Gregor Gronau* für seine unermüdliche und nicht zu überbietende Hilfe bei der redaktionellen Gestaltung meiner Arbeit, meiner Schwester *Susanne* und meinem Schatz *Silvana* für ihr Verständnis und ihre Unterstützung und meinen Eltern *Marlene* und *Helmut Müssig*, die auf vieles in ihrem Leben verzichtet haben, um uns das Studium und die Promotion zu ermöglichen.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	V
1 Einführung	1
2 Material und Methoden	7
2.1 Isolierung kardialer Endothelzellen	7
2.1.1 Erstellen der Percoll-Gradienten	8
2.1.2 Trennung der Herzzellen	9
2.1.3 Zellkultivierung	11
2.2 Isolierung von Kardiomyozyten	12
2.3 Tierexperimentelle Techniken	13
2.3.1 Induktion des Diabetes mellitus	13
2.3.2 Behandlung der Tiere mit Etomoxir	14
2.3.2.1 Orale Applikation	14
2.3.2.2 Intraperitoneale Applikation	14
2.3.3 Organentnahme	15
2.4 Bestimmung der Serumparameter	15
2.5 Immunoblot-Analyse	15
2.5.1 Lyse der Myokardzellen	15
2.5.2 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA) . . .	16
2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	17
2.5.3.1 Färben der SDS-Polyacrylamid-Gele	19
2.5.4 Protein-Transfer	19
2.5.5 Blockieren unspezifischer Bindungsstellen	21
2.5.6 Inkubation mit dem spezifischem Antikörper	21
2.5.7 Nachweis des ersten Antikörpers mit ¹²⁵ Iod-Protein A	21
2.5.8 Signalauswertung am Phospho-Imager	22
2.6 Northern Blotting Hybridisierung	22
2.6.1 Photometrische Analyse der Nukleinsäurelösungen . .	22

2.6.2	Extraktion und Reinigung von RNA	23
2.6.2.1	Phenol-Guanidiniumisothiocyanat	23
2.6.2.2	Total RNA Isolation (TRIzol)	25
2.6.2.3	Cäsiumchlorid-Dichtegradient	25
2.6.3	Vergleich der RNA-Isolierungsverfahren	27
2.6.4	Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese	28
2.6.5	Transfer der denaturierten RNA auf die Membran . . .	29
2.6.6	cDNA-Gewinnung	30
2.6.6.1	Präparation und Transformation von E.coli .	31
2.6.6.2	Extraktion und Reinigung der Plasmid DNA	33
2.6.6.3	Restriktion der Plasmid DNA	33
2.6.7	Prähybridisierung	35
2.6.7.1	Prähybridisierung mit cDNA-Fragmenten .	35
2.6.7.2	Prähybridisierung mit Oligonukleotiden . .	36
2.6.8	Radioaktive Markierung	36
2.6.8.1	Markierung doppelsträngiger DNA	37
2.6.8.2	Markierung von Oligonukleotiden	38
2.6.9	Trennung von nichteingebauten Nukleotiden	38
2.6.10	Hybridisierung	39
2.6.11	Waschen der Membran	39
2.6.12	Auswertung am Phospho-Imager	39
2.7	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion	40
2.7.1	Extraktion und Reinigung von RNA	40
2.7.1.1	Präparation der Endothelzellen (TRIzol) . .	40
2.7.1.2	Präparation der Kardiomyozyten (TRIzol) .	41
2.7.1.3	Präparation des Herzmuskelgewebes	41
2.7.2	Reverse Transkription	41
2.7.2.1	cDNA-Synthese mit spezifischen Primern .	42
2.7.2.2	cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern . .	43
2.7.3	Polymerasekettenreaktion	43
2.7.4	Agarose-Gelelektrophorese	45
2.8	Mathematisch-statistische Methoden	45

3	Ergebnisse	46
3.1	Orale Applikation von Etomoxir	46
3.1.1	Auswirkungen auf die Gewichtsparameter	47
3.1.2	Auswirkungen auf die Stoffwechsellparameter	47
3.1.3	Bewertung der Ergebnisse	48
3.2	Intraperitoneale Applikation von Etomoxir	49
3.2.1	Einfluß auf die Gewichtsparameter	49
3.2.2	Einfluß auf die Stoffwechsellparameter	50
3.2.3	Vergleich der Applikationsformen	50
3.3	Myosin schwere Ketten	51
3.4	Glukose-Transporter Glut4	53
3.4.1	Glut4-Protein	54
3.4.2	Glut4-mRNA	55
3.5	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor	56
3.5.1	AT1-Rezeptor im Herzen	57
3.5.2	Optimierung der Polymerasekettenreaktion (PCR)	58
3.5.2.1	Wirkungsweise der PCR	58
3.5.2.2	Reverse Transkriptase-PCR	58
3.5.2.3	Reverse Transkription, Methodenvergleich	59
3.5.2.4	Primer	59
3.5.2.5	Annealingtemperatur	60
3.5.2.6	Zyklenzahl	61
3.5.2.7	Interner Standard	62
3.5.2.8	Parameter der optimierten PCR	63
3.5.3	Ergebnisse durch die optimierte PCR	64
3.5.3.1	AT1-Rezeptor in Herzmuskelgewebe	64
3.5.3.2	AT1-Rezeptor in Endothelzellen und Kardiomyozyten	65
3.6	Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase	66
3.6.1	Optimierung der PCR	67
3.6.1.1	Primer	67
3.6.1.2	Parameter der optimierten PCR	68
3.6.2	Ergebnisse durch die optimierte PCR	69

4 Diskussion	70
4.1 Tierexperimentelles Modell für den Diabetes mellitus	70
4.2 Behandlung mit Etomoxir	71
4.3 Myosin Schwere Ketten	74
4.4 Glukosetransporter 4	76
4.5 Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase	79
4.6 Angiotensin II Typ 1-Rezeptor	81
5 Zusammenfassung	84
Literaturverzeichnis	86
A Verwendete Materialien	103
B Verwendete Puffer	107
C Marker	110

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

A, A	Ampere (Einheit der elektrischen Stromstärke), 2'-Desoxy-adenosin-5'-phosphat in DNA- Sequenzen
AI, AII	Angiotensin I, Angiotensin II
Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensinkonversionsenzym (engl.: angiotensin converting enzyme)
APS	Ammoniumpersulfat (Ammoniumperoxodisulfat)
AT1, AT2	Angiotensin II Typ 1-Rezeptor, Angiotensin II Typ 2-Rezeptor
(d)ATP	(2'-Desoxy-) Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
<i>b</i>	Base (engl.: base)
<i>bp</i>	Basenpaar (engl.: basepair)
BCA	Bicinchoninsäure (engl.: bicinchoninic acid)
BDM	Buthandionmonoxim
BIS	N,N'-Ethylenbis-acrylamid
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: bovine serum albumine)
C	2'-Desoxy-cytosin-5'-phosphat in DNA-Sequenzen
°C	Grad Celsius (Temperatur)
cDNA	komplementäre DNA (engl.: complementary DNA)
<i>Ci</i>	Curie (altes Maß für Radioaktivitätsmenge)
<i>cpm</i>	Zählereignisse pro Minute (engl.: counts per minute)
CPT I	Carnitin Palmitoyltransferase I
(d)CTP	(2'-Desoxy-) Cytidin-5'-triphosphat
<i>d</i>	Dalton (Molekulargewichtseinheit), 1 <i>d</i> entspricht 1g/mol
DHB	D-(-)-3-Hydroxybutyratserumkonzentration
DMEM	engl.: Dulbeco's modified eagles medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DPBS	engl.: Dulbeco's phosphat buffered saline

<i>dpm</i>	Radioaktive Zerfälle pro Minute (engl.: decays oder disintegrations per minute)
DTT	Dithiothreitol
ECGF	Endothelzellwachstumsfaktor (engl.: endothelial cell growth factor)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (engl.: ethylenediamin tetraacetic acid)
<i>faf</i>	fettsäurefrei (engl.: fatty acid free)
FCS	Fötales Kälberserum (engl.: foetal calf serum)
FSB	Lagerpuffer für <i>E. coli</i> (engl.: freeze stock buffer)
<i>g, g</i>	Gramm (SI-Gewichtseinheit), Gravitationskonstante ($6,67 \cdot 10^{-11} Nm^2 kg^{-2}$)
G	2'-Desoxy-guanosin-5'-phosphat in DNA-Sequenzen
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Glykolytisches Enzym)
GK	Glukoseserumkonzentration
Glut	Glukosetransporter
GTC	Guanidiniumisothiocyanat
(d)GTP	(2'-Desoxy-) Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HES	HEPES-Earlsalz
HG	Herzgewicht
KG	Körpergewicht
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
<i>m</i>	Meter (SI-Längeneinheit)
<i>M</i>	Molarität (SI-Einheit der Stoffmengenkonzentration), <i>1M</i> entspricht <i>1mol/l</i>
MHC	Schwere Kette des Myosin (engl.: myosin heavy chain)
MLC	Leichte Kette des Myosin (engl.: myosin light chain)
MOPS	3-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl.: messenger ribonucleic acid)
<i>N</i>	Normallösung: Lösung, die im Liter ein Grammäquivalent einer bestimmten Substanz gelöst enthält
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form

NADH	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
OD	Optische Dichte (Extinktion)
PBS	Phosphat-Natriumchlorid-Puffer (engl.: phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)
PMSF	Proteaseinhibitor Phenylmethansulfonylfluorid
POCA	Natrium-2-(5-[Chlorphenyl]-pentyl)-oxiran Carboxylat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
®	eingetragenes Warenzeichen (engl.: registered trademark)
RAS	Renin-Angiotensin-System
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease (RNA-degradierendes Enzym)
RNasin	Ribonuklease-Inhibitor
<i>rpm</i>	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure (engl.: ribosomal ribonucleic acid)
RTase	Reverse Transkriptase
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (engl.: reverse transcriptase polymerase chain reaction)
<i>S</i>	Svedberg (Einheit von Sedimentationskoeffizienten), 1 Svedberg entspricht 10^{-13} Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl.: standard error of the mean)
SERCA	Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase (engl.: sarcoplasmic reticulum calcium-ATPase)
SSC	Natriumchlorid-Zitrat-Puffer (engl.: saline-sodium citrate)
SSPE	Natriumchlorid-Phosphat-EDTA-Puffer (engl.: saline-sodium phosphate - EDTA)
STE	Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer (engl.: saline-Tris-EDTA)
SZ	Streptozotocin
T	2'-Desoxy-thymidin-5'-phosphat in DNA-Sequenzen
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer

TBS	Tris-Natriumchlorid-Puffer (engl.: Tris-buffered saline)
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TEN	Tris-EDTA-Natriumchlorid-Puffer
TG	Triglyzeridserumkonzentration
TM	Handelsmarke (engl. Trademark)
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	Tween-Tris-Natriumchlorid-Puffer (engl.: Tween-Tris-buffered saline)
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
U	Einheit der Enzymaktivität (engl.: unit), wenn nicht anders definiert, entspricht eine enzymatische Einheit der Enzymmenge, die bei 37 °C einen Substratumsatz von einem Mikromol Substrat pro Minute aufweist
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt, Einheit der elektrischen Spannung
V., Vv.	Vena, Venae
V1, V2, V3	Myosin schwere Ketten Dimer-Isoformen
v/v	Gehaltsangabe in <i>ml</i> pro 100 <i>ml</i> Lösung, (engl.: volume per volume)
w/v	Gehaltsangabe in g pro 100 <i>ml</i> Lösung, (engl.: weight per volume)
w/w	Gehaltsangabe in g pro 100g Lösung (Massenprozent), (engl.: weight per weight)
x	als „-fach“ bei Puffer-Stocklösungen benutzt (z.B. 10x: lies „zehnfach“)

Erweiterung der Einheiten

<i>k</i>	kilo	10 ³
<i>d</i>	dezi	10 ⁻¹
<i>c</i>	centi	10 ⁻²
<i>m</i>	milli	10 ⁻³
<i>μ</i>	mikro	10 ⁻⁶
<i>n</i>	nano	10 ⁻⁹

1 Einführung

Glukose ist das wichtigste Monosaccharid im menschlichen Kohlenhydratstoffwechsel und der Hauptmetabolit des Gehirns. Etwa 5-6 g Glukose pro Stunde bzw. 50 % der gesamten Glukoseutilisation von 2 mg/kg/min unter Basalbedingungen passieren insulinunabhängig die Blut-Hirn-Schranke, um intrazerebral verbrannt zu werden. Um die Vitalität des Gehirns sicherzustellen, bedarf es also einer akribischen Regulation des Blutzuckers. Den beiden in den pankreatischen β - bzw. A-Zellen gebildeten Hormonen Insulin und Glukagon kommt bei der Konstanthaltung der extrazellulären Glukosekonzentration zwischen 60 und 180 mg/dl größte Bedeutung zu. Insulin hat anregende Wirkung auf anabole Prozesse in Muskulatur, Fettgewebe und Leber und hemmende Wirkung auf katabole Vorgänge. Durch Steigerung des Glukosetransportes in die peripheren Zellen fördert es die Glykogensynthese sowie die Glykolyse und stellt somit Energie und Bausteine im intermediären Stoffwechsel bereit. Glukagon hingegen führt durch Stimulation der Glykogenolyse und der Glukoneogenese in der Leber zur Erhöhung der Glukosekonzentration im Blut. Die Ausschüttung von Insulin und Glukagon wird zentralnervös gesteuert und durch eine Vielzahl von Neurotransmittern und Hormonen vermittelt. Auch beeinflussen sich die sezernierenden Zellen wechselseitig, parakrin, und werden direkt durch die Nahrungsbestandteile Kohlenhydrate, Proteine und Fette und ihre Abbauprodukte angeregt. Angesichts der großen Anzahl von neuroendokrinen Peptiden des gastro-entero-pankreatischen Systems, die an der Insulinsekretion beteiligt sind, gestalten sich die Wechselwirkungen der in den pankreatischen Inselzellen gebildeten Hormone äußerst komplex und sind zum Teil noch gar nicht bekannt. Zweifellos jedoch stimuliert Glukagon die Ausschüttung von Insulin, während Insulin hemmende Wirkung auf die Glukagonsekretion hat. Das in den D-Zellen der Pankreasinseln gebildete Somatostatin inhibiert sowohl Insulin als auch Glukagon. Der Antagonismus zwischen Glukagon und Insulin gelingt nicht zuletzt aufgrund der anatomischen Anordnung der sie produzierenden Zellen so minutiös. Zum einem besteht ein direkter

Kontakt zwischen den Insulin bildenden β -Zellen und den Glukagon sezernierenden A-Zellen, der eine parakrine Interaktion ermöglicht. Zum anderen erfolgt die arterielle Blutversorgung der Langerhansschen Inseln vom Zentrum, in dem vor allen β -Zellen zu finden sind, zur Peripherie hin, die durch einen Reichtum an A-Zellen charakterisiert ist. Der venöse Abfluß aus der Bauchspeicheldrüse erfolgt über die V. portae zur Leber, die beherrschende Funktion im Intermediärstoffwechsel hat. Unter körperlicher Belastung wird die von der sich kontrahierenden Muskulatur vermehrt benötigte Glukose durch die adrenerge Stimulation der Glykogenolyse und der unter dem Einfluß von Glukagon ablaufenden Glukoneogenese bereitgestellt. Die anabole Wirkung des Insulins wird durch das Adrenalin inhibiert [1], [2]. Angesichts der Komplexität der Glukosehomöostase hat der Ausfall eines der beteiligten Hormone schwerwiegende Konsequenzen. Bei Fehlen von Insulin wird Glukose vermindert in die insulinabhängigen Muskel- und Fettzellen aufgenommen und verwertet. Die resultierende Hyperglykämie wird durch die in der Leber unter ungehemmter Glukagonwirkung stattfindende Glykogenolyse und Glukoneogenese noch verstärkt. Das enge Zusammenspiel zwischen Glykolyse und Glukoneogenese wird kontrolliert über die Beeinflussung ihrer Schrittmacherenzyme Phosphofruktokinase-I bzw. Fruktose-1,6-bisphosphatase durch Fruktose-2,6-diphosphat, dessen Konzentration durch ein komplexes Enzymsystem reguliert wird. Fruktose-2,6-diphosphat bewirkt eine Inhibition der Glukoneogenese und eine Stimulation der Glykolyse. Eine vergleichbare Interaktion existiert ebenfalls zwischen Glykogensynthese und Glykogenolyse. Die unter Insulinmangel auftretende Hemmung der Fettsäuresynthese und die Freisetzung von Fettsäuren aus den Depots führt zu einem Überangebot von freien Fettsäuren und Acetyl-CoA im Blut, das eine verstärkte Ketogenese zu Folge hat. Der glykolytische Fluß ist aufgrund des verminderten Transportes von Glukose in die Zelle und wegen der Hemmung des Schrittmacherenzymes der Glykolyse, der Phosphofruktokinase-I, durch das im Rahmen der Fettsäureoxidation vermehrt anfallende Zitrat vermindert. Daraus ergibt sich, daß Malonyl-CoA, das aus Pyruvat, dem Endprodukt des oxidativen Glukoseabbaus, entsteht und Ausgangsstoff der Lipogenese ist, vermindert vorliegt. Somit entfällt seine inhibierende Wirkung auf die Carnitin Palmitoyltransferase I, mit deren Hilfe langkettige Fettsäuren die sonst für sie undurchlässige Mitochondriummem-

bran passieren, und die Bildung von Ketonkörpern wird begünstigt [3]. Die Interaktion zwischen Fettsäure- und Kohlenhydratstoffwechsel gemäß Bild 1.1 wird in dem sog. Randle-Zyklus [4] formuliert. Das bei Insulinmangel zu beobachtende Überangebot an freien Fettsäuren führt über ihren Abbau durch β -Oxidation zu einem erhöhten Gehalt an Acetyl-CoA und $\text{NADH} + \text{H}^+$, der direkt die Pyruvatdehydrogenase und über das vermehrt anfallende Zitrat die Phosphofruktokinase-I hemmt. Glukose-6-Phosphat akkumuliert und durch Inhibition der Hexokinase wird der glykolytische Fluß herabgesetzt.

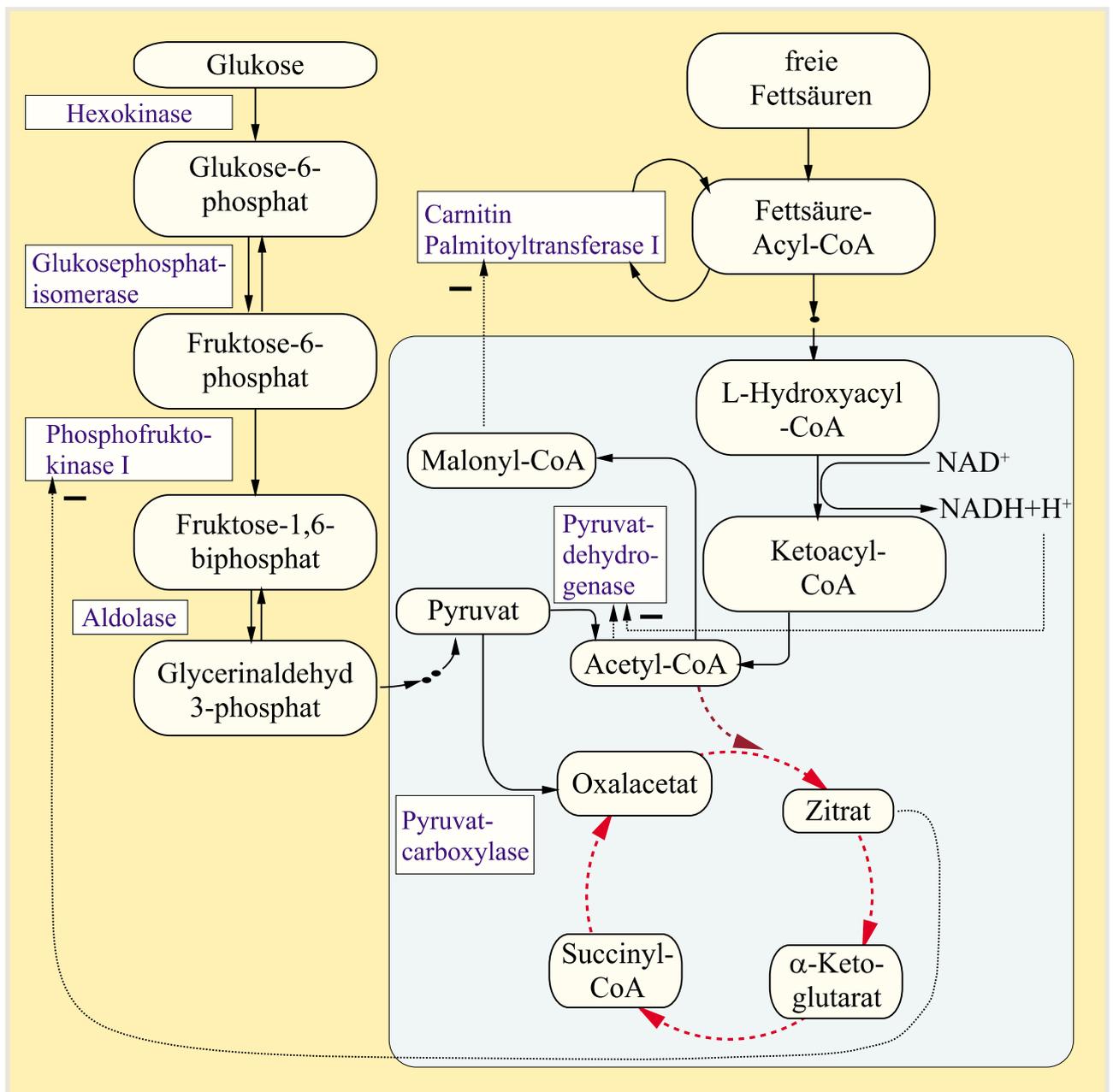


Bild 1.1: Darstellung der Wechselwirkungen zwischen dem Fettsäure- und dem Glukosestoffwechsel

Die zuvor beschriebenen Auswirkungen eines absoluten Insulinmangels werden im Rahmen eines Typ-I-Diabetes beobachtet. Der Typ-I-Diabetes beruht auf einer autoimmunologischen, chronisch-progredienten Entzündung der Langerhansschen Inseln, die in eine selektive Zerstörung der insulinproduzierenden β -Zellen mündet [5]. Als ursächlich für die Entwicklung dieses Insulinmangelsyndroms werden eine genetische Disposition und bislang noch unbekannte, vermutlich in den ersten Lebensjahren einwirkende Umweltfaktoren angenommen [6]. Hingegen stellt sich die Pathogenese des Typ-II-Diabetes weitaus komplexer dar und läßt sich nicht an einem einzelnen Defekt in der Glukosehomöostase festmachen. Der Typ-II-Diabetes ist vielmehr charakterisiert durch die nicht regelrechte Ausschüttung von Insulin auf den Glukosereiz, das verminderte Ansprechen der peripheren Gewebe auf Insulin und einer erhöhten Glukosesynthese in der Leber trotz der bereits bestehenden Hyperglykämie [7]. Begünstigende Faktoren sind eine familiäre Belastung, Übergewicht, Bewegungsarmut und andere Aspekte des sog. metabolischen Syndroms. Der Diabetes mellitus betrifft jeden zwanzigsten Bürger in Deutschland [8]. Mehr als 95 % der Diabetiker gehören dem Typ-II-Diabetes an [9], dessen Inzidenz in den letzten Jahrzehnten stetig gestiegen ist. Als ursächlich werden eine erhöhte Kalorienzufuhr, verminderte körperliche Betätigung und ein Anstieg des mittleren Lebensalters angenommen. Nach [10] zeichnete sich auch für den Typ-I-Diabetes in den letzten drei Jahrzehnten eine Inzidenzzunahme ab. Angesichts ausgefeilter Therapie- und Schulungsprogramme ist die Mortalität an akuten Komplikationen des Diabetes mellitus, wie etwa Hypoglykämien und Ketoazidosen, verschwindend gering [11]. Morbidität und Mortalität werden entscheidend von den Diabetes-Spätfolgen Retinopathie, Neuropathie, Nephropathie und der diabetesspezifischen Erkrankung des Herzmuskels beeinflusst. Die im Diabetes zu beobachtende Herzmuskelerkrankung ergibt sich aus der koronaren Herzkrankheit, die zweifellos prognostisch wegweisend ist, aus der diabetischen Kardiomyopathie und aus der autonomen Neuropathie [12]. Das Risiko eines männlichen Diabetikers im Alter von 45-74 Jahren eine Herzinsuffizienz zu entwickeln ist um den Faktor 2 im Vergleich mit einem Nichtdiabetiker derselben Altersstruktur gesteigert, das einer diabetischen Frau sogar um den Faktor 5 [13]. Die Erkenntnis, daß auch bei Ausschluß aller zu einer Herzinsuffizienz prädisponierender Erkrankungen, wie

etwa einer koronaren Herzkrankheit, das Risiko eines Diabetikers unverändert um das zwei- bis fünffache erhöht ist, legt die Vermutung nahe, daß eine diabetische Herzmuskelerkrankung existiert. Bestärkt wird diese Annahme durch den echokardiographischen und den radionuklidventrikulographischen Nachweis einer eingeschränkten linksventrikulären Funktion bei klinisch unauffälligen Diabetikern, bei denen keine Anzeichen für eine Koronarsklerose bestehen [14]. Insgesamt herrscht noch viel Unklarheit über die Ursachen der diabetischen Kardiomyopathie. Als mögliche Gründe werden die herabgesetzte Glukoseaufnahme in die Herzmuskelzelle und die Hemmung des oxidativen Glukoseabbaus durch die vermehrte Verstoffwechslung von freien Fettsäuren angenommen. Daraus ergeben sich schwerwiegende Konsequenzen. Das gesunde Herzen gewinnt in Ruhe rund 80 % der benötigten Energie durch die Verbrennung von Fettsäuren und Ketonkörpern. Bei Belastung ökonomisiert es seinen Stoffwechsel, indem es vermehrt Glukose und Laktat unter weniger Sauerstoffverbrauch verbrennt [15]. Im diabetischen Herzen bleibt diese metabolische Umstellung aus und der Sauerstoffbedarf ist erhöht. Auch geht der verminderte glykolytische Fluß mit einer Verringerung des zytosolischen ATP einher, die sich in einer Aktivitätsminderung der sarkolemmalen Ionenpumpen manifestiert [16]. Die im Diabetes nachgewiesene Aktivitätsabnahme der Sarkoplasmatischen Kalzium-ATPase ist vermutlich Ursache für die Kalziumüberladung der Herzmuskelzelle und somit verantwortlich für die gestörte Relaxation in der Diastole [17]. Wird das im Diabetes ohnehin in seiner Funktion geschwächte Herz zusätzlichen Stimuli, wie etwa körperliche Belastung, Hypertonie oder langandauernden Einfluß von Katecholaminen, ausgesetzt, wird es schlichtweg überfordert und auf diese Weise das Renin-Angiotensin-System aktiviert [18]. Gestärkt wird diese Annahme durch den Nachweis, daß sich durch Inhibition des Angiotensin-Converting-Enzyms die Entwicklung der im diabetischen Herzen auftretende Fibrose und Hypertrophie verhindern läßt [19]. Um weitere Erkenntnisse über die zugrundeliegenden Mechanismen der diabetischen Kardiomyopathie zu gewinnen und um die Hypothese zu testen, daß sich durch Inhibition der Fettsäureoxidation die Glukoseutilisation und infolgedessen die Leistungsfähigkeit des Herzen verbessern läßt, wurden Streptozotocin-diabetische Ratten mit dem Carnitin Palmitoyltransferase I-Inhibitor Etomoxir[®] behandelt und im Anschluß Bestandteile der Kardio-

myozyten analysiert, deren Bedeutung in der Pathogenese des „diabetischen Herzen“ zugeschrieben werden. Die Einführung zu den jeweiligen Themen erfolgt in den entsprechenden Abschnitten.

2 Material und Methoden

2.1 Isolierung kardialer Endothelzellen [20]

Nichtdiabetische Ratten mit einem Gewicht von 250-400 g dienten der Gewinnung kardialer Endothelzellen. In Äthernästhesie wurde bei den Tieren eine Sternotomie durchgeführt. Die Aorta descendens wurde inzidiert, eine Kanülenspitze vorgeschoben und mit einer Schlaufe befestigt. Nach Eröffnung des rechten Vorhofes und Durchtrennung der Vv. pulmonales wurde das Herz mit Perfusionsmedium I gemäß Tabelle 2.1 blutleer gespült.

Lösungen zur Herzperfusion	
Kalziumfreie Perfusionslösung I	Dulbeco's Phosphat Buffered Saline (DPBS) <ul style="list-style-type: none"> • KH_2PO_4 1,45 mM • Na_2HPO_4 8,10 mM • KCl 2,68 mM • NaCl 0,13 M
Perfusionsmedium I	Dulbeco's Modified Eagles Medium (DMEM)
	Glutamin 584 mg/l Supplement 20 ml/l <ul style="list-style-type: none"> • DPBS 9.55g/l • Penicillin 100 mg/l • Streptomycin 100 mg/l • HEPES 179 g/l
Kollagenaselösung I	Kollagenase Typ XI 133 U/ml und Typ CLSII 45,33 U/ml in DPBS

Tabelle 2.1: Lösungen zur Herzperfusion. Nach Ansetzen wurden die Lösungen durch Filter mit der Maschenweite 0.22µm sterilfiltriert.

Anschließend wurde dem Tier das Herz entnommen und die in der Aorta liegende Kanüle an eine Perfusionsanlage angeschlossen. Die Perfusionsanlage stand in einer sterilen Werkbank und war wie alle in diesem Versuch verwendeten Puffer und Lösungen auf 37°C temperiert. Diese Temperatur wurde während der gesamten Perfusion aufrechterhalten. Nach einem weiteren Spü-

len des Herzens (Fluß: 10 *ml/min*) mit 50 *ml* Perfusionsmedium I und mit 50 *ml* kalziumfreier Perfusionslösung I gemäß Tabelle 2.1 wurde entsprechend [21] das Herz 30 Minuten lang mit 40 *ml* Kollagenaselösung I gemäß Tabelle 2.1 rezirkulierend perfundiert.

2.1.1 Erstellen der Percoll-Gradienten [22]

Zur Auftrennung der Herzzellen wurden Lösungen mit unterschiedlichen Gradienten verwendet. 15,55 *ml* Percoll-Stammlösung gemäß Tabelle 2.2 und 4,45 *ml* HES-Puffer gemäß Tabelle 2.2 wurden zur Erstellung des ersten Gradienten mit einem Dichtebereich von 1,020-1,101*g/ml* in ein 50 *ml*-Zentrifugenröhrchen gegeben und miteinander gemischt.

Zusammensetzung der zur Percoll-Gradienten	
Percoll-Stammlösung	Percoll 90 <i>ml</i>
	Earlsalz-Konzentrat 5 <i>ml</i> <ul style="list-style-type: none"> • NaCl 163,6 <i>mg/l</i> (2,8 <i>mM</i>) • KCl 7,54 <i>g/l</i> (100 <i>mM</i>) • MgCl₂ 3,26 <i>g/l</i> (16 <i>mM</i>) • NaH₂PO₄ 2,76 <i>g/l</i> (20 <i>mM</i>)
	HEPES-Konzentrat (<i>pH</i> 7,2) 5 <i>ml</i> <ul style="list-style-type: none"> • HEPES 112 <i>g/l</i> (500 <i>mM</i>) • BSA 20 <i>g/l</i> (0,2% (<i>w/v</i>))
HEPES-Earlsalz (HES) - Puffer [<i>pH</i> 7,4]	NaCl 8,128 <i>g/l</i> (140 <i>mM</i>)
	KCl 373 <i>mg/l</i> (5 <i>mM</i>)
	MgCl ₂ 163 <i>mg/l</i> (0,8 <i>mM</i>)
	CaCl ₂ 265 <i>mg/l</i> (1,8 <i>mM</i>)
	Na ₂ HPO ₄ 178 <i>mg/l</i> (1 <i>mM</i>)
	HEPES 5,958 <i>g/l</i> (25 <i>mM</i>)
	Glukose 901 <i>mg/l</i> (5 <i>mM</i>)

Tabelle 2.2: Zusammensetzung der Percoll-Gradienten

Im Anschluß wurde der Inhalt des Zentrifugenröhrchen vorsichtig mit einer Lösung, die sich aus 7,8 *ml* Percoll-Stammlösung und 9,7 *ml* HES-Puffer zusammensetzte, überschichtet. Durch 30minütiges Zentrifugieren bei 2000 *rpm* (ohne Bremse) bildete sich ein kontinuierlicher Dichtegradient aus. Um die Dichteunterschiede wahrnehmen zu können, wurden in ein zweites Zen-

trifugenröhrchen farbige Kügelchen verschiedener Dichte (density marker beads, Pharmacia) gegeben, die sich nach Beendigung der Zentrifugation ihrer Dichte entsprechend in dem Zentrifugenröhrchen verteilen. Zur Herstellung des zweiten Gradienten, dessen Dichtebereich zwischen 1,015 und 1,074 g/ml lag, wurde eine Lösung, die 11,1 ml Percoll-Stammlösung und 8,9 ml HES-Puffer enthielt, mit einem Gemisch aus 2,5 ml Percoll-Stammlösung und 12,5 ml HES-Puffer überschichtet und anschließend für 30 Minuten bei 2000 rpm (ohne Bremse) zentrifugiert.

2.1.2 Trennung der Herzzellen [22]

Nach Abschluß der Perfusion mit Kollagenase-Lösung I wurde das Herz von der Perfusionsanlage genommen und die Kanüle aus der Aorta entfernt. In einer sterilen Petrischale wurde das Herz aus dem Perikardbeutel herausgelöst und die Vorhöfe von den Ventrikeln abgetrennt. Anschließend wurde das Ventrikelmyokard mit zwei Pinzetten mechanisch zerkleinert, in einen sterilen 25 ml fassenden Erlenmeyerkolben überführt und 30 Minuten lang in 10 ml Kollagenaselösung I, die auf 37°C temperiert war, inkubiert. Die Inkubation fand unter intermittierender Rotation mit einem Magnetrührer bei 300 rpm in 10 Sekunden dauernden Intervallen statt. Das Homogenat wurde durch ein Nylonsieb mit 200 µm Maschenweite in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der ersten Zentrifugation bei 25 g, bei der die intakten Herzmuskelzellen sedimentierten, wurde der Überstand mit 1 ml Percoll-Stammlösung versetzt und vorsichtig auf den ersten Percoll-Gradienten (Dichte: 1,020-1,101 g/l) gegeben. Die sich anschließende Zentrifugation diente der Auftrennung der Herzzellen ihrer Dichte entsprechend. Die Endothelzellen, die sich in einer Phase mit einer Dichte von etwa 1,051-1,060 g/ml angereichert hatten, wurden entnommen. Eine zweite Schicht, deren Dichte zwischen 1,035 und 1,051 g/ml lag, wurde ebenfalls entnommen, in einem Verhältnis von 1:3 mit HES-Puffer verdünnt und auf den zweiten Gradienten mit einer Dichte von 1,015-1,074 g/l gegeben. Nach 20minütiger Zentrifugation bei 2500 rpm wurde auch diesem Gradienten eine Phase, deren Dichte zwischen 1,051 und 1,060 g/ml war, entnommen. Die in den beiden Zentrifugationsschritten gewonnenen, mit Endothelzellen angereicherten Schichten wurden in einem Verhältnis von 1:4 mit

HES-Puffer verdünnt. Zur Sedimentierung der Zellen erfolgte eine 10 Minuten dauernde Zentrifugation bei 100 *g*.

Lösungen zur Zellkultivierung	
Kulturmedium	DMEM
	Glutamin 584 mg/ℓ
	Supplement [pH 7,4] 20 ml/ℓ <ul style="list-style-type: none"> • DPBS 9,55 g/ℓ • Penicillin 100 mg/ℓ • Streptomycin 100 U/ℓ • HEPES 178,7 g/ℓ
	Fötales Kälberserum (FCS) 20 % (v/v) 30 min bei 54°C inaktiviert
Trypsin-Lösung	Trypsin 1,86 g/ℓ
	DPBS 9,54 g/ℓ
	EDTA 0,20 g/ℓ

Tabelle 2.3: Lösungen zur Zellkultivierung. Nach Erstellen wurden die Lösungen sterilfiltriert (0,2 µm).

Anschließend erfolgte die Resuspension der sedimentierten Zellen in 4 ml Kulturmedium gemäß Tabelle 2.3, dem Endothelzellwachstumsfaktor (3mg/100 ml ECGF) beigefügt wurde. Die Zellsuspension setzte sich aus Endothelzellen, aber auch Fibroblasten und Perizyten zusammen. Zur Zellseparierung wurde das unterschiedliche Anwachsverhalten der Zelltypen auf Nährmedien genutzt. Dazu wurde die Zellsuspension auf eine mit Gelatine gemäß Tabelle 2.4 beschichtete Zellkulturflasche mit einer Fläche von 25 cm² ausplattiert.

<p>Vorbereitung der Zellkulturflaschen mit Gelatinelösung (0,2 % (w/v) Gelatine in sterilem Wasser) 10minütige Vorinkubation bei Raumtemperatur mit Gelatinelösung (100 µℓ/cm²) und anschließendes Verwerfen der Lösung</p>
<p>Vorbereitung der Zellkulturflaschen mit Kollagen A-Lösung (0,05 % (w/v) Kollagen A in PBS) 60minütige Vorinkubation bei 37°C mit Kollagen A-Lösung (80 µℓ/cm²), anschließendes Verwerfen der Lösung und Waschen mit DPBS</p>

Tabelle 2.4: Vorbereitung der Zellkulturflaschen.

Nach 20-30minütiger Inkubation bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 8% CO₂ wurde der Überstand mit den nicht angewachsenen Zellen auf eine frische ebenfalls mit Gelatine beschichtete Zellkulturflasche (25 cm²) gegeben. Wiederum fand eine 20-30 Minuten dauernde Inkubation unter den oben genannten Bedingungen statt mit sich anschließender Umsetzung des Überstandes auf eine mit Kollagen A gemäß Tabelle 2.4 beschichtete Kulturschale (12,5 cm²), die für mindestens 60 Minuten im Brutschrank vorinkubiert wurde. Der zuletzt beschriebene Schritt wurde ein- oder zweimal wiederholt. Abschließend wurde der letzte Überstand verworfen und die zur Zellseparierung genutzten Kulturflaschen mit frischem Kulturmedium, das Endothelzellwachstumsfaktor (3mg/100 ml ECGF) enthielt, versetzt. Über die nächsten 3-5 Tage wurden die Zellen lichtmikroskopisch kontrolliert. In der Regel ergab sich nach der geschilderten Zelltrennung eine Kulturflasche mit einer einzelligen Endothelzellschicht.

2.1.3 Zellkultivierung

Die Zellkultivierung erfolgte auf mit Gelatine beschichteten Zellkulturschalen (25 cm²) gemäß Tabelle 2.4 im Brutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem CO₂-Gehalt der Luft von 8%. Das Kulturmedium wurde jeden dritten Tag gewechselt und während der ersten 5 Passagen mit Endothelzellwachstumsfaktor (3mg/100ml ECGF) versetzt. Nach Erreichen der mikroskopisch gesicherten Konfluenz wurden die Zellen in DPBS gewaschen, mit 1 ml Trypsin-Lösung (40 µl/cm²) gemäß Tabelle 2.3 für 1-2 Minuten inkubiert und durch leichtes Klopfen vom Schalenboden abgelöst. Nach Inhibierung der Trypsin-Wirkung durch Zugabe von 5 ml Kulturmedium wurde eine 10 Minuten dauernde Zentrifugation der zellhaltigen Lösung bei 100 g durchgeführt. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in frischem Kulturmedium resuspendiert. Die Zellen konnten abhängig von ihrer Passagenzahl („Alter“ der Zellen) in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:8 in der frischen Zellkulturschale ausplattiert werden.

2.2 Isolierung von Kardiomyozyten [23]

Die Herzen wurden gemäß der oben beschriebenen Methode zur Gewinnung von Endothelzellen präpariert und mit Perfusionslösung II gemäß Tabelle 2.5 perfundiert. Nach 5 Minuten der Perfusion mit kalziumfreier Kollagenaselösung II gemäß Tabelle 2.5 wurde die Kalziumkonzentration auf $100 \mu\text{mol}/\ell$ und nach weiteren 2 Minuten auf $200 \mu\text{mol}/\ell$ gesteigert.

Lösungen zur Isolierung von Myozyten	
Standardmedium [<i>pH</i> 7.55]	<i>NaCl</i> 128 mM
	<i>KCl</i> 5.9 mM
	<i>NaH₂PO₄</i> 0.2 mM
	<i>Na₂H₂PO₄</i> 0.8 mM
	<i>MgSO₄</i> 1.4 mM
	HEPES 11.9 mM
	Pyruvat 2 mM
	Glukose 5.5 mM
Perfusionslösung II	Buthandionmonoxim (BDM) 15mM in Standardmedium
Kollagenaselösung II	BDM 15mM
	Kollagenase Typ XI 12000U
	Bovines Serumalbumin fettsäurefrei (BSA faf) 0,7% in 35ml Standardmedium
Schüttellösung	BDM 15mM
	<i>CaCl₂</i> 0.2 mM
	Bovines Serumalbumin (BSA) 1%
	BSA faf 1% in Standardmedium
Sedimentationslösung	BDM 15mM
	<i>CaCl₂</i> 1mM
	BSA 1%
	BSA faf 1% in Standardmedium

Tabelle 2.5: *Lösungen zur Isolierung von Myozyten*

Nach insgesamt 15-20minütiger Perfusion wurden die Herzen aus der Apparatur genommen. In einer sterilen Petrischale wurde das Herz aus dem Perikardbeutel herausgelöst und die Vorhöfe von den Ventrikeln abgetrennt. Die zerteilten Ventrikel wurden in einem Gemisch, das zu gleichen Teilen aus Kollagenaselösung II und Schüttellösung gemäß Tabelle 2.5 bestand, aufgenommen und unter leichtem Schütteln für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Im An-

schluß wurde das Ventrikelmyokard vollständig mechanisch aufgeschlossen und 5 Minuten lang in frischer Schüttellösung gehalten. Während dieser Zeit wurde die Kalziumkonzentration durch Zugabe von Kalziumchlorid von $200 \mu\text{mol}/\ell$ in 8 Schritten auf $1 \text{ mmol}/\ell$ gesteigert. Das Homogenat wurde durch ein Nylonnetz mit einer Maschenweite von $200 \mu\text{m}$ in ein Zentrifugenröhrchen überführt und bei 10 g für 2 Minuten zentrifugiert. Um intakte und geschädigte Myozyten voneinander zu trennen, wurde das lockere Zellpellet, das sich am Boden des Zentrifugenröhrchens gebildet hatte, auf eine Sedimentationslösung gemäß Tabelle 2.5 in einem sich verjüngendem Reagenzglas gegeben. Die Kardiomyozyten, die innerhalb von 3 Minuten sedimentierten, wurden als intakt angenommen. Ein Teil der sedimentierten Kardiomyozyten wurde lichtmikroskopisch kontrolliert, die restlichen Herzmuskelzellen wurden 5 Minuten lang bei 750 g sedimentiert und bis zur RNA-Extraktion in TRIzol-Reagenz bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.3 Tierexperimentelle Techniken

Als Versuchstiere dienten männliche Wistar-Ratten, die zu Versuchsbeginn $212 \pm 7 \text{ g}$ wogen. Sie wurden unter standardisierten Bedingungen (12 Stunden Hell-dunkel-Rhythmus) gehalten, erhielten eine Standarddiät sowie Wasser ad libitum und waren unter ständiger Aufsicht des Tierschutzbeauftragten. Die Trinkwassermengen wurden regelmäßig kontrolliert. Die nichtdiabetischen Tiere tranken ca. $20 \text{ ml}/\text{Tag}$, die diabetischen Tiere etwa $100 \text{ ml}/\text{Tag}$.

2.3.1 Induktion des Diabetes mellitus [24]

Der Diabetes wurde durch eine einmalige intraperitoneale Injektion von $60 \text{ mg}/\text{kg}$ Körpergewicht Streptozotocin (N-(Methylnitosocarbamoyl)-alpha-D-glucosamin) unter leichter Äthernarkose der Tiere induziert. Dazu wurden 100 mg Streptozotocin in $3,5 \text{ ml}$ eines Zitrat-Phosphatpuffers (Natriumzitat $0,05 \text{ M}$, Natriumphosphat $0,1 \text{ M}$, pH 4,5) gelöst und $0,5 \text{ ml}$ dieser Lösung pro 250 g Körpergewicht appliziert. Der Erfolg der Diabetesinduktion wurde durch die Messung der Glukosekonzentration in Urin und Blut mittels Teststreifen (Gluketur-Test und Haemo-Glukotest, Boehringer Mannheim) kontrolliert.

2.3.2 Behandlung der Tiere mit Etomoxir[®]

Etomoxir[®] ist ein Razemat von zwei optisch aktiven Phenoxyalkyloxiran-carboxylsäure-ethylestern und gehört in die Gruppe der Carnitin Palmitoyltransferase I-Inhibitoren, die nach [25] antiketotisch und blutzuckersenkend wirken. Demnach hemmt nur das (+)-Enantiomer und nicht das (-)-Enantiomer das Enzym Carnitin Palmitoyltransferase I (CPT I), das sich gemäß [26] an der inneren Seite der äußeren Mitochondrienmembran befindet und am Transport von langkettigen Fettsäuren vom Zytosol in die Mitochondrienmatrix, dem Ort der β -Oxidation, beteiligt ist. Etomoxir[®] wird, wie in [25] beschrieben, schnell aufgenommen und während des Absorptionsprozesses in seinen pharmakologisch wirksamen Hauptmetaboliten *p*-Chloro-phenoxypropionsäure umgewandelt. In der vorliegenden Arbeit wurde den Versuchstieren das (+)-Enantiomer, Natrium-(R)-(+)-2[6-(4-chlorophenoxy)-hexyl]-oxiran-2-carboxylat, verabreicht.

2.3.2.1 Orale Applikation

Etomoxir[®] wurde in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht täglich im Trinkwasser verabreicht. Die Konzentration der Lösung wurde unter Berücksichtigung der Trinkwassermenge ermittelt. Eine Gruppe von Tieren wurde 10 Tage nach Induktion des Diabetes für 8 Wochen behandelt. Für die Tiere einer zweiten Gruppe begann 8 Wochen nach Gabe des Streptozotocins eine zehntägige Behandlung.

2.3.2.2 Intraperitoneale Applikation

Einer weiteren Gruppe von Tieren wurde das in physiologischer Kochsalzlösung gelöste (60 mg in 15 ml 0,9 %iger NaCl-Lösung) Etomoxir[®] in einer Dosierung von 9 mg/kg Körpergewicht täglich intraperitoneal injiziert. Die Behandlung erfolgte einen Monat nach Induktion des Diabetes für 10 Tage.

2.3.3 Organentnahme

Unmittelbar nach Abschluß der Behandlung wurden die Versuchstiere in Narkoseätherbetäubung sterniotomiert. Die Aorta descendens wurde inzidiert, eine Kanülenspitze vorgeschoben und mit einer Schlaufe befestigt. Nach Eröffnung des rechten Vorhofes und Durchtrennung der Vv. pulmonales wurde das Herz mit PBS gemäß Tabelle B.5 blutleer gespült. Anschließend wurden die Herzen entnommen, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80°C gelagert.

2.4 Bestimmung der Glukose-, Triglyzerid- und D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentration im Serum

Nach Entnahme des Blutes aus der Vena cava inferior wurde Serum durch 10minütige Zentrifugation bei 3000 g und 4°C gewonnen. Glukose und Triglyzeride im Serum wurden im „Klinischen Labor“ des Diabetes-Forschungsinstitutes ermittelt. Die Bestimmungen erfolgten am Auto-Analyzer (Hitachi) mittels der entsprechenden Analytika (Gluco-quant Glucose/HK und Triglyzeride GPO-PAP, Boehringer Mannheim). D-(-)-3-Hydroxybutyrat im Serum wurde nach der 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase-Methode in [27] ermittelt.

2.5 Nachweis und Quantifizierung von Glukosetransporter-Proteinen mittels der Immunoblot-Analyse [28], [29], [30]

Die Immunoblot-Analyse beruht auf der Elektrophorese denaturierter Proteine in einem SDS-Polyacrylamid-Gel, dem Transfer der fraktionierten Proteine auf eine Membran, der Inkubation der Membran mit einem ersten gegen das Ziel-Protein gerichteten Antikörper sowie dem abschließenden Nachweis des ersten Antikörpers mit einem immunologisch wirksamen Reagenz.

2.5.1 Lyse der Myokardzellen [31]

Gemörsertes, tiefgefrorenes Herzgewebe (etwa 100mg) wurde in einem 50 ml -Kunststoffröhrchen eingewogen. Anschließend wurden $15 - 20\text{ ml}$ Homoge-

nisationspuffer gemäß Tabelle 2.6 hinzugegeben, Gewebe und Puffer gemischt und das Gemisch auf Eis gestellt. Die Homogenisation des Gewebes erfolgte mit einem Ultra-Turrax auf Eis dreimal 30 Sekunden lang mit jeweils 30 Sekunden Pause. Nach Abschluß einer weiteren Homogenisation in einem Pottergefäß (15-30 Stöße) wurde das Vollhomogenat 10 Minuten lang bei 9500 rpm (ca. 10800 g) und 4°C zentrifugiert (Sorvall-Zentrifuge, Rotor SS34). Der Überstand wurde in ein Ultrazentrifugenröhrchen dekantiert, während das Pellet in 15-20 ml Homogenisationspuffer gelöst, einer weiteren manuellen Homogenisation in einem Pottergefäß unterzogen und unter denselben Bedingungen wie das Vollhomogenat zentrifugiert wurde.

Der Überstand dieser zweiten Zentrifugation wurde mit dem der ersten vereinigt und zwei Stunden bei 45000 rpm (208000 g) und 4°C zentrifugiert (Beckmann-Ultrazentrifuge, Rotor Ti70). Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Pellet in Tris-EDTA-SDS (TES) 1x-Puffer gelöst und durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Pipettenspitze sowie eine Insulinspritze homogenisiert. Bis zur weiteren Analyse wurde die Probe bei - 20°C gelagert.

Homogenisationspuffer [pH 7,4]	
HEPES 5,96g/ℓ	25mM
EDTA-Lösung [500mM] 8ml/ℓ	4mM
Saccharose 85,5g/ℓ ≈ 8,3% (w/w)	250mM
Aprotinin	1U/ℓ
Benzamidin 3g/ℓ	25mM
PMSF	200μM
Pepstatin A	1μM
Leupeptin	1μM

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des Homogenisationspuffers

2.5.2 Proteinbestimmung mit Bicinchoninsäure (BCA)

Die Proteinkonzentrationsermittlung in den Proben wurde mittels einer modifizierten Lowry-Reaktion durchgeführt, die darauf beruht, daß einige Aminosäuren im alkalischen Milieu Kupferionen aus der zweiwertigen Oxidationsstufe in die einwertige reduzieren. Bicinchoninsäure reagiert mit den einwertigen Kupferionen zu einem farbigen Komplex, dessen Absorption bei 540 nm (Absorptionsmaximum bei 569nm) am Spektralphotometer bestimmt wurde. Bei Annahme einer gleichmäßigen Verteilung der Aminosäuren in den Proben

kann die Proteinkonzentration mittels eines Standardproteins ermittelt werden. Dazu wurde mit Rinderserumalbumin als Standardprotein im Dreifachansatz eine Eichgerade von 0 bis $20\mu\text{g}$ erstellt. Von den zu analysierenden Proben wurden einheitlich drei unterschiedliche Volumina im Doppelansatz abgenommen und mit Wasser auf $100\mu\text{l}$ aufgefüllt, so daß zu jeder Probe zweimal drei Lösungen mit verschiedenen Proteinkonzentrationen erhalten wurden. Nach Zugabe von 2 ml eines Gemisches aus 50 Teilen Bicinchoninsäure-Lösung, die Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Bicinchoninsäure und Natriumtartrat in $0,2\text{ N}$ Natronlauge enthielt, sowie einem Teil Kupfer-II-sulfat-Lösung 4% (w/v) wurden die Proben und die Standards für eine halbe Stunde bei 60°C inkubiert, in kaltem Wasser abgeschreckt und eine Stunde lang auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend erfolgte die Absorptionsmessung am Spektralphotometer bei 540nm und die regressive Ermittlung der Proteinmengen der Proben mit Hilfe der erstellten Eichgeraden.

2.5.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese [32], [33], [34]

SDS-Polyacrylamid-Gele		
Angaben für ein Gel	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung [30% (w/w)] <ul style="list-style-type: none"> • Acrylamid $291\text{g}/\ell$ • Bisacrylamid (N,N'-Ethylenbis-acrylamid) $9\text{g}/\ell$ 	2ml	10ml
4x Gelpuffer [$pH\ 8,8$] <ul style="list-style-type: none"> • Tris $181,8\text{g}/\ell$ • SDS $4\text{g}/\ell$ • Natriumazid $100\text{mg}/\ell$ 	3ml	$7,5\text{ml}$
Wasser	7ml	$12,5\text{ml}$
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	$15\mu\text{l}$	$15\mu\text{l}$
↑ mischen, dann Polymerisationsstart durch Zugabe von		
Ammoniumperoxodisulfat (APS) [20% (w/v)]	$150\mu\text{l}$	$200\mu\text{l}$

Tabelle 2.7: Erstellen der SDS-Polyacrylamid-Gele

Die Glasplatten der Gelkammer wurden mit Aceton gereinigt, um sie von jeglichem Fett zu befreien. Die Apparatur wurde nach Angaben des Herstellers (Hoefer Spacer-Mate) aufgebaut. In einem Becherglas wurden die Bestandteile des zu gießenden Trenngels gemäß der Tabelle 2.7 gemischt.

Nach Zugabe von Ammoniumpersulfat wurde die Acrylamid-Lösung zügig in den Spalt zwischen den beiden Glasplatten gegossen. Um zu verhindern, daß Sauerstoff in das Gel diffundierte und die Polymerisation behinderte, wurde das Gel mit Isobutanol überschichtet. Nach Abschluß der Polymerisation, die in vertikaler Position und bei Raumtemperatur erfolgte, wurde das Isobutanol abgegossen. Der obere Rand des Gels wurde mehrere Male mit Wasser abgespült, um nichtpolymerisiertes Acrylamid zu entfernen, und mit einem Papierhandtuch getrocknet. Anschließend wurde die Sammelgel-Lösung gemäß Tabelle 2.7 in einem Becherglas hergestellt und nach Zugabe von APS zügig zwischen die Glasplatten auf das polymerisierte Trenngel gegossen.

In das noch nicht ausgehärtete Sammelgel wurde ein Gelkamm luftblasenfrei gesteckt. Das Gel wurde in vertikaler Position bei Raumtemperatur gelagert. Die Proben wurden vorbereitet, indem gleiche Proteinmengen (einheitlich 30-50 μg) in ein 1,5 ml-Eppendorfröhrchen gegeben und mit TES 1x - Puffer ad 40 μl aufgefüllt wurden. Weiterhin wurden 40 μl Lämmli 2x-Probenpuffer gemäß Tabelle B.9 und 1 μl Dithiothreitol (DTT) 50 % (w/v) zugegeben. Nach kurzer Zentrifugation in einer Tischzentrifuge wurden die Proben 5 bis 10 Minuten bei 100°C denaturiert. Es folgten eine kurzzeitige Zentrifugation in einer Tischzentrifuge und das Zugabe von 1 μl Dithiothreitol (DTT) 50 % (w/v) zu den Proben. Nach Abschluß der Polymerisation des Gels wurde der Kamm entnommen. Die Geltaschen wurden durch Spülen mit Wasser von nichtpolymerisiertem Acrylamid befreit und mit Laufpuffer 1x gemäß Tabelle 2.8 gefüllt. Anschließend wurden die Proben mit einer Hamilton-Pipette in die Geltaschen eingefüllt und die Geltaschen eventuell

Laufpuffer 10x	
Glycin 144g/ℓ	1,92M
Tris 30,28g/ℓ	25mM
SDS 10g/ℓ	1% (w/v)

Tabelle 2.8: Laufpuffer 10x, ergibt einen pH-Wert je nach Chemikalien zwischen 8,3 und 8,8. Im Anodenraum können SDS und Glycin weggelassen werden, allerdings muß dann der pH-Wert eingestellt werden.

mit der Pipettenspitze begradigt. Die Pipette wurde nach dem Auftragen einer Probe durch mehrmaliges Aufziehen von Wasser gereinigt. Das Gel wurde in die Elektrophoreseapparatur eingespannt und die denaturierten Proteine sowie zusätzlich Proteine mit bekanntem Molekulargewicht wurden über Nacht bei 7 mA pro Gel aufgetrennt. Wenn das in Lämmli 2x-Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das untere Ende des Gels erreichte, wurde die Gelkammer aus der Elektrophoreseapparatur entnommen. Die beiden Glasplatten wurden voneinander mit einem Spatel getrennt. Das Sammelgel wurde verworfen, das Trenngel zurechtgeschnitten und die Gelstücke wurden durch Abschneiden einer Ecke markiert.

2.5.3.1 Färben der SDS-Polyacrylamid-Gele mit Coomassie Brilliant Blue [35]

Nicht geblottete Gelstücke wurden mit 0,1 %igem (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, gelöst in Methanol 50 % (v/v) mit 10 % (v/v) Essigsäure, gefärbt. Entfärbt wurde in derselben Lösung ohne Farbstoff, bis der gewünschte Kontrast erreicht war. Anschließend wurden die Gelstücke in einer Lösung, die 6 % (w/v) Glycerin sowie 20 % (v/v) Methanol enthielt, „getrocknet“ und wahlweise photographiert oder in nasser Zellophanfolie eingeschlagen und in einem Geltrockner für 2 Stunden unter Vakuum und bei 80°C getrocknet. Um ein Brechen des Gels zu verhindern, wurde die Heizung einige Minuten vor Beendigung des Vakuums ausgeschaltet.

2.5.4 Protein-Transfer von SDS-Polyacrylamid-Gelen auf Membranen (Western Blotting) [32]

Die zu blottenden Gele wurden ausgemessen und entsprechende Membranen und Filterpapiere zurechtgeschnitten. Ein Überhängen der Filterpapiere hätte einen Kurzschluß zwischen den Enden der ober- und unterhalb des Gels liegenden Filterpapiere zufolge gehabt und somit den Erfolg des Proteintransfers vom Gel auf die Membran gefährdet. Gele und Membranen wurden in Anodenpuffer 2 gemäß Tabelle 2.9 äquilibriert. Zuvor waren die Membranen mit einer Pinzette durch Methanol gezogen worden. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran, wurde mittels einer Semi-Dry-Blotting-Apparatur (BioRad) durchgeführt.

Dazu wurden auf die mit Anodenpuffer 1 gemäß Tabelle 2.9 befeuchtete Anode aufeinanderfolgend luftblasenfrei (durch Rollen mit einer Glaspipette) sechs in Anodenpuffer 1 getränkte Filterpapiere, drei in Anodenpuffer 2 getränkte Filterpapiere, drei Membranen, das Gel und neun in Kathodenpuffer gemäß Tabelle 2.9 getränkte Filterpapiere gelegt. Die Kathode wurde mit Kathodenpuffer befeuchtet. Das Western Blotting erfolgte elektrophoretisch für eine bis zwei Stunden bei Raumtemperatur und $0,8 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche. Es handelte sich um ein diskontinuierliches Western-Blotting, weil die im Kathodenpuffer vorhandene 6-Aminohexansäure den Transport der niedermolekularen Proteine verlangsamte und auf diese Weise einen gleichmäßigen Transfer von Proteinen aller Molekulargewichte ermöglichte. Nach Abschluß des Transfers wurde die Blotting-Apparatur abgebaut. Die Filterpapiere wurden verworfen.

Das Gel wurde wie zuvor beschrieben ge- bzw. entfärbt, um zu beurteilen, ob der Proteintransfer komplett erfolgt war.

Die unterste, d.h. die der Anode am nächsten gelegene, Membran wurde zweimal in TTBS gemäß Tabelle 2.10 gewaschen und anschließend in TTBS mit India Ink ($100 \mu\ell/100 \text{ ml}$) angefärbt, ebenfalls um den Erfolg des elektrophoretischen Transfers zu beurteilen.

Anodenpuffer 1	
Tris $36,3\text{g}/\ell$	300mM
Methanol	$20\%(\text{v/v})$
Anodenpuffer 2	
Tris $3,03\text{g}/\ell$	25mM
Methanol	$20\%(\text{v/v})$
Kathodenpuffer	
6-Amino-hexansäure $5,2\text{g}/\ell$	40mM
SDS $100\text{mg}/\ell$	$0,01\%$
Methanol	$20\%(\text{v/v})$

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Puffer zum Western Blotting

Tween Tris buffered saline (TTBS) [pH 7,6]	
Tris $2,4\text{g}/\ell$	20mM
Natriumchlorid $8\text{g}/\ell$	137mM
Tween 20	$0,05\%(\text{v/v})$
Kalziumchlorid-dihydrat $294\text{mg}/\ell$	2mM

Tabelle 2.10: Zusammensetzung von Tween Tris buffered saline

2.5.5 Blockieren unspezifischer Bindungsstellen [35]

Die beiden oberen Membranen wurden nach dem Blotten in einer Blockierlösung gemäß Tabelle 2.11 bei Raumtemperatur für 90 Minuten geschüttelt, um mögliche Bindungsstellen abzusättigen, an denen es bei der Inkubation mit den Antisera zu unspezifischen Bindungen kommen könnte.

Blockierlösung	
Phosphat-Natriumchlorid-Puffer (PBS) 1x [pH 7,4]	
Magermilchpulver	10% (w/v)
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitanmonolaureat)	0,05% (v/v)

Tabelle 2.11: Zusammensetzung der Blockierlösung

2.5.6 Inkubation mit dem spezifischem Antikörper [31]

Nach einmaligem Waschen in PBS 1x mit 0,05 % (v/v) Tween 20 wurden die Membranen in jeweils einem 50 ml-Kunststoffröhrchen in PBS 1x, das 10 % Magermilchpulver enthielt, unter ständigem Rotieren auf einem Taumel-Rollen-Mischer über Nacht bei Raumtemperatur mit dem unmarkierten, für das Zielprotein spezifischen Antikörper inkubiert. Dazu wurden die kommerziell erhältlichen Glut1- (Calbiochem; Anti-Glukose Transporter, Ratte (Kaninchen); Katalognummer 400055) im Verhältnis 1:1000 und Glut4-Antikörper (Calbiochem; Anti-Glukose Transporter, Insulin-regulierbar, Ratte (Kaninchen); Katalognummer 400057) im Verhältnis 1:500 verdünnt eingesetzt.

2.5.7 Nachweis des ersten Antikörpers mit ¹²⁵Iod-Protein A [36]

Die Antikörperlösung wurde dekantiert. Im Anschluß wurden die Membranen viermal 15 Minuten lang in PBS 1x mit 0,05% Tween 20 und einmal für 5 Minuten in PBS 1x ohne Tween 20 gewaschen. Die Inkubation der Membranen mit dem radioaktivmarkierten Antikörper (¹²⁵I-Protein A 0,3 μ Ci/ml) erfolgte in PBS 1x, versetzt mit 10 % Magermilchpulver, für 4 Stunden bei Raumtemperatur unter ständigem Rotieren auf dem Taumel-Rollen-Mischer. An-

schließlich wurden die Membranen, um mögliche unspezifische Hintergrundradioaktivität zu reduzieren, in TTBS, dem Tween 20 in einer Endkonzentration von 0,05% zugegeben wurde, gewaschen, solange bis die Strahlung der Waschlösung weniger als 200 *cpm/ml* oder einen konstanten Wert aufwies. Die Membranen wurden zwischen zwei Papiersaugtüchern abgetupft und in Frischhaltefolie eingepackt.

2.5.8 Signalauswertung am Phospho-Imager

Den in einer Photokassette befestigten Membranen wurde anstelle eines Röntgenfilms eine Bildplatte (Screen) aufgelegt. Die Expositionsdauer war abhängig von Signalstärke sowie unspezifischer Hintergrundradioaktivität und lag zwischen 12 und 18 Stunden. Die Quantifizierung erfolgte am Phospho-Imager mittels der mitgelieferten Software.

2.6 Nachweis spezifischer mRNA mittels der Northern Blotting Hybridisierung

Die Northern Blotting Hybridisierung beruht auf der Elektrophorese denaturierter RNA in einem Agarosegel, dem Transfer der fraktionierten RNA auf eine Nylonmembran sowie der abschließenden Hybridisierung der immobilisierten RNA mit einer radioaktiv markierten Probe.

2.6.1 Photometrische Reinheits- und Ausbeutebestimmung von Nukleinsäurelösungen

Mittels der photometrischen Bestimmung der optischen Dichte einer nukleinsäurehaltigen Lösung lassen sich qualitative und quantitative Aussagen über die eingesetzten Nukleotide machen. Nukleotide absorbieren als substituierte Aromaten UV-Licht in einem Wellenlängenbereich von 220 - 320 *nm*. Das Absorptionsmaximum liegt bei 260 *nm*. Die Messung der Nukleinsäurepräparationen, die mit TE-Puffer *pH* 7,6 gemäß der Tabelle B.6 verdünnt wurden, erfolgte an einem Spektralphotometer in einer Quarzküvette bei den Wellenlängen 260, 280 und 325 *nm* gegen einen Pufferleerwert. Selbst bei guter Präparation stimmten der Leerwert und der bei 325 *nm* gemessene Wert nicht

überein. Deshalb wurden die bei 260 und 280 *nm* ermittelten Werten um den bei 325 *nm* gemessenen Wert korrigiert. Die weiteren Berechnungen erfolgten mit den korrigierten Werten.

Das Absorptionsmaximum bei 260 *nm* wurde zur Konzentrationsbestimmung benutzt. Die Extinktionskoeffizienten von RNA und DNA unterschieden sich, da das Absorptionsmaximum von einzelsträngiger Nukleinsäure größer ist als das von doppelsträngiger. Eine Optische Dichte-Einheit (OD) entspricht einer Nukleinsäure-Konzentration von

- 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für Einzelstrang-RNA und
- 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ für Doppelstrang-DNA.

Der Reinheitsfaktor ließ sich über den Quotienten der Absorptionen bei 260 und 280 *nm* bestimmen. Er sollte zumindestens 1,7 - 2,0 betragen.

2.6.2 Extraktion und Reinigung von RNA

Die entnommenen Herzen wurden in PBS 1x gespült, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80°C gelagert. Die Herzen wurden bei - 196 °C Kühlung zu einem feinen Pulver gemörsert, das bis zur weiteren Analytik bei - 80°C gelagert wurde.

2.6.2.1 Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Methode [37]

Das Gewebepulver (ca. 180 *mg*) wurde in 2,4 *ml* Guanidiniumisothiocyanat-Puffer I (GTC-Puffer I) gemäß Tabelle 2.12 aufgenommen und in einem 15 *ml*-Kunststoffröhrchen mit einem Ultra-Turrax dreimal 30 Sekunden lang homogenisiert mit jeweils 30 Sekunden Pause zwischen den Homogenisations-schritten.

Es folgte eine Zentrifugation bei 4°C und 1000 *rpm*. Anschließend wurde das Homogenat auf drei 2*ml*-Eppendorfgefäße verteilt. Dem Homogenat wurde 1/10 Volumen Natriumacetat (2 *M* *pH* 4,0), 1 Volumen mit Wasser abgesättigtes Phenol und 2/5 Volumen Chloroform zugegeben. Die Proben wurden 20 Sekunden lang gemixt und für 15 Minuten auf Eis stehengelassen. Es schloß sich eine 20minütige Zentrifugation an bei 4°C und 10.000 *g*. Die

Guanidiniumisothiocyanat-Puffer I	
Guanidiniumisothiocyanat	100g
steriles Wasser	117,2ml
Natriumacetatpuffer [0,75M, pH 7,0]	7ml
N-Lauroylsarcosin-Lösung [20% (w/v)]	10,6ml
sterilfiltrieren (0,8 μ m) und Zugabe von	
2-Mercaptoethanol	360 μ l/50ml

Tabelle 2.12: Zusammensetzung des Guanidiniumisothiocyanat-Puffers I

wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben. Die Proben wurden gemixt. Nach zweistündiger Präzipitation bei -20°C wurde die RNA 20 Minuten lang bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen. 1000 μl Ethanol 70 % wurden hinzugegeben und die Proben gemixt. Nach einer weiteren 5 Minuten dauernden Zentrifugation bei 7.500 g und 4°C wurden die Überstände abgenommen und die Pellets in 200 μl GTC-Puffer resuspendiert. Dazu wurden die Proben 10 Minuten lang bei 56°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt. Die drei zu einer Herzprobe gehörenden Volumina wurden miteinander vereint und die oben beschriebene RNA-Fällung wiederholt. Nach mindestens zwei Stunden Präzipitation bei -20°C wurde die Probe für 20 Minuten bei 4°C und 10.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 70 %igem Ethanol gewaschen. Nach fünfminütiger Zentrifugation bei 4°C und 7.500 g wurde wiederum der Überstand abgenommen. Das Eppendorfgefäß wurde mit geöffnetem Deckel für 10 Minuten bei Raumtemperatur stehengelassen. Anschließend wurde das Pellet in Wasser gelöst. Dazu wurde die Probe 10minütig bei 56°C inkubiert und dann für 5 Minuten auf Eis gestellt. Bevor die RNA zu je 20 μg aliquotiert und als Ethanolpräzipitat bei -20°C gelagert wurde, erfolgte die Bestimmung der Konzentration und der Qualität der RNA mit Hilfe eines Spektralphotometers.

2.6.2.2 Total RNA Isolation (TRIzol)

Das als Pulver vorliegende Gewebe (etwa 100 mg) wurde in 1000 μl TRIzol-Reagenz aufgenommen und mit einer Eppendorf-Mikropistille homogenisiert. Die Probe wurde 5 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert, um die komplette Dissoziation der Nukleoprotein-Komplexe zu ermöglichen. Nach Zugabe von 200 μl Chloroform wurde das Eppendorfgefäß kräftig für 15 Sekunden mit der Hand geschüttelt und 2-3 Minuten lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die nachfolgende 15 Minuten dauernde Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C trennte das Homogenat in eine untere rote Phenol-Chloroform Phase, eine Interphase und eine farblose obere wässrige Phase. Die RNA befand sich ausschließlich in der wässrigen Phase, dessen Volumen etwa 60 % des Volumens des TRIzol Reagenz ausmachte, in dem das Gewebe homogenisiert worden war. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und 1 Volumen Isopropanol hinzugegeben. Die Probe wurde gemixt und 10 Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte eine 10minütige Zentrifugation bei 12.000 g und 4°C. Das RNA-Präzipitat bildete ein gelartiges Pellet an Seite und Boden des Eppendorfgefäßes. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet in 75 %igem Ethanol gewaschen. Dazu wurden 1000 μl Ethanol 75% in das Eppendorfgefäß gegeben, die Probe gemixt und für 5 Minuten bei 7.500 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde einmal wiederholt. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet 10 Minuten lang luftgetrocknet bei geöffnetem Deckel des Eppendorfgefäßes. Anschließend wurde das Pellet in Wasser durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Pipettenspitze gelöst, die Probe für 10 Minuten bei 56°C inkubiert und für 5 Minuten auf Eis gestellt. Bevor die RNA zu je 20 μg aliquotiert und als Ethanolpräzipitat bei - 20°C gelagert wurde, erfolgte die Bestimmung der Konzentration und der Qualität der RNA mit Hilfe eines Spektralphotometers.

2.6.2.3 Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation [38], [35]

Das pulverisierte Gewebe (etwa 500 mg) wurde in einem 50 ml-Kunststoffröhrchen in 8 ml Guanidiniumisothiocyanat-Puffer II gemäß Tabelle 2.13 aufgenommen und mit einem Ultra-Turrax dreimal 30 Sekunden lang

Guanidiniumisothiocyanat-Puffer II	
Guanidiniumisothiocyanat 94,53g/200ml	4M
Natriumacetat [3M pH 6,0] 1,67ml/200ml	25mM
sterilfiltrieren (0,2µm) und Zugabe von	
2-Mercaptoethanol 1670µl/200ml	120mM

Tabelle 2.13: Zusammensetzung des Guanidiniumisothiocyanat-Puffers II

mit jeweils 30 Sekunden Pause zwischen den einzelnen Schritten homogenisiert. Im Anschluß erfolgte eine 10minütige Zentrifugation bei 1000 g und 4°C, um den bei der Homogenisation entstandenen Schaum zu verringern. In ein Ultrazentrifugenröhrchen wurden 4 ml Cäsiumchloridlösung gemäß Tabelle 2.14 vorgelegt und mit dem Guanidiniumisothiocyanat-Homogenat vorsichtig überschichtet. Nach dem Austarieren mit Guanidiniumisothiocyanat-Puffer erfolgte die Ultrazentrifugation in dem Swingout-Rotor SW 40 für 24 Stunden bei 32.000 rpm und 20°C. Während der Zentrifugation wurden die Zellbestandteile entsprechend ihrer Schwebedichte in den sich bildenden kontinuierlichen Cäsiumchloridgradienten (etwa 1,85 bis etwa 1,6 g/cm³) aufgetrennt. Dabei wurde die RNA pelletiert, während die DNA eine Bande im Cäsiumchlorid bildete. Proteine und Zelltrümmer verbleiben in der GTC-Phase, auf der Oberfläche sammelten sich Lipide und Membrantrümmer.

Die Guanidiniumisothiocyanatphase wurde mit einer Pasteurpipette entfernt und die Ränder des Röhrchens mit einem Wattestäbchen von GTC-Puffer befreit. Nun wurden die ersten

Cäsiumchlorid-Lösung	
Cäsiumchlorid 95,79g/100ml	5,7M
Natriumacetat [3M pH 6,0] 1,67ml/200ml	25mM
sterilfiltrieren (0,2µm)	

Tabelle 2.14: Zusammensetzung der Cäsiumchlorid-Lösung

zwei Milliliter der Cäsiumchloridlösung mit einer frischen Pasteurpipette abgenommen und der Rest der Cäsiumchloridlösung in ein Glasschälchen umgestülpt. Mit einem Wattestäbchen wurden die letzten Tropfen der Cäsiumchloridlösung entfernt. Das Pellet wurde in Natriumacetat (0,3 M pH

6,0) gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. 1 Volumen eines Phenol-Chloroformgemisches (1:1) wurde hinzugegeben und gemixt. Durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 14.000 *rpm* und 4°C wurde die Probe in eine untere Phenol-Chloroform-Phase, eine Interphase und eine obere wässrige Phase, in der sich die RNA ausschließlich befand, getrennt. Die Oberphase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe der 2,5fachen Menge an Ethanol 100 % erfolgte eine mindestens zweistündige Präzipitation der RNA bei - 20°C. Während der anschließenden zehnminütigen Zentrifugation bei 14.000 *rpm* und 4°C bildete die präzipitierte RNA ein Pellet an Seite und Boden des Eppendorfgefäßes. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 75%igem Ethanol gewaschen. Dazu wurden 1000 μl Ethanol 75 % in das Eppendorfgefäß gegeben, die Probe gemixt und 10 Minuten lang bei 14.000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen. Nach 10minütigem Trocknen bei geöffnetem Deckel des Eppendorfgefäßes wurde das Pellet in Wasser gelöst, für 10 Minuten bei 56°C inkubiert und 5 Minuten lang auf Eis gestellt.

2.6.3 Vergleich der RNA-Isolierungsverfahren

Im Vergleich der Methoden zur Isolierung von RNA wurde deutlich, daß die Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Methode nach [37] mit 0,3 bis 1,1 μg RNA pro eingesetztem *mg* Herzgewebe (im Mittel $0,75 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{mg}$) die höchsten Ausbeuten lieferte. Mittels der TRIzol-Methode betrug die Menge an gewonnener RNA zwischen 0,3 und 0,6 μg pro eingesetztem *mg* Herzgewebe ($0,42 \pm 0,05 \mu\text{g}/\text{mg}$), mit der Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation sogar noch weniger. Eine durchgeführte Hybridisierung mit radioaktivmarkierten Oligonukleotiden, die gegen α -MHC- und β -MHC-mRNA gerichtet waren, ergab für die verschiedenen Methoden bei gleicher eingesetzter RNA-Menge ähnliche Signalstärken. Aus diesem Grunde entschied ich mich für die Methode, die die größten Ausbeuten lieferte, die Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Methode, darüberhinaus bedurfte sie mit 1 bis 1,5 Tagen einer geringeren Präparationszeit als die Cäsiumchlorid- Dichtegradientenzentrifugation (1,5 bis 2 Tage).

2.6.4 Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese [35]

Ein RNA-Aliquot, das als Ethanolpräzipitat bei -20°C gelagert worden war, wurde 30 Minuten lang bei 14.000 *rpm* und 4°C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden 1000 μl Ethanol 70 % hinzugegeben und die Probe gemixt.

RNA-Probenpuffer (2000 μl)	
steriles Wasser 630 μl	
deionisiertes Formamid 1000 μl	50% (v/v)
Formaldehydlösung [37%] 350 μl	2,3M
Ethidymbromidlösung [10mg/ml] 20 μl	100 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Tabelle 2.15: Zusammensetzung des RNA-Probenpuffers

Es schloß sich eine 15minütige Zentrifugation bei 14.000 *rpm* und 4°C an. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet 10 Minuten lang luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 15 μl RNA-Probenpuffer gemäß Tabelle 2.15 gelöst, indem die Probe für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend 5 Minuten lang auf Eis gestellt wurde. Dem Probenpuffer wurden 3 μl Blaumarker gemäß Tabelle 2.16 hinzugegeben.

Blaumarker	
Bromphenolblau	0,1% (w/v)
Xylencyanol FF	0,1% (w/v)
Glycerol	30% (v/v)

Tabelle 2.16: Zusammensetzung des Blaumarkers

Formaldehyd-Agarosegel (200ml)	
Agarose 2,4g	1,2% (w/v)
γ -Morpholino-propansulfonsäure (MOPS) 10x 20ml	1x
<ul style="list-style-type: none"> • MOPS (83,72g/l) 400mM • Natriumacetatlösung [3M] (33,3ml/l) 100mM • EDTA-Lösung [500mM] (20ml/l) 10mM 	
steriles Wasser 146ml	
Agarose lösen und abkühlen lassen	
Formaldehydlösung [37%] 34ml	2,3M

Tabelle 2.17: Zusammensetzung des Formaldehyd-Agarosegels

Die RNA wurde in denaturierter Form in einem gemäß Tabelle 2.17 vorbereiteten Formaldehyd- Agarosegel, an das eine Spannung von 25 V angelegt wurde, über Nacht bei 4°C nach ihrer Größe aufgetrennt. Die vollständige Denaturierung der RNA muß gewährleistet sein, da sonst keine lineare Abhängigkeit zwischen der Wanderungsgeschwindigkeit und dem Molekulargewicht der RNA besteht.

2.6.5 Transfer der denaturierten RNA auf die Membran [35]

Nach Ende der elektrophoretischen Auftrennung wurde die RNA unter UV-Licht optisch kontrolliert. Besondere Beachtung galt der Degradation, die sich als Schmier im niedermolekularen Bereich bemerkbar machte. Desweiteren sollten die Banden der 28S- und 18S-ribosomalen RNAs deutlich erkennbar sein. Wünschenswert war ein Intensitätsverhältnis 28S : 18S von etwa 2 (Bild 2.1).

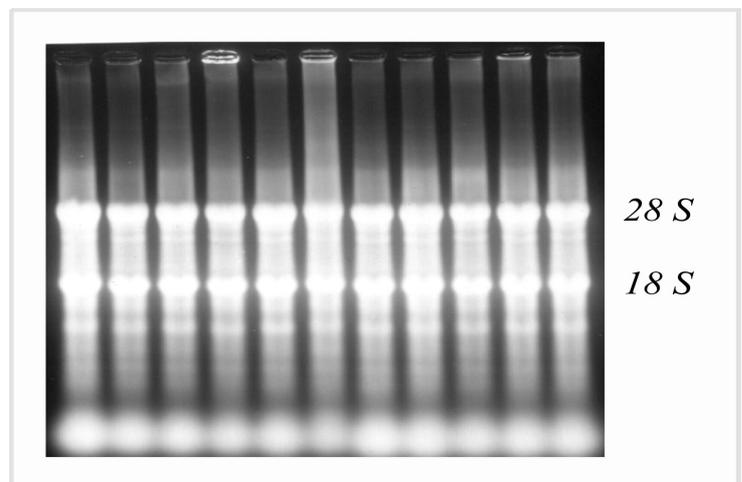


Bild 2.1: Beispiel für das Intensitätsverhältnis der Banden der 28S- und 18S-ribosomalen RNAs. 20 µg Gesamt-RNA pro Bahn wurden in einem Formamid-Formaldehyd-Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert.

Im Anschluß wurde das Gel zurechtgeschnitten und ausgemessen. Dieser Größe entsprechend wurden eine Membran und vier Filterpapiere ausgeschnitten. Es folgte der Aufbau der Blot-Apparatur. Dazu wurde das Gel umgedreht auf einen Träger gelegt. Zwischen Träger und Gel befanden sich ein zurechtgeschnittenes Filterpapier sowie ein zusätzliches Filterpapier, das den gesamten Träger bedeckte und rechts und links des Trägers in jeweils eine mit SSPE 20x-Puffer gemäß Tabelle B.4 gefüllte Glasschale reichte. Das Gel wurde mit einer Plastikfolie umgeben, um ein Übereinanderliegen der ober- und unterhalb des Gels liegenden Filterpapiere zu verhindern. Da ein Kurzschluß den Erfolg des RNA-Transfers erheblich eingeschränkt hätte. Auf das Gel wurde die Mem-

bran und drei in SSPE 20x-Puffer getränkte Filterpapiere gelegt. Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten wurden durch Rollen mit einer Glaspipette verhindert. Um einen kapillaren Sog zu erzeugen, wurde auf die Filterpapiere ein Stapel Papierhandtücher, eine Glasplatte sowie ein Gewicht gelegt, das ungefähr 500 g wog. Auf diese Weise wurde eine Diffusion der RNA aus dem Gel auf die Membran ermöglicht. Der Transfer erfolgte zwischen 24 und 48 Stunden. Naßgewordene Papierhandtücher wurden ausgetauscht. Nach Abschluß des Transfers wurde die Membran gewaschen, um sie von jeglichen Agaroseresten zu befreien. Dazu wurde die Membran in eine mit SSPE 5x-Puffer gefüllte Glasschale gelegt, die 2-5 Minuten lang bei Raumtemperatur in einem Schüttelinkubator hin- und herbewegt wurde. Die Membran wurde zwischen zwei Papiersaugtüchern abgetupft. Um die RNA auf der Nylonmembran zu fixieren, wurde die Membranseite, die die RNA trug, für 5 Minuten UV-Licht ausgesetzt, und anschließend die Membran 2 Stunden lang bei 80°C „gebacken“. Das Gel und die drei Filterpapiere, die der Membran aufgelegt hatten, wurden unter UV-Licht auf verbliebene RNA kontrolliert.

2.6.6 cDNA-Gewinnung

Zum Nachweis von spezifischer mRNA eignet sich DNA, die zu der zu analysierenden mRNA komplementär ist. Dazu wird komplementäre DNA (cDNA), die durch Umschreiben der nachzuweisenden mRNA mittels der Reversen Transkriptase gewonnen wurde, unter Verwendung von Restriktionsendonukleasen in Plasmide eingebaut. Plasmide sind ringförmige doppelhelikale DNA-Moleküle, die Gene für die Inaktivierung von Antibiotika, die Produktion von Toxinen und den Abbau natürlicher Produkte tragen und die sich unabhängig vom Wirtschromosom replizieren. Anschließend wird der Plasmidvektor in die Wirtszelle durch Transformation eingeschleust, die darauf beruht, daß einige Bakterien nackte DNA-Moleküle aus dem Medium aufnehmen, und deren Wirkungsgrad sich durch eine Reihe von Techniken verbessern läßt. Die in dem Plasmid enthaltenen Gene, die Enzyme zum Abbau von Antibiotika exprimieren, helfen die Bakterienzellen zu erkennen, die transformiert worden sind, da in einem Zellmedium, dem ein Selektionsantibiotikum beigegeben wird, nur solche Zellen wachsen, die über die im Plasmid enthaltene Information verfügen. Nach dem Bakterienwachstum, das der Vervielfältigung der

Plasmid-DNA dient, werden die Zellen lysiert und die DNA extrahiert. Um das ursprünglich in das Plasmid eingebaute cDNA-Fragment zu erhalten, wird die DNA mit Restriktionsendonukleasen geschnitten, gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und das interessierende Fragment aus dem Gel eluiert.

2.6.6.1 Präparation und Transformation kompetenter *E.coli* [39]

Bakterien des *E.coli*-Stammes DH5 α wurden zur Transformation von Plasmid-DNA vorbereitet („kompetent“ gemacht), indem sie in 50 ml SOB-Medium gemäß Tabelle 2.18 unter Schütteln bei 250rpm und bei 37°C gehalten wurden, bis sie eine optische Dichte, gemessen bei 600 nm gegen den SOB-Leerwert, von 0,44 bis 0,55 erreichten. Die Bakterien wurden für 10 Minuten auf Eis abgekühlt, in ein gekühltes Zentrifugenröhrchen gegeben und 5 Minuten lang bei 2500rpm und 4°C zentrifugiert (Sorvall Zentrifuge, SS34-Rotor). Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Sediment in 17ml FSB-Lösung gemäß Tabelle 2.19 aufgenommen und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dem Ansatz 140 μ l Stickstoff-begastes DMSO zugegeben und weitere 5 Minuten auf Eis gehalten. Nach Wiederholen der beiden zuletzt beschriebenen Schritte wurden die Bakterien zu jeweils 210 μ l in eisgekühlte Gefäße aliquotiert und langsam bei -70°C eingefroren. Bei dieser Temperatur waren sie mehrere Monate haltbar.

SOB-Medium	
Hefeextrakt 10g/l	1%(w/v)
Trypton 20g/l	2%(w/v)
NaCl 584,4mg/l	10mM
KCl 186,4mg/l	2,5mM
<i>pH</i> 7,5, Autoklavieren und anschließendes steriles Zugeben von	
MgCl ₂ 952,1mg/l	10mM
MgSO ₄ 1,204g/l	10mM

Tabelle 2.18: Zusammensetzung des SOB-Mediums

Nach dem Auftauen der kompetenten Bakterien auf Eis wurde ihnen die Plasmidlösung zugegeben, deren Volumen maximal 5% des Gesamtvolumens ausmachte, und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden sie 90 Sekunden lang bei 42°C gehalten und erneut auf Eis gestellt. 800µl LB-Medium gemäß Tabelle 2.20 wurden zugegeben und die bakterienhaltige Lösung 1 Stunde lang bei 37°C und 250rpm geschüttelt. Es folgte das Ausstreichen der Bakterien auf Agar-Platten, die gemäß Tabelle 2.20 mit dem Selektionsantibiotikum Ampicillin versetzt waren, und eine ca. 12 Stunden dauernde Inkubation. Bakterien, die das Plasmid aufgenommen hatten, synthetisierten das Enzym β-Lactam-Aminohydrolase und waren damit befähigt, das bakterizid wirkende Antibiotikum Ampicillin abzubauen. Nichttransformierte Bakterien hingegen verfügten nicht über dieses Enzym und starben ab. Als Kontrolle diente ein Transformationsansatz ohne Plasmid.

Freeze Stock Buffer (FSB)	
Kaliumacetat 981,4mg/ℓ	10mM
KCl 7,455g/ℓ	100mM
MnCl ₂ * 4H ₂ O 8,906g/ℓ	45mM
CaCl ₂ * 2H ₂ O 1,47g/ℓ	10mM
[Co(NH ₃) ₆]Cl ₃ 802,4mg/ℓ	3mM
Glycerol 100ml/ℓ	10 % (v/v)
pH 6,4, sterilfiltrieren und bei 4°C Lagern	

Tabelle 2.19: Zusammensetzung des Freeze Stock Buffers

Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	
Hefeextrakt 5g/ℓ	0,5% (w/v)
Trypton 10g/ℓ	1% (w/v)
NaCl 10g/ℓ	1% (w/v)
pH 7,5, autoklavieren	
LB-Agar: wie LB-Medium, zusätzlich 15g/ℓ Agar	
Ampicillin-Stocklösung [25mg/ml] steril zugeben 25µg/ml	

Tabelle 2.20: Zusammensetzung des Luria-Bertani-Mediums

2.6.6.2 Extraktion und Reinigung der Plasmid DNA [35], [40]

Nach der Inkubation der ausgestrichenen Agarplatte wurden einige Kolonien in 5ml LB-Medium, dem Ampicillin beigefügt wurde, überführt und etwa 10 Stunden unter Schütteln bei 250rpm und 37°C gehalten. Die Bakterien wurden wiederum ausgestrichen und etwa 12 Stunden in 250ml LB-Medium mit Ampicillin inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch 15minütige Zentrifugation bei 4°C und 6000rpm sedimentiert (Sorvall, SS34-Rotor) und über eine Fertigsäule (QIAGEN-Kit) mit den dazugehörigen Puffern aufgereinigt. Dazu wurden die Bakterien in einer Lösung, die sich aus Tris 50mM, EDTA 10mM sowie RNase A 100mg/ml zusammensetzte und deren pH-Wert 8,0 war, aufgenommen und in einer zweiten Lösung, die NaOH 200mM und SDS 1% (w/v) enthielt, lysiert. Das Detergenz wurde durch Zugabe von Kaliumacetat 3M als schwerlösliches Kaliumsalz gefällt. Anschließend wurde das Lysat 30 Minuten lang bei 4°C und 16000 rpm zentrifugiert (Sorvall SS34) und gefiltert. Das klare Lysat wurde auf die zuvor äquilibrierte Fertigsäule gegeben. Nach zweimaligem Waschen der Fertigsäule mit einer Lösung, die aus NaCl 1M, MOPS 50mM und Ethanol 15% (v/v) bestand, wurde die am Säulenmaterial adsorbierte Plasmid-DNA mit der NaCl 1,25M, Tris 50mM und Ethanol 15% (v/v) enthaltenen Lösung eluiert, mit 0,7 Volumina Isopropanol gefällt und 30 Minuten lang bei 4°C und 15000g zentrifugiert (Sorvall SS34). Nach Abnehmen des Überstandes wurde das Sediment in 70%igem Ethanol gewaschen, erneut für 15 Minuten zentrifugiert und nach Dekantieren des Überstandes luftgetrocknet. Die Plasmid-DNA wurde in sterilem Wasser gelöst und am Spektralphotometer und durch Agarosegel-Elektrophorese bezüglich Konzentration und Reinheit analysiert. Zur Kontrolle der Präparation wurden entsprechend den Herstellerangaben Proben von sämtlichen Arbeitsschritten mit Isopropanol gefällt und gelelektrophoretisch analysiert.

2.6.6.3 Restriktion der Plasmid DNA und Gelelektrophorese der Plasmidfragmente [35], [45]

Die Konzentration und die Qualität der Plasmide wurden spektralphotometrisch bestimmt. Anschließend wurden 5 bis 10 µg Plasmid in einem 20 µl-Ansatz gemäß Tabelle 2.21 mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen in Fragmente zerschnitten. Die Enzymkonzentration sollte 1 Unit Enzym pro µg zu-

schneidende Plasmid-DNA und pro Schnittstelle des Enzyms betragen. Die Restriktionsenzyme waren so zu wählen, daß die erhaltenen Fragmente sich in ihrer Größe unterschieden, um das Fragment, das als Sonde dienen sollte, von den anderen gelelektrophoretisch trennen zu können. Desweiteren mußte der Puffer auf das Enzym abgestimmt sein.

Restriktionsbedingungen				
cDNA	Plasmid-name	Vektor	Restriktion mit	Fragmentgröße
GAPDH	pGAPD	pBR322	Sfi bei 50°C, anschl. Bst EII bei 60°C	1000 bp
ratGlut4	pSM1-1-1	pBbluescript KS+	Eco R1 und Bgl II bei 47°C	1500 bp

Tabelle 2.21: Restriktionsbedingungen [41], [42]

Nach Abschluß der Restriktion wurden 2 μl Blaumarker zu dem 20 μl -Restriktionsansatz gegeben, beides gemischt und in die Geltaschen eines 0,8 %igen Agarosegels (TAE 1x) gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung fand bei 100 V und 50 mA für 30 bis 40 Minuten statt. Anschließend wurde die zu isolierende Fragmentbande mit einem Skalpell unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Mit Hilfe eines Kits und den dazugehörigen Puffern (Jetsorb) wurde die cDNA aus dem Gel eluiert. Prinzip des Kits ist die Zerstörung der Gelmatrix bei 50°C in 7 M Natriumperchlorat-Lösung und die gleichzeitige Adsorbierung der DNA an Silicagelpartikel. Es wurden 300 μl Puffer A1 und 10 μl Jetsorb-Suspension/100 mg Gel in das Eppendorfgefäß gegeben. Die Probe wurde gemixt und bei 50°C für 15 Minuten inkubiert. Während der Inkubation wurde die Probe alle 3 Minuten gemixt. Nach Zentrifugation für 30 Sekunden bei 14.000 g in einer Tischzentrifuge wurde der Überstand verworfen. 300 μl Puffer A1 wurden hinzugegeben, gemixt und ein weiteres Mal zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen, 300 μl Puffer A2 hinzugegeben und ein letztes Mal zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes trocknete das Pellet für 5-10 Minuten an der Luft. Anschließend wurde die DNA mit 30-50 μl TE-Puffer gemäß der Tabelle eluiert. Um die Konzentration der DNA-Lösung abzuschätzen, wurden 1 μl und 4 μl der DNA-Lösung sowie 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng und 150 ng der Plasmid-DNA in einem 0,8 % Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Signalstärken miteinander verglichen.

2.6.7 Prähybridisierung [35]

Die Bedingungen für die Prähybridisierung sowie für die Hybridisierung waren davon abhängig, ob cDNA-Fragmente (mehr als 100 Nukleotide) oder Oligonukleotide (bis 50 Nukleotide) verwendet wurden.

Denhardt's 100x	
Rinderserumalbumin (BSA)	2% (w/v)
Ficoll	2% (w/v)
Polyvinylpyrrolidon	2% (w/v)

Tabelle 2.22: Zusammensetzung des Denhardt's 100x

2.6.7.1 Prähybridisierung mit cDNA-Fragmenten

Die Membran wurde in eine festverschließbare Glasröhre mit der Seite, die die RNA trug, nach innen geschoben und für mindestens zwei Stunden bei 42°C mit Prähybridisierungslösung gemäß Tabelle 2.23 durch ständige Rotation der Glasröhre um die eigene Achse benetzt.

Prähybridisierungslösung für cDNA-Fragmente	
SSPE 20x 7,5ml	5x
Denhardt's 100x 1,5ml	5x
SDS [10% (w/v)] 1,5ml	0,5% (w/v)
Formamid deionisiert 15ml	50%
Wasser 4,5ml	
denaturierte Heringssperma-DNA	100µg/ml

Tabelle 2.23: Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung für cDNA-Fragmente

2.6.7.2 Prähybridisierung mit Oligonukleotiden

Zum Nachweis spezifischer mRNA wurden

- das synthetische 42er Oligonukleotid α -MHC (Myosin Heavy Chain) 3'-GGA CAG GTC GTC TTT CTC GGA GCG GCA ACG GTA GGG TGT TAT-5', das komplementär zu den Nukleotiden 5855-5896 der mRNA (EMBL Accession Nr. X15938, [44]) ist, sowie
- das synthetische 42er Oligonukleotid β -MHC 3'-GAG ATG GGT TGG GAT TCC TAC GGA CAC TTC GGG ACT CTG GAC-5', das komplementär zu den Nukleotiden 5825-5866 der mRNA (EMBL Accession Nr. X15939, [43]) ist, verwendet.

Die Prähybridisierung erfolgte ebenfalls mindestens 2 Stunden lang in dem Hybridisierungsofen, unterschied sich jedoch gemäß Tabelle 2.24 von der für cDNA-Fragmente in der Temperatur (45°C anstatt 42°C) und dem geringeren Gehalt der Prähybridisierungslösung an Formamid (20% anstatt 50%).

Prähybridisierungslösung für Oligonukleotide	
SSPE 20x 7,5ml	5x
Denhardt's 100x 1,5ml	5x
SDS [10% (w/v)] 1,5ml	0,5% (w/v)
Formamid deionisiert 6ml	20%
Wasser 13,5ml	
denaturierte Heringssperma-DNA	100µg/ml

Tabelle 2.24: Zusammensetzung der Prähybridisierungslösung für Oligonukleotide

2.6.8 Radioaktive Markierung der Sonde

Mittels einer radioaktiv markierten Sonde gelingt die autoradiographische Darstellung, an welcher Stelle der Membran die komplementäre DNA mit der nachzuweisenden mRNA hybridisiert. Dazu wird unter Verwendung von Enzymen, wie etwa einer DNA-Polymerase, in die DNA-Sonde ein Nukleotid eingebaut, das ein Radioisotop enthält.

2.6.8.1 Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA [46]

Die durch Restriktion und anschließender Gelelektion gewonnenen doppelsträngigen cDNA-Fragmente wurden unter Verwendung von

- „Random Primern“, einem Gemisch aus Hexanukleotiden, und dem
- Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I

mit $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP gemäß Tabelle 2.25 radioaktiv markiert.

Random Primed DNA-Labeling	
Erstellung der DNA-Lösung 11,5 μl	
<ul style="list-style-type: none"> • DNA 20 – 200ng • H_2O ad 11,5 μl 	
Zugabe von:	
dCTP-Stammlösung [500 μM] 1 μl	25 μM
dGTP-Stammlösung [500 μM] 1 μl	25 μM
dTTP-Stammlösung [500 μM] 1 μl	25 μM
10x Reaktionspuffer (enthält Random Primer) 2 μl	
10 Minuten bei 95 °C inkubieren und anschließend 5 Minuten in Eis abkühlen	
Zugabe von:	
$[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP [3000Ci/mmol, 10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$] 2,5 μl	25 μCi
mit Pipettenspitze mischen	
Zugabe von:	
Klenow DNA-Polymerase 1 μl	10U
mit Pipettenspitze mischen und	
mind. 3 Stunden bei 37°C oder ca. 12 Stunden bei Raumtemperatur inkubieren	

Tabelle 2.25: Random Primed DNA-Labeling

2.6.8.2 5'-Markierung (Endlabeling) von Oligonukleotiden [35]

Zur radioaktiven Markierung mit $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ wurden die synthetischen Oligonukleotide, die über freie 5'-OH-Gruppen verfügten, gemäß Tabelle 2.26 mit dem Enzym Polynukleotid-Kinase inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Ansatz für 5 Minuten auf 90°C erhitzt, um das Enzym durch Denaturieren zu inaktivieren.

5'-Endmarkierung mit Polynukleotid-Kinase
Erstellung der Oligonukleotid-Lösung $12\mu\text{l}$ <ul style="list-style-type: none"> • Oligonukleotide (5'-OH) 30pmol • H_2O ad $12\mu\text{l}$
Zugabe von:
10x Kinase-Puffer $2\mu\text{l}$
$[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ $5\mu\text{l}$ [> 5000Ci/mmol, $10\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, < 10pmol]
Polynukleotid-Kinase [$10\text{U}/\mu\text{l}$] $1\mu\text{l}$
1 Stunden bei 37°C inkubieren

Tabelle 2.26: 5'-Endmarkierung mit Polynukleotid-Kinase

2.6.9 Trennung von nichteingebauten Nukleotiden und radioaktiv markierter DNA [35]

In eine autoklavierte Fertigsäule wurden 2 ml einer Biogel P30-Suspension gegeben. Nach Absetzen des Gels wurde die ausgehärtete Säule dreimal mit 1 ml STE-Puffer pH 8,0 gemäß Tabelle B.6 äquilibriert. Der Ansatz der radioaktiven Markierung wurde mit STE-Puffer pH 8,0 ad $200\mu\text{l}$ aufgefüllt, auf die Säule gegeben und mit demselben Puffer eluiert. Jeweils vier Tropfen wurden in einem $1,5\text{ ml}$ -Eppendorfgefäß aufgefangen. Um eine gute Auftrennung von den nicht eingebauten Nukleotiden und der Sonde zu erhalten, wurden 15-20 Fraktionen gesammelt. Jeweils $2\mu\text{l}$ der aufgefangenen Tropfen wurden entnommen und in ein Szintillationsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 3 ml Szintillationsflüssigkeit und kräftigem Schütteln, wurde die Radioaktivität im Beta-Counter bestimmt. Das Auftragen der erhaltenen Zerfälle pro Minute gegen die Fraktionsnummern in einem Diagramm lieferte zwei Maxima. Das erste, in der Regel das größere, beinhaltet die markierte DNA und das zweite die nicht eingebauten Nukleotide.

2.6.10 Hybridisierung [35]

Die vereinigte, markierte DNA wurde bei 95°C für 10 Minuten denaturiert, auf Eis 5 Minuten lang abgeschreckt und zur Prähybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei Prähybridisierungstemperatur für 16-72 Stunden in einem Hybridisierungssofen mit Agitation.

2.6.11 Waschen der Membran [35]

Um die Hintergrundradioaktivität auf der Membran zu reduzieren und die spezifischen Signale deutlicher hervortreten zu lassen, wurde die Membran nach der Hybridisierung gewaschen. Bei Hybridisierung mit cDNA-Fragmenten wurde zweimal mit SSPE 2x gemäß Tabelle B.4 mit 0,1% (w/v) SDS bei Raumtemperatur und anschließend zweimal mit SSPE 2x mit 0,1 % (w/v) SDS bei 42°C jeweils 15 Minuten lang gewaschen. Bei Hybridisierung mit Oligonukleotiden wurde einmal mit SSPE 5x mit 0,1 % (w/v) SDS bei Raumtemperatur, einmal mit SSPE 2x mit 0,1 % (w/v) SDS bei Raumtemperatur und einmal mit SSPE 2x mit 0,1% (w/v) SDS bei 45°C jeweils 5 Minuten lang gewaschen. War nach diesen Waschschritten die unspezifische Hintergrundradioaktivität noch zu hoch, wurden weitere Waschschrritte durchgeführt, bei denen der Salzgehalt der Waschlösung verringert, die Temperatur erhöht oder die Dauer der Waschschrritte gesteigert wurde. Wurde mit derselben Membran eine zweite Hybridisierung mit einer neuen Sonde durchgeführt, durfte die RNA nicht eintrocknen und die erste Sonde mußte vollständig entfernt werden. Dazu konnte die Membran entweder in Wasser mit 0,1 % (w/v) SDS gekocht werden, oder aber, schonender, für 30 Minuten in 50 % (v/v) Formamid bei 60°C inkubiert werden. Um die Wirksamkeit des Waschens zu überprüfen, wurde der Membran eine Bildplatte aufgelegt. Im Erfolgsfalle durften keine Signale mehr gesehen werden.

2.6.12 Auswertung am Phospho-Imager

Nachdem die Membran zwischen zwei Papiersaugtüchern abgetupft, in Frischhaltefolie geschlagen und in einer Photokassette befestigt worden war, wurde ihr eine Bildplatte (Screen) aufgelegt. Die Expositionsdauer war abhängig von

Signalstärke sowie unspezifischer Hintergrundradioaktivität und lag zwischen 12 und 18 Stunden. Die Quantifizierung erfolgte am Phospho-Imager mittels der mitgelieferten Software.

2.7 Nachweis spezifischer mRNA durch Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) [47], [48], [49]

Die Polymerasekettenreaktion dient dazu, ein DNA-Segment, das zwischen zwei Regionen mit bekannten Sequenzen liegt, zu vervielfältigen. Zum Nachweis von mRNA ist diese vor Durchführung der PCR mit einer DNA-abhängigen RNA-Polymerase in cDNA umzuschreiben.

2.7.1 Extraktion und Reinigung von RNA

Die in [37] vorgestellte Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Methode bietet sich zur RNA-Extraktion an, da sie gleichzeitig Zellen auseinanderbricht und Ribonukleasen inaktiviert. Die im Homogenisationspuffer wirksamen Substanzen sind Guanidiniumisothiocyanat und β -Mercaptoethanol. Das Guanidiniumisothiocyanat inaktiviert wie das β -Mercaptoethanol RNasen, zusätzlich desintigriert Guanidiniumisothiocyanat Zellstrukturen und dissoziiert Nukleoproteinkomplexe. Das TRIzol-Reagenz, eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidiniumisothiocyanat, ist eine Vereinfachung der in [37] entwickelten Methode.

2.7.1.1 Präparation der Endothelzellen (TRIzol)

Die Endothelzellen wurden aus perfundierten Rattenherzen gewonnenen (Abschnitt 2.1, Seite 7) und standardmäßig zellkultiviert (Abschnitt 2.1.3, Seite 11). Nach mikroskopisch gesicherter Konfluenz wurden die Endothelzellen für 1-2 Minuten mit 1 ml Trypsin-Lösung inkubiert und durch leichtes Klopfen vom Schalenboden abgelöst. Um die Wirkung des Trypsins abzustoppen, wurden 5 ml Kulturmedium in die Kulturflasche gegeben. Zur Sedimentierung der Zellen wurde 10minütig bei 4 °C und 100 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in TRIzol-Reagenz aufgenommen und durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml-Insulinspritze homogenisiert. Die Menge an zugefügtem TRIzol-Reagenz war abhängig von der Fläche der

Kulturflasche (1 ml pro 10 cm²), nicht jedoch von der Zellzahl. Die sich nun anschließenden Schritte der RNA-Isolierung unterschieden sich nicht von den bereits in Abschnitt 2.6.2.2 (Seite 25) dargestellten Schritten, so daß von einer erneuten Schilderung abgesehen und an vorherigen Abschnitt verwiesen wird.

2.7.1.2 Präparation der Kardiomyozyten (TRIzol)

Die Kardiomyozyten wurden aus perfundierten Rattenherzen isoliert (Abschnitt 2.2, Seite 12), in TRIzol-Reagenz aufgenommenen und bei -20 °C bis zur weiteren Analyse gelagert. Nach dem Auftauen bei 4 °C wurden sie durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 1 ml-Insulinspritze mechanisch aufgeschlossen. Die RNA-Extraktion erfolgte analog zu der bereits zuvor beschriebenen RNA-Isolierung aus Herzgewebe mittels TRIzol-Reagenz (Abschnitt 2.6.2.2, Seite 25).

2.7.1.3 Präparation des Herzmuskelgewebes [37]

Die RNA-Isolierung aus dem bei -196 °C pulverisiertem Herzmuskelgewebe wurde nach der bereits im Abschnitt 2.6.2.1 (Seite 23) beschriebenen Phenol-Guanidiniumisothiocyanat-Methode durchgeführt.

2.7.2 Reverse Transkription von mRNA [50]

Ein RNA-Aliquot, das als Ethanolpräzipitat bei -20°C gelagert worden war, wurde 30 Minuten lang bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Nach Abnehmen des Überstandes wurden 1000 µl Ethanol 70 % hinzugegeben und die Probe gemixt. Nach einer 15minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wurde der Überstand verworfen und das RNA-Pellet 10 Minuten lang luftgetrocknet. Das Pellet wurde in 30 µl Wasser gelöst, indem die Probe für 10 Minuten bei 65°C inkubiert und anschließend für 5 Minuten auf Eis gestellt wurde. Anschließend erfolgte wie oben beschrieben die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der RNA-Lösung mit Hilfe des Spektralphotometers.

Der Schlüssel zur Herstellung von komplementärer DNA (cDNA) aus RNA ist die Reverse Transkriptase, ein Enzym, das Retroviren der Replikation ihres RNA-Genoms dient. Die Reverse Transkriptase erzeugt in Anwesenheit eines Primers, der an die RNA ankoppelt und über eine freie 3'-OH-Gruppe verfügt, und der vier Desoxyribonukleosidtriphosphaten einen zur eingesetzten RNA-Matrize komplementären DNA-Strang. Das Umschreiben von RNA in cDNA mittels der Reversen Transkriptase kann, wie nachfolgend beschrieben, unter Verwendung verschiedener Primer vorgenommen werden.

2.7.2.1 cDNA-Synthese mit gen-spezifischen Primern

2 μg Gesamt-RNA wurden in ein 0,5 ml-Eppendorfgefäß gegeben und mit Wasser ad 17,75 μl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 3 Minuten bei 70 - 80°C inkubiert, anschließend kurzzeitig bei 14.000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert und auf Eis gestellt. Anschließend wurde zu der Probe 12,25 μl des cDNA-Mastermixes gemäß Tabelle 2.27 hinzugefügt und durch mehrmaliges Aufziehen

3'(antisense) Primer	2,0 μl
5 x First Strand Puffer	6,0 μl
<ul style="list-style-type: none"> • Tris – HCl [pH 8,3] 250 mM • KCl 375 mM • MgCl₂ 15 mM 	
dNTP [10 mM]	1,5 μl
RNasin	0,75 μl
RTase [2U/ μl]	2,0 μl

Tabelle 2.27: Mastermix zur cDNA-Synthese mit 3'(antisense) gen-spezifischen Primern (dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphate; RTase: Reverse Transkriptase; RNasin: RNase Inhibitor).

durch eine Pipettenspitze gemischt. Die Probe wurde für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Die sich daran anschließende 10minütige Inkubation bei 70-80°C diente dazu, die Reverse Transkriptase zu inaktivieren und die Reaktion abzuhalten. Die Probe wurde für 1 Minute bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und bis zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion bei - 80°C gelagert.

2.7.2.2 cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern

2 μg Gesamt-RNA wurden in ein 0,5 ml-Eppendorfgefäß gegeben und mit Wasser ad 8 μl aufgefüllt. Es wurden 2 μl Oligo(dT)-Primer (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) hinzugegeben und der Ansatz durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette gemischt. Die Probe wurde für 5 Minuten bei 60°C inkubiert, anschließend kurzzeitig bei 14.000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um sicherzustellen, daß sich die gesamte Flüssigkeit am Boden des Eppendorfgefäßes befand, und auf Eis gestellt. 30 μl des Mastermixes gemäß Tabelle 2.28 wurden zu dem Ansatz gegeben. Mastermix und Ansatz wurden durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Pipette gemischt und kurzzeitig bei 14.000 rpm und Raumtemperatur in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Es schloß sich eine einstündige Inkubation bei 37°C und darauffolgend eine zehnmünütige Inkubation bei 72°C an. Die Probe wurde für 1 Minute bei 4°C und 14.000 rpm zentrifugiert und bis zur weiteren Analyse bei - 80°C gelagert.

Wasser	11,5 μl
5 x First Strand Puffer	6,0 μl
<ul style="list-style-type: none"> • Tris – HCl [pH 8,3] 250 mM • KCl 375 mM • MgCl₂ 15 mM 	
DTT [0,1 M]	4,0 μl
dNTP [10 mM]	4,0 μl
RNasin	0,5 μl
RTase [2U/ μl]	2,0 μl

Tabelle 2.28: Mastermix zur cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern (DTT: Dithiothreitol; dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphate; RTase: Reverse Transkriptase; RNasin: RNase Inhibitor).

2.7.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) [51]

Da ein Teil der vorliegenden Arbeit die Optimierung der Polymerasekettenreaktion zum spezifischen Nachweis der mRNA zweier in der Entwicklung der Kardiomyopathie bedeutsamen Zellproteine war, erfolgt die ausführliche Darstellung dieses Nachweisverfahrens im Ergebnisteil (Abschnitte 3.5.2, Seite 58 und 3.6.1, Seite 67). Der Vollständigkeit halber wird aber bereits an dieser Stelle der Ablauf der Polymerasekettenreaktion aufgezeigt. 42,5 μl des PCR-Mastermixes gemäß Tabelle 2.29 wurden in ein 0,5 ml-Eppendorfgefäß gegeben, 5 μl cDNA-Template zugefügt und beides gemischt. Bei jeder Po-

lymerasekettenreaktion wurden Negativkontrollen verwendet. Um eine DNA-Verunreinigung des PCR-Mastermixes zu erkennen, wurden anstelle des Templates 5 μl Wasser zugefügt.

Zum Ausschluß einer DNA-Kontamination der in die cDNA-Synthese eingesetzten RNA, wurde nicht umgeschriebene RNA in die Polymerasekettenreaktion eingesetzt. Die Ansätze, einschließlich der Negativkontrollen, wurden mit 50 μl Mineralöl überschichtet, um eine Verdunstung während der Reaktion zu verhindern. Bevor man die Eppendorfgefäße in den Thermocycler stellte, wurden sie kurzzeitig in einer Tischzentrifuge bei 14.000 *rpm* und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Ablauf der PCR stell-

Wasser	16,5 μl
10 x PCR Reaktionspuffer <ul style="list-style-type: none"> • <i>Tris – HCl</i> (pH 8,0) 25 mM • <i>KCl</i> 50 mM • 2-Mercaptoethanol 1 mM • autoklavierte Gelatine 100 $\mu\text{g}/\ell$ • NP-40 0,5 % (w/v) • Tween-20 0,5 % (w/v) 	5,0 μl
<i>MgCl₂</i> -Puffer 25 mM	3,0 μl
dNTP 1,25 mM	8,0 μl
5' sense Primer (GAPDH) 4 μM	2,5 μl
3' antisense Primer (GAPDH) 4 μM	2,5 μl
5' sense Primer ((AT1 oder SERCA) 4 μM	2,5 μl
3' antisense Primer (AT1 oder SERCA) 4 μM	2,5 μl

Tabelle 2.29: Mastermix zur Polymerasekettenreaktion (dNTP: Desoxyribonukleosidtriphosphate; GAPDH: Glyzerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; AT1: Angiotensin II Typ 1-Rezeptor; SERCA: Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase).

te sich wie nachstehend beschrieben dar. Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 94°C für 3 Minuten. Die DNA sollte vollständig denaturiert sein, weil die nur zum Teil voneinandergetrennten DNA-Doppelstränge sehr schnell wieder hybridisiert wären. Dies hätte ein nichteffizientes Annealing und eine Selbsthybridisierung der Oligonukleotide zur Folge gehabt. Während der 10minütigen Inkubation bei 72°C wurden in jedes Eppendorfgefäß 2,5 μl Taq-Polymerase (1 U/ μl) gegeben. Daran schlossen sich die Reaktionszyklen mit einer optimierten Anzahl an (30 Sekunden bei 92°C, 1 Minute bei Hybridisierungstemperatur, 1 Minute bei 72°C). Die Trennung des neu synthetisierten

DNA-Stranges von der Matrize erfolgte bei 92°C. Bei der Annealingtemperatur hybridisierten die Primer mit der DNA. Die Elongation fand bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, statt. Nach Durchlaufen aller Zyklen wurden die Proben bei 72°C für 10 Minuten gehalten, um die vollständige Elongation der PCR-Produkte und die Hybridisierung von komplementären DNA-Einzelsträngen zu gewährleisten. Nach Abschluß der Reaktion wurden die Reaktionsansätze bei 25°C im Thermocycler und nach Entnahme bis zur weiteren Analyse bei 4°C gelagert.

2.7.4 Agarose-Gelelektrophorese [35]

Aus einem Gesamtvolumen von 50 μl wurden 10 μl des PCR-Reaktionsgemisches entnommen, mit 3 μl Blaumarker gemischt und in die Geltaschen eines 2 % (w/v) Agarosegels (TAE 1x mit 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid) gefüllt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte unter Anlegung einer Spannung von 80 V für 50 Minuten. Anschließend wurden die amplifizierten cDNA-Fragmente unter UV-Licht visualisiert und fotografiert (45 Sekunden Belichtungszeit, 30 Sekunden Entwicklungszeit). Die Bildpositive wurden mittels eines Scanners eingelesen und unter Verwendung des Bildverarbeitungssystem Bioimage Whole-Band-Analyzer die erhaltenen Signale ausgewertet.

2.8 Mathematisch-statistische Methoden

Die statistischen Daten wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Zweiseitige p-Werte von $< 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet. In den experimentellen Untersuchungen wurde der Student-t-Test für ungepaarte Stichproben eingesetzt.

3 Ergebnisse

Zur Gewinnung von Erkenntnissen über die Auswirkungen des Diabetes auf die Herzmuskular wurden bei den Versuchstieren ein Diabetes mellitus durch die einmalige Injektion von Streptozotocin induziert. Dabei galt es herauszufinden, inwieweit die Gabe von Etomoxir die im Diabetes beschriebene Kardiomyopathie positiv beeinflusst. Die nachstehenden Ausführungen geben eine detaillierte Übersicht über das gesamte Vorgehen während der Untersuchungen.

3.1 Orale Applikation von Etomoxir[®]

Die Versuchstiergruppen setzten sich aus

- einer nichtbehandelten nichtdiabetischen Kontrollgruppe (n=8),
- einer nichtbehandelten diabetischen Gruppe (n=5),
- einer 8 Wochen lang behandelten nichtdiabetischen Gruppe (n=5),
- einer 8 Wochen lang behandelten diabetischen Gruppe, deren Behandlung 10 Tage nach Induktion des Diabetes begonnen wurde (n=5), und
- einer 10 Tage lang behandelten diabetischen Gruppe, deren Behandlung 8 Wochen nach Induktion des Diabetes begonnen wurde (n=5),

zusammen. Das Medikament wurde den Versuchstieren in Trinkwasser gelöst in einer Konzentration von 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag verabreicht. Mittels dieser Versuchsplanung galt es, zum einem die Auswirkungen des Diabetes auf das Gewichtsverhalten und auf die Serumparameter der Tiere aufzuzeigen, zum anderen die Veränderungen durch eine Behandlung mit Etomoxir[®] zu dokumentieren.

3.1.1 Auswirkungen des Diabetes und der oralen Gabe von Etomoxir[®] auf die Gewichtsparameter

Der diabetische Zustand ging mit einem um 26 % verringerten Körpergewicht und einem um 15 % reduzierten Herzgewicht, bezogen auf die Kontrolle, einher (Tabelle 3.1). Das relative Herzgewicht war im Vergleich mit den gesunden Tieren jedoch um 14 % erhöht. Die Behandlung mit Etomoxir[®] hatte sowohl bei den gesunden als auch bei den diabetischen Tieren eine Zunahme des relativen Herzgewichtes zufolge. Bei den nichtdiabetischen Ratten führte die Gabe der Substanz auch zu einem Anstieg des absoluten Herzgewichtes um 20 % (Tabelle 3.1).

	KG (g)	Δ KG (g)	HG (g)	HG/KG (g/100g)
Kontrolle	411 \pm 12	198 \pm 12	1,13 \pm 0,03	0,28 \pm 0,01
Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir	430 \pm 23	211 \pm 21	1,36 \pm 0,07 #	0,32 \pm 0,01 #
Diabetisch	304 \pm 13 *	81 \pm 9 *	0,97 \pm 0,04*	0,32 \pm 0,01 *
Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir	254 \pm 27	44 \pm 23	0,95 \pm 0,11	0,37 \pm 0,02 §
Diabetisch + 10 T. Etomoxir	249 \pm 20	43 \pm 19	0,80 \pm 0,12	0,32 \pm 0,02

Tabelle 3.1: Auswirkungen des Diabetes und der oralen Gabe von Etomoxir auf die Körper- und Herzgewichte am Tag der Organentnahme. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. (KG: Körpergewicht, HG: Herzgewicht, HG/KG: Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht, Δ KG: Differenz der Körpergewichte gemessen am Tag der Diabetesinduktion und der Organentnahme). * $p < 0,05$: Kontrolle vs. diabetische Tiere, # $p < 0,05$: nichtdiabetische behandelte Tiere vs. Kontrolle, § $p < 0,05$: 8 Wochen lang behandelte diabetische vs. nichtbehandelte diabetische Tiere.

3.1.2 Auswirkungen des Diabetes und der oralen Gabe von Etomoxir[®] auf die Stoffwechsellparameter

Durch Induktion des Diabetes kam es zu einem Anstieg der Glukosekonzentration um 230 % und zu einem Anstieg der D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentration im Serum um nahezu 300 % (Tabelle 3.2). Die Glukose- und Triglyzeridkonzentrationen im Serum waren bei den behandelten nichtdiabetischen Tieren signifikant um 25 % kleiner als bei den Kontrolltieren (Tabelle 3.2). Nach der Behandlung der diabetischen Tiere traten lediglich

geringfügige, nichtsignifikante Veränderungen der Laborparameter auf.

	GK (mg/dℓ)	TG (mg/dℓ)	DHB (μmol/ml)
Kontrolle	275 ± 19	141 ± 9	0,250 ± 0,035
Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir	206 ± 22#	106 ± 11 #	0,210 ± 0,013
Diabetisch	641 ± 21*	116 ± 18	0,700 ± 0,205 *
Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir	573 ± 33	139 ± 52	0,798 ± 0,328
Diabetisch + 10 T. Etomoxir	575 ± 33	111 ± 32	0,847 ± 0,266

Tabelle 3.2: Auswirkungen des Diabetes und der oralen Gabe von Etomoxir auf die Serumparameter am Tag der Organentnahme. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe ± SEM. (GK: Glukosekonzentration, TG: Triglyzeridkonzentration, DHB: D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentration) * $p < 0,05$: Kontrolle vs. diabetische Tiere, # $p < 0,05$: nichtdiabetische behandelte Tiere vs. Kontrolle.

3.1.3 Bewertung der Ergebnisse

Mit dieser Versuchstierreihe waren eindeutige Veränderungen im Diabetes mellitus hinsichtlich der Glukose- und D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentration im Serum nachzuweisen. Unverändert war die Triglyzeridkonzentration im Vergleich mit der Kontrolle. Hingegen war in [52] ein massiver Anstieg der Triglyzeridkonzentration im Serum nach Induktion des SZ-Diabetes zu sehen. Eine signifikante Erniedrigung der Triglyzeridkonzentration unter der Gabe von Etomoxir[®] war lediglich bei den behandelten nichtdiabetischen Ratten nachzuweisen, nicht jedoch bei den diabetischen Tieren. Durch die Behandlung mit Etomoxir[®] wurde wider Erwarten die Konzentration an D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentration im Serum nicht beeinflusst. Da diese Beobachtungen vorausgehenden Untersuchungen wie auch den aufgrund des Wirkungsprofils der Substanz zu erwartenden Veränderungen widersprachen, wurde vermutet, daß die Substanz bei der Applikation nur begrenzt wirksam ist und daß der Unterschied in den Beobachtungen möglicherweise durch die unterschiedlichen Applikationsformen bedingt sind. Aus diesem Grunde wurde eine zweite Versuchsreihe durchgeführt, in der den Tieren das Medikament intraperitoneal injiziert wurde, um auszuschließen, daß die Applikationsform Ursache dafür war, daß die Veränderungen nicht mit dieser Deutlichkeit auftraten wie in [53].

3.2 Intraperitoneale Applikation von Etomoxir[®]

Die Versuchstiergruppen setzten sich aus

- einer nichtbehandelten nichtdiabetischen Kontrollgruppe (n=5),
- einer nichtbehandelten diabetischen Gruppe (n=5),
- einer 10 Tage lang behandelten nichtdiabetischen Gruppe (n=5) und
- einer 10 Tage lang behandelten diabetischen Gruppe, deren Behandlung 4 Wochen nach Induktion des Diabetes begonnen wurde (n=5),

zusammen. Das Medikament wurde den Versuchstieren in der Konzentration von 9 mg/kg Körpergewicht täglich intraperitoneal injiziert.

3.2.1 Einfluß des Diabetes und der intraperitonealen Applikation von Etomoxir[®] auf die Gewichtsparemeter

	KG (g)	HG (g)	HG/KG (g/100g)
Kontrolle	422 ± 2	1,01 ± 0,04	0,24 ± 0,01
Kontrolle + Etomoxir	414 ± 5	1,25 ± 0,07 #	0,30 ± 0,02
Diabetisch	276 ± 16 *	0,74 ± 0,06 *	0,27 ± 0,02
Diabetisch + Etomoxir	251 ± 59	0,80 ± 0,08	0,32 ± 0,03

Tabelle 3.3: Einfluß des Diabetes und der intraperitonealen Applikation von Etomoxir auf die Körper- und Herzgewichte am Tag der Organentnahme. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe ± SEM. (KG: Körpergewicht, HG: Herzgewicht, HG/KG: Herzgewicht bezogen auf das Körpergewicht). * $p < 0,05$: Kontrolle vs. diabetische Tiere, # $p < 0,05$: nichtdiabetische behandelte Tiere vs. Kontrolle.

Das Körpergewicht und das absolute Herzgewicht waren im Diabetes deutlich um 35 % bzw. 26 % erniedrigt (Tabelle 3.3). Die Behandlung der nichtdiabetischen Tiere mit Etomoxir[®] bewirkte eine Zunahme des absoluten und des relativen Herzgewichtes um etwa 25 %. Durch die Verabreichung von Etomoxir[®] wurden bei den diabetischen Ratten weder das Körpergewicht, noch das absolute oder relative Herzgewicht in signifikanter Weise beeinflusst (Tabelle 3.3).

3.2.2 Einfluß des Diabetes und der intraperitonealen Applikation von Etomoxir[®] auf die Stoffwechselfparameter

Die Glukosekonzentration sowie die D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentration im Serum waren im Diabetes um mehr als das 2,5 fache gesteigert (Tabelle 3.4). Die Applikation des Medikamentes hatte sowohl bei den gesunden Tieren als auch bei den diabetischen Tieren einen deutlichen Abfall der Triglyzeridkonzentration im Serum zufolge. In beiden Fällen war er jedoch aufgrund des großen Fehlers nichtsignifikant (Tabelle 3.4). Die Glukose- und die D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentrationen zeigten sich von der Behandlung unbeeinflusst.

	GK (mg/dl)	TG (mg/dl)	DHB ($\mu\text{mol/ml}$)
Kontrolle	270 \pm 25	180 \pm 20	0,228 \pm 0,018
Kontrolle + Etomoxir	260 \pm 20	132 \pm 26	0,208 \pm 0,009
Diabetisch	723 \pm 15 *	174 \pm 42	0,628 \pm 0,023 *
Diabetisch + Etomoxir	779 \pm 58	106 \pm 13	0,895 \pm 0,137

Tabelle 3.4: Einfluß des Diabetes und der intraperitonealen Applikation von Etomoxir auf die Serumparameter am Tag der Organentnahme. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. (GK: Glukosekonzentration, TG: Triglyzeridkonzentration, DHB: D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentration). * $p < 0,05$: Kontrolle vs. diabetische Tiere.

3.2.3 Vergleich der Applikationsformen

Insgesamt zeigte sich in der zweiten Versuchsreihe ein ähnliches Bild wie in der ersten. Die Veränderungen der Gewichts- und Serumparameter schienen unabhängig von der Applikationsform des Medikamentes. Die sich anschließenden Untersuchungen wurden an den Herzen der ersten Versuchsreihe durchgeführt.

3.3 Einfluß von Diabetes und der Behandlung mit Etomoxir[®] auf die Expression der Myosin schwere Ketten-mRNA

Im Diabetes mellitus ist die Kontraktilität der Myokardzellen deutlich eingeschränkt. Die Vermutung, daß diese auf eine Veränderung der kontraktilen Elemente der Zelle zurück zu führen ist, wird dadurch bekräftigt, daß es durch Induktion des Diabetes zu einem Wechsel des aktiveren V1 Myosin Isoenzym zu der weniger aktiven V3 Isoform kommt [54]. Das Myosin-Protein setzt sich aus zwei schweren Ketten (engl.: Myosin Heavy Chain, MHC) und vier leichten Ketten (engl.: Myosin Light Chain, MLC) zusammen. Die schweren Ketten können aus zwei gleichen oder zwei unterschiedlichen Isoformen aufgebaut sein. Abhängig von der Zusammensetzung der schweren Ketten entstehen Myosine mit unterschiedlicher ATPase-Aktivität [55]. Das V1 Myosin Isoenzym, welches sich aus zwei α -Ketten zusammensetzt, hat eine höhere ATPase-Aktivität als die aus zwei β -Ketten bestehende V3 Isoform. Das V2 Myosin Isoenzym verfügt über ein α - und β -Protein und nimmt hinsichtlich seiner Aktivität eine Mittelstellung zwischen den erstgenannten ein [56]. Bei der vorgenommenen Untersuchung galt es zu zeigen, inwieweit die oben beschriebene Verschiebung der Proteine auch mit einer Veränderung der mRNA-Expression einhergeht. Dazu wurden 20 μ g denaturierte RNA gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und die fraktionierte RNA auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde zum einem mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die komplementär zur α -MHC- und β -MHC-mRNA war, zum anderen mit radioaktiv markierter, für die GAPDH-mRNA spezifischer cDNA inkubiert. Abschließend erfolgte die Auswertung der Signale und die Standardisierung der Signale für α -MHC- und β -MHC-mRNA auf die für GAPDH-mRNA. Im Diabetes konnte eine Abnahme der Menge von α -MHC-mRNA um 38 % festgestellt werden (Bild 3.1). Außerdem verringerte sich der Anteil von α -MHC an der Summe von α -MHC- und β -MHC-Transkripten von $51,7 \pm 5,9$ % auf $28,3 \pm 3,4$ % (Tabelle 3.5). Dagegen stiegen die Zahl der β -MHC-Transkripte und der Anteil von β -MHC an der Summe von α -MHC- und β -MHC-Transkripten um das 1,5fache an (Bild 3.1, Tabelle 3.5). Die Menge an α -MHC-mRNA bei den behandelten gesunden

Tieren kann als von der Applikation des Medikamentes unbeeinflusst angesehen werden. Der Anstieg des Anteils von α -MHC an den Gesamttranskripten war durch den Abfall der Menge an β -MHC-mRNA um 35 % bedingt (Bild 3.1).

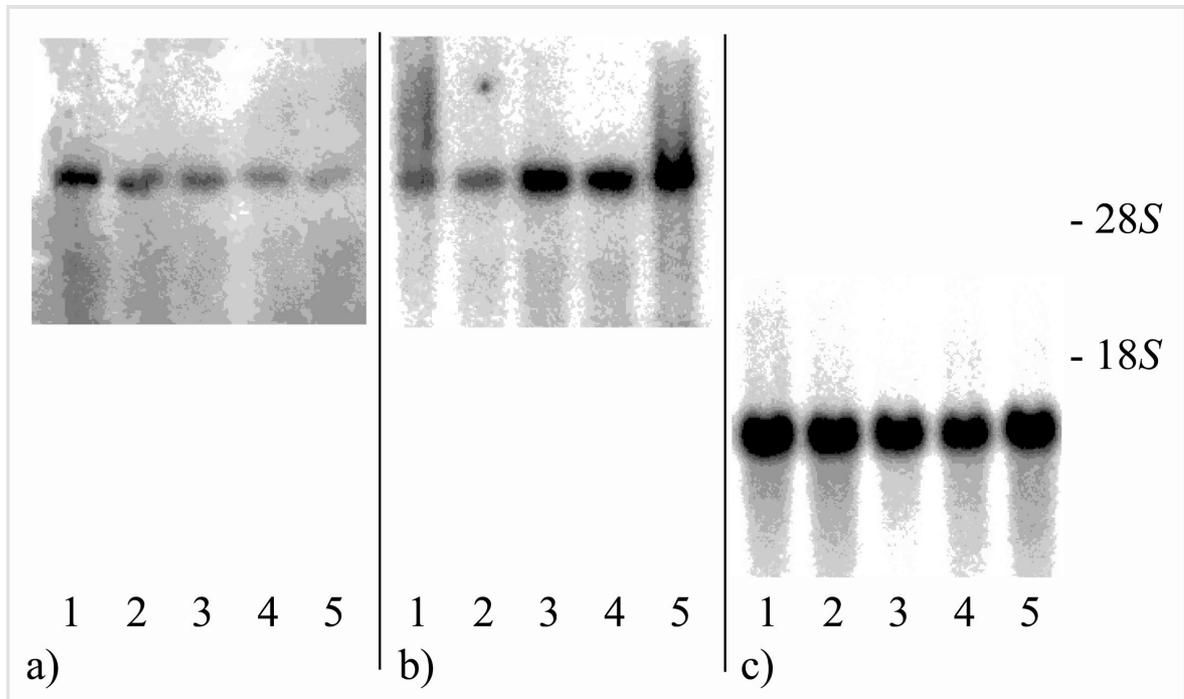


Bild 3.1: Beispiel für die Intensitätsverteilung von α -MHC- (a), β -MHC- (b) und GAPDH- mRNA-Signalen (c) in der Northernblotting Hybridisierung. Zuordnung gemäß Tabelle 3.5; Kontrolle (1), Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir (2), Diabetisch (3), Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir (4) und Diabetisch + 10 T. Etomoxir (5).

Nach Behandlung der gesunden Tiere war die Gesamttranskriptmenge von α -MHC und β -MHC um 15% im Vergleich mit der Kontrolle verringert. Die Gabe von Etomoxir[®] hatte sowohl bei den 10 Tage als auch bei den 8 Wochen lang behandelten diabetischen Tieren eine Zunahme an α -MHC-mRNA um etwa 10 % der Kontrolle sowie einen Anstieg des Anteils von α -MHC an der Gesamttranskriptmenge um 30 % zur Folge (Tabelle 3.5). Die Zahl der Transkripte von β -MHC verringerte sich bei den für 8 Wochen behandelten diabetischen Ratten um 30 %, die bei den 10 Tage lang behandelten nur geringfügig. Aufgrund des großen Fehlers waren die Abnahmen jedoch nicht signifikant. Der Anteil von β -MHC an der Summe von α -MHC- und β -MHC-Transkripten reduzierte sich bei beiden behandelten Gruppen um 14 % (Tabelle 3.5).

	$\frac{\alpha\text{MHC}}{\text{GAPDH}}$ in %	$\frac{\alpha\text{MHC}}{\alpha\text{MHC}+\beta\text{MHC}}$ in %	$\frac{\beta\text{MHC}}{\text{GAPDH}}$ in %	$\frac{\beta\text{MHC}}{\alpha\text{MHC}+\beta\text{MHC}}$ in %	$\alpha\text{MHC}+\beta\text{MHC}$ in %
Kontrolle	100 ± 15	51,7 ± 5,9	100 ± 14	48,3 ± 5,9	100 ± 8
Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir	102 ± 15	65,0 ± 4,8	65 ± 19	35,0 ± 4,8	85 ± 15
Diabetisch	62 ± 13*	28,3 ± 3,4 *	167 ± 21 *	71,7 ± 3,4 *	112 ± 15
Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir	71 ± 10	37,1 ± 3,0 §	127 ± 9	62,9 ± 3,0 §	98 ± 8
Diabetisch + 10 T. Etomoxir	74 ± 13	36,6 ± 10,1	163 ± 38	63,4 ± 10,1	117 ± 13

Tabelle 3.5: Einfluß des Diabetes und der Behandlung mit Etomoxir auf die Signalintensitäten von α -MHC- und β -MHC-mRNA. Nach Agarose-Gelelektrophorese von 20 μg denaturierter Gesamt-RNA und Transfer der fraktionierten RNA auf eine Nylonmembran wurden α -MHC- und β -MHC-mRNA mit für sie spezifischen, radioaktiv markierten Oligonukleotiden und GAPDH-mRNA mit einer für sie spezifischen, radioaktiv markierten cDNA nachgewiesen (Northernblotting Hybridisierung). Die Einzelsignale für α -MHC- und β -MHC-mRNA wurden auf das GAPDH-Signal derselben RNA standardisiert. Zur Bestimmung des Anteils von α -MHC- bzw. β -MHC-mRNA an der Gesamttranskriptmenge wurde der Quotient aus standardisiertem Einzelsignal und der Summe beider standardisierter Einzelsignale gebildet. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe \pm SEM. * $p < 0,05$: Kontrolle vs. diabetische Tiere, § $p < 0,05$: 8 Wochen lang behandelte diabetische vs. nichtbehandelte diabetische Tiere.

3.4 Glukose-Transporter Glut4

Glukose spielt als Energielieferant und Ausgangssubstanz anderer organischer Verbindungen eine bedeutende Rolle im Stoffwechsel. Mittels eines Transportsystems wird sie durch die für sie nicht permeable Plasmamembran in die Zelle geschleust. Die Familie der Glukose-Transporter umfaßt fünf solcher Proteine. Sie unterscheiden sich u.a. in der Gewebeverteilung. Gemeinsam ist ihnen, daß die Glukose entlang ihres chemischen Gradienten, ohne Energie zu verbrauchen, die Plasmamembran passiert. Besondere Bedeutung im Diabetes kommt dem ausschließlich in Muskel- und Fettgewebe vorkommenden Glut4 zu, da dieser auf Insulin reagiert [57]. Unter Insulinstimulation werden im Zytosol der Zelle gespeicherte Glukosetransporter-Proteine zur Zellmembran gebracht und dort zur Glukosebeförderung rekrutiert. Gründe für eine Insulinresistenz im Diabetes, dem Nichtansprechen der Gewebe auf ausreichend vorhandenes Insulin, könnte zum einem eine verringerte Zahl der insulinsensiblen Glukosetransporter und zum anderem eine Störung in der Translokation der Proteine vom Zytosol zur Basalmembran sein [58].

3.4.1 Einfluß von Diabetes und Etomoxir[®] auf Glut4-Protein

Die Glukoseaufnahme in die Herzmuskelzelle und der glykolytische Abbau zum Laktat sind sowohl bei diabetischen Patienten als auch bei streptozotocin-induzierten diabetischen Tieren vermindert [59]. Nicht bekannt ist jedoch, ob die verringerte Aufnahme in das Myokard in Veränderungen des Glukosetransportes oder aber der Glukoseverstoffwechslung innerhalb der Zelle begründet ist. Aus der Familie der Glukosetransporter dominiert im Myokard der Glukosetransporter Glut 4 [60]. In der Tat ist die Glukosetransportaktivität des Sarkolemmes im diabetischen Stoffwechselzustand vermindert [61]. Der Frage, ob für die gezeigte verminderte Aktivität eine Verringerung der Anzahl an Glukosetransporter in der äußeren Zellmembran oder aber eine Funktionsabnahme der Glukosetransporter ursächlich ist, wurde in [61] nachgegangen und eine Reduktion der Menge an Glukosetransporter-Protein im Sarkolemm gezeigt. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zum einen festzustellen, ob der Grund für die verminderte Anzahl an Glukosetransportern im Sarkolemm bei diabetischen Ratten eine Störung der Translokation der im Zellinnern gespeicherten Proteine zur äußeren Membran oder eine insgesamt verminderte Menge an Glukosetransportern in der gesamten Zelle ist, zum anderen, ob Etomoxir[®] Einfluß auf den Glukosetransport nimmt. 40 μg der in der Membranpräparation gewonnenen Proteine wurden gelelektrophoretisch ihrer Größe entsprechend aufgetrennt und mittels einer Blotting-Apparatur auf eine Membran transferiert. Nach der Inkubation der Membran mit einem gegen das Glut4-Protein gerichteten Antiserum und dem Nachweis des ersten spezifischen Antikörpers mit einem zweiten radioaktivmarkierten folgte die Auswertung der Signale. Nach Induktion des Diabetes mellitus verringerte sich die Menge an Transporterprotein um mehr als ein Viertel (Bild 3.2). Die Behandlung mit Etomoxir[®] hatte sowohl bei den

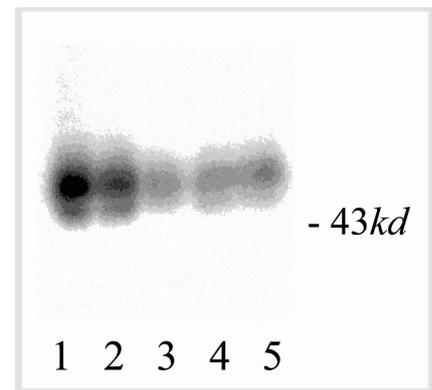


Bild 3.2: Beispiel für die Intensitätsverteilung von Glut4-Proteinsignalen im Immunoblot-Nachweis.

Zuordnung gemäß Tabelle 3.6; Kontrolle (1), Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir (2), Diabetisch (3), Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir (4) und Diabetisch + 10 T. Etomoxir (5).

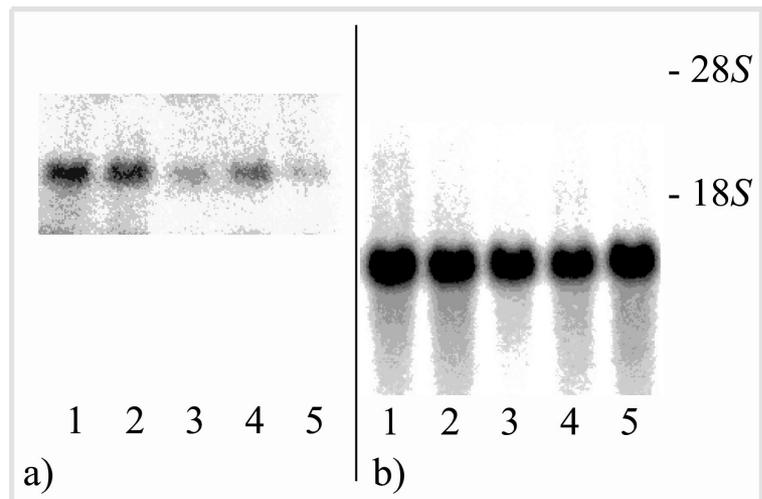
diabetischen als auch bei den gesunden Tieren keinen positiven Einfluß auf die Anzahl von Glukosetransportern. Tatsächlich war sogar eine nichtsignifikante Verringerung zu beobachten (Tabelle 3.6).

Tabelle 3.6: *Einfluß des Diabetes sowie der Behandlung mit Etomoxir auf die Signalintensitäten von Glut4-Protein im Herzen. Gleiche Mengen an Protein (40 µg) wurden einer Immunoblot-Analyse unterzogen. Dazu wurde Glut4-Protein mit einem polyklonalem, für Glut4-Protein spezifischen Antikörper und ¹²⁵I-Protein A nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blotting nachgewiesen. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe ± SEM.*

	Glut4-Protein in %
Kontrolle	100 ± 19,1
Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir	88,0 ± 7,2
Diabetisch	72,6 ± 11,6
Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir	48,9 ± 7,6
Diabetisch + 10 T. Etomoxir	43,5 ± 10,7

3.4.2 Einfluß von Diabetes und Etomoxir[®] auf Glut4-mRNA

Bild 3.3: *Beispiel für die Intensitätsverteilung von Glut4 (a) und GAPDH (b) -mRNA-Signalen in der Northernblotting Hybridisierung. Zuordnung gemäß Tabelle 3.7; Kontrolle (1), Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir (2), Diabetisch (3), Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir (4) und Diabetisch + 10 T. Etomoxir (5).*



Nachdem gezeigt wurde, daß im Diabetes die Menge an Glut4-Protein in der gesamten Zelle reduziert ist, stellte sich die Frage, ob diese Verminderung in einem vermehrten Abbau des Proteins und in einer verminderten Expression der mRNA und somit einer eingeschränkten Synthese begründet ist. Zur Beantwortung der Frage, ob die dargestellten Veränderungen bezüglich des Transporter-Proteins auch mit solchen der mRNA einhergehen, wurden 20 µg denaturierte RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Membran wurde zum einem mit radioaktiv markierter cDNA, die komplementär zur Glut4-mRNA war, zum anderen mit radioaktiv

markierter, für die GAPDH-mRNA spezifischer cDNA inkubiert. Abschließend erfolgte die Auswertung der Signale und die Standardisierung der Signale für Glut4-mRNA auf die für GAPDH-mRNA.

Tabelle 3.7: *Einfluß des Diabetes sowie der Behandlung mit Etomoxir auf die Signalintensitäten von Glut4-mRNA-Signalen. Nach Agarose-Gelelektrophorese von 20 µg Gesamt-RNA und Transfer auf eine Nylonmembran wurden Glut4-*

	Glut4-mRNA in %
Kontrolle	100 ± 19
Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir	101 ± 13
Diabetisch	55 ± 8,5*
Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir	64 ± 9
Diabetisch + 10 T. Etomoxir	68 ± 8

*mRNA und GAPDH-mRNA mit für sie spezifischen, radioaktiv markierten cDNAs nachgewiesen (Northernblotting Hybridisierung). Das Einzelsignal für Glut4-mRNA wurde auf das GAPDH-Signal derselben RNA standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe ± SEM. * $p < 0,05$: Kontrolle vs. diabetische Tiere*

Die Transkriptmenge von Glut4 betrug im diabetischen Zustand nahezu nur die Hälfte (Bild 3.3). Die Behandlung der gesunden Tiere ließ die Zahl der Transkripte unbeeinflusst. Nach der Applikation von Etomoxir[®] konnte bei den diabetischen Tieren ein leichter, wegen des großen Fehlers jedoch nichtsignifikanter, Anstieg an Glut4-mRNA beobachtet werden (Tabelle 3.7).

3.5 Angiotensin II Typ 1-Rezeptor

Die häufige Anwendung von ACE-Hemmern und neuerdings auch Angiotensin II-Rezeptorenblockern bei kardiovaskulären Erkrankungen unterstreicht den großen Einfluß des Renin-Angiotensin-Systems auf Herz und Gefäße [62]. Ausgangspunkt der Renin-Angiotensin-Kaskade ist das in der Leber gebildete Angiotensinogen. Dieses wird durch das in der Macula densa produzierte Enzym Renin zum Angiotensin I hydrolysiert. Es schließt sich eine Spaltung durch das überwiegend endothelständige Angiotensin I-Konversionsenzym (ACE) zum Angiotensin II an, der eigentlich physiologisch wirksamen Substanz [63]. Angiotensin II entfaltet seine Wirkung zum einen indirekt über die Stimulierung der Aldosteronausschüttung aus der Nebennierenrinde und zum anderen direkt über Angiotensin II-Rezeptoren [64]. Mit dem Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT1-Rezeptor) und dem Angiotensin II Typ 2-Rezeptor

(AT₂-Rezeptor) lassen sich zumindestens zwei Rezeptor-Subtypen unterscheiden [65]. Die meisten Effekte des Angiotensin II, wie beispielsweise Erhöhung von Blutdruck und extrazellulärem Volumen sowie vermehrte Zellproliferation, werden über den AT₁-Rezeptor vermittelt.

3.5.1 Auswirkungen von Diabetes und Etomoxir[®] auf die Expression von Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA im Herzen

Im Diabetes kommt es zu pathologischen Veränderungen der Herzmuskelzellen, die nicht durch die Risikofaktoren Atherosklerose, Hyperlipidämie oder arterieller Hypertonie zu erklären sind, die aber über das Renin-Angiotensin-System positiv zu beeinflussen sind. Nach [66] läßt sich durch die Hemmung des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors die im diabetischen Stoffwechselzustand auftretende Reduzierung der Glukosetransporter 4-Proteine, und somit die insbesondere unter Belastung auftretende Einschränkung der Glukoseutilisation, verhindern. Die nachfolgend beschriebenen Experimente wurden unter der Fragestellung durchgeführt, ob sich die vermehrte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems im Diabetes durch die vermehrte Expression von AT₁-Rezeptor-mRNA erklären läßt und inwieweit die Behandlung mit Etomoxir[®] die Synthese des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors beeinflußt. Die Anwendung der Northernblotting Hybridisierung war in diesem Fall wegen der erwarteten, geringen mRNA-Mengen an dem Angiotensin II Typ 1-Rezeptor problematisch [67], so daß an dieser Stelle der Nachweis der mRNA mit Hilfe des im nachstehenden Abschnitt 3.5.2 aufgezeigten Verfahrens, der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), erfolgte.

3.5.2 Optimierung der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Wie schon zuvor angedeutet, war wegen der erwartet geringen myokardialen mRNA-Mengen an Angiotensin II Typ 1-Rezeptor der Nachweis durch die Northernblotting Hybridisierung schwierig. Aus diesem Grunde wurde eine Optimierung der Polymerasekettenreaktion für den Nachweis von mRNA des AT1-Rezeptors vorgenommen.

3.5.2.1 Wirkungsweise der Polymerasekettenreaktion

Das Prinzip der Polymerasekettenreaktion entspricht dem der DNA-Replikation in der Zelle. Als Ausgangsmaterial dient ein doppelsträngiges DNA-Stück, das unter Hitzeeinwirkung zu zwei Einzelsträngen denaturiert wird. Nun koppeln zwei synthetisch hergestellte Primer, die aus den flankierenden Bereichen der Matrize abgeleitet sind und somit die gesuchte Sequenz einrahmen, an den Einzelstrang an und hybridisieren mit ihm. Sie dienen als Starter der DNA-Polymerase, die in Anwesenheit der Desoxynukleotide dATP, dCTP, dGTP und cTTP einen zur Matrize komplementären Strang synthetisiert. Benötigt werden also eine DNA-Matrize, eine DNA-Polymerase, Desoxynukleotide, zwei Primer (synthetisierte Oligonukleotide) und ein Puffersystem, das die Reaktion ermöglicht. Werden Denaturierung, Hybridisierung (Annealing) und Polymerisation wiederholt, verdoppelt sich jeweils die Ausgangsmenge an DNA und es ist eine exponentielle Zunahme zu beobachten.

3.5.2.2 Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

Die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) unterscheidet sich grundsätzlich nicht von der oben beschriebenen Polymerasekettenreaktion, ihr ist lediglich ein Schritt vorangestellt. Als Ausgangsmaterial dient nicht DNA, sondern RNA. Anhand von dieser RNA-Matrize wird mit Hilfe eines Enzyms, der Reversen Transkriptase, eine komplementärer DNA (cDNA) erstellt und anschließend, wie oben beschriebenen, die gesuchte DNA-Sequenz amplifiziert.

3.5.2.3 Reverse Transkription, Methodenvergleich

Wurde die cDNA als Template in die Polymerasekettenreaktion eingesetzt, so zeigte sich, daß mit der, die mit Oligo(dT)-Primern synthetisiert worden war, spezifischere PCR-Produkte zu erhalten waren als bei Verwendung der mit 3'(antisense) gen-spezifischen Primern hergestellten cDNA-Matrize (Bild 3.4). Aus diesem Grunde wurde in den nachfolgenden Analysen die cDNA-Synthese mit Oligo(dT)-Primern durchgeführt.

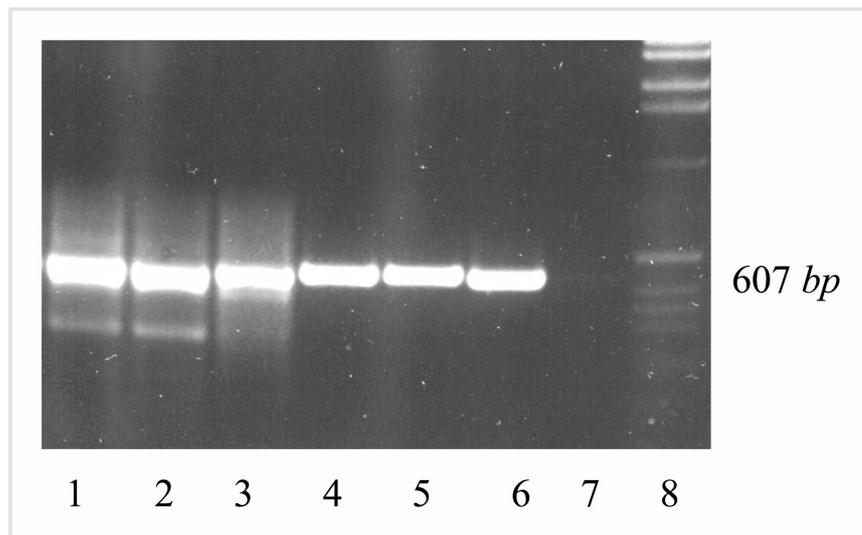


Bild 3.4: Gegenüberstellung der Ergebnisse nach Durchführung der PCR mit cDNA, die mit 3'(antisense) Primern erstellt wurde (1-3), und nach Durchführung der PCR mit cDNA, die mit Oligo(dT)-Primern synthetisiert wurde (4-6), Negativkontrolle (7) und Marker 100 bp (8). Nach der Reversen Transkription von 2 µg Gesamt-RNA mit 3'(antisense) Primern sowie mit Oligo(dT)-Primern wurde die für den AT1-Rezeptor spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 607 bp) der resultierenden cDNA mittels der PCR amplifiziert. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte und Sichtbarmachung unter UV-Licht.

3.5.2.4 Primer

Der Erfolg der Polymerasekettenreaktion ist ganz entscheidend von der Primerwahl abhängig, da Primerlänge und Basenzusammensetzung die Hybridisierungstemperatur beeinflussen. Die synthetisierten Oligonukleotide sollten zwischen 22 und 30 Basen lang sein und sollten sich in A/T- und G/C-Gehalt nicht unterscheiden, damit die optimale Hybridisierungstemperatur der beiden Primer ähnlich ist. Hier wurden zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion

tion die nachstehend angegebenen Primer-Sequenzen verwendet. Das Primer-Paar

1. sense 5'-GGAAACAGCTTGGTGGTG-3' und
antisense 5'-GCACAATCGCCATAATTATCC-3'

wurde nach dem in [68] sowie in [69] zu findenden Sequenzen entworfen und lieferte nach [71] ein für den Angiotensin II Typ 1 -Rezeptor spezifisches Produkt mit einer Länge von 607 *bp* und das Primer-Paar

2. sense 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' und
antisense 5'-AGATCCACAACGGATACATT-3'

wurde nach dem in [70] zu findenden Sequenzen entworfen und lieferte nach [72] ein für die Glyzerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase spezifisches Produkt mit einer Länge von 307 *bp*.

3.5.2.5 Annealingtemperatur

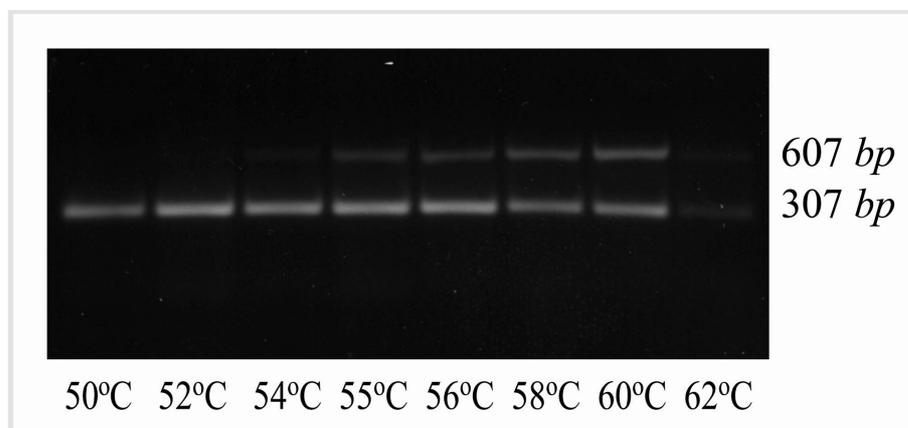


Bild 3.5: Einfluß der Annealingtemperatur auf die Signalstärke bei der PCR. 2 μ g Gesamt-RNA wurden mit Oligo(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben, die für den AT1-Rezeptor spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 607 *bp*) und die für den internen Standard GAPDH spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 307 *bp*) der resultierenden cDNA mittels der PCR amplifiziert, die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht photographiert.

Unter der Annealingtemperatur versteht man die Temperatur, bei der die Primer spezifisch an die DNA-Matrize ankoppeln und mit ihr hybridisieren. Sie wird ganz entscheidend von Länge, Basenzusammensetzung und Konzentration der Oligonukleotide beeinflusst. In der Tat ist die Annealingtemperatur

der kritischste Faktor der Polymerasekettenreaktion. Denn, ist sie zu hoch, findet keine Primerhybridisierung statt, ist sie zu niedrig, steigt die Zahl unspezifischer Hybridisierungen und somit unspezifischer PCR-Produkte deutlich an. Zur Optimierung der Hybridisierungstemperatur wurde sie variiert unter sonst gleichen Bedingungen. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und unter UV-Licht visualisiert und photographiert (Bild 3.5). Mit 60°C wurde für die folgenden Experimente die höchstmögliche Hybridisierungstemperatur gewählt, bei der noch ein deutliches Signal erhalten wurde.

3.5.2.6 Zyklenzahl

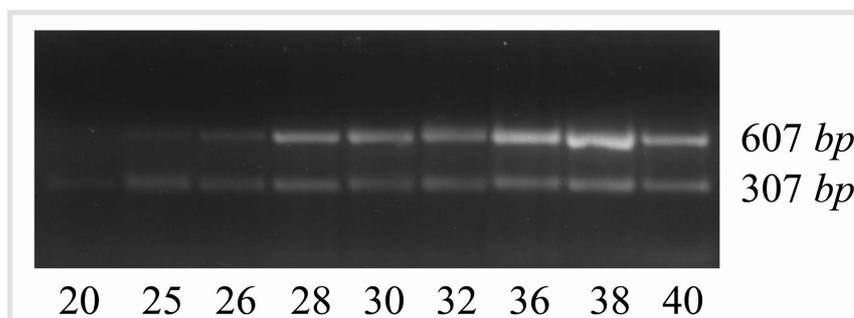


Bild 3.6: Einfluß der Zyklenzahl auf die Menge an DNA, die mit der PCR synthetisiert wurde. Nach der Reversen Transkription von 2 µg Gesamt-RNA mit Oligo(dT)-Primern wurde die für den AT1-Rezeptor spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 607 bp) und die für den internen Standard GAPDH spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 307 bp) der resultierenden cDNA mittels der PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht photographiert und am Densitometer ausgewertet.

Die PCR ist definitionsgemäß eine Kettenreaktion. Die Produkte eines Amplifikationszyklus dienen als Matrizen für den nächsten. Die Menge an PCR-Produkt vermehrt sich also exponentiell, jedoch nur theoretisch. Experimentell zeigt sich, daß die DNA-Menge anfangs in der Tat exponentiell zunimmt, nach einer gewissen Zyklenzahl wird die Zunahme jedoch geringer bis sie letztendlich stagniert (Plateau-Effekt). Aufgrund dieses Plateau-Effektes wird keine wesentliche Erhöhung der Ausbeute erzielt, sondern eher eine Zunahme der Menge und Komplexität unspezifischer Nebenprodukte erreicht. Desweiteren besteht die Gefahr, daß bei sehr großer Zyklenzahl Unterschiede zwischen verschiedenen Proben nivelliert werden. Um Aufschluß über die Abhängigkeit der Ausbeute an PCR-Produkt von der Zyklenzahl zu gewin-

nen, wurden PCR-Reaktionen mit unterschiedlichen Zyklenzahlen und sonst gleichen Bedingungen durchgeführt (Bild 3.6). Anschließend wurden die Signale der PCR-Produkte am Densitometer ausgewertet und deren Werte gegen die jeweilige Zyklenzahl in einem Diagramm eingetragen. Die nachfolgenden Untersuchungen wurden bei einer Zyklenzahl von 30 durchgeführt, da sie eine ausreichende DNA-Menge lieferte und in dem Bereich lag, in dem die Zunahme an PCR-Produkten exponentiell war.

3.5.2.7 Interner Standard

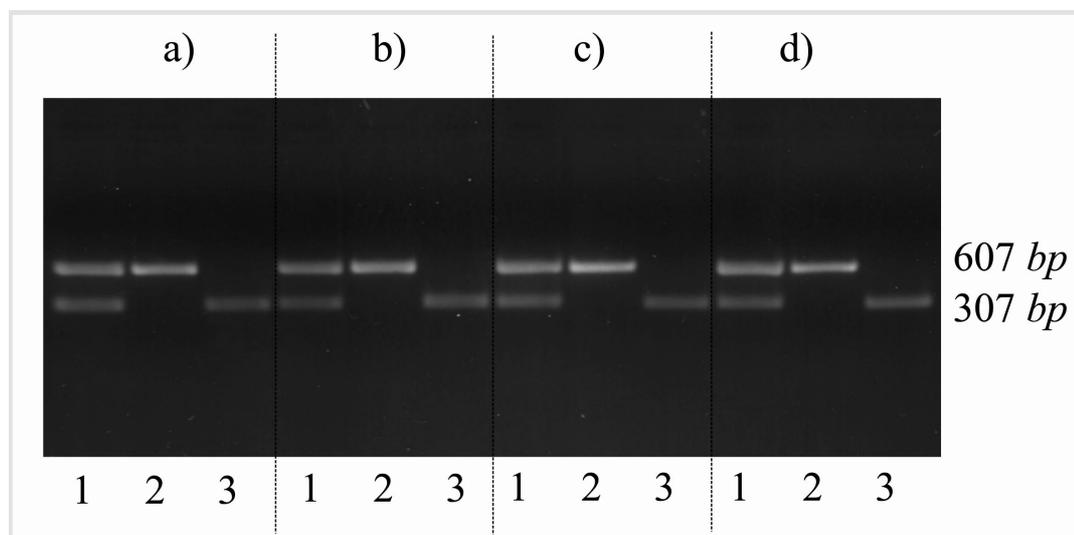


Bild 3.7: Gegenüberstellung der Signalintensitäten nach Durchführung der RT-PCR. Nach der Reversen Transkription von 2 μg Gesamt-RNA mit Oligo(dT)-Primern wurde die resultierende cDNA in vier unabhängigen Reaktionen (a)-(d) genutzt, um in einem gemeinsamen Ansatz die für den AT1-Rezeptor spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 607 bp) und die für den internen Standard GAPDH spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 307 bp) (1) sowie in getrennten Ansätzen die für den AT1-Rezeptor spezifische Sequenz (2) und die für den internen Standard GAPDH spezifische Sequenz (3) der resultierenden cDNA zu vervielfältigen. Anschließend wurden die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht photographiert und am Densitometer ausgewertet.

Die Menge an Produkt kann von PCR-Reaktion zu PCR-Reaktion unterschiedlich sein, obwohl zur Amplifikation dieselbe cDNA eingesetzt, gleiche Zyklenzahl und gleiche experimentelle Bedingungen gewählt, sogar ein PCR-Mastermix verwendet werden („tube-to-tube variation“). Um diesen Unterschieden herrzuwerden, wurde mit der Glyzerinaldehyd-3-phosphat-

Dehydrogenase (GAPDH), einem Enzym der Glykolyse, ein interner Standard benutzt. Ein zweites genspezifisches Primerpaar ermöglicht die Amplifikation dieses Fragmentes, das als endogener Standard dient, entweder in einer zweiten PCR-Reaktion oder in derselben Reaktion, in der die eigentlich gesuchte Sequenz vervielfältigt wird. Durch Amplifikation von Ziel-mRNA und Standard-mRNA in einer Reaktion wird zwar „tube-to-tube variation“ umgangen, es beinhaltet jedoch die Gefahr, daß sich die Primerpaare gegenseitig beeinflussen.

Zur Abschätzung der Primerinterferenz wurde nach der Reversen Transkription von 2 μg Gesamt-RNA mit Oligo(dT)-Primern die resultierende cDNA in vier unabhängigen Reaktionen genutzt, um in einem gemeinsamen Ansatz Ziel- und Standard-Sequenz sowie in getrennten Ansätzen die für AT1 und für GAPDH spezifischen Sequenzen zu vervielfältigen. Die Auswertung der Signale am Densitometer, die in Bild 3.7 dargestellt sind, ergab, daß die Produktmenge für den Angiotensinrezeptor in dem getrennten Ansatz gegenüber dem gemeinsamen geringfügig erhöht war ($100 \pm 5,53 \%$ vs. $89,27 \pm 5,56 \%$), während bei der Produktmenge für GAPDH kaum einen Unterschied gesehen wurde (gemeinsamer Ansatz $44,95 \pm 4,08 \%$, getrennter Ansatz $43,20 \pm 2,57\%$). Daraus wurde geschlossen, daß eine Primerinterferenz zu vernachlässigen ist, zumal der beobachtete minimale Unterschied aufgrund des großen Fehlers nicht das Signifikanzniveau erreichte. Wegen der oben genannten Vorteile wurden bei den folgenden Polymerasekettenreaktionen Ziel- und Standardsequenz gemeinsam in einer Reaktion amplifiziert.

3.5.2.8 Parameter der optimierten Polymerasekettenreaktion

Nach der oben beschriebenen Optimierung der einzelnen PCR-Parameter vollzog sich die Polymerasekettenreaktion über

1. 3 Minuten bei 94°C zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen,
2. 10 Minuten bei 72°C unter Zugabe von $2,5 \mu\text{l}$ Taq-Polymerase ($1 \text{ U}/\mu\text{l}$),
3. 30maliges Durchlaufen eines PCR-Zyklusses über

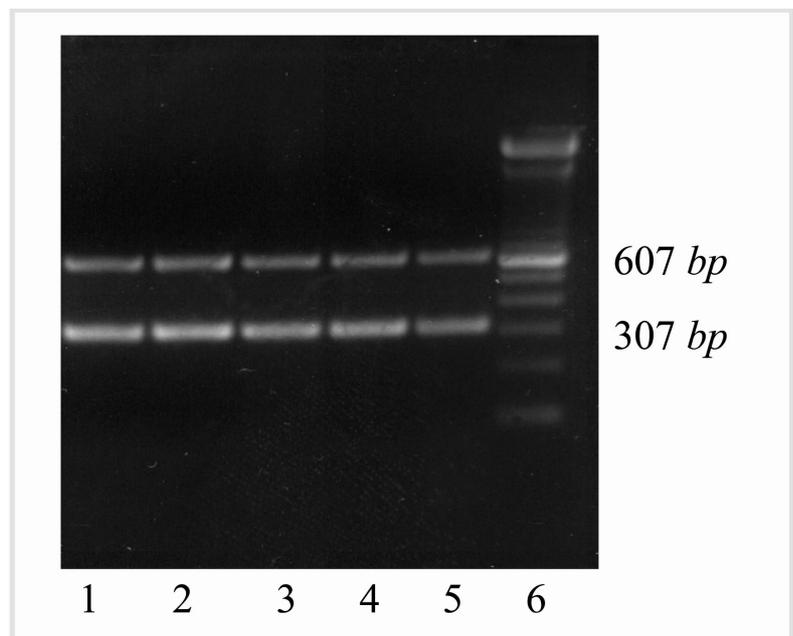
- (a) 30 Sekunden bei 92°C zur Trennung der neusynthetisierten DNA-Stränge von den Matrizen,
 - (b) 1 Minute bei 60°C zur Hybridisierung der Primer mit der Matrize sowie
 - (c) 1 Minute bei 72°C zur Polymerisation,
4. 10 Minuten bei 72°C und
 5. bis zur Entnahme der Proben bei 25°C .

3.5.3 Ergebnisse durch Anwendung der optimierten Polymerasekettenreaktion

In den durchgeführten Versuchen wurden sowohl die Auswirkungen des Diabetes und der Gabe von Etomoxir auf die Expression der AT1-Rezeptor-mRNA im Herzmuskelgewebe als auch die Expression der AT1-Rezeptor-mRNA in isolierten Kardiomyozyten und Endothelzellen untersucht.

3.5.3.1 Expression der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA in Herzmuskelgewebe

Bild 3.8: Beispiel für die Intensitätsverteilung von Signalen der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA (vermutete Transkriptgröße 607 bp) und von Signalen der mRNA des internen Standards GAPDH (vermutete Transkriptgröße 307 bp) in der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion. Zuordnung gemäß Tabelle 3.8; Diabetisch (1), Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir (2), Diabetisch + 10 T. Etomoxir (3), Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir (4), Kontrolle (5) und Marker 100 bp (6).



Im diabetischen Zustand war die Anzahl der PCR-Produkte für AT1 minimal vermindert. Die Behandlung der gesunden Tiere veränderte die Transkriptmenge nicht. Die behandelten diabetischen Ratten wiesen eine nichtsignifikante Erhöhung an PCR-Produkten auf (Bild 3.8 und Tabelle 3.8). Wegen der großen Fehler waren die genannten Veränderungen nicht signifikant.

Tabelle 3.8: Auswirkungen des Diabetes und der Gabe von Etomoxir auf die Signalstärken von Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA in der Reversen Transkriptase-

	AT1/GAPDH	
Kontrolle	0,97 ± 0,10	(100,0 %)
Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir	0,99 ± 0,16	(102,0 %)
Diabetisch	0,86 ± 0,10	(88,6 %)
Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir	1,02 ± 0,12	(105,1 %)
Diabetisch + 10 T. Etomoxir	0,97 ± 0,13	(100,0 %)

Polymerasekettenreaktion. Nach der Reversen Transkription von 2 µg Gesamt-RNA mit Oligo(dT)-Primern wurde die für den AT1-Rezeptor spezifische Sequenz sowie die für den internen Standard GAPDH spezifische Sequenz der resultierenden cDNA mittels der PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht visualisiert und die Signale am Densitometer ausgewertet. Das Signal für AT1-PCR-Produkte wurde auf das GAPDH-Signal derselben cDNA standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe ± SEM.

3.5.3.2 Expression der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA in Endothelzellen und Kardiomyozyten

In den vorangehenden Untersuchungen wurde der quantitative Nachweis von Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA im Herzgewebe vorgenommen, ohne zu differenzieren in welchen Zellen die nachgewiesene RNA exprimiert wurde. Um Aufschluß über den Ort der mRNA-Expression zu gewinnen, wurden Endothelzellen und Kardiomyozyten aus perfundierten Herzen nichtdiabetischer Ratten isoliert. Die Endothelzellen wurden standardmäßig zellkultiviert. Anschließend wurde RNA aus den Zellen extrahiert, durch Reverse Transkription in cDNA umgeschrieben und die Zielsequenz mittels der Polymerasekettenreaktion amplifiziert. Wie in Bild 3.9 verdeutlicht, wird Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA sowohl in isolierten Herzmuskelzellen als auch in zellkultivierten kardialen Endothelzellen synthetisiert.

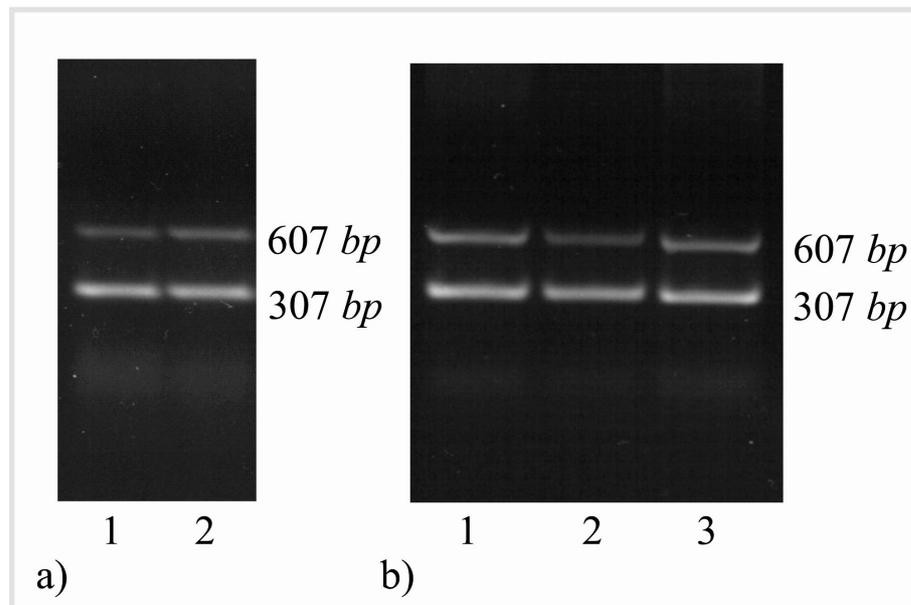


Bild 3.9: Qualitativer Nachweis von Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA in Kardiomyozyten und Endothelzellen. 2 μg Gesamt-RNA der isolierten Zellen wurden mit Oligo(dT)-Primern in cDNA umgeschrieben und die für den AT1-Rezeptor spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 607 bp) sowie die für den internen Standard GAPDH spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 307 bp) der resultierenden cDNA der Kardiomyozyten (a) 1-2) und der Endothelzellen (b) 1-3) in unabhängigen Reaktionen mittels der PCR amplifiziert. Anschließend wurden die PCR-Produkte einer Gelelektrophorese unterzogen und unter UV-Licht photographiert.

3.6 Einfluß von Diabetes und Etomoxir[®] auf Expression der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase-mRNA

Der Diabetes mellitus geht mit einer Störung des intrazellulären Kalziumgleichgewichtes der meisten Gewebe, auch des Herzens, einher [73]. Als ursächlich für den erhöhten Kalziumgehalt der Herzmuskelzelle können die Herabsetzung der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase-Aktivität, des Natrium-Kalzium-Austausches, der Natrium-Kalium-ATPase-Aktivität sowie des Natrium-Wasserstoffionen-Austausches angesehen werden. Insbesondere die Aktivitätsminderung der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase (SERCA) kann zu Kontraktionseinbußen der Herzmuskelzelle führen [74]. Da der Transport des Kalziums vom Sarkoplasma in das sarkoplasmatische Retikulum die Relaxation erleichtert, besteht die Möglichkeit, daß diese bei erhöhtem Kalziumgehalt des Sarkoplasmas eingeschränkt ist. Letztendlich kann der verringerte Kalziumtransport in das sarkoplasmatische Retikulum durch Be-

einflussung der Homöostase anderer Ionen zu einem Fortschreiten der diabetischen Kardiomyopathie führen. Besonderer Augenmerk bei der vorliegenden Arbeit galt der Fragestellung, ob die in [17] gezeigte Aktivitätsminderung der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase in einer Funktionsabnahme der SERCA bei unveränderter Menge, oder aber in einer verminderten Expression als Zeichen einer reduzierten Synthese begründet ist. Andere Arbeitsgruppen hatten sich bereits mit dieser Fragestellung beschäftigt und mittels der Northernblotting Hybridisierung SERCA-mRNA in der Herzmuskulatur nachgewiesen [75], [76]. Jedoch kamen sie zu unterschiedlichen Ergebnissen hinsichtlich des myokardialen Gehaltes an SERCA-mRNA im diabetischen Stoffwechselzustand. Aus diesem Grunde wurde der Polymerasekettenreaktion, die im Vergleich mit der Northernblotting Hybridisierung das sensitivere Nachweisverfahren ist, der Vorzug gegeben, um auch kleine Unterschiede in der Expression der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase wahrzunehmen. Die Polymerasekettenreaktion wird im nachstehenden Abschnitt 3.6.1 beschrieben.

3.6.1 Optimierung der PCR

Aufgrund der bereits zuvor angesprochenen Notwendigkeit einer sehr sensitiven Nachweismöglichkeit für mRNA, galt es die Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion für den Nachweis von Sarkoplasmatischer Retikulum Kalzium-ATPase-mRNA zu optimieren. Dies geschah, wie bereits ausführlich in Abschnitt 3.5.2 (Seite 58) beschrieben, unter besonderer Berücksichtigung der Annealingtemperatur, der Zyklenzahl und dem Internen Standard.

3.6.1.1 Primer

Gemäß den Ausführungen in Abschnitt 3.5.2.4 (Seite 59) wurden zur Durchführung der Polymerasekettenreaktion die nachstehend angegebenen Primer-Sequenzen verwendet. Das Primer-Paar

1. sense 5'-CAGTGTAAGGAGGACAACCCAGAC-3' und antisense 5'-ACAACGCACATGCACGCAC-3'

wurde nach dem in [77] zu findenden Sequenzen entworfen und lieferte ein für die Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase spezifisches Produkt mit einer Länge von 433 *bp* [78] und das Primer-Paar

2. sense 5'-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA- 3' und
antisense 5'-AGATCCACAACGGATACATT- 3'

wurde nach dem in [70] zu findenden Sequenzen entworfen und lieferte nach [72] ein für die Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase spezifisches Produkt mit einer Länge von 307 *bp*.

3.6.1.2 Parameter der optimierten PCR

Nach der oben beschriebenen Optimierung der einzelnen PCR-Parameter vollzog sich die Polymerasekettenreaktion über

1. 3 Minuten bei 94°C zur Denaturierung der DNA-Doppelstränge zu Einzelsträngen,
2. 10 Minuten bei 72°C unter Zugabe von 2,5 μl Taq-Polymerase (1 $U/\mu\text{l}$)),
3. 30maliges Durchlaufen eines PCR-Zyklusses über
 - (a) 30 Sekunden bei 92°C zur Trennung der neusynthetisierten DNA-Stränge von den Matrizen,
 - (b) 1 Minute bei 63°C zur Hybridisierung der Primer mit der Matrize sowie
 - (c) 1 Minute bei 72°C zur Polymerisation,
4. 10 Minuten bei 72°C und
5. bis zur Entnahme der Proben bei 25°C.

3.6.2 Ergebnisse durch Anwendung der optimierten Polymerasekettenreaktion

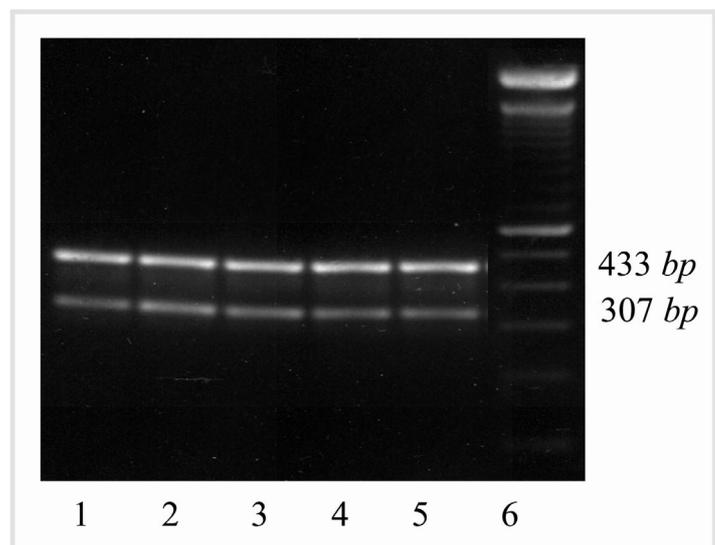
Tabelle 3.9: *Einfluß des Diabetes und der Etomoxirbehandlung auf die Signalstärken der Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium-ATPase-mRNA in der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion. Nach*

	SERCA/GAPDH
Kontrolle	2,30 ± 0,19
Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir	2,27 ± 0,16
Diabetisch	1,88 ± 0,20
Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir	1,77 ± 0,13
Diabetisch + 10 T. Etomoxir	1,77 ± 0,08

der Reversen Transkription von 2 µg Gesamt-RNA mit Oligo(dT)-Primern wurde die für SERCA spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 433 bp) und die für den internen Standard GAPDH spezifische Sequenz (vermutete Transkriptgröße 307 bp) der resultierenden cDNA mittels der PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, unter UV-Licht photographiert und die Signale am Densitometer ausgewertet. Das Signal für SERCA-PCR-Produkte wurde auf das GAPDH-Signal derselben cDNA standardisiert. Angegeben sind die Mittelwerte einer Gruppe ± SEM.

Die Induktion des Diabetes führte zu einer Abnahme der PCR-Transkripte für SERCA um 18,3 % im Vergleich mit der Kontrolle (Tabelle 3.9). Die Behandlung mit Etomoxir[®] ließ die PCR-Produktmenge sowohl bei den gesunden Tieren als auch bei den diabetischen nahezu unbeeinflusst (Bild 3.10).

Bild 3.10: *Beispiel für die Intensitätsverteilung von Signalen der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase-mRNA (vermutete Transkriptgröße 433 bp) und der mRNA des internen Standards GAPDH (vermutete Transkriptgröße 307 bp) in der Reversen Transkriptase-Polymerasekettenreaktion. Zuordnung gemäß Tabelle 3.9; Diabetisch (1), Diabetisch + 8 Wo. Etomoxir (2), Diabetisch + 10 T. Etomoxir (3), Kontrolle + 8 Wo. Etomoxir (4), Kontrolle (5) und Marker 100 bp (6).*



4 Diskussion

4.1 Tierexperimentelles Modell für den Diabetes mellitus

Im Diabetes mellitus, einer Erkrankung, die durch einen Mangel an Insulin oder durch das fehlende Ansprechen der Gewebe auf Insulin gekennzeichnet ist, besteht eine erhöhte Inzidenz, kardiovaskulär zu erkranken [79]. Zu den beschriebenen Dysregulationen des Herz- und Gefäßsystems zählen arterielle Hypertonie, Atherosklerose, Mikroangiopathie, Herzinsuffizienz und autonome Neuropathie. Das Risiko eines Diabetikers, an einer kardiovaskulären Krankheit zu versterben, ist fast dreimal so groß wie das eines Nichtdiabetikers [79]. Um Erkenntnisse über die Ursachen des vermehrten Auftretens von Erkrankungen an Herz und Gefäßen im Diabetes mellitus zu gewinnen, wurden tierexperimentelle Modelle für den Diabetes entwickelt. Zu unterscheiden sind der spontane, der viral induzierte und der chemisch induzierte Diabetes mellitus. Zu letzterem gehört das Streptozotocin-Modell. Streptozotocin ist ein aus dem grampositiven Bakterium *Streptomyces achromogenes* gewonnenes Antibiotikum. Strukturell ist es eine 2-Deoxy-D-glukose mit einer Methylnitrosoharnstoffgruppe an der C₂-Position. Die diabetogene Wirkung des Streptozotocins wurde erstmals in [80] beschrieben. Der Wirkungseintritt der Substanz ist äußerst schnell. Bereits 1 Stunde nach der Gabe von Streptozotocin sind histologische Veränderungen an den β -Zellen des Pankreas zu erkennen [81]. Da selbst bei hohen Dosen von Streptozotocin, die eine Insulintherapie erforderlich machen, keine histologischen Veränderungen an Leber und Nieren nachzuweisen sind [81], wird angenommen, daß Streptozotocin selektiv die insulinproduzierenden β -Zellen der Pankreasinseln zerstört. Vermutlich wegen der Strukturhomologie zur Glukose wird es in die pankreatischen β -Zellen aufgenommen, um im Zellinnern durch die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen und durch die Alkylierung von Proteinen und der DNA seine zytotoxische Wirkung zu entfalten [82]. Klinisch findet es Anwendung als Chemotherapeutikum bei nicht operablen Pankreaskarzinomen [83].

Durch die einmalige intraperitoneale Injektion von Streptozotocin (60 mg/kg Körpergewicht) wurde bei den Versuchstieren ein chronischer Insulinmangeldiabetes induziert, bei dem noch eine Restfunktion der β -Zellen erhalten ist, um die Entwicklung einer ketotischen Stoffwechsellage zu verhindern [84]. Dieser Zustand ist gekennzeichnet durch Hyperglykämie, Glukosurie, Polyurie, Polydipsie, Erhöhung der D-3-Hydroxybutyratserumkonzentration sowie einem geringeren Körpergewicht im Vergleich mit den Kontrolltieren [85]. Charakteristisch war außerdem die Zunahme des relativen Herzgewichtes, die schon von anderen Autoren als diabetische Organomegalie beschrieben wurde [86], [87].

4.2 Behandlung mit Etomoxir[®]

In [4] wurde die nahezu vollständige Inhibierung des Einflusses von Insulin auf den Glukosetransport im Herzen durch Fettsäuren und Ketonkörper demonstriert und mit dem „Glukose-Fettsäure-Zyklus“ das Wechselspiel zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel formuliert. Als Ursache für die verminderte Glukoseutilisation im Diabetes mellitus werden eine Hemmung der entscheidenden Schritte des Glukoseabbaus, nämlich des Membrantransportes, der Phosphorylierung der Glukose, der Phosphofruktokinase-reaktion sowie der Pyruvatdehydrogenase-reaktion, angenommen. Die im Diabetes vermehrt angebotenen Fettsäuren führen über ihr Abbauprodukt Acetyl-CoA, das in den Zitratzyklus einmündet, zu einem erhöhten Gehalt der Herzmuskelzelle an Zitrat. Da Zitrat die Phosphofruktokinase-I hemmt, akkumulieren die sich vor dem Block befindenden Glukoseabbauprodukte [88]. Zu diesen zählt Glukose-6-Phosphat, welches über Inhibierung der Glukosephosphorylierung durch die Hexokinase den Eintritt der Glukose in die Glykolyse hemmt [89]. Zudem hemmen die durch die β -Oxidation der Fettsäuren entstehenden Acetyl-CoA und NADH + H⁺ den Pyruvatdehydrogenasekomplex und damit den Abbau des Pyruvats zum Acetyl-CoA [90], [91]. Die daraus abgeleitete Hypothese, daß sich die Insulinempfindlichkeit im Diabetes durch Beeinflussung des Fettstoffwechsels verbessern läßt, wurde in [84] bestätigt, indem an isoliert perfundierten Herzen SZ-diabetischer Ratten gezeigt wurde, daß sich unter Perfusion mit Natrium-2-(5-[Chlorphenyl]-pentyl)-oxiran Carboxylat (POCA)

der Glukosestoffwechsel und die Insulinsensitivität verbessern. POCA wird deshalb eine blutzuckersenkende Wirkung zugeschrieben. Nach [25] zeigt sich Etomoxir[®], ein Abkömmling des POCA, der Ausgangssubstanz in seiner hypoglykämischen und antiketotischen Wirkung sowie seinen fettsenkenden Eigenschaften überlegen. Gemeinsames Wirkungsprinzip beider Substanzen, die keine akuten Nebenwirkungen haben sollen [25], ist die selektive Inhibition der Carnitin Palmitoyltransferase I (CPT I) mit der Folge, daß die Aufnahme langkettiger Fettsäuren in das Mitochondrium und somit ihre Oxidation vereitelt werden. Es wird diskutiert, daß für die Inhibierung der Carnitin Palmitoyltransferase I eine kovalente Bindung an dem Enzym, das sich an der Innenseite der äußeren Mitochondrienmembran befindet, notwendig ist. Die Bildung von Azy-Carnitin aus Azy-CoA und Carnitin ist damit extramitochondriell blockiert. Die Oxidation kurz- und mittelkettiger Fettsäuren wird dagegen nicht vermindert [92], da diese, auch ohne an Carnitin gekoppelt zu sein, die Mitochondrienmembran passieren und in die Mitochondrienmatrix, den Ort der β -Oxidation, gelangen können. Aufgrund der dargestellten Wirkungsweise von Etomoxir[®], der Inhibition der CPT I, wurde angenommen, daß sich die im Diabetes mellitus erhöhten Serumkonzentrationen von Glukose und D-(-)-3-Hydroxybutyrat unter der Therapie mit Etomoxir[®] verringern. Tatsächlich zeigten sich in den durchgeführten Untersuchungen die Glukose- und D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentrationen sowohl durch die orale als auch durch die intraperitoneale Behandlung unbeeinflusst. Die erwarteten Veränderungen der Serumparameter nach der Applikation von Etomoxir[®] blieben aus. Diese Beobachtungen decken sich nicht mit den in [85] und in [53] erzielten Ergebnissen. In beiden Arbeiten gelang der Nachweis einer Verringerung der D-(-)-3-Hydroxybutyratkonzentration im Serum streptozotocin-diabetischer Ratten unter der Therapie mit Etomoxir[®]. Während in [85] auch eine Senkung der Glukosekonzentration um 20 % und eine leichte Verminderung der Triglyzeridkonzentration im Serum durch die Behandlung von diabetischen Ratten mit dem Carnitin Palmitoyltransferase I-Hemmer beobachtet wurden, blieben signifikante Veränderungen dieser beiden Parameter in [53] aus. Die nach [85] fettsenkenden Eigenschaften von Etomoxir[®] sind aufgrund des angenommenen Wirkungsprinzips, der Hemmung der CPT I, nicht zu erwarten, sind aber möglicherweise durch die Hemmung der *de novo* Fettsäu-

resynthese zu erklären. Wegen der Inhibierung des Transportes von langkettigen Fettsäuren in das Mitochondrium ist im Zytosol der Quotient von langkettigen Azy-CoA-Molekülen zu Azy-Carnitinen erhöht und bewirkt eine „feed-back“-Hemmung der *de novo* Fettsäuresynthese [93]. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit stellt die nach POCA-Gabe beobachtete Stimulierung der Lipoproteinlipase mit dem damit vermehrten Abbau von Triglyzeriden im Serum dar [94]. Bei der Suche nach Gründen für das Ausbleiben der erwarteten Veränderungen, sollte berücksichtigt werden, daß sowohl unter oraler als auch unter intraperitonealer Gabe von Etomoxir[®] das relative Herzgewicht der diabetischen und der gesunden Tiere erhöht war. Diese Beobachtung deckt sich mit der in [85] beschriebenen Zunahme von Triglyzeriden und Phospholipiden im Herzen nach der Gabe von Etomoxir[®] und spricht gegen eine vollständige Wirkungslosigkeit der eingesetzten Substanz. Vielmehr ist anzunehmen, daß das Medikament in nicht ausreichenden Mengen gegeben wurde, um die D-(-)-3-Hydroxybutyrat- und die Glukoseserumkonzentration zu senken. In der vorliegenden Arbeit wurde das (+)-Enantiomer von Etomoxir[®] (Applied Science & Technology, Zug) in der ersten Versuchsreihe in einer Dosierung von 10 mg/kg Körpergewicht täglich im Trinkwasser verabreicht und in der zweiten Versuchsreihe in einer Dosierung von 9 mg/kg Körpergewicht täglich intraperitoneal injiziert. Während in [85] das Racemat von Etomoxir[®] (Byk Gulden, Konstanz) in einer Dosierung von 18 mg/kg Körpergewicht täglich intraperitoneal verabreicht wurde, erhielten die Versuchstiere in [53] das (+)-Enantiomer (Byk Gulden, Konstanz) in einer Dosierung von 9 mg/kg Körpergewicht täglich intraperitoneal. Somit wurde das Medikament in der vorliegenden Arbeit in gleichen Mengen und unter gleichen Bedingungen wie in [53] gegeben. Einziger Unterschied bestand darin, daß die Substanzen von unterschiedlichen Herstellern stammten. Diese Erkenntnisse legen die Vermutung nahe, daß Unterschiede bezüglich der Verfügbarkeit und der Pharmakokinetik, die möglicherweise auf herstellerbedingten modifizierten Synthetisierungsprozessen beruhen, ursächlich für das Ausbleiben der erwarteten Veränderungen der Serumparameter unter der Applikation von Etomoxir[®] sind.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß das Medikament in nicht ausreichenden Mengen dosiert wurde, um die in anderen Arbeiten beschriebene

Verringerung der D-(-)-3-Hydroxybutyratserumkonzentration nachzuweisen. Dennoch legt die in beiden Versuchsreihen signifikante Zunahme des relativen Herzgewichtes eine, wenn auch eingeschränkte, Wirksamkeit nahe. Zur Abschätzung der Wirksamkeit des eingesetzten Etomoxir[®]-Enantiomers werden in der Zukunft Studien erforderlich sein, die Verfügbarkeit und Pharmakokinetik der Substanz analysieren, um insbesondere eine Aussage darüber machen zu können, ob eine höhere Dosierung im Vergleich mit dem (+)-Enantiomer (Byk Gulden, Konstanz) erforderlich ist.

4.3 Einfluß von Diabetes und Etomoxir[®] auf die kardialen Isomyosine

Um die Ursachen der „diabetischen Kardiomyopathie“ zu verstehen, wurden eine Reihe von Tiermodellen entwickelt, darunter der Streptozotocin-induzierte Diabetes mellitus der Ratte. Im Rahmen dieses Modells wird vermutet, daß die Kontraktilitätseinbußen und die verminderte Energieproduktion, die nach [18] und [95] kennzeichnend für die diabetesspezifische Erkrankung des Herzmuskels sind, ursächlich mit Änderungen im Muster der myokardialen Myosine einhergehen. Im Rattenherzen können mit α - und β -MHC zwei von benachbarten Genen exprimierte Isoformen der Myosin Schweren Ketten (MHC - Myosin Heavy Chain) unterschieden werden [96]. Die α -MHC Isoform verfügt über eine hohe Adenosintriphosphatase (ATPase) - Aktivität, so daß gemäß [97] das Herz einer gesunden jungen Ratte, das reich an α -MHC ist, sehr gute Kontraktionseigenschaften hat. Die ATPase-Aktivität von β -MHC liegt deutlich unter der von α -MHC. Das Muster von α -MHC und β -MHC hat somit einen bestimmenden Einfluß auf die Kontraktionskraft des Herzens. Die Expression beider Isoenzyme und somit ihr Anteil an der Gesamttranskriptmenge sind vom Stoffwechsel des Tieres [98], vom Hormonhaushalt [99], von mechanischen Einwirkungen auf das Herz [100] sowie vom Alter des Tieres [77] abhängig. Im Diabetes mellitus wird eine Änderung des Proteinmusters beobachtet, die durch eine deutliche Abnahme von α -MHC und eine ausgeprägte Zunahme von β -MHC charakterisiert ist [52]. Diabetische Tiere, die wie in [52] beschrieben, mit Etomoxir[®] behandelt werden, bilden einen deutlich verringerten Anteil an β -MHC aus, der jedoch immer noch

ein Vielfaches der gesunden Kontrollen ausmacht. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fragestellung nachgegangen, ob die im Diabetes beschriebene Proteinverschiebung mit Veränderungen auf der Transkriptionsebene einhergeht, und ob die partielle Angleichung an den Normalzustand unter der Applikation von Etomoxir[®] sich nicht nur im Proteinmuster, sondern auch in der Expression von mRNA zeigt. Dazu wurde die mRNA der Myosin Schwere Ketten analysiert. Im Diabetes wurde eine Abnahme der Menge von α -MHC-mRNA um 38 % sowie ein Anstieg der β -MHC-Transkripte um das 1,5fache beobachtet. Die Gabe von Etomoxir[®] führte zu einer partiellen Normalisierung des Isoenzymmusters. Die Menge an α -MHC-mRNA nahm um etwa 10 % zu, die β -MHC-Transkripte verringerten sich um 30 %. Damit konnte gezeigt werden, daß die Änderung im Proteinmuster der myokardialen Myosine im diabetischen Stoffwechsellzustand und die partielle Angleichung der Proteinverteilung unter der Therapie mit Etomoxir[®] in einer modifizierten Genexpression begründet ist. Die Beobachtung, daß es unter der Gabe von Etomoxir[®], also durch Beeinflussung des Fettsäuremetabolismus, zu einer teilweisen Angleichung an den Normalzustand der im Diabetes veränderten Transkription der Myosine im Herzmuskel kommt, läßt vermuten, daß Änderungen im Fettstoffwechsel ursächlich für eine modifizierte Genexpression von α - und β -MHC sind. Aufgrund des angenommenen Wirkungsprinzips von Etomoxir[®] liegt die Annahme nahe, daß die Hemmung der Carnitin Palmitoyltransferase I zu der partiellen Normalisierung der im Diabetes massiv erhöhten β -MHC- und der stark erniedrigten α -MHC-Transkripte führt. Da jedoch nach [52] auch die Umgehung der CPT I durch die Gabe von mittelkettigen Fettsäuren, die gemäß [102] die Mitochondrienmembran, auch ohne an einen Transporter gebunden zu sein, passieren können, eine Verringerung der Menge an der β -MHC-Isoform zur Folge hat, die etwas weniger stark ausfällt als die ohne Umgehung der CPT I, ist anzunehmen, daß die partielle Normalisierung des Proteinmusters nicht ausschließlich durch die CPT I-Hemmung bedingt ist. Vermutlich kommen den lipidsenkenden Eigenschaften des Etomoxir[®] durch die in [93] gezeigte Hemmung der *de novo* Fettsäuresynthese entscheidende Bedeutung für die reduzierte β -MHC-Expression zu. Nach [4] existiert ein Wechselspiel zwischen Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, das sich in einer Hemmung der Glukoseutilisation im Herzen durch Fettsäuren und Ketonkör-

per manifestiert. Die Hypothese, daß es im Diabetes nicht primär die erhöhte Lipidserumkonzentration, sondern die daraus resultierende und durch den Insulinmangel verstärkte Reduzierung der Glukoseaufnahme ist, die zu einem Wechsel im Protein- und auch im mRNA-Muster der myokardialen Myosine führt, wird durch die Beobachtung in [103] und [104] bestärkt, daß eine vermehrte Zufuhr von Kohlenhydraten bei hungernden Ratten mit einer Verringerung der im fastenden Zustand erhöhten β -MHC-Proteine assoziiert ist. Zusammenfassend kann festgehalten werden, daß die im Diabetes auftretende Umkehr von der Glukoseutilisation zur vermehrten Fettsäureverstoffwechslung in der Herzmuskelzelle als Signal für die vermehrte Transkription von β -MHC-mRNA zu deuten ist und daß sich die Menge an β -MHC-mRNA durch Beeinflussung des gestörten Wechselspiels zwischen Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel partiell normalisieren läßt.

4.4 Einfluß von Diabetes und Etomoxir[®] auf die kardialen Glukosetransporter 4

In dem mit Sauerstoff ausreichend versorgten Herzen stellen freie Fettsäuren, die entsprechend ihrer Serumkonzentration aufgenommen und verstoffwechselt werden, die Hauptenergiequelle dar [105], [106]. Steigt der Energiebedarf des arbeitenden Herzen an, kann es nicht die Aufnahme und den Metabolismus der freien Fettsäuren entsprechend erhöhen. Stattdessen werden nach [107] und [108] Glykolyse und Glukoseoxidation forciert infolge einer verstärkten Glykogenolyse und eines vermehrten Glukosetransportes und auf diese Weise die notwendige Energie bereitgestellt. Hingegen ist das ischämische Herz nicht mehr in der Lage, freie Fettsäuren zu verbrennen, sondern gewinnt die erforderliche Energie zu großen Teilen über den anaeroben Glukoseabbau [109]. Da das in den Myokardzellen abgelagerte Glykogen entsprechend [110] innerhalb weniger Stunden verbrannt wird, kommt dem Glukosetransport die größte Bedeutung hinsichtlich der ausreichenden Versorgung der Herzmuskelzelle mit Glukose zu. Störungen, die sich im Bereich des Glukosetransportes abspielen, können also, da unter Umständen nicht genügend Energie bereitgestellt wird, zu Schädigungen am Herzen führen. Der Glukosetransport in die Myokardzelle wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst. Positiv wirken sich

aus körperliche Betätigung [111], Insulin [112] ebenso pathophysiologische Zustände wie Hypoxie und Ischämie [113], [114]. Freie Fettsäuren oder ein erhöhter ventrikulärer Druck hingegen inhibieren den Glukosetransport [115]. Im diabetischen Stoffwechszustand sind der insulin-stimulierte Glukoseverbrauch und der Glukosetransport im Herzen eingeschränkt [116], [117], vermutlich wegen der nach [118] verminderten Translokation von Glukosetransportern aus intrazellulären Kompartimenten in die Plasmamembran und der damit gemäß [61] herabgesetzten Proteinmenge der sarkolemmalen Glukosetransporter 4. Zur Beantwortung der sich aus diesen Beobachtungen ableitenden Frage, ob neben der verringerten Proteinmenge in der Plasmamembran auch die Anzahl an Glukosetransportern in der gesamten Zelle reduziert ist, wurden in der vorliegenden Arbeit die myokardialen Glut4-Proteine in den Gesamtmembranen untersucht. Nach Induktion des Diabetes mellitus wurde eine Abnahme der Transporterproteinmenge um mehr als ein Viertel beobachtet. Die anschließende Analyse der Glut4-mRNA, die Aufschluß darüber geben sollte, ob die Reduzierung der Glut4-Proteine durch einen vermehrten Abbau des Proteins oder durch eine verminderte Transkription der für Glut 4 spezifischen mRNA und damit durch eine eingeschränkte Synthese bedingt ist, ergab, daß die Transkriptmenge von Glut4 im diabetischen Zustand nahezu nur die Hälfte der gesunden Kontrolle betrug. In der vorliegenden Arbeit gelang also der Nachweis, daß im Diabetes neben der eingeschränkten Translokation von im Zytosol gespeicherten Glukosetransportern auch die Proteinmenge an Glut 4 in der gesamten Zelle sowie die Genexpression und somit die Synthese von Glukosetransportern vermindert sind. Vermutlich sind die geschilderten Veränderungen hinsichtlich des Glukosetransporters 4 mitursächlich für die im Diabetes reduzierte Glukoseutilisation. Aus dem in [4] beschriebenen „Glukose-Fettsäure-Zyklus“ wurde die Vermutung abgeleitet, daß sich die im Diabetes eingeschränkte Glukoseutilisation durch Hemmung der β -Oxidation verbessern läßt. Tatsächlich wurde in [85] die blutzuckersenkende Wirkung von Etomoxir[®] gezeigt. Gegenstand der im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente war die sich daraus ergebende Frage, ob der verbesserte Glukoseabbau unter der Therapie mit Etomoxir[®] möglicherweise mit einer Zunahme an Glukosetransportern einhergeht. Nach der Applikation von Etomoxir[®] konnte bei den diabetischen Tieren weder ein signifikan-

ter Anstieg an Glut4-Protein noch an Glut4-mRNA beobachtet werden. Da die blutzuckersenkende Wirkung von Etomoxir[®] in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden konnte, müssen die Ergebnisse bezüglich des Glukosetransporters zurückhaltend diskutiert werden. Nicht auszuschließen ist, daß bei einer Dosierung des Medikamentes, die zu einer nachvollziehbaren Senkung der Glukoseserumkonzentration geführt hätte, Veränderungen an der Menge von Glut4-Protein und/oder Glut4-mRNA zu beobachten wären. Die etwas hypothetische Annahme, daß der unter der Gabe von Etomoxir[®] erwartete, erhöhte Glukoseabbau nicht über Änderungen des Glukosetransporters vermittelt wird, ließe sich durch einen verstärkten glykolytischen Fluß stützen. Wie in Abschnitt 4.2 (Seite 71) beschrieben, hemmt das im Diabetes erhöht vorliegende Zitat die Phosphofruktokinase-I, mit der Folge, daß über eine Akkumulation von Glukose-6-Phosphat die Hexokinase gehemmt wird. Daneben wird der Pyruvatdehydrogenasekomplex durch bei der β -Oxidation anfallendem Acetyl-CoA und $\text{NADH} + \text{H}^+$ inhibiert. Bei Einschränkung der β -Oxidation durch verminderten Transport der Fettsäuren in das Mitochondrium, dem von Etomoxir[®] angenommenen Wirkungsprofil, nimmt der Zellgehalt an Acetyl-CoA ab, die Inhibierung der für die Glykolyse wichtigen Enzyme wird aufgehoben und Glukose vermehrt abgebaut. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen. Der im Diabetes beschriebene eingeschränkte Glukosetransport manifestiert sich in einer Abnahme der Menge an myokardialem Glukosetransporter 4-Protein und -mRNA als Hinweis auf eine reduzierte Synthese. Über die Wirkung von Etomoxir[®] auf den Glukosetransporter 4 läßt sich aufgrund des fehlenden Nachweises seiner hypoglykämischen Wirkung lediglich sagen, daß bei Dosierungen des Medikamentes, die zu einer partiellen Normalisierung der im Diabetes veränderten kardialen Myosine führen, keine Veränderungen hinsichtlich des Glut 4 zu beobachten sind. Ob sich eine Normalisierung der Anzahl der Glukosetransporter unter einer höheren Dosierung des Carnitin Palmitoyltransferase I-Hemmers einstellt, bedarf weiterer Untersuchungen.

4.5 Einfluß von Diabetes und Etomoxir[®] auf die kardiale Sarkoplasmatische Retikulum Kalzium ATPase

Die Herzfunktion ist im Insulinmangeldiabetes eingeschränkt und charakterisiert durch eine verringerte Kontraktionsgeschwindigkeit, eine verlängerte diastolische Relaxationszeit, ein herabgesetztes Herzminutenvolumen und einen erhöhten Füllungsdruck [119]. Die verlangsamte diastolische Relaxationsgeschwindigkeit geht nach [120] und [121] mit einer verminderten Kalziumaufnahme des sarkoplasmatischen Retikulums und einer verringerten Aktivität der Ca^{2+} -ATPase einher. Die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums reguliert die intrazelluläre Kalziumkonzentration, indem sie mit der durch Hydrolyse von ATP freigesetzten Energie Kalzium gegen einen Gradienten in das sarkoplasmatische Retikulum pumpt [122], [123], [124]. Zumindestens drei Isoformen der Kalzium-stimulierten ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums werden unterschieden [125], [126]. Die Isoform der schnell kontrahierenden Muskeln (SERCA1) wird in großem Maße im quergestreiften Skelettmuskel gebildet. Die Isoform der Herz- und langsam kontrahierenden Muskeln (SERCA2) wird insbesondere im Myokard (SERCA2a) und eine anders gespleißte Form in Nichtmuskelzellen (SERCA2b) exprimiert. Die Expression der nichtmuskulären Isoform (SERCA3) findet in diversen Zelltypen statt [127]. Eine Reihe von Arbeiten, darunter [17], legen die Vermutung nahe, daß die im Diabetes verlängerte Relaxationszeit ursächlich mit einer verminderten Ca^{2+} -ATPase-Aktivität einhergeht. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Veränderungen der Ca^{2+} -ATPase-Aktivität im diabetischen Herzen mit einer Abnahme der mRNA der Sarkoplasmatischen Kalzium-ATPase vergesellschaftet ist. Dazu wurde die mRNA der überwiegend in den Myokardzellen exprimierten Isoform SERCA2 analysiert. Die Induktion des Diabetes führte zu einer Abnahme der Menge an SERCA2-mRNA um 18,3 % im Vergleich mit der Kontrolle. Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, daß die verminderte Ca^{2+} -ATPase-Aktivität möglicherweise in einer reduzierten Genexpression und einer daraus folgenden herabgesetzten Synthese von SERCA2 begründet ist. Jedoch sind die Daten anderer Arbeitsgruppen hinsichtlich des SERCA2-mRNA-Gehaltes der Herzmuskelzelle im Diabetes recht unterschiedlich. Nach [75] war im Diabetes die SERCA2-mRNA um 50 % vermin-

dert, in [128] wurden keine Veränderung der mRNA-Menge im diabetischen Stoffwechselzustand gesehen und in [76] wurde eine leichte, nichtsignifikante Verringerung der Menge an SERCA2-mRNA bei unverändertem Gehalt an SERCA2-Protein in den Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums beobachtet. Weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Abklärung, inwieweit sich die im Diabetes gezeigte Reduzierung der Menge an SERCA2-mRNA durch Beeinflussung des Fettstoffwechsels normalisieren läßt. Grund zu dieser Annahme waren die Erkenntnisse, daß nach [129] langkettige Fettsäuren einen negativen Einfluß auf die Aktivität von SERCA2 haben und daß sich gemäß [52] durch Reduzierung der Lipidserumkonzentrationen unter der Therapie mit Etomoxir[®] die im Diabetes eingeschränkte Aktivität der Kalziumpumpe des sarkoplasmatischen Retikulums verbessern läßt. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß die Behandlung der diabetischen Tiere mit Etomoxir[®] den mRNA-Gehalt an SERCA2 nahezu unbeeinflusst ließ. Bei der Interpretation der Ergebnisse, die im Rahmen der Analyse des kardialen Gehaltes an SERCA2-mRNA erzielt wurden, darf nicht unberücksichtigt bleiben, daß die lipidsenkende Wirkung von Etomoxir[®] und somit die in [52] angenommene Ursache für die Aktivitätszunahme von SERCA2 in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte. Demnach ist es also durchaus möglich, daß bei einer Dosierung des Medikamentes, die zu einer nachweisbaren Senkung der Lipidserumkonzentration geführt hätte, Veränderungen an der Menge von SERCA2-mRNA zu sehen wären. Zusammenfassend gelang in der vorliegenden Arbeit der Nachweis, daß die Genexpression der Sarkoplasmatischen Retikulum-ATPase verringert ist. Daraus leitet sich die Vermutung ab, daß die bereits zuvor beschriebene Aktivitätsabnahme der Ca^{2+} -ATPase auf einer eingeschränkten Synthese der Kalziumpumpe beruht. Unbeeinflusst zeigte sich die Transkription der SERCA2-mRNA unter dem Einfluß von Etomoxir[®], dessen Deutung jedoch erschwert ist, da die Abnahme der Blutfette, die als ursächlich für die Aktivitätszunahme der Ca^{2+} -ATPase angenommen wird, ausblieb. Daraus ergibt sich, daß weitere Analysen der Expression der Sarkoplasmatischen Retikulum-ATPase notwendig sind, insbesondere wenn Etomoxir[®] in ausreichenden Mengen gegeben wird, um die Lipidserumkonzentration zu senken.

4.6 Einfluß von Diabetes und Etomoxir[®] auf den kardialen Angiotensin II Typ 1-Rezeptor

Die Blutdruckregulation sowie die Homöostase des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes werden nach [130] entscheidend von dem Renin-Angiotensin-System (RAS) beeinflusst. Ausgangspunkt der systemischen Renin-Angiotensin-Kaskade ist das in den juxtaglomerulären Zellen der Niere gebildete Renin. Eine verringerte Natriumkonzentration an der Macula densa, ein herabgesetzter renaler Perfusionsdruck, ein verminderter Kaliumspiegel im Blut sowie eine sympathische Aktivierung wirken begünstigend auf die Freisetzung des proteolytischen Enzyms [131]. Angiotensin II und Aldosteron hingegen hemmen die Ausschüttung. Renin hydrolysiert Angiotensinogen, welches in der Leber gebildet und in das Blut abgegeben wird, zu Angiotensin I. Die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II erfolgt durch Abspaltung des C-terminalen Dipeptids mittels des Angiotensinkonversionsenzym (engl.: Angiotensin Converting Enzyme: ACE), das insbesondere in der Lungenstrombahn zu finden ist. Da das Angiotensinkonversionsenzym auch Bradykinin und andere kleine Peptide spaltet, kommt ihm gemäß [132] eine regulierende Funktion zwischen dem RAS und dem Kallikrein-Kinin System zu. Angiotensin II bewirkt eine Vasokonstriktion, sowohl der arteriellen als auch der venösen Gefäße, durch die in [133] beschriebene direkte Wirkung auf die glatte Muskulatur und durch Beeinflussung des peripheren und zentralen Nervensystems [134]. Angiotensin II hat eine verstärkte Natriumrückresorption sowohl am proximalen Tubulus als auch, über die stimulierte Aldosteronfreisetzung, am distalen Tubulus zu folge [135]. In den vergangenen Jahren konnte außerdem in [136], [137] und [138] gezeigt werden, daß Angiotensin II das Zellwachstum stimuliert und eine Hypertrophie in den Gefäßen und am Herzen durch Zunahme der Proteinsynthese und der Expression von Wachstumsfaktoren fördert. Zusammenfassend kommt Angiotensin II, neben der Regulation der Funktion des Herzkreislaufsystems und der Nieren, in einer Reihe von pathophysiologischen Zuständen Bedeutung zu. Dazu zählen die Schädigung von Endothelzellen und vaskulärer, glatter Muskelzellen [139], die Fibrosierung des Myokards und die Glomerulosklerose [140], [141], [142] und [143]. Die Vermutung, daß Angiotensin II in der Pathophysiologie des Diabetes mel-

litus eine entscheidende Rolle spielt, wird dadurch bestärkt, daß nach [144] die geschilderten Wirkungen des Angiotensin II den im Diabetes zu beobachteten Veränderungen an Gefäßen und Niere entsprechen und daß ACE-Hemmer nach [145] positiven Einfluß auf die diabetische Nephropathie und Retinopathie haben sowie nach [146] und [150] kardioprotektiv wirken. Angiotensin II entwickelt seine Wirkung, indem es mit speziellen in der Zellmembran liegenden Rezeptoren reagiert. Die genannten Mechanismen werden alle über den Angiotensin II Typ 1-Rezeptor (AT1-Rezeptor) vermittelt. Die genaue Bedeutung des Angiotensin II Typ 2-Rezeptors ist bislang unklar. Möglicherweise vermittelt er Wirkungen von Angiotensin II, die die Zellproliferation hemmen [147]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Frage nachgegangen, inwieweit die Überaktivität des RAS im diabetischen Stoffwechselzustand sich in Veränderungen an dem Angiotensin II Typ 1-Rezeptor manifestiert. Dazu wurde die Expression der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA analysiert, also des Rezeptors, der nach heutigen Erkenntnissen die überwiegende Mehrzahl der Angiotensin II-Wirkung vermittelt. Die durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß im Diabetes die Menge an Angiotensin II Typ 1-Rezeptor-mRNA im Herzen von Ratten 9 Wochen nach Diabetesinduktion nicht signifikant verändert ist. Hingegen waren in [63] der mRNA-Gehalt an Angiotensin II-Rezeptoren und die Rezeptorendichte in den Herzen zwei Wochen lang SZ-diabetischer Ratten erhöht. Da die Analysen bezüglich der mRNA-Mengen an Angiotensin II-Rezeptoren zu unterschiedlichen Zeiten durchgeführt wurden, ist nicht auszuschließen, daß es sich bei der in [63] beschriebenen Zunahme der mRNA lediglich um eine vorübergehende handelt, die wenige Tage nach Diabetesinduktion zu beobachten ist, jedoch nicht kennzeichnend für den chronischen Insulinmangel-Diabetes ist. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, daß die Überaktivität des RAS im Diabetes langfristig vermutlich nicht mit Veränderungen bezüglich der Synthese des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors einhergehen. In diesem Zusammenhang scheint die Vermutung interessant, daß einige ACE-Hemmer, die über Sulfhydrylgruppen verfügen, wie etwa Captopril, möglicherweise als Fänger von Sauerstoffradikalen fungieren [148], [149]. Die im diabetischen Herzen ständig entstehenden Sauerstoffradikale reagieren mit Stickstoffmonoxid (*NO*) und führen nach [150] durch ein Ungleichgewicht zwischen Stickstoffmonoxid (*NO*) und freien Radikalen

zu einer gestörten Vasodilatation. Die Vermutung, daß ACE-Hemmer Sauerstoffradikale im Herzen abfangen, bietet sich als weitere Erklärungsmöglichkeit für ihre bis heute nicht vollständig bekannte kardioprotektive Wirkung an und läßt ihre Gabe im Diabetes als besonders indiziert erscheinen. Unterstrichen wird diese Hypothese durch die in [151] beschriebenen Ergebnisse, daß sich die durch Angiotensin II induzierte Fibrose im Rattenherz durch chronische Hemmung der *NO*-Synthase steigern läßt. Demnach liegt die Vermutung nahe, daß die im Diabetes beschriebene Überaktivität des Renin-Angiotensin-Systems auf einer gestörten Wechselwirkung zwischen dem vasodilatierend wirkenden *NO* und dem vasokonstriktiven Angiotensin II beruht. Da *NO* vermehrt mit im diabetischen Herzen entstehenden Radikalen reagiert, fehlt es letztendlich, um dem Angiotensin II entgegen zu wirken. In der vorliegenden Arbeit gelang also der Nachweis, daß der Angiotensin II Typ 1-Rezeptor bei 9 Wochen alten SZ-diabetischen Ratten nicht vermehrt exprimiert wird und somit Veränderungen an dem Angiotensin II Typ 1-Rezeptor vermutlich nicht als ursächlich für die im Diabetes beobachtete Überaktivität des Renin-Angiotensin-Systems angesehen werden können.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Zielsetzung durchgeführt, weiteren Aufschluß über die Ursachen der diabetischen Kardiomyopathie zu gewinnen. Dazu wurde bei Wistar-Ratten durch einmalige intraperitoneale Injektion von Streptozotocin ein Insulinmangeldiabetes induziert. Der Diabetes manifestierte sich in einer Hyperglykämie, einer Glukosurie, einer Polyurie, einer Polydipsie sowie einer Erhöhung der D-3-Hydroxybutyratserumkonzentration. Das Körpergewicht der diabetischen Ratten war im Vergleich mit dem der Kontrolltiere verringert, das relative Herzgewicht erhöht. Nachfolgend wurde die Genexpression von Zellbestandteilen, denen entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie zugeschrieben werden, analysiert. Die Untersuchung der kardialen Myosine ergab, daß im diabetischen Herzen die energiereiche α -Isoform der Myosin Schwere Ketten stark vermindert und die energieärmere β -Isoform deutlich gesteigert ausgebildet werden, und legt die Vermutung nahe, daß die im Diabetes mellitus eingeschränkte Kontraktilität des Herzens auf einer veränderten Expression der kontraktilen Elemente beruht. Die Analyse des Glukosetransporter 4 (Glut 4) zeigte im Diabetes eine Verminderung sowohl des Protein- als auch des mRNA-Gehaltes an Glut 4 im Herzmuskel. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß, neben der verminderten Rekrutierung von im Zytosol gelagerten Glukosetransportern, eine insgesamt verminderte Synthese des Transporters verantwortlich für den herabgesetzten Glukosetransport in die Myokardzelle ist. Angesichts der in der vorliegenden Arbeit gezeigten reduzierten myokardialen Expression von mRNA der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase (SERCA) im Diabetes, ist anzunehmen, daß sie ursächlich für die Aktivitätsabnahme der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase ist. Infolge der reduzierten Aktivität der SERCA kommt es zur Überladung der Herzmuskelzelle mit Kalziumionen und somit zu Kontraktionseinbußen des Herzmuskels. Die Expression des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors zeigte sich vom diabetischen Stoffwechselzu-

stand unbeeinflusst und kann somit nicht als Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems dienen. Vielmehr ist anzunehmen, daß die im Diabetes beschriebene Überaktivität des Renin-Angiotensin-Systems auf einer gestörten Wechselwirkung zwischen dem vasodilatierend wirkenden *NO* und dem vasokonstriktiven Angiotensin II beruht. Die Ergebnisse, die nach der Behandlung der Versuchstiere mit Etomoxir[®] erzielt wurden, müssen zurückhaltend diskutiert werden, da sich die untersuchten Serumparameter Glukose, D-3-Hydroxybutyrat und Triglyzeride unter der Therapie nicht veränderten. Andere Arbeitsgruppen, die das Medikament von einem anderen Hersteller bezogen, konnten, bei ansonsten gleichen Bedingungen, Angleichungen der Serumparameter an den Normalzustand zeigen. Das nach Applikation von Etomoxir[®] erhöhte relative Herzgewicht sowohl der diabetischen als auch der stoffwechselgesunden Tiere spricht jedoch gegen eine Wirkungslosigkeit des Medikamentes. Desweiteren kam es bei der Gabe des Carnitin Palmitoyltransferase I-Hemmers zu einer partiellen Normalisierung der im Diabetes veränderten Myosinzusammensetzung. Bei Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich des Glukosetransporters 4 und der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase kann lediglich die Aussage getätigt werden, daß bei Dosierungen, die ausreichen, die Expression der Myosin-Isoformen zum Teil zu normalisieren, Veränderungen im Vergleich mit den unbehandelten Tieren nicht gezeigt werden konnten. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß es bei Dosierungen des Medikamentes, die zu den eigentlich erwarteten Serumparameterveränderungen führen, zur Angleichung der im Diabetes veränderten Synthese von Glut4 und SERCA kommt. Die partielle Normalisierung der kardialen Myosine läßt eine positive Wirkung von Etomoxir[®] auf die diabetische Kardiomyopathie vermuten. Weitere Untersuchungen werden jedoch nötig sein, um abzuschätzen, ob bei Dosierungen, die ausreichend sind, um die D-3-Hydroxybutyrat- und die Glukoseserumkonzentration zu senken, sich auch Veränderungen der Genexpression des Glukosetransporters 4 und der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase zeigen.

Literaturverzeichnis

- [1] STARKE, A. A. R. Physiologie des Kohlenhydratstoffwechsels und Regulation der Glukose-Homöostase. In: Berger, M. (Hrsg.): Diabetes mellitus. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore: 3-11, 1995.
- [2] STRYER, L. Biochemie. Spektrum-der-Wissenschaft-Verlagsgesellschaft: 1011-1040, 1990.
- [3] STARKE, A. A. R. Pathophysiologie und Pathobiochemie des Insulinmangels bei Typ-I-Diabetes. In: Berger, M. (Hrsg.): Diabetes mellitus. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore: 215-225, 1995.
- [4] RANDLE, P. J.; GARLAND, P. B.; HALES, C. N.; NEWSHOLME, E. A. The glucose fatty acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet 1: 785-789, 1963.
- [5] KOLB, H. Diabetes. In: Gemsa, D.; Kalden, J. R.; Resch, K. (Hrsg.): Immunologie. Grundlagen, Klinik, Praxis. Thieme, Stuttgart-New York: 503-511, 1990.
- [6] ZIEGLER, A.-G.; HILLEBRAND, B.; RABL, W.; MAYRHOFER, M.; HUMMEL, M.; MOLLENBAUER, U.; VORDERMANN, J.; LENZ, A.; STANDL, E. On the appearance of islet associated autoimmunity in offspring of diabetic mothers: a prospective study from birth. Diabetologia 36: 402-408, 1993.
- [7] STARKE, A. A. R. Pathophysiologie, Pathogenese und Genetik des Stoffwechselsyndroms des Typ-II-Diabetes. In: Berger, M. (Hrsg.): Diabetes mellitus. Urban & Schwarzenberg, München-Wien-Baltimore: 369-387, 1995.
- [8] HAUNER, H.; VON FERBER, L.; KÖSTER, I. Schätzung der Diabeteshäufigkeit in der Bundesrepublik Deutschland anhand von

- Krankenkassen-Daten. Sekundäranalyse einer repräsentativen Stichprobe AOK-Versicherter der Stadt Dotmund. Dtsch. med. Wschr. 117: 645-650, 1992.
- [9] RATZMANN, K. P. Eine Analyse von alters- und geschlechtsspezifischer Diabetesprävalenz sowie Behandlungsart: die Berlin-Studie. Akt. Endokr. Stoffw. 12: 220-223, 1991.
- [10] MICHAELIS, D.; JUTZI, E.; VOGT, L. Epidemiology of insulin-treated diabetes mellitus in the East-Germany population: differences in long-term trends between incidence and prevalence rates. Diabete.-Metab. 19: 110-115, 1993.
- [11] JÖRGENS, V.; GRÜSSER, M.; BOTT, U.; MÜHLHAUSER, I.; BERGER, M. Effective and safe translation of intensified insulin therapy to general internal medicine departments. Diabetologia 36: 99-105, 1993.
- [12] WILLIAMS, G. H.; BRAUNWALD, E. Endocrine and nutritional disorders and heart disease. In: Braunwald, E. (eds.): Heart disease. 4th ed. pp. 1827-1855. Saunders, Philadelphia-London-Toronto 1992.
- [13] KANNEL, W. B.; HJARTLAND, M.; CASTELLI, W. P. Role of diabetes in congestive heart failure. The Framingham Study. Amer. J. Cardiol. 34: 29-34, 1974.
- [14] UUSITUPA, M.; SIITONEN, O.; PYÖRÄLÄ, K.; LÄNSIMIIES, E. Left ventricular function in newly diagnosed non-insulin-dependent (type 2) diabetics evaluated by systolic time intervals and echocardiography. Acta Med. Scand. 217: 379-388, 1985.
- [15] OPIE, L. H. Energy metabolism and ventricular function. In: The Heart. Grune & Straton, London, pp. 111-212.
- [16] BRICKNELL, O. I.; OPIE, L. H. Effects of substrates on tissue metabolic changes in the isolated rat heart during underperfusion and on release of lactate dehydrogenase and arrhythmias during reperfusion. Circ. Res. 43:102-115, 1978.

- [17] GANGULY, P. K.; PIERCE, G. N.; DHALLA, K. S.; DHALLA, N. S. Defective cardiac sarcoplasmic reticular calcium transport in diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.* 244: E528-535, 1983.
- [18] RÖSEN, P.; POGATSA, G.; TSCHÖPE, D.; ADDICKS, K.; REINAUER, H. Diabetische Kardiopathie - Pathophysiologische Konzepte und therapeutische Ansätze. *Klin. Wochenschrift.* 69 (Suppl. XXIX): 3-15, 1992.
- [19] CLOZEL, M.; KUHN, H.; HEFTI, F.; BAUMGARTNER, H. R. Endothelial dysfunction and sub-endothelial monocyte macrophages in hypertension. Effect of angiotensin enzyme inhibition. *Hypertension* 18: 132-141, 1991.
- [20] LINSSEN, M.; VAN NIEUWENHOVEN, F. A.; DUIJVESTIJN, A. M.; GLATZ, J. F. C.; VAN DER VUSSE, G. J. Continuous endothelial cell lines obtained from adult rat heart. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 29 A: 611-613, 1993.
- [21] LANGENDORFF, O. Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen. Hrsg.: Pflügler, E. W. F.: Für die gesammte Physiologie des Menschen und der Thiere. Band 61: 291-332, 1895.
- [22] HIRSCH, B. C. Charakterisierung des Glukosetransportes in Rattenherz-Endothelzellen: Einfluß von Insulin und Diabetes. Dissertation, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1997.
- [23] FISCHER, Y.; ROSE, H.; KAMMERMEIER, H. Highly insulin-responsive isolated rat heart muscle cells yielded by a modified isolation method. *Life Sci.* 49: 1679-1688, 1991.
- [24] RERUP, C. C. Drugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. *Pharmacol. Rev.* 22: 485-518, 1970.
- [25] EISTETTER, K.; WOLF, H. P. O. Etomoxir. *Drugs of the Future* 11: 1034-1036, 1986.

- [26] MCGARRY, J. D.; WOELTJE, K. F.; KUWAJIMA, M. ET AL. Regulation of ketogenesis and the renaissance of carnitine palmitoyltransferase. *Diabetes Metab. Rev.* 5: 271-284, 1959.
- [27] WILLIAMSON, D. H.; MELLANBY, J.; KREBS, H. A. Enzymatic determination of D(-)-beta-hydroxybutyric acid and acetoacetic acid in blood. *Biochem. J.* 82: 90, 1962.
- [28] BIRNBAUM, M. J.; HASPEL, H. C.; ROSEN, O. M. Cloning and characterization of a cDNA encoding the rat brain glucose-transport protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 5784 - 5788, 1986.
- [29] HASPEL, H. C.; ROSENFELD, M. G.; ROSEN, O. M. Characterization of antisera to a synthetic carboxy-terminal peptide of the glucose transporter protein. *J. Biol. Chem.* 263: 398 - 403, 1988.
- [30] JAMES, D. E.; STRUBE, M.; MUECKLER, M. Molecular cloning and characterization of an insulin-regulatable glucose transporter. *Nature* 338: 83 - 87, 1989.
- [31] HÖNACK, C. Glukose-Transporter in kultivierten Endothelzellen aus Rinderaorta. Diplomarbeit, Universität zu Köln, 1992.
- [32] WESTERMEIER R. ET AL. Pharmacia SD 008/89.
- [33] WESTERMEIER, R.; GRONAU, S.; SCHICKLE, H. Semidry-Blotting von Proteinen aus SDS- und IEF-Polyacrylamidgelen. Pharmacia LKB GmbH, Biotechnologie, SD RE-072.
- [34] BIO-RAD BULLETIN 1156 Acrylamid Polymerization - A Practical Approach, Bio-Rad Laboratories, Richmond, California (1984).
- [35] SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [36] BIBERFELD, P.; GHETIE, V.; SJÖQUIST, J. Demonstration and assay of IgG antibodies in tissues and on cells by labeled staphylococcal protein A. *J. Immunol. Methods* 6: 249 - 259, 1975.

- [37] CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 156-159, 1987.
- [38] CHIRGWIN, J. M.; DRZYBYLA, A. E.; MACDONALD, R. J. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18: 5294-5299, 1979.
- [39] HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166: 557 - 565, 1983.
- [40] QIAGEN Plasmid Handbook, Winter 1992/93, Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland).
- [41] BIRNBAUM, M. J. Identification of a novel gene encoding an insulin-responsive glucose transporter protein. *Cell* 57: 303-315, 1989.
- [42] FORT, P.; MARTY, L.; PIECHAZCYK, M.; EL SABROUTY, S.; JEANTENEUR, P.; BLANCHARD, J. M. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 13: 1431-1442, 1985.
- [43] KRAFT, R.; BRAVO-ZEHNDER, M.; TAYLOR, D. A.; LEINWAND, L. A. Complete nucleotide sequence of full length cDNA for rat beta cardiac myosin heavy chain. *Nucleic Acids Res.* 17: 7529 - 7530, 1989.
- [44] MCNALLY, M.; KRAFT, R.; BRAVO-ZEHNDER, M.; TAYLOR, D. A.; LEINWAND, L. A. Full length rat alpha and beta cardiac myosin heavy chain sequences comparisons suggest a molecular basis for functional differences. *Journal of Molecular Biology* 210: 665-671, 1989.
- [45] JETsorb DNA Extraction from Agarose Gels. Protocol, January 1994, Genomed GmbH (Bad Oeynhausen, Deutschland).
- [46] Random Primed Labelling Kit Instructions, 6. Auflage, Boehringer Mannheim GmbH.

- [47] SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354, 1985.
- [48] MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARF, S.; SAIKI, R.; HORN, G.; ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51: 263-273, 1986.
- [49] MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific Synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350, 1987.
- [50] HU, A. L. W.; D' ALESSIO, J. M.; GERARD, J. M.; KULLMANN, J. RT-catalyzed first-strand synthesis and the amplification of beta-actin mRNA using the polymerase chain reaction. *BRL-Focus* 13: 26-29, 1991.
- [51] SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487, 1988.
- [52] RUPP, H.; ELIMBAN, V.; DHALLA, N. S. Modification of myosin isozymes and SR Ca^{2+} -pump ATPase of the diabetic rat heart by lipid-lowering interventions. *Molecular and Cellular Biochemistry* 132: 69-80, 1994.
- [53] STETZKOWSKI, M. Auswirkungen des Carnitinpalmityltransferase-I-Hemmstoffes Etomoxir auf Parameter des Glucose- und Lipidstoffwechsels, die Herzfunktion und das Isomyosin-Muster des Herzmuskels diabetischer Ratten nach einmonatiger Therapie. Dissertation, Medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, 1995.
- [54] DILLMANN, W. H. Diabetes mellitus induces changes in cardiac myosin of the rat. *Diabetes* 29: 579-582, 1980.

- [55] D' ALBIS, A.; PANTALONI, C.; BECHET, J. J. An electrophoretic study of native myosin isoenzymes and of their subunit content. *Eur. J. Biochem.* 99: 261-272, 1979.
- [56] SCHWARTZ, K.; LECARPENTIER, Y.; MARTIN, J. L.; LOMPRES, A. M.; MERCADIER, J. J.; SWYNGHEDAUW, B. Myosin isoenzyme distribution correlated with speed of myocardial contraction. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13: 1071-1075, 1985.
- [57] LIENHARD, G. E.; SLOT, J. W.; JAMES, D. E.; MUECKLER, M. M. Glucose-Transportproteine. *Spektrum der Wissenschaft März 1992*: 48-54.
- [58] GOULD, G. W.; HOLMAN, G. D. The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression. *Biochem. J.* 295: 329-341, 1993.
- [59] UNGAR, I.; GILBERT, M.; SIEGEL, A.; BLAIN, J. M.; BING, R. J. Studies on myocardial metabolism. IV. Myocardial metabolism in diabetes. *Am. J. Med.* 17: 385-396, 1955.
- [60] SLOT, J. W.; GEUZE, H. J.; GIGENGACK, S.; JAMES, D. E.; LIENHARD, G. E. Translocation of the glucose transporter GLUT 4 in cardiac myocytes in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7815-7819, 1991.
- [61] GARVEY, W. T.; HARDIN, D.; JUHASZOVA, M.; DOMINGUEZ, J. H. Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rats: implications for diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.* 264: H837-H844, 1993.
- [62] PICHLER, M.; KLEIN, W.; HUBER, K.; PACHINGER, O. Blockade des Renin-Angiotensin-Systems: ACE-Hemmer und Angiotensin-II-Rezeptorblocker. *Wien. med. Wschr.* 146: 228-231, 1996.
- [63] SECHI, L. A.; GRIFFIN, C. A.; SCHAMBELAN, M. The cardiac renin-angiotensin system in STZ-induced diabetes. *Diabetes* 43: 1180-84, 1994.

- [64] BAKER, K. M.; BOOZ, G. W.; DOSTAL, D. E. Cardiac actions of angiotensin II: role of an intracardiac renin-angiotensin system. *Annu. Rev. Physiol.* 54: 227-41, 1992.
- [65] BOTTARI, S. P.; DE GASPARO, M.; STECKELINGS, U. M.; LEVENS, N. R. Angiotensin II receptor subtypes: characterization, signalling mechanisms and possible physiological implications. *Frontiers in Neuroendocrinology* 14, No. 2: 123-171, 1993.
- [66] HÖNACK, C.; RÖSEN, P. Inhibition of angiotensin Type 1 receptor prevents decline of glucose transporter (GLUT 4) in diabetic rat heart. *Diabetes* 45 Suppl. 1: S82-S87, 1996.
- [67] SUZUKI, J.; MATSUBARA, H.; URAKAMI, M.; INADA, M. Rat angiotensin II (type 1A) receptor mRNA regulation and subtype expression in myocardial growth and hypertrophy. *Circ. Res.* 73: 439-447, 1993.
- [68] MURPHY, T. J.; ALEXANDER, R. W.; GRIENGLING, K. K.; RUNGE, M. S.; BERNSTEIN, K. E. Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature (Lond.)* 351: 233-236, 1991.
- [69] IWAI, N.; INAGAMI, T. Identification of two subtypes in the rat type 1 angiotensin II receptor. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 177: 299-304, 1991.
- [70] FORT, P.; MARTY, L.; PIECHACZYK, M.; EL SABROUTY, S.; DANI, C.; JEANTEUR, P.; BLANCHARD, J. M. Various rat adult tissues express only one major mRNA species from the glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase multigenic family. *Nucleic Acids Res.* 13: 1431-1442, 1985.
- [71] MATSUBARA, H.; KANASAKI, M.; MURASAWA, S.; TSUKAGUCHI, Y.; NIO, Y.; INADA, M. Differential gene expression and regulation of angiotensin II receptor subtypes in rat cardiac fibroblasts and cardiomyocytes in culture. *J. Clin. Invest.* 93: 1592-1601, 1994.

- [72] LIU, S.; ADCOCK, I. M.; OLD, R. W.; BARNES, P. J.; EVANS, T. W. Lipopolysaccharid treatment *invivo* induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 196: 1208-1213, 1993.
- [73] LEVY, J.; GAVIN, J. R. III; SOWERS, J. R. Diabetes mellitus: a disease of abnormal cellular calcium metabolism? *The American Journal of Medicine* 96: 260-273, 1994.
- [74] TOMLINSON, K. C.; GARDINER, S. M.; HEBDEN, R. A.; BENNETT, T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular reference to the cardiovascular system. *The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics* 44 No.1: 103-150, 1992.
- [75] RUSS, M.; REINAUER, H.; ECKEL, J. Diabetes-induced decrease in the mRNA coding for sarcoplasmic reticulum in adult rat cardiomyocytes. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 178: 906-912, 1991.
- [76] ZARAIN-HERZBERG, A.; YANO, K.; ELIMBAN, V.; DHALLA, N. S. Cardiac sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase expression in streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 203: 113-120, 1994.
- [77] LOMPRES, A. M.; DE LA BASTIE, D.; BOHELER, K. R.; SCHWARTZ, K. Characterization and expression of the rat heart sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase mRNA. *FEBS Lett.* 249: 35-41, 1989.
- [78] SANTIAGO-GARCIA, J.; MAS-OLIVA, J.; SAAVEDRA, P.; ZARAIN-HERBERG, A. Analysis of mRNA expression and cloning of a novel plasma membrane Ca^{2+} -ATPase splice variant in human heart. *Mol. Cell. Biochem.* 155: 173-182, 1996.
- [79] GARCIA, M. J.; MCNAMARA, P. M.; GORDON, T.; KANNELL, W. B. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population: sixteen year followup study. *Diabetes* 23: 105-111, 1974.

- [80] RAKIETEN, N.; RAKIETEN, M. L.; NADKARNI, M. V. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). *Cancer Chemother. Rep.* 29: 91-98, 1963.
- [81] JUNOD, A.; LAMBERT, A. E.; ORCI, L.; PICTET, R.; GONET, A. E.; RENOLD, A. E. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 126: 201-205, 1967.
- [82] WILSON, G. M.; LEITER, E. H. Streptozotocin interactions with pancreatic β -cells and the induction of insulin-dependent diabetes. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 156: 27-54, 1990.
- [83] ARBUCK, S. G. Overview of chemotherapy for pancreatic cancer. *Int. J. Pancreatol.* 7: 209-222, 1990.
- [84] RÖSEN, P.; REINAUER, H. Inhibition of carnitine palmitoyltransferase 1 by phenylalkyloxiranecarboxylic acid and its influence on lipolysis and glucose metabolism in isolated, perfused hearts of streptozotocin-diabetic rats. *Metabolism* 33: 177-185, 1984.
- [85] SCHMITZ, F. J.; RÖSEN, P.; REINAUER, H. Improvement of myocardial function and metabolism in diabetic rats by carnitine palmitoyl transferase inhibitor Etomoxir. *Horm. Metab. Res.* 27: 515-522, 1995.
- [86] HAJINAZARIAN, M.; COSIO, F. G.; NAHMAN, N. S.; MAHAN, J. D. Angiotensin-converting enzyme inhibition partially prevents diabetic organomegaly. *Am. J. Kidney Dis.* 23: 105-117, 1994.
- [87] GARVEY, W. T.; HARDIN, D.; JUHASZOVA, M.; DOMINGUEZ, J. H. Effects of diabetes on myocardial glucose transport system in rats: implications for diabetic cardiomyopathy. *Am. J. Physiol.* 264: H837-H844, 1993.
- [88] GARLAND, P. B.; RANDLE, P. J.; NEWSHOLME, E. A. Citrate as an intermediary in the inhibition of PFK in rat heart and muscle by fatty acids, ketone bodies, pyruvate, diabetes and starvation. *Nature* 200: 169-170, 1963.

- [89] ENGLAND, P. J.; RANDLE, P. J. Effectors of rat-heart hexokinases and the control of rates of glucose phosphorylation in the perfused rat heart. *Biochem. J.* 105: 907-920, 1967.
- [90] GARLAND, P. B.; RANDLE, P. J.; NEWSHOLME, E. A. Effect of fatty acids, ketone bodies, diabetes and starvation on pyruvate metabolism in rat heart and diaphragm muscle. *Nature* 195: 381-383, 1962.
- [91] GARLAND, P. B.; RANDLE, P. J.; NEWSHOLME, E. A. Regulation of glucose uptake by muscle. *Biochem. J.* 93: 665-678, 1964.
- [92] SKORIN, C.; NECOCHEA, C.; JOHOW, V.; SOTO, U.; GRAU, M. A.; BREMER, J.; LEIGHTON, F. Peroxisomal fatty acid oxidation and inhibitors of the mitochondrial carnitin pamtoltransferase I in isolated rat hepatocytes. *Biochem. J.* 281: 561-567, 1992.
- [93] VAARTJES, W. J.; DE HAAS, C. G. M.; HAAGSMAN, H. P. Effects of sodium 2-[5-(4-chlorophenyl)-pentyl]-oxirane-2-carboxylate (PO-CA) on intermediary metabolism in isolated rat liver cells. *Biochem. Pharmacol.* 35: 4267-4272, 1986.
- [94] ROGERS, M. P. Effects of 2-[5-(4-chlorophenyl)pentyl]-oxirane-2-carboxylate on protein-lipase, adipose tissue lipolysis and glycerol phosphate acyltransferase in rats. *Biochem. Pharmacol.* 36: 971-972, 1987.
- [95] MALHORTA, A.; PENPARGKUL, S.; FEIN, F. S.; SONNENBLICK, E. H.; SCHEUER, J. The effect of streptozotocin induced diabetes in rats on cardiac contractile proteins. *Circ. Res.* 49: 1243-1250, 1981.
- [96] MAHDAVI, V.; PERIASAMY, M.; NADAL-GINARD, B. Molecular characterization of two myosin heavy chain genes expressed in the adult heart. *Nature* 297: 659-664, 1982.
- [97] ALPERT, N. R.; MULIERI, L. A. Functional consequences of altered cardiac myosin isoenzymes. *Med. Sci. Sport and Exer.* 18: 309-313, 1986.

- [98] DILLMANN, W. H. Fructose feeding increases Ca^{++} activated myosin ATPase activity and changes myosin isoenzyme distribution in the diabetic rat heart. *Endocrinology* 114: 1678-1685, 1984.
- [99] DILLMANN, W. H.; BERRY, S.; ALEXANDER, N. M. A physiological dose of triiodothyronine normalizes cardiac myosin adenosine triphosphatase activity and changes myosin isoenzyme distribution in semistarved rats. *Endocrinology* 112: 2081-2087, 1983.
- [100] SWOAP, S. J.; HADDAD, F.; BODELL, P.; BALDWIN, K. M. Control of beta myosin heavy chain expression in systematic hypertension and caloric restriction in the rat heart. *Am. J. Physiol.* 269: C1025-C1033, 1995.
- [101] LOMPRES, A. M.; NADAL-GINARD, B.; MAHDAVI, V. Expression of the cardiac alpha- and beta-myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated. *J. Biol. Chem.* 259: 6437-6446, 1984.
- [102] SELBY, P. L.; SHERRATT, H. S. A. Substituted 2-oxiranecarboxylic acids: a new group of candidate hypoglycaemic drugs. *Trends Pharmacol.* 10: 495-500, 1989.
- [103] RUPP, H.; ELIMBAN, V.; DHALLA, N. S. Diabetes-like action of intermittent fasting on sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -pump ATPase and myosin isoenzymes can be prevented by sucrose. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 164: 319-325, 1989.
- [104] MORRIS, G. S.; SURDYKA, D. G.; HADDAD, F.; BALDWIN, K. M. Apparent influence of metabolism on cardiac isomyosin profile of food-restricted rats. *Am. J. Physiol.* 258: R346-R351, 1990.
- [105] OPIE, L. H. Metabolic response during impending myocardial infarction. I. Relevance of studies of glucose and fatty acid metabolism in animals. *Circulation* 45: 483-490, 1972.
- [106] WISENSKI, J. A.; GERT, E. W.; NEESE, R. A.; GRUENKE, L. D.; MORRIS, D. L.; CRAIG, J. C. Metabolic fate of extracted glucose in normal human myocardium. *J. Clin. Invest.* 76: 1819-1827, 1985.

- [107] OPIE, L. H.; MANSFORD, K. R. L.; OWEN, P. Effects of increased heart work and glycolysis and adenine nucleotides in the perfused heart of normal and diabetic rats. *Biochem. J.* 124: 475-490, 1971.
- [108] AVOGARO, A.; NOSADINI, R.; DORIA, A.; FIORETTO, P.; VELUSI, M.; VIGORITO, C.; SACCA, L.; TOFFOLO, G.; COBELLI, C.; TREVISAN, R.; DUNER, E.; RAZZOLINI, R.; RENGO, F.; CREPALDI, G. Myocardial metabolism in insulin-deficient diabetic humans without coronary artery disease. *Am. J. Physiol.* 258 (Endocrinol. Metab. 21): E606-E618, 1990.
- [109] WHITMER, J. T.; IDELL-WENGER, J. A.; ROVETTO, M. J.; NEELY, J. R. Control of fatty acid metabolism in ischemic and hypoxic hearts. *J. Biol. Chem.* 253: 4305-4309, 1978.
- [110] OPIE, L. H. Exercise and the myocardial factor in ischaemic heart-disease. *Lancet* 1: 1067-1068, 1973.
- [111] GERTZ, E. W.; WISNESKI, J. A.; STANLEY, W. C.; NEESE, R. A. Myocardial substrate utilization during exercise in humans. Dual carbon-labeled carbohydrate isotope experiments. *J. Clin. Invest.* 82: 2017-2025, 1988.
- [112] MORGAN, H. E.; HENDERSON, M. J.; REGEN, D. M.; PARK, C. R. Regulation of glucose uptake in muscle. I. The effects of insulin and anoxia on glucose transport and phosphorylation in the isolated, perfused heart of normal rats. *J. Biol. Chem.* 236: 253-261, 1961.
- [113] HACKER, T. A.; HALL, J. L.; STONE, C. K.; STANLEY, W. C. Alanine, glutamate, and ammonia exchanges in acutely ischemic swine myocardium. *Basic. Res. Cardiol.* 87: 184-192, 1992.
- [114] KALFF, V.; SCHWAIGER, M.; NGUYEN, N.; MCCLANAHAN, T. B.; GALLAGHER, K. P. The relationship between myocardial blood flow and glucose uptake in ischemic canine myocardium determined with fluorine-18-deoxyglucose. *J. Nucl. Med.* 33: 1346-1353, 1992.

- [115] NEELY, J. R.; BOWMAN, R. H.; MORGAN, H. E. Effects of ventricular pressure development and palmitate on glucose transport. *Am. J. Physiol.* 216: 804-811, 1969.
- [116] ALMIRA, E. C.; BOSHELL, B. R.; GARCIA, A. R. Insulin binding and glucose transport activity in cardiomyocytes of a diabetic rat. *Am. J. Physiol.* 250: E402-E406, 1986.
- [117] FISCHER, Y.; THOMAS, J.; RÖSEN, P.; KAMMERMEIER, H. Action of metformin on glucose transport and glucose transporter GLUT 1 and GLUT 4 in heart muscle cells from healthy and diabetic rats. *Endocrinology* 136: 412-420, 1995.
- [118] KAHN, B. B. Facilitative glucose transporters: regulatory mechanisms and dysregulation in diabetes. *J. Clin. Invest.* 89: 1367-1374, 1992.
- [119] FEIN, F. S.; SONNENBLICK, E. H. Diabetic cardiomyopathy. *Prog. Cardiovasc. Res.* 27: 255-270, 1985
- [120] PENPARGKUL, S.; FEIN, F.; SONNENBLICK, E. H.; SCHEUER, J. Depressed cardiac sarcoplasmic reticular function from diabetic rats. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 13: 303-309, 1981.
- [121] LOPASCHUK, G. D.; TAHILIANI, A. G.; VADLAMUDI, R. V. S. V.; KATZ, S.; MCNEILL, J. H. Cardiac sarcoplasmic reticulum function in insulin- or carnitine-treated diabetic rats. *Am. J. Physiol.* 245: H969-H976, 1983.
- [122] MACLENNAN, D. H. Molecular tools to elucidate problems in excitation-contraction coupling. *Biophys. J.* 58: 1355-1365, 1990.
- [123] INESI, G. Mechanism of calcium transport. *Annu. Rev. Physiol.* 47: 573-601, 1985.
- [124] DE MEIS, L. Fast efflux of Ca^{2+} mediated by the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 266: 5736-5742, 1991.

- [125] LYTTON, J.; ZARAIN-HERZBERG, A.; PERIASAMY, M.; MACLENNAN, D. H. Molecular cloning of the mammalian smooth muscle sarco(endo)plasmatic reticulum Ca^{2+} -ATPase. *J. Biol. Chem.* 264: 7059-7065, 1989.
- [126] BRANDL, C. J.; DELEON, S.; MARTIN, D. R.; MACLENNAN, D. H. Adult forms of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmatic reticulum. Expression in developing skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 262: 3768-3774, 1987.
- [127] LYTTON, J.; WESTLIN, M.; BURK, S. E.; SHULL, G. E.; MACLENNAN, D. H. Functional comparison between isoforms of the sarcoplasmatic or endoplasmatic reticulum family of calcium pumps. *J. Biol. Chem.* 267: 14483-14489, 1992.
- [128] DILLMANN, W. H. In *The Diabetic Heart* (M. Nagano, and N. S. Dhalla, Eds.), pp. 263, 270, Raven Press Ltd., New York, 1991.
- [129] DHALLA, N. S.; ELIMBAN, V.; RUPP, H. Paradoxical role of lipid metabolism in heart function and dysfunction. *Mol. Cell. Biochem.* 116: 3-9, 1992.
- [130] MORGAN, M. E.; BAKER, K. M. Cardiac hypertrophy: mechanical, neural and endocrine dependence. *Circulation* 83: 13-25, 1991.
- [131] SEALEY, J. E.; LARAGH, J. H. The renin-angiotensin-aldosterone system for normal regulation of blood pressure and sodium and potassium homeostasis. In: Laragh, J. H.; Brenner, B. M., eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. New York, NY: Raven Press Ltd: 1287-1317, 1990.
- [132] ERDOS, E. G. The angiotensin I converting enzyme. *Fed. Proc.* 36: 1760-1765, 1977.
- [133] FOLKOW, B.; JOHANSSON, B.; MELLANDER, S. The comparative effects of angiotensin and noradrenaline on consecutive vascular sections. *Acta Physiol. Scand.* 53: 99-104, 1961.

- [134] ZIMMERMANN, B. G.; SYBERTZ, E. J.; WONG, P. C. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system. *J. Hypertens.* 2: 581-587, 1984.
- [135] BIRON, P.; KOIW, E.; NOWACZYNSKI, W. The effects of intravenous infusions of valine-5 angiotensin II and other pressor agents on urinary electrolytes and corticoids including aldosterone. *J. Clin. Invest.* 60: 338-347, 1961.
- [136] ITOH, H.; MUKOYAMA, M.; PRATT, R. E.; GIBBONS, G. H.; DZAU, V. J. Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J. Clin. Invest.* 91: 2268-2274, 1993.
- [137] DOSTAL, D. E.; BOOZ, G. W.; BAKER, K. M. Angiotensin II signaling pathways in cardiac fibroblasts: conventional versus novel mechanisms in mediating cardiac growth and function. *Mol. Cell. Biochem.* 157: 15-21, 1996.
- [138] HUCKLE, W. R.; EARP, H. S. Regulation of cell proliferation and growth by angiotensin II. *Prog. Growth Factor Res.* 5: 177-194, 1994.
- [139] KATZ, A. Angiotensin II: hemodynamic regulator or growth factor? *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 22: 739-747, 1990.
- [140] KEANE, W. F.; ANDERSON, S.; AURELL, M.; DE ZEEUW, D.; NARINS, R. G.; POVAR, G. Angiotensin converting enzyme inhibitors and progressive renal insufficiency: current experience and future directions. *Annals of Internal Medicine* 111: 503-516, 1989.
- [141] WEBER, K. T.; SUN, Y.; GUARDA, E. Structural remodeling in hypertensive heart disease and the role of hormones. *Hypertension* 23: 869-877, 1994.
- [142] WOLF, G.; MUELLER, E.; STAHL, R. A.; ZIYADEH, F. N. Angiotensin II-induced hypertrophy of cultured murine proximal tubular cells is mediated by endogenous transforming growth factor-beta. *J. Clin. Invest.* 92: 1366-1372, 1993.

- [143] WOLF, G. Angiotensin as a renal growth promoting factor. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 377: 225-236, 1995.
- [144] HSUEH, W. A. Effect of the renin-angiotensin system in the vascular disease of type II diabetes mellitus. *American Journal of Medicine* 92 (Suppl. 4B) 13S-19S, 1992.
- [145] LEWIS, E. J.; HUNSICKER, L. G.; BAIN, R. P.; ROHDE, R. D. The effect of angiotensin-converting-enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *New England Journal of Medicine* 329: 1456-1462, 1993.
- [146] RÖSEN, R.; RUMP, A. F. E.; RÖSEN, P. The ACE-inhibitor captopril improves myocardial perfusion in spontaneously diabetic (BB) rats. *Diabetologia* 38: 509-517, 1995.
- [147] STOLL, M.; STECKELINGS, M.; PAUL, M.; BOTTARI, S. P.; METZGER, R.; UNGER, T. The angiotensin AT₂-receptor mediates inhibition of cell proliferation in coronary endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 95: 651-657, 1995.
- [148] WESTLIN, W.; MULLANE, K. Does captopril attenuate reperfusion-induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals? *Circulation* 77: I30-I39, 1988
- [149] BAGCHI, D.; PRASAD, R.; DAS, D. K. Direct scavenging of free radicals by captopril, an angiotensin converting enzyme inhibitor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 158:52-57, 1989.
- [150] RÖSEN, P.; BALLHAUSEN, T.; BLOCH, W.; ADDICKS, K. Endothelial relaxation is disturbed by oxidative stress in the diabetic heart: Influence of tocopherol as antioxidant. *Diabetologia* 38: 1157-1168, 1995.
- [151] HOU, J.; KATO, H.; COHEN, R. A.; CHOBANIAN, A. V.; BRECHER, P. Angiotensin II-induced cardiac fibrosis in the rat is increased by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.* 96: 2469-2477, 1995.

A Verwendete Materialien

Verwendete Chemikalien, Geräte sowie Lieferanten

- AGS GmbH, 69123 Heidelberg, Deutschland
Restriktionsenzyme, kleine Agarosegelkammer
- Amersham-Buchler GmbH & Co. KG, 38001 Braunschweig, Deutschland
 ^{125}I -Protein A, $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ -dATP, $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -ATP, Hyperfilm MP Autoradiographiefilme, Sicherheitsartikel für Arbeiten mit Radioaktivität, Taq DNA Polymerase, MgCl_2 -Puffer 25 mM, 10 x PCR Reactionbuffer
- Applied Science & Technology AG, CH-6302 Zug, Schweiz
Etomoxir[®]
- Bayer AG, 51368 Leverkusen, Deutschland
Trasylol (Aprotinin)
- Beckmann Instruments GmbH, 80807 München, Deutschland
Ultrazentrifugen L5-65, L5-75, Optima, Rotoren Ti 70, SW40, SW60, Spektralphotometer DU 7400
- Behr Labortechnik GmbH, 40599 Düsseldorf, Deutschland
Assistent Taumelrollenmischer RM5
- Biochrom BeteiligungsGmbH & Co. Produktionsgesellschaft, 12247 Berlin, Deutschland
Kollagen A
- Biorad Laboratories GmbH, 80939 München, Deutschland (Sitz in Richmond, California, USA)
Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Zellophanfolie zum Einschweißen von Gelen
- Biozol Diagnostica Vertrieb GmbH, 85380 Eching, Deutschland (Produkte von Biomol, Sitz in Plymouth Meeting, PA, USA)
Cäsiumchlorid, MOPS

- Boehringer Mannheim GmbH, 68298 Mannheim, Deutschland
Restriktionsenzyme, Random Primed Labelling Kit, Streptozotocin, faf BSA, BSA
- Calbiochem-Novabiochem GmbH, 65796 Bad Soden, Deutschland
Antisera gegen die Glukosetransportproteine GLUT1 und GLUT4
- Costar, Cambridge, USA
25 cm²-Zellkulturflaschen
- DESAGA GmbH, Heidelberg, Deutschland
Diffusions-Entfärbe-Apparatur
- DE-VAU-GE Gesundkostwerk GmbH, 21339 Lüneburg, Deutschland
Frema-Reform Magermilchpulver (max. 1% Fett)
- DuPont de Nemours GmbH (NEN, Sorvall), 61343 Bad Homburg, Deutschland
[α -³²P]-dATP, [γ -³²P]-ATP, Kühlzentrifugen Superspeed RC-2B, RC-5B und Zubehör (Röhrchen und Adapter) sowie die Rotoren SS34 und GSA.
- Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, 22331 Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge, variable Pipetten, Plastikmörser
- Gerd Grosche GmbH & Co. KG, 44894 Bochum, Deutschland
Röntgenfilm-Entwicklungstanks
- Heraeus Instruments GmbH, 63450 Hanau, Deutschland
Werkbank Lamin Air HB 2448, Minifuge GL, Brutschrank Serie 6000
- Hoefer Scientific Instruments (Vertrieb SERVA)
Vertikalelektrophorese-Einheit
- Janke & Kunkel KG (IKA-Werk), 79219 Staufen, Deutschland
Ultra-Turrax Gewebehomogenisator
- Karl Friedrich Klees GmbH, 40221 Düsseldorf, Deutschland
Potter-Glasgefäße mit Teflon-Stößeln
- KMF Laborchemie Handels GmbH, 53757 Sankt Augustin, Deutschland
BCA Protein Assay Reagent (Artikel von Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA)
- Kodak-Eastman (Vertrieb: SIGMA)
Fotochemikalien (Entwickler, Fixierer)

- Leitz International GmbH & Co., 74078 Heilbronn, Deutschland
Mikroskop Leica DM-IRB
- Life Technologies Overseas GmbH, 76344 Eggenstein-Leopoldshafen, Deutschland
100 mM dNTPSet, 0,1 M DTT, SUPERSRIPTTM RNase H Reverse Transcriptase, TRIzolTM Reagent, 100 Base-Pair-Ladder
- Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Deutschland
gebräuchliche Lösungsmittel und Puffersalze
- Millipore GmbH, 65760 Eschborn, Deutschland
Immobilon-P Protein-Transfermembran, Sterilfilter, Whole-Band-Analyzer (BI-Systems-Corporation)
- MWG Biotech GmbH, 85560 Ebersberg, Deutschland
Elektrophoresekammer, Hybaid Thermal Reactor, spezifische PCR-Primer
- Peter Oehmen GmbH, 45141 Essen, Deutschland
Einmalartikel der Firma Falcon, Dynagard Sterilfilter 0,22 μ m und 0,8 μ m, Einmal-Pipetten der Firma Sarstedt
- Omni-Media, Cambridge, USA
Scanner XRS
- Pelikan AG, 30001 Hannover, Deutschland
Fount India Calligraphy Ink
- Pharmacia Biotech Europe GmbH, 79021 Freiburg, Deutschland
synthetische 42er-Oligonukleotide (α -, β -MHC), Percoll, Density Marker Beads
- Pharmacia-LKB, 79021 Freiburg, Deutschland
Submarine Elektrophorese-Einheit GNA 200, Stromgeber 2301 Macrodrive 1, Stromgeber EPS 400/500, Multitemp II Thermostatic Circulator, Gamma-Counter Compugamma, LMW Low Molecular Weight Electrophoresis Calibration Kit
- Polaroid, Cambridge, USA
Kamerasystem MP-4, selbst entwickelnder Film 665
- Promega, Mannheim, Deutschland
RNasin Ribonuclease Inhibitor

- Qiagen GmbH, 40724 Hilden, Deutschland
Plasmid-Präparations-Kit (Maxi-Säulen 500µg)
- Radiometer Deutschland GmbH, 47877 Willich, Deutschland
PHM 82 Standard pH-Meter, Einstab-Meßelektrode
- Raytest GmbH, 75334 Straubenhardt, Deutschland
Phospho-Imager FUJIX BAS1000 und Zubehör
- Sartorius GmbH, 37075 Göttingen, Deutschland
Laborfein- und Analysenwaagen
- Schleicher & Schüll GmbH, 37586 Dassel, Deutschland
Filterpapierbögen 580 x 600mm (2040B, „Watman“-Filterpapier)
- Schütt Labortechnik GmbH, 37075 Göttingen, Deutschland
Aldo-Xer-Geltrockner
- SERVA Feinbiochemika GmbH & Co. KG, 69115 Heidelberg, Deutschland
Acrylamid, Ammoniumperoxodisulfat, Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R-250 (Serva Blue), HEPES, TEMED, Produkte von Hoefer Scientific Instruments
- SIGMA-Aldrich Chemie GmbH, 82039 Deisenhofen, Deutschland
molekularbiologische Salze und Puffer, Chemikalien für Bakterienkultur, Kollagenase Typ XI, Trypsin, Penicillin, Streptomycin, PCR-Öl, Oligo(dT)-Primer, GTC, Phenol, Proteaseinhibitoren (Leupeptin, Pepstatin A, Benzamidin), 6-Aminohexansäure, Autoradiographiekassetten
- Sniff, Soest, Deutschland
Rattenfutter
- Winkelmann Versuchstierzucht GmbH & Co., 33178 Borcheln, Deutschland
männliche Wistar-Ratten (200-250g)
- Worthington biomedical corporation, Freehold, New Jersey, USA
Kollagenase CLS II
- Zinsser Analytik GmbH, 60489 Frankfurt am Main, Deutschland
Quicksafe A Szintillationscocktail für die Flüssig-Szintillationsmessung β -strahlender Isotope

B Verwendete Puffer

Tris-Acetat-EDTA (TAE) 50x	
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris) 242g/ℓ	2M
EDTA 14,61g/ℓ	50mM
mit Eisessig <i>pH</i> -Wert auf 8,0 einstellen, autoklavieren	

Tabelle B.1: Zusammensetzung des Tris-Acetat-EDTA (TAE) 50x

Tris-Borat-EDTA (TBE) 10x	
Tris 108g/ℓ	0,9M
Borsäure 55g/ℓ	0,9M
EDTA-Lösung [500mM, <i>pH</i> 8,0] 20ml/ℓ	10mM
autoklavieren	

Tabelle B.2: Zusammensetzung des Tris-Borat-EDTA

SSC 20x	
NaCl 175,3 g/ℓ	3M
Natriumzitat 88,2 g/ℓ	300mM
<i>pH</i> -Wert auf 7,0 einstellen, autoklavieren	

Tabelle B.3: Zusammensetzung des SSC 20x

SSPE 20x	
<i>NaCl</i> 210 g/ℓ	3,6 M
<i>NaH₂PO₄</i> 27,6 g/ℓ	200 mM
EDTA 5,85 g/ℓ	20 mM
<i>pH</i> -Wert auf 7,7 einstellen, autoklavieren	

Tabelle B.4: Zusammensetzung des SSPE 20x

PBS 10x (ohne Ca^{2+}, Mg^{2+})	
<i>NaCl</i> 80 g/ℓ	1,37 M
<i>KH₂PO₄</i> 2 g/ℓ	15 mM
<i>KCl</i> 2 g/ℓ	2,7 mM
<i>NaH₂PO₄</i> 14,2 g/ℓ	80 mM
PBS 1x sollte einen <i>pH</i> -Wert von etwa 7,4 und eine Osmolalität von 280-320 mosmol/kg aufweisen.	

Tabelle B.5: Zusammensetzung des PBS 10x (ohne Ca^{2+} , Mg^{2+})

(S)TE	
<i>NaCl</i> 5,84 g/ℓ	100 mM
Tris 1,21 g/ℓ	10 mM
EDTA 292 mg/ℓ	1 mM
<i>pH</i> -Wert je nach Anwendung auf 7,4 , 7,5 , 7,6 oder 8,0 einstellen und autoklavieren	

Tabelle B.6: Zusammensetzung von (S)TE

NaOAc2MpH 4,0	
Natriumacetat 164 g/ℓ	2 M
mit Eisessig auf <i>pH</i> 4,0 (etwa 550ml/ℓ) einstellen und autoklavieren	

Tabelle B.7: Zusammensetzung von NaOAc2MpH 4,0

<i>NaOAc3MpH 5,2</i>	
Natriumacetat 246,1 g/ℓ	3 M
mit Eisessig auf <i>pH</i> 5,2 (etwa 100ml/ℓ) einstellen und autoklavieren	

Tabelle B.8: Zusammensetzung von *NaOAc3MpH 5,2*

Lämmli 2x-Probenpuffer	
SDS 1 g	2% (w/v)
EDTA 3 mg	0,2 mM
Bromphenolblau 10 mg	0,2% (w/v)
Stammpuffer <i>pH</i> 6,8 2,5 ml	25 mM Tris
Glycerol 87% (v/v) 20 ml	35% (v/v)
mit Wasser auf 50 ml auffüllen	

Tabelle B.9: Zusammensetzung des Lämmli 2x-Probenpuffers

Stammpuffer <i>pH</i> 6,8	
Tris 6,06 g	0,5 M
SDS 0,4 g	0,4 mM
Natriumazid 0,01 g	0,01 % (w/v)
mit Wasser auf 100ml auffüllen und <i>pH</i> auf 6,8 einstellen	

Tabelle B.10: Zusammensetzung des Stammpuffers *pH* 6,8

C Marker

Proteine (Zahlenangaben in *kD*, Herstellerangaben), in Klammern die Laufgewichte (scheinbaren Molekulargewichte) der gefärbten Proteine (soweit Herstellerangaben vorlagen)

LWM Calibration Kit (Pharmacia)	
94	Phosphorylase b (Kaninchen)
67	Albumin (Rinderserum)
43	Ovalbumin (Hühner-Eiweiß)
30	Carboanhydrase (Rindererythrozyten)
20,1	Trypsin Inhibitor (Sojabohne)
14,4	α -Lactalbumin (Kuhmilch)

Rainbow protein molecular weight markers (Amersham)	
200	Myosin, blau
97,4	Phosphorylase b, braun
69	Rinderserumalbumin, rot
46	Ovalbumin, gelb
30	Carboanhydrase, orangefarben
21,5	Trypsin-Inhibitor, grün
14,3	Lysozym, magenta

Prestained SDS-PAGE Standard solution (SIGMA)	
116 (116)	β -Galaktosidase (E.coli)
84 (96,4)	Fruktose-6-phosphat-kinase (Kaninchen)
58 (80,4)	Pyruvat-Kinase (Huhn)
45 (55,7)	Ovalbumin (Huhn)
36,5 (43,7)	Laktatdehydrogenase (Kaninchen)
26,6 (38,8)	Trisphosphatisomerase (Kaninchen)

DNA (Zahlenangaben in Basenpaaren, *bp*)

Phage λ-DNA geschnitten mit Eco R1 und Hind III (AGS, Renner)
21226, 5148, 4973, 3530, 2027, 1584, 1375, 947, 831, 564, 125
1 kb-Leiter (Life Technologies)
12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, 1636 (etwa 10 % der aufgetragenen Menge), 1018, 506/517 (Doppelbande), 396, 344, 298, 220, 201, 154, 134, 75
100 bp DNA-Leiter (Life Technologies)
2072, 1500, 1400, 1300, 1200, 1100, 1000, 900, 800, 700, 600 (2-3fach stärker als die anderen Banden), 500, 400, 300, 200, 100

RNA

Bei der agarosegelelektrophoretischen Auftrennung der RNA wurden keine Molekulargewichtsstandards verwendet. Das Molekulargewicht der Transkripte wurde anhand der 18S- und 28S-ribosomalen RNA regressiv (Laufstrecke linear proportional dem Logarithmus des Molekulargewichtes) ermittelt. Für die 18S-rRNA wurde ein Molekulargewicht von 2000*b*, für die 28S-rRNA ein Molekulargewicht von 5300 *b* nach Angaben der Firma SIGMA angenommen.

Lebenslauf

Karsten Thomas Müssig
Neisserstr. 12
40880 Ratingen

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 29.03.1973
Eltern: Helmut und Marlene Müssig, geb. Tente
Geburtsort: Düsseldorf-Kaiserswerth

Schulbildung

1979 - 1983 Besuch der Karl-Arnold-Schule, Städtische Grundschule Eckamp
1983 - 1992 Besuch des Theodor-Fliedner-Gymnasiums der Evangelischen Kirche im Rheinland
27.06.1992 Aushändigung des Zeugnisses der allgemeinen Hochschulreife

Grundwehrdienst

01.07.1992 - 30.06.1993 Grundwehrdienst als Sanitätssoldat

Studium

19.04.1993 - 02.05.2000 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
31.03.1995 Aushändigung des Zeugnisses über die Ärztliche Vorprüfung
23.09.1996 Aushändigung des Zeugnisses über den Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
11.12.1997 Aushändigung des Zeugnisses über United States Medical Licensing Examination Step 1
15.09.1998 Aushändigung des Zeugnisses über den Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
22.04.1999 Aushändigung des Zeugnisses über United States Medical Licensing Examination Step 2
9.05.2000 Aushändigung des Zeugnisses über den Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

seit 01.07.2000 Arzt im Praktikum in der Medizinischen Klinik IV an dem Universitätsklinikum Tübingen, Ärztlicher Direktor Prof. Dr. med. H.-U. Häring

Einfluß des Streptozotocin-Diabetes und des Carnitin Palmitoyltransferase I-Hemmers Etomoxir auf die myokardiale Genexpression

Karsten Thomas Müssig

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Zielsetzung durchgeführt, weiteren Aufschluß über die Ursachen der diabetischen Kardiomyopathie zu gewinnen. Dazu wurde bei Wistar-Ratten durch einmalige intraperitoneale Injektion von Streptozotocin ein Insulinmangeldiabetes induziert. Der Diabetes manifestierte sich in einer Hyperglykämie, einer Glukosurie, einer Polyurie, einer Polydipsie sowie einer Erhöhung der D-3-Hydroxybutyratserumkonzentration. Das Körpergewicht der diabetischen Ratten war im Vergleich mit dem der Kontrolltiere verringert, das relative Herzgewicht erhöht. Nachfolgend wurde die Genexpression von Zellbestandteilen, denen entscheidende Bedeutung in der Pathogenese der diabetischen Kardiomyopathie zugeschrieben werden, analysiert. Die Untersuchung der kardialen Myosine ergab, daß im diabetischen Herzen die energiereiche α -Isoform der Myosin Schwere Ketten stark vermindert und die energieärmere β -Isoform deutlich gesteigert ausgebildet werden, und legt die Vermutung nahe, daß die im Diabetes mellitus eingeschränkte Kontraktilität des Herzens auf einer veränderten Expression der kontraktilen Elemente beruht. Die Analyse des Glukosetransporter 4 (Glut 4) zeigte im Diabetes eine Verminderung sowohl des Protein- als auch des mRNA-Gehaltes an Glut 4 im Herzmuskel. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß, neben der verminderten Rekrutierung von im Zytosol gelagerten Glukosetransportern, eine insgesamt verminderte Synthese des Transporters verantwortlich für den herabgesetzten Glukosetransport in die Myokardzelle ist. Angesichts der in der vorliegenden Arbeit gezeigten reduzierten myokardialen Expression von mRNA der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase (SERCA) im Diabetes, ist anzunehmen, daß sie ursächlich für die Aktivitätsabnahme der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase ist. Infolge der reduzierten Aktivität der SERCA kommt es zur Überladung der Herzmuskelzelle mit Kalziumionen und somit zu Kontraktionseinbußen des Herzmuskels. Die Expression des Angiotensin II Typ 1-Rezeptors zeigte sich vom diabetischen Stoffwechselzustand unbeeinflusst und kann somit nicht als Erklärungsmöglichkeit für die erhöhte Aktivität des Renin-Angiotensin-Systems dienen. Vielmehr ist anzunehmen, daß die im Diabetes beschriebene Überaktivität des Renin-Angiotensin-Systems auf einer gestörten Wechselwirkung zwischen dem vasodilatierend wirkenden *NO* und dem vasokonstriktiven Angiotensin II beruht. Die Ergebnisse, die nach der Behandlung der Versuchstiere mit Etomoxir[®] erzielt wurden, müssen zurückhaltend diskutiert werden, da sich die untersuchten Serumparameter Glukose, D-3-Hydroxybutyrat und Triglyzeride unter der Therapie nicht veränderten. Andere Arbeitsgruppen, die das Medikament von einem anderen Hersteller bezogen, konnten, bei ansonsten gleichen Bedingungen, Angleichungen der Serumparameter an den Normalzustand zeigen. Das nach Applikation von Etomoxir[®] erhöhte relative Herzgewicht sowohl der diabetischen als auch der stoffwechselgesunden Tiere spricht jedoch gegen eine Wirkungslosigkeit des Medikamentes. Desweiteren kam es bei der Gabe des Carnitin Palmitoyltransferase I-Hemmers zu einer partiellen Normalisierung der im Diabetes veränderten Myosinzusammensetzung. Bei Interpretation der Ergebnisse hinsichtlich des Glukosetransporters 4 und der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase kann lediglich die Aussage getätigt werden, daß bei Dosierungen, die ausreichen, die Expression der Myosin-Isoformen zum Teil zu normalisieren, Veränderungen im Vergleich mit den unbehandelten Tieren nicht gezeigt werden konnten. Nicht auszuschließen ist jedoch, daß es bei Dosierungen des Medikamentes, die zu den eigentlich erwarteten Serumparameterveränderungen führen, zur Angleichung der im Diabetes veränderten Synthese von Glut4 und SERCA kommt. Die partielle Normalisierung der kardialen Myosine läßt eine positive Wirkung von Etomoxir[®] auf die diabetische Kardiomyopathie vermuten. Weitere Untersuchungen werden jedoch nötig sein, um abzuschätzen, ob bei Dosierungen, die ausreichend sind, um die D-3-Hydroxybutyrat- und die Glukoseserumkonzentration zu senken, sich auch in Veränderungen der Genexpression des Glukosetransporters 4 und der Sarkoplasmatischen Retikulum Kalzium-ATPase zeigen.

