

Aus dem Institut für Herz-Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Leiter: Univ. Prof. Dr. rer. nat. A. Gödecke

Adaptive Mechanismen der Myoglobin Knockout Maus unter
normobarem hypoxischem Stress

Dissertation

zur Erlangung eines Doktors der Medizin
Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Jie- Hoon Thomas Kim

2012

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der
Heinrich–Heine–Universität Düsseldorf
gez.: Univ.–Prof. Dr. med. J. Windolf
Dekan
Referent: Univ.–Prof. Dr. med. J. Schrader
Korreferent: PD. Dr. med. C. Heiß

Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Schlieper G, Kim JH, Molojavyi A, Jacoby C, Laussmann T, Flügel U, Gödecke A, Schrader J.

Adaptation of the myoglobin knockout mouse to hypoxic stress.

Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2004 Apr;286(4):R786-92. Epub 2003 Dec 4.

„Quod in manu fortunae positum est disponis, quod in tua, dimittis.
Quo spectas? Quo te extendis?
Omnia quae ventura sunt in incerto iacent: protinus vive.“

Seneca

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Myoglobin und die Globine	1
1.2 Aufbau und Struktur	2
1.3 Myoglobin als Sauerstoffspeicher und Sauerstoffpuffer	4
1.4 Myoglobin als Sauerstofftransporter und die erleichterte O ₂ Diffusion	4
1.5 Myoglobinvermittelte oxidative Phosphorylierung	6
1.6 Myoglobin und NO – gleichzeitig Dioxygenase und Reduktase	6
1.8 Myoglobin als Schutzfaktor vor oxidativem Stress	8
1.9 Stellenwert von Myoglobin in der klinischen Diagnostik	9
1.10 Myoglobin und maligne Erkrankungen	10
1.11 Transgene Tiermodelle in der physiologischen Forschung	11
1.12 Transgene Myoglobin – Knockout Mausmodelle	12
2. Fragestellung der vorliegenden Arbeit	13
3. Material und Methoden	14
3.1 Versuchstiere	14
Physiologische Methoden	15
3.2 Erzeugung einer chronischen Hypoxie	15
3.3 Anästhesie	16
3.4 Hämodynamische Parameter und arterielle Blutgasanalyse	17
3.5 Venöse Blutparameter	17
3.6 Histologie	17
3.7 Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT)	18
Molekularbiologische Methoden	19
3.8 Allgemeiner Umgang mit RNA	19
3.9 RNA Isolation	19
3.10 Photometrische RNA – Konzentrationsbestimmung	21
3.11 Gelelektrophorese	21
Allgemeines Prinzip	21
3.11a RNA Gel	22
3.11b DNA Gel	22
3.12 Isolation der mRNA aus der kardialen Gesamt RNA für die	22
cDNA Array Hybridisierung	22
3.13 cDNA Synthese und radioaktive Markierung für Array Hybridisierung	24
3.14 Expressionsanalyse durch cDNA Arrays	25
Allgemeines Prinzip	25
3.15 Säulenchromatographie	25
3.16 Messung des ³² P	26
3.17 Array Hybridisierung der cDNA Proben	26
3.17a Vorhybridisierung	26
3.17b Hybridisierung	26
3.17c Waschungen	27
3.18 Exposition der Arrays	27
3.19 cDNA Stripping der Arrays	28
3.20 Datenanalyse	28
3.21 Reverse Transkription für PCR / RT PCR	29
3.22 PCR	30
3.23 RT PCR	31
3.24 Statistik	32
4. Ergebnisse	33

4.1 Tiergewichte.....	33
4.2 Arterielle Blutgasanalyse.....	34
4.3 Änderungen des venösen Blutbilds.....	35
4.4 Histologie	39
4.5 Hämodynamische Parameter.....	40
4.6 Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT).....	41
4.7 Genexpressionsanalyse.....	42
4.8 RT – PCR.....	46
5. Diskussion	47
5.1 Methodenkritik.....	47
5.1a Erfolgreiche Erzeugung einer Hypoxie.....	47
5.1b Anästhesie	47
5.1c Arterielle Blutgasanalyse.....	48
5.1d Bildgebung	48
5.2 Gewichtsveränderungen	49
5.3 Funktionelle Parameter	49
5.3a Arterielle Blutgasanalyse.....	49
5.3b Venöses Blutbild	50
5.3c Histologie	52
5.3d Invasive Messungen	52
5.3e Kardiale Parameter in der MR Bildgebung.....	53
5.4 Expressionsanalyse	55
5.5 Fazit und Ausblick.....	68
6. Zusammenfassung	72
7. Anhang verwendeter Materialien	73
8. Abkürzungsverzeichnis	76
9. Literaturverzeichnis.....	77
10. Eidesstattliche Versicherung	96
11. Danksagung	97
12. Lebenslauf.....	98

1. Einleitung

1.1 Myoglobin und die Globine

Eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff ist die wesentliche Voraussetzung für den aeroben Stoffwechsel. Aufgrund ihrer Größe kann in komplexen Organismen die O₂ Versorgung jedoch nicht mehr allein durch Diffusions – und Perfusionsprozesse von Sauerstoff aus der Umgebungsluft aufrechterhalten werden.

Infolgedessen haben sich im Laufe der Evolution – neben der Entwicklung eines Kreislaufsystems – auch unterschiedliche, respiratorische Proteine entwickelt, die im Zusammenspiel mit dem Kreislaufsystem die Sauerstoffhomöostase und den Abtransport des entstehenden Kohlendioxids gewährleisten. Die sogenannten „Globine“ bezeichnen eine Gruppe respiratorischer Proteine, die im Regelfall ein Sauerstoffatom zwischen dem Eisenatom ihres Porphyrinrings und einem Histidinrest ihrer Polypeptidkette binden können^{32, 60}. Die einzelnen Globine unterscheiden sich in Verteilung, strukturellem Aufbau und mutmaßlicher Funktion voneinander³².

Zu den seit längerem bekannten Globinen gehören unter anderem Hämoglobin (Hb) und Myoglobin (Mb). Vor ca. 10 Jahren wurden noch einige weitere Globine entdeckt, so beispielsweise das in Zellen des ZNS exprimierte Neuroglobin (NGB)³¹ und das – nach seiner ubiquitären Verbreitung in allen menschlichen Zellen benannte – Cytoglobin (CYGB)³². Phylogenetische Analysen der Globine legen den Schluss nahe, dass alle Globine von einem entwicklungsgeschichtlich gemeinsamen Ursprung her abstammen und sich im Laufe der Evolution ihren spezifischen Bedürfnissen entsprechend weiter ausdifferenziert haben. Es wird angenommen, dass sich Myoglobin und Hämoglobin vermutlich vor über 500 bis 600 Mio. Jahren auseinander entwickelt haben³². Die Gruppe um den Erstbeschreiber des Cyto – bzw. Neuroglobins Burmester schlägt vor, dass das unterschiedliche Verteilungsmuster der verschiedenen Globine im Körper Rückschlüsse auf die mutmaßliche biologische Funktion der jeweiligen Globine liefern könnte³². Dennoch steht die funktionelle Charakterisierung der vor kurzem entdeckten Globine noch vergleichsweise am Anfang. Die weitaus länger bekannten Globine Hämoglobin und Myoglobin hingegen gehören zu den am besten charakterisierten Proteinen in der Biologie. Während noch vor knapp einem Jahrzehnt die Auffassung, dass die funktionelle Bedeutung des Myoglobins (Mb) weitgehend geklärt sei, weit verbreitet war, hat sich – nicht zuletzt durch die an transgenen Mausmodellen gewonnenen Erkenntnisse – das Verständnis für die funktionelle Bedeutung des seit langem bekannten Myoglobins in den letzten Jahren deutlich gewandelt und erweitert.

Bereits seit Beginn des letzten Jahrhunderts galt Myoglobin vornehmlich als O₂ Speicherprotein bzw. als O₂ Transportprotein, dessen funktionelle Bedeutung sich im wesentlichen auf einen Beitrag zur kontinuierlichen Sauerstoffversorgung des Organismus erschöpfte und der Muskulatur ihre charakteristische rote Farbe verlieh, darüber hinaus jedoch keine weiteren Funktionen wahrzunehmen schien⁸⁴. In den experimentellen Ansätzen der vergangenen Jahrzehnte wurde eine funktionelle Myoglobindeaktivierung vor allem durch unterschiedliche chemische bzw. pharmakologische Mittel erreicht¹⁰², hierbei zeigten sich zwar Hinweise auf mögliche weitere Funktionen des Myoglobins, deren funktionelle Relevanz *in vivo* jedoch umstritten war (erleichterte O₂ Diffusion, NO Oxidase Funktion), oder *in vivo* noch nicht nachgewiesen werden konnte (Peroxidasefunktion)¹⁰². Die Interpretation der hierbei erhobenen Daten setzt als Prämisse jedoch voraus, dass die eingesetzten Chemikalien/ Pharmaka zum einen selektiv Myoglobin deaktivieren und zum anderen ihrerseits keine weiteren unspezifischen Veränderungen in der Zelle verursachen¹⁰².

1. Einleitung

Erst mit der Verfügbarkeit zweier unabhängig voneinander generierter transgener Knockout Mausmodelle wurde eine selektive, unspezifische Nebenwirkungen in der Zielzelle vermeidende, Technologie verfügbar, mit der die Myoglobinfunktion in vivo untersucht werden konnte^{101, 102}. Die Überraschung war dementsprechend groß, dass Myoglobindefizienz phänotypisch zunächst keine größeren Ausfälle zu verursachen schien. Die Gruppe um Garry spekulierte sogar daher: „If myoglobin is not essential for routine activities of homeothermic animals, what evolutionary pressures have led to the conservation of the structure and expression patterns of myoglobin during vertebrate evolution?“⁹³

Allerdings räumte Garry selbst ein, dass: „More detailed studies of cardiac and skeletal muscle function and metabolism, or more extreme physiological challenges, may reveal abnormalities that were not detected by our initial tests, but our present, unexpected results raise new questions with respect to oxygen transport and muscle metabolism.“⁹³

Eine detailliertere Analyse der Gruppe um Gödecke konnte im Verlauf dann auch nachweisen, dass der Verlust von Myoglobin eine Reihe von kompensatorischen Veränderungen verursacht, so z.B. die Zunahme der Kapillardichte, des koronaren Flusses und des Hämatokrits, so dass in der Summe der O₂ Gradient zum Mitochondrium steiler gestellt wird¹⁰².

Die Etablierung von transgenen Myoglobin^{-/-} Mausmodellen hat die Myoglobinforschung stimuliert. Mit ihrer Hilfe konnte in jüngerer Zeit experimentell nachgewiesen werden, dass Myoglobin tatsächlich noch andere, über eine bloße O₂ Speicher – und Transportfunktion hinausgehende, funktionelle Bedeutung haben könnte^{84, 102}.

Seitdem nachgewiesen wurde, dass in der Vergangenheit die funktionelle Relevanz des Myoglobins unterschätzt worden ist, hat sich das Interesse an einer weiteren Erforschung des Myoglobins deutlich intensiviert. Mb fungiert in vielen Forschungsbereichen von der Biologie bis hin zur Physik als Modellprotein, anhand dessen man sich grundlegende Erkenntnisse über die Zusammenhänge von Form und Funktionalität bei Proteinen im allgemeinen erhofft¹²¹. Frauenfelder schrieb 2003 in einem Review hierzu: “Thirty years ago the textbook function of Mb, storage of dioxygen at the heme iron, was considered to be simple, fully understood, and consequently boring.... Since then, the situation has changed: Mb is no longer fully understood. It plays roles other than O₂ storage, serves as a prototype for complex systems, and yields insight into the chemistry and physics of soft matter and of chemical reactions.“⁸⁴

1.2 Aufbau und Struktur

Jahrzehntelang herrschte Einigkeit darüber, dass die Expression von Myoglobin (Mb) auf das Zytoplasma von oxidativen Skelettmuskelfasern, sowie von Kardiomyozyten und glatten Muskelzellen der Gefäße beschränkt sei, und dass es der Muskulatur die charakteristische rötliche Färbung verleihe^{74, 202, 214, 281}.

Neuere Untersuchungen an Karpfen und Zebrafischen belegen jedoch, dass Myoglobin unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen auch extramuskulär in anderen Geweben (u.a. Leber, Nieren, ZNS) in signifikanter Größenordnung exprimiert wird^{52, 83, 264}. Auch beim Menschen ist die Myoglobinexpression offensichtlich nicht –wie Jahrzehntlang angenommen– auf die o.g. Gewebe beschränkt. In einigen menschlichen Tumoren nicht muskulärer Genese (u.a. Ovarialca, Colonca etc.) wird Myoglobin in signifikantem Ausmass exprimiert^{78, 121}.

1. Einleitung

Myoglobin wurde spektroskopisch 1897 von Mörner entdeckt, der das Muskelpigment zunächst als „Myochrom“ bezeichnete, um es vom Hämoglobin zu unterscheiden^{121, 190}. Der Terminus Myoglobin wurde 1921 von Günther eingeführt^{111,121}. Gegen Ende der Fünfziger Jahren gelang es der Arbeitsgruppe um Kendrew und Mitarbeiter in einer mit dem Nobelpreis prämierten Arbeit mittels radiographischer Methoden erstmals eine tertiäre Proteinstruktur zu entschlüsseln^{149, 150}.

Myoglobin ist ein relativ kleines und dicht gepacktes Protein, das aus einer einzelnen Polypeptidkette aus 153 Aminosäuren besteht, einen mittleren Durchmesser von ca. 3 nm besitzt und ein Molekulargewicht von etwa 17,8 kDA aufweist^{74, 84}. Die Peptidkette gruppiert sich zu acht α Helices, die eine zentrale Hämgruppe eng umschlingen. Diese Hämgruppe enthält einen Fe – Porphyrinring, mit einem zentralen, zweiwertigen Eisenatom, das – analog zum Hämoglobin – zu reversibler Bindung und Freisetzung von O₂ und anderen kleine Liganden wie beispielsweise CO oder NO fähig ist. Die Hämgruppe des Myoglobins wird durch zwei Histidinreste stabilisiert (His 64 und His 93)²⁰², die auf dem Intron 2 kodiert werden. Während das phylogenetisch verwandte und strukturell ähnlich aufgebaute Hämoglobin vier Hämgruppen und eine sigmoidale Bindungskinetik aufweist, verläuft die O₂ Bindungskurve von Myoglobin, das nur eine Hämgruppe besitzt, hyperbolisch²⁰².

Obwohl Myoglobin ein relativ kompakt aufgebautes Protein ist, enthält es vier interne Bindungsstellen, die groß genug sind um ein Xenonatom binden zu können (benannt Xe1 – Xe4)^{235, 258}. Die für diese intern gelegenen Bindungsstellen kodierenden Gene werden in unterschiedlichen Säugetieren sehr konstant vererbt und sind daher vermutlich von funktioneller Relevanz. In der Literatur werden verschiedene Funktionen (z.B. als Ligandenspeicher) diskutiert⁸⁴.

Das gesamte Protein ist mit einer Hydratationshülle aus ein bis zwei Schichten H₂O Molekülen umgeben⁸⁴, und wird nur zu einem relativ geringen Ausmaß durch Umgebungsbedingungen beeinflusst. Lediglich hohe Temperaturen oder hoher Laktatgehalt üben einen deutlichen Effekt auf die Proteinfunktion aus^{100, 281}. Aufgrund des kompakten Proteinaufbaus umgibt die Aminosäurekette die zentrale Hämgruppe allerdings derart dicht, dass keinerlei direkte Verbindung zur äußeren Umgebung besteht. Es wurde daher geschlossen, dass über Konformationsänderungen Bewegungen innerhalb des Proteins möglich sein müssen, um die Bindung der *extern* gelegenen Liganden wie beispielsweise Sauerstoff an die *innerhalb* des Myoglobins gelegene Hämgruppe überhaupt erst zu ermöglichen. Obwohl die Struktur und Funktion des Myoglobins seit mittlerweile mehreren Jahrzehnten erforscht werden, ist der genaue Mechanismus dieser vermuteten Proteinbewegung bis dato noch nicht aufgeklärt worden, und bleibt auch weiterhin Gegenstand der Forschung^{84, 121}.

Nachfolgend sollen einige wesentliche Myoglobinfunktionen dargestellt werden.

1.3 Myoglobin als Sauerstoffspeicher und Sauerstoffpuffer

Bereits seit den dreißiger Jahren des vergangenen Jahrhunderts ist die Fähigkeit des Myoglobins als Sauerstoffspeicher zu fungieren, der Phasen kurzfristiger Ischämie zu puffern vermag, gut belegt worden^{74, 281}. Es wird angenommen, das Myoglobin dazu beiträgt, im Herzen landlebender Wirbeltiere als kurzfristiger Puffer die O₂ Versorgung des Myokards während der systolischen Kompression zu sichern^{74, 281}. Darüber hinaus, zeigte sich eine vermehrte Expression von Myoglobin bei Menschen und Tieren, die sich längerfristig an den geringeren Sauerstoffgehalt in großen Höhen adaptieren mussten^{74, 256}. Bereits 1953 mutmaßte Lawrie, dass bei tauchenden Tieren die hohen Myoglobin – Konzentrationen auch im Sinne eines Sauerstoff *Langzeitspeichers* zu einer Verlängerung der muskulären O₂ – Versorgung während der Tauchphase beitragen können^{74, 114, 162, 281}.

Die Beobachtung, das die höchsten Myoglobin – Konzentrationen in der Muskulatur tauchender Säuger und Vögel gefunden wurden, die z.T. 10 – fach über den Mb – Konzentrationen terrestrischer Tiere liegen, unterstützte die Annahme von Myoglobin als potentiell O₂ Langzeitspeicher. Der Grad der Myoglobinexpression verhält sich dabei analog zum Cytochrom C Gehalt des Gewebes: mit steigendem Cytochrom c Gehalt steigt auch der Grad Myoglobinexpression²⁸⁶.

1.4 Myoglobin als Sauerstofftransporter und die erleichterte O₂ Diffusion

In den sechziger Jahren gelang der Nachweis, dass der rote Blutfarbstoff Hämoglobin Vermittler einer erleichterten O₂ – Diffusion ist^{236, 283}. Später übertrug Wittenberg dieses Konzept auch auf das phylogenetisch und strukturell eng verwandte Myoglobin aus. Es wurde vorgeschlagen, das MB nicht nur als bloßes O₂ Speichermedium diene, sondern darüber hinaus den intrazellulären O₂ Transport unterstützen könne (die sogenannte „Myoglobin mediated facilitated oxygen diffusion“)^{282, 284}. Gemäß diesem Konzept bestehe parallel zum Einstrom von rein physikalisch gelöstem O₂ zusätzlich noch ein Fluss von Mb:O₂ Komplexen vom Sarkolemm zu den Mitochondrien. Der Hypothese gemäß soll das MB in der Nähe der Zellmembran bei hohen pO₂ Drücken den Sauerstoff aufnehmen, sich als Oxymyoglobin durch translationale Diffusion innerhalb des Zytosols verteilen, um dann in der Nähe der Mitochondrien bei niedrigerem pO₂ den Sauerstoff abzugeben und schließlich in einem deoxygenierten Zustand wieder zur Zellwand zurück zu diffundieren.

Wittenberg schlug vor, das dieser Mechanismus ein wichtiges Bindeglied zwischen der kapillären O₂ Versorgung einerseits, und dem O₂ Verbrauch in den mitochondrialen Cytochromen andererseits darstellen könnte^{187, 284}. Anhand konzentrierter Proteinlösungen konnte dieser Mechanismus *in vitro* nachvollzogen werden^{280, 284}. Allerdings bestehen hinsichtlich der Funktion *in vivo* bis heute kontroverse Ansichten. In der Vergangenheit durchgeführte experimentelle Ansätze an isolierten Zellen, Papillarmuskeln, oder auch ganzen Geweben, bzw. theoretische Modellrechnungen führten zu Ergebnissen, die die Bedeutung der Mb vermittelten O₂ – Diffusion zum einen zu bestätigen schienen^{96, 254, 280}, während andere Autoren der Bedeutung des o.g. Mechanismus *in vivo* widersprachen^{38, 143, 144}.

1. Einleitung

Die Bedeutung der Myoglobin vermittelten intrazellulären O₂ Verteilung in vivo wird im Schrifttum trotz Jahrzehntelanger Forschung noch kontrovers beurteilt. Zwar entspricht die bereits Anfang des vergangenen Jahrhunderts von Krogh^{156, 157} und Hill¹²⁵ aufgestellte Hypothese eines kontinuierlich verlaufenden Konzentrationsgradienten zwischen zwei offenen Kapillaren vermutlich nicht den tatsächlichen physiologischen Gegebenheiten in der Zelle, wird aber als nützliches Hilfsmittel in Modellrechnungen berücksichtigt. (Eine Übersicht über gegenwärtige Vorstellungen über den intrazellulären O₂ Konzentrationsgradienten findet sich bei Wittenberg)²⁸⁶.

Die Distanz, die ein mit Sauerstoff beladenes Myoglobinmolekül zurücklegen kann, wird vor allem durch die Sauerstoffdiffusionsrate und den Myoglobindiffusionskoeffizienten bestimmt. Die bisher verfügbaren Modellkalkulationen über die funktionelle Bedeutung des MB als O₂ Transportprotein sind in vivo nicht unumstritten. Viele der Modellkalkulationen basieren auf der Annahme, dass der Diffusionskoeffizient des Myoglobins in Lösungen, die der Proteinkonzentration in Zellen entspricht, auch den Bedingungen in vivo entspräche²⁸⁶.

Neuere Untersuchungen der Arbeitsgruppe um Jürgens stellen diese Annahme jedoch in Frage. In ihren Untersuchungen gelangen Sie zu dem Schluss, dass die tatsächliche Diffusibilität des Myoglobins nur einen Bruchteil so groß ist, wie ursprünglich in den Berechnungen aus Proteinlösungen angenommen wurde ($2,1 \times 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ bei 37 °C)²⁰⁴. Die Autoren um Jürgens argumentieren darüber hinaus, dass bedingt durch die Größe des MbO₂ – Komplexes die im Vergleich zum physikalisch gelösten O₂ ohnehin geringere Diffusionsgeschwindigkeit des MbO₂ – Komplexes, wahrscheinlich durch strukturelle Gegebenheiten innerhalb der Myozyten (z.B. Aktin – Myosin – Filamente) noch weiter herabgesetzt werden könnte²⁰⁴.

Ein genügend großer Diffusionskoeffizient (D_{MB}) für den MB:O₂ Komplex ist allerdings eine der wesentlichen Voraussetzungen, damit der MB:O₂ Komplex in vivo in ausreichender Geschwindigkeit zur O₂ Versorgung des Gewebes beitragen kann.

Ein Indiz für die funktionelle Bedeutung der MB vermittelten erleichterten O₂ Diffusion ist die Tatsache, dass molekularer Sauerstoff in Wasser relativ unlöslich ist. Bei einer Körpertemperatur von 37°C beträgt das Verhältnis des an Myoglobin gebundenen O₂ zum physikalisch frei gelösten O₂ ca. 30:1. Es wird daher angenommen, dass zumindest ein großer Teil des Sauerstofftransportes durch das Zytoplasma Myoglobin mediiert sein könnte²⁸⁶. Die Myoglobinkonzentration der Herzmuskulatur beträgt etwa 200 – 300 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ ²⁸⁶. Da sowohl die Mitochondrien (35 % des Zellvolumens), als auch das Sarkoplasmatische Retikulum (etwa 4 % des Zellvolumens) kein Myoglobin enthalten, beträgt die Myoglobinkonzentration im verbliebenen Zellkompartiment etwa 330 $\mu\text{mol kg}^{-1}$. Der O₂ – Halbsättigungsdruck des Mb ($P_{50\text{O}_2}$) liegt mit 2,4 mm Hg deutlich unter dem O₂ Halbsättigungsdruck des Hämoglobins ($P_{50\text{O}_2}$ etwa 26 mmHg), so dass der in den Kapillaren freigesetzte Sauerstoff beim Eintritt in die Myozyten vermutlich bevorzugt an Myoglobin gebunden wird^{74, 281}.

Eine weitere Voraussetzung für eine erleichterte Diffusion durch das Mb in vivo eine zumindest teilweise O₂ Entsättigung des Myokards. Es ist allerdings noch immer unklar, unter welchen Bedingungen im Herzen der pO₂ auf so niedrige Werte fällt, dass der MB:O₂ Komplex den an ihn gebundenen Sauerstoff auch wieder abgibt¹⁰⁵. Angesichts des niedrigen $P_{50\text{O}_2}$ des MB ist unter *basalen* Bedingungen eine solche teilweise O₂ Entsättigung nicht zu beobachten, was in der Vergangenheit die in vivo Relevanz der Mb vermittelten erleichterten Diffusion noch zusätzlich in Frage stellte.

Mittels ^1H – NMR – Untersuchungen an humanem M. Quadrizeps gelang jedoch der Nachweis, dass bei *physikalischer Belastung* eine deutliche Entsättigung zu beobachten ist²²³, so dass vorgeschlagen wurde, dass eine Mb vermittelte erleichterte O_2 Diffusion möglicherweise vor allem in *stark arbeitender* Muskulatur von Bedeutung könnte.

Die Arbeitsgruppe um Jürgens hat diesen Gedanken aufgegriffen und in Modellrechnungen auf der Basis eines maximal arbeitenden menschlichen Herzens den möglichen Beitrag des Myoglobins zur O_2 Versorgung des Herzens während Systole und Diastole präzisiert⁶⁹. Die Schlussfolgerung war, dass Myoglobin während der *Diastole* eher keine wesentliche Bedeutung zur Deckung des O_2 Bedarfs hat, jedoch während der Kompression des Gewebes im Rahmen der *Systole* sowohl über die O_2 Speicherfunktion, als auch durch die Myoglobin vermittelte erleichterte O_2 Diffusion eine Rolle zu spielen scheint.

Allerdings gelangen die Autoren zu dem Schluss, dass das an Myoglobin gebundene O_2 Reservoir in ihrer Modellrechnungen nur für maximal ein Drittel der systolischen Phase von ca. 150 ms auszureichen scheint. Insofern scheinen auch während der Systole eher andere O_2 Quellen, wie an Hämoglobin gebundenes O_2 eine größere Rolle als Myoglobin zu spielen^{69,105}. Obwohl die Bedeutung des Myoglobins beim Sauerstofftransport *in vivo* immer noch kontrovers diskutiert wird, deuten Befunde, wonach die Mb – Expression bei dilatativer Kardiomyopathie (DCM)^{194, 277} massiv reduziert ist, auf eine enge funktionelle Beziehung zwischen reduziertem O_2 – Transport und einer kardialer Funktionseinschränkung hin.

1.5 Myoglobinvermittelte oxidative Phosphorylierung

Wittenberg und Wittenberg beschrieben erstmalig 1987, dass der MbO_2 – Komplex, nicht aber ein Mb:CO Komplex die Atmung in isolierten Kardiomyozyten der Ratte stimuliert^{284,285}. Diese Untersuchungen wurden unter hohen O_2 – Partialdrücken durchgeführt, so dass eine Sättigung der Atmungskette mit O_2 vorlag. Dieser Effekt war verschieden von der beschriebenen O_2 Speicherfunktion und der erleichterten Diffusion, so dass die Autoren eine weitere Mb Funktion postulierten, die sie als so genannte „Myoglobinvermittelte oxidative Phosphorylierung“ bezeichneten.

Die molekularen Mechanismen, die dieser Funktion zugrunde liegen können, sowie eine eventuelle *funktionelle Bedeutung in vivo* sind allerdings bisher unverstanden.

1.6 Myoglobin und NO – gleichzeitig Dioxygenase und Reduktase

NO spielt bei der Regulation einer ganzen Reihe von Zellfunktionen eine wesentliche Rolle. Im Herz – Kreislaufsystem ist es an der Regulation des Blutdrucks, der Ca^{2+} Homöostase, an Wachstums und Differenzierungsprozessen und der Angiogenese beteiligt¹⁰⁴. Es ist allgemein anerkannt, dass *Hämoglobin* eine zentrale Rolle bei der Inaktivierung des NO durch Oxidation zu Nitrat und Methämoglobin besitzt^{62,74,137}.

Angesichts der eingangs erwähnten engen phylogenetischen und strukturellen Verwandtschaft zwischen Hämoglobin und Myoglobin war es daher nicht überraschend, dass ein Vergleich der kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der NO Interaktion mit *Myoglobin* in *in vitro* Versuchen ähnliche Daten für die NO Assoziation und Dissoziation für beide Proteine zeigte⁵⁰. Die Vermutung, dass beide Proteine *in vivo* möglicherweise auch ähnliche Funktionen in der NO Homöostase ausüben können, war somit naheliegend. Die in den frühen 50er Jahren durch Kendrew et al erhobenen Röntgen – Strukturdaten der tertiären Myoglobinstruktur bildeten die Grundlage für eine intensive Erforschung der NO – Oxidationsfunktion des Mb durch gezielte Mutagenese.

So gelang es in den 90 Jahren einer Arbeitsgruppe um Eich durch gezielte Einführung von Punktmutationen mehrere Myoglobin Varianten zu konstruieren, die – bei unveränderten O₂ Bindungseigenschaften – eine 4 bis 10 fach niedrigere NO – Oxidationsrate aufwiesen als das ursprüngliche Wildtyp Protein⁶⁷.

Die Übertragung dieser Mutation auf Hb α – Ketten führte zur Bildung von Hämoglobinvarianten mit ebenfalls reduzierter NO Oxidationskapazität. Dieser Befund unterstreicht erneut die enge funktionelle Verwandtschaft von Hb und Mb.

Zukünftig könnten möglicherweise genetisch modifizierte Hämoglobine als Blutersatzstoffe zu Transfusionszwecken eingesetzt werden, denen die NO oxidierenden und damit Hypertonie begünstigende Eigenschaften fehlen könnten (denn freies extrazelluläres Hb:O₂ zerstört NO und löst somit indirekt eine Hypertonie aus)^{3, 4}. Die Gruppe um Ignarro et al. setzt bereits 1987 Myoglobin in biochemischen und physiologischen Experimenten als NO Fänger ein. Dies war möglich, da wie bereits erwähnt auch das Oxymyoglobin –ganz analog zum Hämoglobin– die Fähigkeit besitzt, NO zu Nitrat zu oxidieren¹³⁶.

Allerdings blieb lange ungeklärt, inwieweit diese Eigenschaft *in vivo* Relevanz besitzen könnte. Erst im Jahr 2001 gelang es Flögel et al. mit Hilfe von NMR spektroskopischen Methoden die mögliche Bedeutung des Mb auf die kardiale NO Homöostase *in vivo* aufzuzeigen⁷⁴.

Am Beispiel der transgenen Myoglobin^{-/-} Maus gelang der experimentelle Nachweis, dass infundiertes NO das Oxymyoglobin zu Metmyoglobin konvertierte. Diese Reaktion war zwar bereits seit Anfang der 80 Jahre aus *in vitro* Experimenten bekannt,⁶² der Nachweis einer funktionellen Relevanz *in vivo* gelang aber erst nach Verfügbarkeit von transgenen Mb KO Mutanten¹⁰³.

Mithilfe der von Gödecke etablierten Myoglobin^{-/-} Maus konnten Flögel und Kollegen zeigen, dass Bradykinin Infusionen (das die endogene NO Produktion stimuliert), bzw. NO Infusionen selbst zu einem Abfall der koronaren Perfusion führten, während die Wildtyp Kontrollgruppe relativ unbeeinflusst blieb^{74,75}.

Diese Ergebnisse wurde von den Autoren dahingehend interpretiert, das in den Wildtypkontrollen das Oxymyoglobin das biologisch aktive NO abfangen konnte (das als potenter Vasodilatator wirkt und zum einen den Blutfluss, als auch die Anzahl der geöffneten Kapillaren beeinflusst), während die Myoglobin defizienten Tiere hingegen diesen Schutz vor einem NO Überschuss nicht mehr besaßen.

Wurde NO in noch höheren Konzentrationen infundiert, wurde sogar die kardiale Kontraktilität reduziert und die Reserven an energiereichen Phosphaten vermindert^{74,75}. Im Unterschied zum strukturell nahe verwandten Hämoglobin scheint sich die Interaktion des Mb auf die NO Homöostase in erster Linie auf die Degradation des intrazellulär verfügbaren NO zu beschränken, während Hb nicht nur durch oxidative Inaktivierung auf die NO Homöostase einwirkt, sondern auch durch die Bildung von S– Nitrosothiolen^{74,137} und die Bindung an deoxygeniertes Hb^{74, 247}.

Eine analoge S – Nitrosothiolreaktion mit NO ist für Mb jedoch bereits deswegen chemisch sehr unwahrscheinlich, weil die bislang charakterisierten Myoglobine kein Cystein enthalten. Das Vorhandensein von Schwefel ist jedoch eine Vorbedingung für die genannte Reaktion^{74,137}. Während Mb unter oxygenierten Bedingungen als Dioxygenase wirkt, scheint es unter hypoxischen Bedingungen als Reduktase zu fungieren. Wie Rassaf nach Abschluss unserer Untersuchungen an einem Langendorf perfundierten Herzen nachweisen konnte, konvertiert Deoxy Mb Nitrit zu NO, welches dann mit der Zytochromoxidase reagiert und den energetischen Status und die Kontraktilität vermindert (die Tiere wurden zuvor mit einem NO Synthase Inhibitor behandelt)²¹⁸.

1.7 OxyMB – Kontrollmechanismus der intrazellulären O₂ Homöostase?

Wittenberg interpretierte die Ergebnisse von Flögel et al. dahingehend, das Oxymyoglobin eine zentrale Rolle in der O₂ Homöostase der Zelle besitzt, um sowohl das Sauerstoffangebot, als auch die Sauerstoffutilisation der Zelle zu kontrollieren²⁸⁶. NO war bereits als reversibler, jedoch recht potenter Inhibitor der Zytochromoxidase bekannt²⁸⁶. Wittenberg gelangt zu dem Schluss, das Oxymyoglobin – sofern vorhanden – kontinuierlich intrazelluläres NO abfängt und so zu einer Entlastung der Zytochromoxidase führen soll²⁸⁶. So soll etwa ein Drittel des in die Zelle einfließenden Sauerstoffes durch die Oxymyoglobin medierte NO Dioxygenierung beeinflusst werden. Wittenberg gelang in einem Versuch an isolierten Herzzellen, die einem so hohen Sauerstoffpartialdruck ausgesetzt wurden, dass die bereits erwähnte Myoglobin facilitated Oxygen Diffusion einerseits, und die Sauerstoffverfügbarkeit andererseits keine Rolle mehr spielten, der experimentelle Nachweis, dass sich in diesem Zustand das intrazelluläre Oxymyoglobin progressiv zu Kohlenmonoxid MB umwandelte, was zu einer Abnahme der Sauerstoffaufnahme um etwa 30% führte²⁸⁶. Indem Myoglobin als Radikalfänger des bioaktiven NO fungiert, das das endogene NO zu Nitrat umwandelt, beeinflusst das Oxymyoglobin den intrazellulären Gehalt an biologisch aktivem NO. Das NO selbst wird kontinuierlich in den Myozyten produziert (wobei die histologische Lokalisierung der NO produzierenden Struktur noch diskutiert wird)²⁸⁶. Die Inaktivierungsreaktion von Oxymyoglobin mit NO zu Nitrat führt zur Bildung von Ferromyoglobin. Dieses Ferromyoglobin wird wiederum durch die intrazelluläre Metmyoglobinreduktase wieder recycelt.

Der sarkoplasmatische NO Gehalt wird somit durch das Verhältnis dieser beiden Prozesse, die NO Bildung einerseits und der NO Inaktivierung durch Oxymyoglobin andererseits, beeinflusst. Das biologisch aktive NO seinerseits kontrolliert sowohl die Rate des kapillären O₂ Angebotes der Zelle (über die Vasodilatation und Beeinflussung des Blutflusses), als auch das Ausmaß der Sauerstoffutilisation durch die Zytochromoxidase. Wittenberg schlug vor, das die Inaktivierungsreaktion von NO durch Myoglobin das verbindende Glied hin zu einem Modell eines integrierten Kontrollsystems für die Verfügbarkeit von O₂ in der Zelle sein könnte. Indem es den sarkoplasmatischen NO Gehalt reguliert (über die Deaktivierung von NO durch Oxy – Mb zu Nitrat), nimmt der intrazelluläre Oxymyoglobingehalt sowohl Einfluss auf die O₂ Aufnahme durch die Cytochrom C Oxidase, als auch auf das kapilläre O₂ Angebot und die intrazelluläre NO Generierung²⁸⁶.

1.8 Myoglobin als Schutzfaktor vor oxidativem Stress

Ein Strukturvergleich von Myoglobin mit anderen Proteinen verdeutlicht neben der ausgeprägten strukturellen Ähnlichkeit zum Hämoglobin auch Homologien zu hämhaltigen Peroxidasen. Dabei weist insbesondere die Hämbindungsdomäne viele spektroskopische und chemische Ähnlichkeiten zur aktiven Domäne von Peroxidasen auf.

Es ist bekannt das eine Verbindung von Globinen mit H₂O₂ zur Bildung von Globinradikalen (Globin[•]) führt^{75, 97}. Und bereits in den frühen 20 Jahren des vergangenen Jahrhunderts schrieb Wu Hämoglobin eine enzymatische Aktivität als Peroxidase zu^{75,289}. Ähnliche Reaktionen wurden für MB und H₂O₂ in den fünfziger Jahren nachgewiesen^{75, 97}. So gelang beispielsweise Keilin und Mitarbeiter der Nachweis, das Substrate wie Phenol oder aromatische Amine unter H₂O₂-Verbrauch durch Mb oxidiert werden konnten¹⁴⁷.

Durch Einsatz von *in vitro* Mutagenese war es gelungen, die natürlichen Peroxidaseeigenschaften zu modifizieren. Die Gruppe um Wan und Mitarbeiter war so beispielsweise in der Lage, die Mb – abhängige Peroxidase – Aktivität um das 25 fache der Ausgangsaktivität zu steigern²⁷⁴.

Die funktionelle Bedeutung *in vivo* blieb allerdings noch lange Zeit unklar. Erst vor relativ kurzer Zeit gelang der Gruppe um Flögel et al. der experimentelle Nachweis, das die Peroxidasefunktion von MB auch *in vivo* eine signifikante Rolle im Schutz des Herzens vor *oxidativem Stress* besitzt. So scheinen Myoglobinfreie Herzen gegenüber den natürlichen Wildtyp Herzen in der Bewältigung von oxidativem Stress unterlegen zu sein. Es zeigte sich, das sowohl eine direkte intrakoronare Infusion von H₂O₂, als auch die mittels 2,3 Dimethoxy –1,4 – Naphthoquinon stimulierte endogene ROS Bildung bei MB Null Mäusen die kardiale Leistungsfähigkeit im Vergleich zu den WT Kontrolltieren *signifikant verringerte*.

Die Autoren folgern daraus, das MB auch eine wichtige Rolle in den Redoxreaktionen des Herzens besitzt, um das Herz funktionell und metabolisch vor einem oxidativem Schaden durch ROS zu schützen⁷⁵.

1.9 Stellenwert von Myoglobin in der klinischen Diagnostik

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen derzeit weltweit noch vor malignen Erkrankungen die wichtigste Ursache für Morbidität und Mortalität dar. Eine wichtige Entität ist hierbei der akute Myokardinfarkt (AMI). Pathophysiologisch ist der akute Myokardinfarkt charakterisiert als eine Komplikation der zugrundeliegenden koronaren Herzkrankheit (KHK). In einem Großteil der Fälle findet sich eine primäre koronare Thrombose infolge stenosierender Arteriosklerose statt, darüber hinaus sind auch Überlastungen des Myokards bei einem relativem Mangel der zur Verfügung stehenden energiereichen Phosphate bei zu Grunde liegender Arteriosklerose bekannt (sog. Mangelinsuffizienz). Zudem sind in der Literatur auch primäre Gefäßspasmen sowohl zuvor bereits stenosierter als auch bislang unauffälliger Gefäße beschrieben worden, die jedoch insgesamt seltener sind^{123, 246}.

Eine gravierende Störung des zellulären Energiehaushaltes wie beispielsweise infolge einer Ischämie führt zu einer Änderung der Membranpermeabilität, so dass zytoplasmatisch gelöste Makromoleküle freigesetzt werden. Ob allerdings eine rasche Freisetzung von zytoplasmatischen Proteinen zwingender Beweis für eine Zellnekrose sein muss, oder nicht auch Zeichen einer prinzipiell noch reversiblen Zellschädigung sein könnte, ist umstritten^{1, 211}.

Dessen ungeachtet: da Myoglobin näherungsweise ausschließlich im Skelett und Herzmuskulatur angesiedelt ist, kann es bei einer Schädigung dieser Gewebe freigesetzt werden und zu einer Myoglobinämie im peripheren Blut führen. Diese Myoglobinämie kann in der serologischen Diagnostik eines akuten Myokardinfarktes neben dem klinischen Bild und der Elektrokardiographie hilfreich sein. Von Kiss et al wurde in diesem Zusammenhang bereits 1956 über das Auftreten von Myoglobin im peripheren Blut berichtet^{151, 246}.

Allerdings wiesen die freigesetzten zytosolischen Proteine wie Myoglobin (Mb), und die Myokardspezifischen Troponine I und T kein enzymatische Aktivität auf, so dass erst seit Beginn der 90 Jahre im Rahmen der breiteren Verfügbarkeit von schnellen Enzymimmunoassays diese Proteine in der Akutdiagnostik des MI bestimmt werden⁶³. Heute sind EKG Kontrollen zum Monitoring von ST Streckenhebungen und klinisch chemische Untersuchungen zum Enzymverlauf von Troponin T, GOT, GPT, LDH, α HBDH, CK und CK MB weithin als klinische Standards etabliert¹²³.

Die laborchemische Bestimmung von Myoglobin hingegen ist gegenüber der Bestimmung der anderen bereits erwähnten biochemischen Marker in den Hintergrund getreten. Darüber hinaus kommt Myoglobin nicht ausschließlich in der Herzmuskulatur, sondern auch in der Skelettmuskulatur vor. Folglich wäre eine Erhöhung des Myoglobingehaltes im Serum zwar *sensitiv* aber durchaus nicht *spezifisch* für einen Herzmuskelschaden.

Tatsächlich können sowohl chronische oder akute Erkrankungen der Skelettmuskulatur, als auch Traumatisierungen derselben, ebenfalls zu Myoglobin Serumspiegelerhöhungen führen. Die Gruppe um Varki et al. identifizierte dabei als häufigste Ursachen intramuskuläre Injektionen, operative Eingriffe und den Zustand nach epileptischen Grand- Mal Anfällen^{246,266}.

Selbst unter physiologischen Bedingungen wird ein wenig Myoglobin freigesetzt und ist im peripheren Blut nachweisbar (Referenzgrenze: $70 \mu\text{g/l}^3$)⁶³. Darüber hinaus wird Myoglobin in den Nieren metabolisiert und zu etwa 3% renal eliminiert (bei einer relativ kurzen Plasmahalbwertszeit von nur neun Minuten)^{152, 246}. Infolgedessen unterliegt die Myoglobin Serumkonzentration auch Schwankungen, die durch Änderungen des Blutdrucks, des Herz Zeit Volumens (HZV), sowie der Nierenfunktion hervorgerufen werden können^{246, 259}.

Aus den genannten Erwägungen hat sich in der klinischen Routine der Nachweis des myokardspezifischen Troponin T gegenüber dem Myoglobin eher als Marker einer Myokardischämie durchsetzen können. Troponin T liegt in Kardiomyozyten sowohl in einer freien, als auch als eine an die Myofibrillen gebundenen Form in sehr hoher Konzentration vor. Eine Muskelschädigung äußert sich demnach in einem prozentual sehr starken und lang anhaltenden Serumanstieg von Troponin T.

Die Bestimmung von Troponin T weist auch gegenüber der Bestimmung anderer Proteine wie CK, CKMB und LDH eine ganze Reihe von Vorteilen auf. Denn im Gegensatz zu LDH und CKMB fallen die Troponin T Serumspiegel langsamer ab, somit sind auch subakute und auch bereits abgelaufene Infarkte nachweisbar (bis zu zwei Wochen nach der Ischämie) bei denen die Serumkonzentration von LDH und CKMB bereits wieder auf normale Werte zurückgefallen sein können¹²³.

1.10 Myoglobin und maligne Erkrankungen

Wie dargelegt, spielt Myoglobin eine wichtige Rolle in der O₂ Homöostase, interagiert mit NO und kann als Radikalfänger dienen. Die Überwindung von hypoxischen Zuständen gilt als ein Schlüsselfaktor in der Tumorprogression²⁶⁷.

Maligne veränderte Gewebe sind nicht nur durch genetische Veränderungen (Aktivierung von Onkogenen und Verlust von Tumorsuppressorgenen) charakterisiert, sondern besitzen oft eine hypoxische Mikroumgebung, welche ihrerseits wiederum HIF abhängige Transkriptionsfaktoren aktiviert⁷⁷. Die in tumorösen Gewebe ein sprossende Gefäßversorgung ist jedoch oftmals irregulär aufgebaut und funktionell unzureichend^{58, 77}. Es ist insofern naheliegend, dass die Expression von Myoglobin malignen Zelllinien, die hypoxischen und oxidativem Stress ausgesetzt sind, über die verbesserte O₂ Versorgung und Kontrolle des NO/ROS Stoffwechsels einen Überlebensvorteil bieten könnte⁷⁸. Die Gruppe um Flonta konnte kürzlich den Nachweis erbringen, dass nicht nur Tumoren muskulären Ursprungs (wie beispielsweise Sarkome und Rhabdomyosarkome), sondern auch solide Tumoren nicht muskulären Ursprungs, wie beispielsweise Ovarialca und Mammaca Myoglobin in signifikantem Ausmaß exprimieren, während die Kontrollzelllinien aus normalen Gewebe keine Myoglobinexpression aufwiesen⁷⁸.

Galluzzo konnte nachweisen, dass MB exprimierende Zellen im Vergleich zu Kontrollen in vivo eine etwa um den Faktor fünf geringere Tumorexpanionsrate aufwies. Dies legt die Vermutung nahe, dass die verbesserte Sauerstoffspannung in maligne veränderten Geweben den Reiz zu metastatischen Absiedlungen vermindert^{77, 89}. Die Erforschung des möglichen Stellenwertes von Myoglobin in der Tumorbilogie ist noch in den Anfängen begriffen, beinhaltet aber faszinierendes Potential, um das bestehende Verständnis über die Tumorentstehung und Tumorprogression zu erweitern und evtl. in Zukunft weitere therapeutische Optionen in der Onkologie zu ermöglichen.

1.11 Transgene Tiermodelle in der physiologischen Forschung

Bereits in der Vergangenheit wurden in der kardiologischen und physiologischen Forschung erfolgreich genetisch modifizierte Tiermodelle zur Untersuchung der Pathophysiologie menschlicher Erkrankungen eingesetzt. Die Gruppe um Okamoto beispielsweise setzte bereits 1963 einen spontan hypertensiven Rattenstamm in der Untersuchung der arteriellen Hypertonie ein^{106,199}.

Wie Gödecke 2002 in seiner Habilitationsschrift über transgene Tiermodelle in der kardiovaskulären Forschung ausführte, wiesen diese Tiermodelle auf der Basis eines zunächst unbekanntem genetischen Hintergrundes einen definierten Phänotyp auf.

Die hierbei möglicherweise zu Grunde liegenden molekularen Ursachen waren zunächst unbekannt und mussten im Anschluss durch gezielte Rückkreuzungen auf die normalen Kontrollstämme in Koppelungsanalysen eingegrenzt werden. Im wesentlichen wurde dabei die Kosegregation der phänotypischen Veränderungen mit bestimmten Bereichen des Genoms beobachtet, und dadurch eine Reihe möglicher Gene zurück geschlossen, die den Phänotyp erklären können¹⁰⁶.

Die Vorgehensweise war also deduktiv: vom vorliegenden Phänotyp wurde auf mögliche zu Grunde liegende Kandidatengene geschlossen. Im Jahr 1982 gelang es einer Gruppe um Palmiter einer Labormaus ein Gen einer anderen Tierart einzufügen^{106, 203}. Seit dieser Pionierleistung nimmt die Zahl der gentechnisch modifizierten (transgenen) Tiere stetig zu. Diese transgenen Tiermodelle erlauben anstelle der deduktiven, eine induktive Herangehensweise bei der Erforschung von physiologischen Mechanismen.

Anstatt von einem vorliegenden Phänotyp auf die mögliche zu Grunde liegende genetische Ursache zurück zu schließen, steht am Anfang eine genetische Modifikation (beispielsweise Inaktivierung oder Überexpression eines Gens), die es erlaubt, am entstehenden Phänotyp die Rolle des inaktivierten oder überexprimierten Gens bei der Genese einer Erkrankung zu untersuchen¹⁰⁶. Bis dato stehen vor allem transgene Mausmodelle im Zentrum des Interesses. Mausmodelle sind im Vergleich zu Modellen an größeren Säugern zum einen preiswerter und weisen eine einfachere Handhabung und kürzere Generationszeiten auf.

Der Einsatz molekularbiologischer Techniken weist gegenüber den experimentellen Ansätzen der Vergangenheit große Vorteile auf. So wurden vor der Ära der molekularbiologischen Methoden meist Chemikalien zur Inaktivierung des Myoglobins verwendet. Unterschiedliche Gruppen setzten zu diesem Zweck vor allem Wasserstoffperoxyd, CO oder Nitrit ein^{46,112,254}.

Die Interpretation der aus Experimenten mit chemischer Inaktivierung des Mb gewonnenen Daten basiert auf der Prämisse, dass die gewählten Inhibitoren einerseits selektiv Myoglobin inaktivieren können, andererseits jedoch keinen unspezifischen Neben- und oder Wechselwirkungen auf andere Zellfunktionen haben sollten¹⁰⁶.

Kohlenmonoxid (CO) jedoch hemmt Cytochrom (mithin somit auch das Cytochrom C), beeinflusst also den zellulären Sauerstoffbedarf, und auch für Nitrit sind von Glabe et al. unspezifische Nebenwirkungen beschrieben worden^{101,106}.

Im Vergleich zur chemischen Inaktivierung der Mb Aktivität bietet ein transgener Ansatz ein ungleich höheres Maß an Spezifität. Da sogar die Einführung von Punktmutationen in das Genom ermöglicht wird, wird das Problem einer geringeren Selektivität von chemischen Inhibitoren bzw. Aktivatoren elegant umgangen¹⁰⁶.

1.12 Transgene Myoglobin – Knockout Mausmodelle

Die biologisch – medizinische Myoglobinforschung wurde wesentlich stimuliert durch die Generierung zweier Myoglobin – Knockout Mausstämme, die von Garry et al (1998) und Gödecke et al (1999) unabhängig voneinander etabliert und analysiert wurden^{93, 102}.

Garry gelangte in einer ersten Charakterisierung ihres Myoglobin^{-/-} Mausstammes zu der Auffassung, dass der Myoglobinverlust zunächst ohne erkennbare funktionelle Konsequenzen zu bleiben schien. Die Tiere waren lebensfähig, fruchtbar und konnten sich untereinander mit Myo^{-/-}, Myo^{+/-} und Myo^{+/+} fortpflanzen. Die histologische Untersuchung von Herz und Skelettmuskulatur wies keine Auffälligkeiten auf, die spontane Todesrate war in Myoglobin^{-/-} und Wildtypieren vergleichbar groß und kein Tier entwickelte Hinweise auf eine Herzinsuffizienz. Die ventilatorische Antwort auf eine normobare Hypoxie von 13.5% O₂ (entsprechend dem O₂ Gehalt in 3,700 m Höhe) war in beiden Gruppen gleich, die Untersuchung an isolierten Herz – und Skelettmuskeln ergab eine vergleichbar gute Leistungsfähigkeit⁹³. Der relativ unauffällige Phänotyp stellte zunächst das seit Jahrzehnten bestehende klassische Verständnis über die Bedeutung des Myoglobins in Frage. Die Autoren zogen initial die Schlussfolgerung, dass Myoglobin funktionell ohne Bedeutung zu sein schien und auf bisher unverstandenem Wege einer Elimination im Laufe der Evolution entkommen sei⁹³.

Gödecke et al. jedoch kamen bei der Charakterisierung ihres Myoglobin^{-/-} Stammes zu einer anderen Ergebnis: eine detailliertere funktionelle und morphologische Untersuchung des transgenen Mausstammes hatte das Ergebnis, dass in den Myoglobin – defizienten Tiere sogar auf struktureller Ebene multiple Kompensationsmechanismen aktiviert werden, die in ihrer Summe den O₂ – Gradienten in der Muskulatur steiler stellen, und somit einen Beitrag zur Gewebeoxygenierung leisten¹⁰².

Im Detail wiesen die Herzen der Myoglobin – defiziente Tiere beispielweise einen um 30% erhöhten Koronarfluss und eine gesteigerte Koronarreserve auf, die wahrscheinlich das funktionelle Korrelat der ebenfalls erhöhten Kapillardichte darstellt, um den kardialen O₂ – Bedarf selbst bei maximaler β – adrenerger Stimulation decken zu können¹⁰².

2. Fragestellung der vorliegenden Arbeit

Die bisherigen Untersuchungen im Institut für Herz – Kreislaufphysiologie am Myoglobin^{-/-} Mausstamm haben bereits zeigen können, dass auf funktioneller Ebene Kompensationsmechanismen aktiviert werden, die eine suffiziente Sauerstoffversorgung des Myokards unter basalen Bedingungen garantieren¹⁰².

Garry et al. wiederum berichteten an dem dort etablierten Myoglobin^{-/-} Modell über erhöhte Mortalitätsraten, wenn Myoglobin während der Embryonalentwicklung fehlt. Dies impliziert die Möglichkeit, dass die Kompensation der Myoglobin – Defizienz bereits so früh während der Entwicklung erfolgen könnte, so dass im Phänotyp des adulten Tieres dann keine wesentlichen Funktionseinschränkungen mehr nachweisbar sind. Da Myoglobin als Radikalfänger des bioaktiven Stickoxids (NO) fungieren kann⁷⁴, und darüber hinaus am Stoffwechsel der oxidativen Radikale während der postischämischen Erholungsphase teilnimmt⁷⁵, ist es wahrscheinlich, dass Myoglobin Verlustmutanten gegenüber ihren wildtypischen Artgenossen nicht nur einem lokal verringerten Sauerstoffangebot, sondern darüber hinaus auch noch zusätzlich einem erhöhten oxidativen und nitrosativem Stress ausgesetzt sind.

Von beiden Stimuli ist bekannt, dass Sie Einfluss auf die Genexpression nehmen können^{22, 178}.

Es stellte sich daher die Frage, ob sich in einem Genomweiten Screeningverfahren mögliche Veränderungen der Genexpression zwischen den Wildtyp Tieren und ihren transgenen Artgenossen nachweisen ließen. Mit Blick auf diese Annahmen verfolgt die Arbeit die folgenden spezifischen Fragen:

1. Da unter basalen normoxischen Bedingungen aufgrund der bereits eingangs erwähnten physiologischen Kompensationsmechanismen zunächst keine weiteren Unterschiede im Phänotyp nachweisbar waren, ist es jedoch möglich, dass unter erhöhtem physiologischem Stress einer chronischen Hypoxie (zwei Wochen, bei 10% O₂ Konzentration) Anzeichen einer funktionellen Dekompensation auftreten könnten, die unter normoxischen Bedingungen noch kompensiert werden.

Zur Beantwortung dieser Frage wurden funktionelle und anatomisch – morphologische Untersuchungen zu HZV, RR, MRT, Blutbild und Histologie des Herzens durchgeführt.

2. Spiegeln sich mögliche funktionelle Änderungen des Phänotyps bei chronischer Hypoxie auch in Veränderungen der Genexpression wider? Um eine möglichst große Anzahl potentiell unterschiedlich exprimierter Gene zu erfassen, wurde eine cDNA Microarray Analyse durchgeführt, und die unterschiedliche Expression einiger ausgesuchter Gene mittels PCR überprüft.

3. Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Die für diese Arbeit verwendeten Tiere wurden in der Tierversuchsanlage der Heinrich – Heine Universität gezüchtet. Zur Erzeugung wurde durch homologe Rekombination in den embryonalen Stammzellen das essentielle Exon 2 deletiert. Dieses Exon kodiert die Aminosäuren 31 – 105 des Proteins und enthält sowohl die Häm – Bindungsstelle, als auch wichtige Histidinketten, die die Bindungsstelle stabilisieren. In der Erstbeschreibung wurde durch Gödecke et al. durch unterschiedliche Methoden der experimentelle Nachweis erbracht, dass kein Myoglobin exprimiert wird.¹⁰²

Die Mm. Solei und die Herzen von Myoglobin Null Mäusen sind depigmentiert und erscheinen daher heller als bei WT Tieren, vom rein phänotypischen Erscheinungsbild sind beide Gruppen nicht voneinander zu unterscheiden.

Für die Untersuchungen wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Das durchschnittliche Alter der Tiere betrug acht Wochen. Als Kontrollgruppe wurden entsprechende Alters – und Gewichtsangepasste NMRI Wildtyp (WT) Tiere verwendet.

Das Körpergewicht variierte zwischen 27 und 36 g, das linksventrikuläre Herzgewicht betrug zwischen 108 und 138 mg. Da die Tiere für die MNR Untersuchungen wogen zwischen 23 und 27 g.

Alle Tiere erhielten eine Standarddiät und Wasser ad libitum, die Temperatur betrug 22 – 24°C. Die Tiere wurden in der zentralen Tierversuchsanlage (TVA) der Heinrich – Heine Universität gehalten und gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes behandelt (Genehmigung: 23.05 – 120 – 3 – 69/00). Der Versuchsablauf ist schematisch in Abbildung 3.1 dargestellt.

3. Material und Methoden

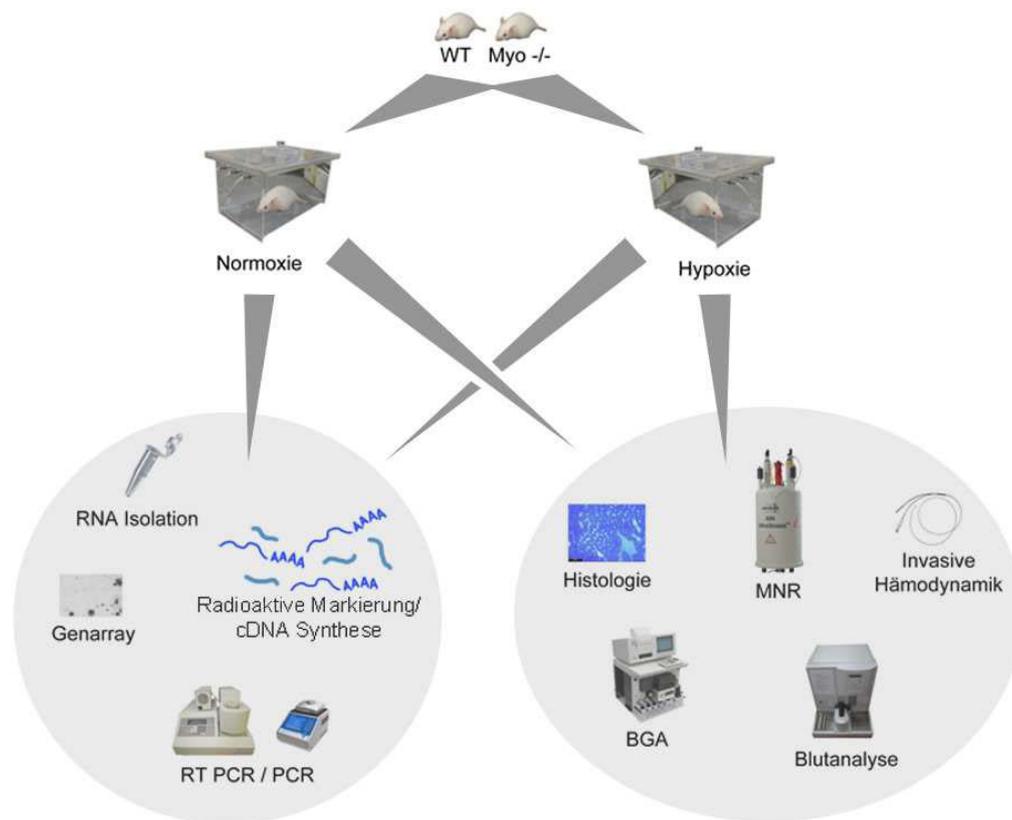


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung der funktionellen und molekularbiologischen Analyse von WT und $Myo^{-/-}$ Mutanten; Quelle: selbst.

Sowohl normoxische, als auch hypoxische Tiere wurden dem Käfig entnommen, durch eine Kombination aus Ketavet und 2% Rompun betäubt (Dosierung: $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ketavet und $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 2% Rompun), gewogen und im Anschluss sofort anschließend durch zervikale Dislokation getötet. Der Thorax wurde durch eine transversale Inzision in Höhe des Diaphragmas eröffnet und der vordere Thoraxschild entfernt. Die Herzen wurden unmittelbar anschließend mit einer eiskühlten 0,9 % NaCl Lösung perfundiert und blutleer gespült, bevor Sie exzidiert wurden.

Physiologische Methoden

3.2 Erzeugung einer chronischen Hypoxie

Um die unter basalen Bedingungen gut adaptierten Tiere einem erhöhtem physiologischen Stress auszusetzen, wurden sowohl die transgenen $Myo^{-/-}$, als auch vom Alter und Gewicht vergleichbare Wildtyp Kontrollen einer normobaren Hypoxie mit einem Sauerstoffgehalt von 10 % über den Zeitraum von zwei Wochen ausgesetzt (normale Raumluftzusammensetzung: 78% N_2 , 21 O_2 , > 1% Argon, CO_2 und andere Gase; eine Halbierung des Sauerstoffpartialdrucks liegt in ca. 5.500 m Höhe vor). Hierzu wurden die Käfige der Tiere in eine gasdichte Plexiglasbox mit einem Gesamtvolumen von 39 L eingesetzt (siehe Abbildung 3.2, Feinmechanische Werkstatt der Heinrich - Heine Univ. Düsseldorf). Es wurde ein permanent hoher Gasdurchfluss erzeugt, wobei Gasflussmesser der Firma ABB (Snap In Kleindurchflussmesser, ABB, Göttingen) den Gasfluss konstant hielten. Bei 10 – fachem Luftwechsel pro Stunde wurden 390 Liter Gasgemisch pro Stunde, d.h. 39 Liter O_2/h , zugeführt.

3. Material und Methoden

Je Mäuse – Käfig wurden bis zu 8 Mäuse á 30 – 40 g platziert, d.h. bis Mäuse bis zu einem Gesamtgewicht von 320 g, die insgesamt maximal 1,6 Liter Sauerstoff je Stunde verbrauchten. Folglich wurde ein Sauerstoff Überangebot erreicht (39 vs. 1,6 Liter), wodurch einerseits die O₂ – Konzentration in der Plexiglasbox nicht unter den eingestellten Wert absinken konnte, und andererseits eine zu starke CO₂ Konzentration, Wärme oder Luftfeuchtigkeitsanstieg verhindert (siehe Abbildung 3.2). Aus diesem Grund war weder eine separate CO₂ Entgiftung durch Granulat, als auch eine spezielle Kühlvorrichtung erforderlich.

Im Gegensatz zur hypobaren Hypoxie mit einer Verminderung des Luftdrucks, wie Sie in Höhenlagen vorkommt (neben Veränderungen der Umgebungstemperatur, des Wasserdampfdrucks, des Luftdrucks, des O₂ Partialdrucks und der Strahlungsintensität), liegt eine normobare Hypoxie durch Verminderung des O₂ Anteils in der Atemluft vor.



Abbildung 3.2: verwendete Plexiglaschamber zur Erzeugung einer normobaren Hypoxie, Hersteller: Feinmechanische Werkstatt der Heinrich – Heine Universität Düsseldorf. Quelle: selbst.

Die Kontrolltiere wurden in einer baugleichen Kammer zu Raumluftbedingungen gehalten. Die Temperatur betrug konstant zwischen 22°C und 24 °C. Futter und Wasser wurde ad libitum gegeben und die Käfige einmal in der Woche ausgetauscht. Hierzu wurde die Kammer in der Woche für etwa 5 Minuten geöffnet.

Insgesamt wurden die Hypoxien während der zweiwöchigen Versuchsdauer durchschnittlich für weniger als 20 min unterbrochen. Exemplarisch wurde der Sauerstoffgehalt innerhalb der Box durch eine Kalomelektrode überprüft.

3.3 Anästhesie

Für die Analyse der arteriellen Blutgase, die Entnahme der venösen Blutproben, die Histologischen Untersuchungen, die Isolation von RNA und die MRT Bildgebung wurden die Tiere anästhesiert. Hierzu wurde Urethan intraperitoneal in einer Dosierung von 1,5 g * kg⁻¹ verabreicht. Bei der NMR Bildgebung wurde eine Inhalationsnarkose mit Isofluran in Kombination mit Diazepam (Dosierung: 1,2% Isofluran in Kombination mit 2,5 mg * kg⁻¹ Diazepam i.p.) angewandt. Für die RNA Isolation wurden mit 100 mg * kg⁻¹ Ketavet und 50 mg * kg⁻¹ Rompun (2%) betäubt. Anästhesierte Mäuse sind anfällig für Hypothermien und wurden daher auf erwärmbaren Kontrolltischen (Hugo Sachs Elektronik), oder unter Wärmelampen gelagert.

3. Material und Methoden

3.4 Hämodynamische Parameter und arterielle Blutgasanalyse

Sowohl hypoxische Tiere ($n = 10$), als auch die Tiere der normoxischen Vergleichsgruppe ($n = 8$) wurden der Kammer entnommen, gewogen und mit $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Urethan intraperitoneal anästhesiert. Den Tieren des hypoxischen Kollektivs wurde mittels einer Maske 10 % O_2 angeboten. Aufgrund der bereits erwähnten Gefahr einer Auskühlung wurden die Tiere auf einem auf 37°C vorgewärmten Wärmetisch (Hugo Sachs Elektronik) gelagert.

Unter mikroskopischer Präparation (Leica MS5, Leica Wetzlar) der rechten Arteria Carotis wurde ein gestreckter Polyethylen Katheters (Millar Micro Tip, innerer Durchmesser = 0,4 mm; gefüllt mit einer $\text{NaCl}/\text{Heparin } 100 \text{ U ml}^{-1}$) eingebracht, an das ein Statham P23 XL Transducersystem angeschlossen war. Die Daten wurden durch ein Powerlab 800 Gerät und Dokumentationssoftware (ADInstruments) aufgezeichnet. Die Beobachtungsdauer von Puls und Blutdruck betrug je Tier etwa 10 Minuten, nachdem sich ein Steady State eingestellt hatte. Normoxische Tiere atmeten Raumluft. Das hypoxische Kollektiv wurde während der Prozedur durch eine Maske mit 10 % O_2 versorgt.

Im Anschluss wurde den Tieren Blut für die arterielle Blutgasanalyse entnommen. Nach durchgeführter hämodynamischer Messung wurde den Tieren mit einer 23 G Nadel etwa 0,2 mL arterielles Blut entnommen und in einem BGA Röhrchen aufgefangen. Die Proben wurden direkt im Anschluss mittels eines Blutgasanalysegerätes Modell Radiometer ABL 505 (Diamond Diagnostics Inc.; Holliston, USA) analysiert.

3.5 Venöse Blutparameter

Um die venösen Blutzellparameter zu erheben, wurden die Tiere (hypoxisch $n = 9$, Kontrolle $n = 8$) nach der Entnahme und dem Wiegen, median sternotomiert und das Blut via intrakardialer Punktion entnommen. Das so gewonnene Blutvolumen betrug im Mittel etwa 0,6 ml, und wurde eisgekühlt in einem EDTA beschichteten pädiatrischen Röhrchen in das Institut für klinische Chemie an der Heinrich – Heine Universität transportiert. Dort wurden die Proben anschließend mittels eines voll automatisierten Analysgerätes (SE 9000, Sysmex, Kobe, Japan) analysiert.

3.6 Histologie

Nach Entnahme aus der Box, wurden sowohl die hypoxischen Tiere ($n = 10$) als auch das normoxische Kontrollkollektiv ($n = 8$) gewogen, und wie beschrieben anästhesiert ($1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ Urethan i.p.). Sie wurden durch zervikale Dislokation getötet. Im Anschluss wurde der Thorax rasch durch mediane Sternotomie eröffnet und das Herz durch makroskopische Präparation dargestellt. Die Aorta ascendens wurde mit einer 23 G Kanüle punktiert und mit der St. Thomas Hospitallösung bis zur Kardioplegie perfundiert. Es schloss sich eine fünfminütige Perfusion mit der Cacodylatpüllösung (0,22 M Saccharose und 0,1 M Cacodylat) bei einem Perfusionsdruck von 100 mm Hg an. Anschließend wurden die Herzen ($n = 18$) erneut für 5 Minuten bei 100 mm Hg mit 2,5 % Glutaraldehyd in einem 0,1 M Cacodylatpuffer als Fixativ perfundiert.

Die Herzen wurden exzidiert und die Präparate über Nacht in derselben Lösung postfixiert. Die freie anteriore Wand des linken Ventrikels wurde in 6 – 9 Schnitte geschnitten und eingebettet (Spurr, Serva, Heidelberg). Die angefertigten Semidünnschnitte wurden mit 1 % Toluidinblau Lösung angefärbt (siehe Abbildung 3.3) und die Kapillaren mithilfe eines computerisierten digitalen Analysesystems aufgenommen und (Soft Imaging Systems, Münster) ausgezählt.

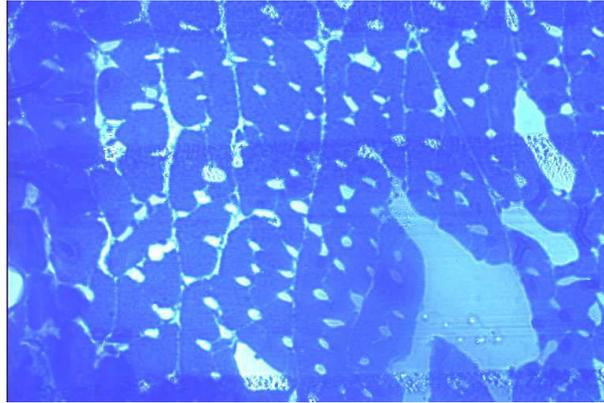


Abbildung 3.3 Histologischer Schnitt in 1% Toluidinblaufärbung. Kapillaren werden mit Analysesystem markiert und ausgezählt, Abbildung: selbst.

3.7 Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

Für die MRT Untersuchungen zur Beurteilung der linksventrikulären Funktion wurden die Tiere ($n = 7$; 3 WT/ 4^{-/-}) zum einen *vor* und *nach* der zweiwöchigen Exposition untersucht. Die MRT Untersuchungen wurden mittels eines Bruker DRX 9,4 Tesla Wide Bore NMR Spektrometer (Bruker, Rheinstetten), welches mit einem aktiv abgeschirmten 40 mm Gradientenset und einen dual angeschlossenen 30 mm Birdcage Resonator ausgestattet war.

Die hochauflösenden Bilder der Mäuseherzen wurden durch eine EKG getriggerte (Physiogard SM 785 NMR, Bruker Medical SA, Wissenbourg, FA) fast gradient echo (FLASH) cine Sequenz mit einem flip angle von 45° akquiriert. Um eine maximale Anzahl von Aufnahmen über den gesamten Herzzyklus zu erhalten (etwa 100 ms bei 600 Schlägen in der Minute), wurde die kürzest mögliche Echozeit (1,8 ms) verwendet. Bei einer Wiederholungsrate von 3,8 ms wurden so 26 Frames während eines RR Intervalls gewonnen. Dies ermöglicht eine genügend hohe zeitliche Auflösung, um innerhalb des Herzzyklus Diastole und Systole abgrenzen zu können. Die resultierende in – plane Auflösung betrug $117 \times 117 \mu\text{m}^2$ (bei einem Blickfeld von $30 \times 30 \text{mm}^2$, und einer 256×256 Matrix). Die totale Akquisitionszeit betrug pro Schicht für eine cine Sequenz etwa 2 Minuten. Es wurden zwischen 6 und 8 aufeinanderfolgende Schichten mit einer Schichtdicke von 1 mm akquiriert, um das gesamte Herz abzudecken.

Das Herzinnenvolumen wurde durch manuelle Markierung erfasst.

Die Schichtdicke (1mm) wurde mit dem gemessenen Areal multipliziert, um das Volumen zu erhalten. Die enddiastolischen Parameter wurden im ersten Frame nach Einsetzen des QRS Komplexes erhoben, und der Frame mit dem minimalen ventrikulären Volumen wurde als Endsystole bestimmt. Um eine Signalüberlappung der höchsten und tiefsten Schicht mit nichtkardialen Strukturen zu vermeiden, wurde die Dicke der genannten Schichten per Dichtemessung erfasst und korrigiert. Dies ist möglich, da die Intensität des erfassten Signals mit der Anzahl der präzessierenden Protonen (respektive der Schichtdicke) korreliert.

Es wurden die jeweiligen Schichten aufeinander normiert, und der Mittelwert aus fünf repräsentativen Bildpunkten gebildet. Mittels dieses Verfahrens wurden die obersten und untersten Schichten mit dem ermittelten Anteil gewichtet. Da alle Schichten ohne Lücke erfasst wurden, wurde das Gesamtvolumen als Summe aller Schichtvolumina berechnet, und es waren keine weiteren Annahmen zur geometrischen Form nötig.

3. Material und Methoden

Aus den MRT Bildern wurden die enddiastolischen und endsystolische Volumina [μl], das Schlagvolumen (enddiastolisch – endsystolischem Volumen [μl]), die Ejektionsfraktion (Schlagvolumen/ enddiastolisches Volumen [%]) und die linksventrikuläre Masse erhoben. Zur Berechnung der linksventrikulären Masse (epikardiale Grenzen – linksventrikuläre Kavität) wurde definitionsgemäß eine myokardspezifische Dichte von $1,05\text{g}/\text{cm}^3$ [mg] angenommen und die Papillarmuskeln wurden berücksichtigt. Um über einen längeren Zeitraum eine stabile Herz und Atemfrequenz zu erhalten, wurden die Tiere anstelle abweichend von der üblichen Narkoseverabreichung einer intraperitonealen Anästhesie mit Urethan mittels einer Maskennarkose mit 1,2% Isofluran (Gasmischelement, Föhr Medical Instruments, Seeheim) sowie Diazepam ($2,5\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) sediert.

Molekularbiologische Methoden

3.8 Allgemeiner Umgang mit RNA

Ribonukleasen (RNasen) sind hochaktive und stabile Enzyme, die die RNA Struktur schnell und dauerhaft zerstören können. Um eine Kontamination der Proben durch RNasen zu vermeiden, muss auf strenge Hygiene und eine sorgfältige Arbeitsweise geachtet werden. Alle wieder verwendbaren Materialien, die mit der Probe in Kontakt kommen müssen vorher 12 h lang mit 0,1% DEPC vorbehandelt werden, die verbliebenen DEPC Reste sind per Autoklavierung zu entfernen. Darüber hinaus darf nur RNase freies Wasser verwendet werden, zwischen verschiedenen Arbeitsschritten sollten keine Wartezeiten entstehen, RNA Proben sind während der Verarbeitung auf Eis gekühlt zu lagern, Probenbehälter sind nach Möglichkeit stets geschlossen zu halten und die Handschuhe möglichst oft zu wechseln.

Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden, die die RT – PCR und die Array Analyse beeinflusst hätte, wurden hierfür vorgesehene RNA Proben mit einer DNase behandelt. Da das kardiale Gewebe eine große Menge an kontraktilen Proteinen, Bindegewebe und Kollagenfasern enthält wurde das homogenisierte Lysat mit Proteinase K behandelt. Nukleinsäureproben wurden in Aliquots aufgeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

3.9 RNA Isolation

Es sind unterschiedliche Methoden der RNA Isolation etabliert.

Für die Verwendung in Array Analysen ist die Verwendung von hochreiner RNA ohne Kontaminationen obligat. Während bei der Phenol/ Chloroformextraktion nach Chomczynski und Sacci die Trennung durch Zentrifugalkräfte aufgrund der unterschiedlichen Dichte der Zellbestandteile erfolgt, enthält das in unseren Versuchen verwendete, kommerziell erhältliche RNA Isolations Kit von Qiagen spezielle Säulen, in denen die RNA auf einer Matrix gebunden wird.

Die mittels Säulenaufreinigung gewonnene RNA ist im Regelfall reiner als bei der Phenol/ Chloroformextraktion. Nach Angaben des Herstellers weist die erhaltene Gesamt RNA einen erhöhten Anteil von mRNA auf, weil die RNAs, die weniger als 200 Nukleotide lang sind (z.B. tRNA und rRNA durch das Verfahren) zu einem großen Teil abgetrennt werden.

Die Isolation der kardialen Gesamt RNA mit dem kommerziell erhältlichen RNA Isolationskit RNeasy Midi Kit (Qiagen) erfolgte nach der Anleitung des Herstellers „RNeasy Midi Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Tissue“, variiert durch „Appendix C: RNeasy Midi Protocol for Isolation of Total RNA Heart, Muscle and Skin Tissue“.

3. Material und Methoden

Die nachfolgend erwähnten Substanzen befanden sich im Lieferumfang des Kits und stammen von demselben Hersteller. Einzig β – Merkaptoethanol (14,3 M), Ethanol (96%), mehrfach destilliertes Wasser, Proteinase K (Qiagen) sowie ggf. adäquate Reaktionsgefäße (Cellstar) mussten vom Anwender separat bereitgestellt werden. Es war darauf zu achten, die maximale Bindekapazität der Säulen nicht zu überschreiten, da dies zu verminderter Probenqualität und Menge geführt hätte.

- Die Herzen ($n = 48$) wurden mit einem Ultra Turrax T 18 (IKA Staufen) 2 min lang bei 24000 Umdrehungen/ min^{-1} in 300 μl RLT Puffer homogenisiert.
- Um evtl. vorhandenes Bindegewebe, kontraktile Proteine etc. vor der Weiterverarbeitung zu eliminieren, wurde ein enzymatischer Proteinverdau mit Proteinase K durchgeführt.
- Der Suspension wurden 4 ml zweifach destilliertes Wasser und 65 μl Proteinase K (Qiagen) zugesetzt. Die Suspension wurde sorgfältig durch mehrfaches Pipettieren gemischt.
- Die Suspension wurde 20 min lang in einem vorgeheizten Wasserbad (WB 14) bei einer Temperatur von 55 °C inkubiert.
- Im Anschluss wurde die Suspension 5 min lang bei einer Temperatur von 20 °C mit 3000 Umdrehungen/ min^{-1} zentrifugiert (Megafuge 1.0).
- Der Überstand wurde in ein neues, steriles 6 ml Gefäß überführt (Cellstar). Dabei war darauf zu achten, keine Bestandteile des sedimentierten Rückstandes zu berühren.
- Der Probe wurde 3 ml 96% Ethanol (Merck) zugesetzt und durch pipettieren gut vermischt.
- Jeweils 3 ml dieser Lösung wurden auf das Extraktionsröhrchen aufgetragen und für 5 min bei 5000 Umdrehungen/ min^{-1} zentrifugiert (Megafuge 1.0). Der durchgeflossene Anteil wurde verworfen.
- Der letzte Arbeitsschritt und die Zentrifugation wurden erneut wiederholt, bis das Volumen der gesamten Probe (9 ml) komplett aufgetragen war.

Um eine mögliche Kontamination mit DNA auszuschließen, wurde zusätzlich eine DNase Behandlung durchgeführt. Verwendet wurde das „RNase free DNase Set“ (Qiagen).

- Auf das Extraktionsröhrchen wurde 1,9 ml RW 1 Puffer (Qiagen) aufgetragen und die Probe wurde für 5 min bei 5000 Umdrehungen/ min^{-1} (Megafuge) zentrifugiert.
- Je 20 μl DNase I Stammlösung wurde 140 μl RDD Puffer (jeweils Qiagen, Hilden) zugesetzt und durch sanftes verschwenken miteinander gemischt.
- Der präparierte Inkubationsmix wurde (kurz) zentrifugiert, um an den Wänden verbliebene Flüssigkeitsreste zu sammeln.
- Der DNase I Inkubationsmix wurde auf die Probenröhrchen aufgetragen für 15 min bei Raumtemperatur (20 – 25° C) belassen.
- Anschließend wurde 1,9 ml RW 1 Puffer aufgetragen und die Probe für 5 min stehen gelassen. Die Probenbehälter wurden für 5 min bei 5000 Umdrehungen/ min^{-1} (Megafuge) zentrifugiert. Die durchgeflossene Substanz wurde verworfen.

3. Material und Methoden

- Die Extraktionsröhrchen wurden in neue 15 ml Gefäße eingesetzt und 2,5 ml RPE Puffer aufgetragen. Der Puffer wurde in einem zweiminütigen Zentrifugationsschritt bei 5000 Umdrehungen/min⁻¹ (Megafuge) abgewaschen.
- Im Anschluss wurden nochmals 2,5 ml RPE Puffer (Qiagen, Hilden) aufgetragen und die Behälter für 5 min bei 5000 Umdrehungen/min⁻¹ zentrifugiert (Megafuge), um die Röhrchen zu trocknen.
- Abschließend wurde die auf der Membran gebundene RNA mit 100 µl RNase freien Wasser benetzt, eine Minute stehen gelassen und anschließend für 3 Minuten bei 5000 Umdrehungen/min⁻¹ eluiert. Dieser Arbeitsschritt wurde wiederholt.

Den gewonnenen Proben wurde ein 15µl Aliquot für das denaturierende RNA Gel und das Spektralphotometer entnommen. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei einer Temperatur von – 20° C eingefroren.

3.10 Photometrische RNA – Konzentrationsbestimmung

Zur Quantifizierung und zur Abschätzung des Reinheitsgrades der RNA wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers (Lambda 20) die RNA – Extinktionen photometrisch bei 260 und 280 nm Wellenlänge bestimmt. Der Extinktionswert bei einer Wellenlänge von 260 nm erlaubt die Konzentrationsbestimmung der in der Probe enthaltenen Nukleinsäuren unter der Prämisse, dass ein OD – Wert (Optische Dichte) von eins annähernd einer Konzentration von 40 µg/ml RNA entspricht ($A_{260} = 40 \mu\text{g/ml}$).

Nukleinsäuren weisen bei 260 nm und 280 nm zwei Absorptionsmaxima auf, die sich in einem Verhältnis von 2:1 befinden. Proteine mit aromatischen Resten hingegen weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm Wellenlänge auf. Bei einer Kontamination mit Proteinen ergibt sich somit ein Verhältnis von $OD_{260\text{nm}} / OD_{280\text{nm}} \leq 2$. Ein Quotient von 1,6 – 2,0 spricht für einen akzeptablen Reinheitsgehalt der Probe, noch kleinere Quotienten hingegen für eine Kontamination.

Es wurden nur Proben mit einem OD Quotienten $\geq 1,8$ weiter verarbeitet. Die Nukleinsäure Konzentration in der Küvette errechnete sich nach folgender Formel:

$OD_{260} \times 40 \mu\text{g/ml} \times \text{Verdünnung in der Quarzküvette: } 1000 = \mu\text{g RNA}/\mu\text{l}$

3.11 Gelelektrophorese

Allgemeines Prinzip

Nukleinsäuren weisen bei neutralem pH eine negative Ladung auf und können in einer porenbildenden Matrix nach ihrer Größe aufgetrennt werden, da sie auf Grund der negativen Ladung in einem elektrischen Feld zur Anode wandern. Die dabei zurückgelegte Strecke ist von ihrer Größe und dreidimensionalen Struktur, der Konzentration der Agarose, der Stärke des elektrischen Feldes und der Ionenstärke des Puffers abhängig. Da die photometrische Analyse eine mögliche Probendegradation durch RNasen nicht völlig ausschließen kann, wurde eine Gelelektrophorese durchgeführt, um die Intaktheit der RNA zu prüfen. Intakte RNA der Maus sollte als Signal helle Banden bei 18 S und 28 S (entsprechend etwa 4,5 Kb und 1,9 Kb) ergeben.

3. Material und Methoden

3.11a RNA Gel

RNA Gele enthalten Formaldehyd, das die in der RNA enthaltenen Sekundärstrukturen zerstören soll. Zur Herstellung eines RNA – Gels wurden 1 g Agarose (ultra PURE) in 72 ml Wasser in einer Mikrowelle für 2 min unter Kochen gelöst. Um die Agarosekonzentration nach dem Erhitzen konstant zu halten, ist es zweckmäßig, eine Markierung des anfänglichen Flüssigkeitsstandes am Reaktionsgefäß vorzunehmen, so dass nach dem Lösevorgang das Volumen der Lösung leicht überprüft und gegebenenfalls die verdampfte Flüssigkeitsmenge durch Aqua bidest ersetzt werden kann. Unter einem Abzug wurde unter ständigem Rühren 10 ml 10x MOPS Puffer und 18 ml Formaldehyd (37%) zugesetzt. Im Anschluss daran wurde die gelöste Agarose luftblasenfrei in den vorbereiteten Schlitten gegossen und etwa eine Stunde zum Aushärten auf ebener Standfläche stehen gelassen.

Die RNA – Proben wurden in ein Gesamtvolumen von 40 µl Denaturierungspuffer gelöst, für fünf Minuten in einem Hezelement (Thermomixer 5437) bei einer Temperatur von 60° C denaturiert, auf Eis abgekühlt und mit 5 µl RNA – Probenpuffer (50 % Glycerin, 0,1 % Bromphenolblau) versetzt. Die RNA – Proben wurden bei 100 V 1 h lang elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proben 10 - 15 min in eine Ethidiumbromidlösung (EtBr) gelegt. Das EtBr interkaliert zwischen die Nukleinsäurebasen und fluoresziert nach Anregung mit UV – Licht, so dass über dieses Verfahren die Lokalisation der Nukleinsäuren im Gel sichtbar gemacht werden kann. Nukleinsäurefragmente wurden im UV – Licht bei 366 nm Wellenlänge sichtbar gemacht. Nach der Elektrophorese wurden die Gele im UV – Durchlicht (Hofer – Mighty Bright) mit einer Polaroidkamera dokumentiert.

3.11b DNA Gel

PCR amplifizierte DNA wurde in Agarose – Gelen (1 %) aufgetrennt. Agarose wurde dafür in Wasser unter Kochen gelöst und mit $\frac{1}{100}$ Volumen 50xTAE – Puffer und 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) in vorbereitete Gelwannen gegossen. Zur Aussparung der Geltaschen wurden Plastikämme in die Wannan eingehängt. Die Gele wurden luftblasenfrei gegossen und abgekühlt, die Ämme entfernt und die Gele in Elektrophorese – Kammern mit Gelpuffer (0,5 x TAE) überführt. Die DNA-Proben wurden mit $\frac{1}{10}$ Volumen DNA – Lade –Puffer versetzt und in die Geltaschen eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 150 V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele im UV – Durchlicht (Hofer-Mighty Bright, Serva, Heidelberg) mit einer Polaroidkamera dokumentiert.

3.12 Isolation der mRNA aus der kardialen Gesamt RNA für die cDNA Array Hybridisierung

Die isolierte RNA stellt die gesamte kardiale RNA der Maus dar. Gemäß Empfehlung des Herstellers empfahl es sich nicht, ohne weitere Vorbereitungen die kardiale Gesamt – RNA zu verwenden, da dies ein unspezifisches Hintergrundsignal ergeben hätte. Durch die Verwendung reiner mRNA konnte laut Hersteller in der Signalgebung eine höhere Sensitivität erreicht werden. Die gesuchte mRNA musste somit von Resten der rRNA und tRNA separiert werden. Neben der Reduktion eines unspezifischen Hintergrundsignals wurde durch die Isolation der mRNA die Gefahr einer möglichen Kontamination durch genomische RNA und rRNA weiter minimiert.

Posttranskriptional besitzt mRNA am 3´ Ende ein polyadenyliertes Ende. Dieses Poly A Ende dient als Angriffspunkt für streptavidinhaltige magnetische Perlen, die

3. Material und Methoden

aufgrund der hohen Affinität des Streptavidins für das Vitamin Biotin, an den Poly A Schwanz eukaryoter RNA binden können. Der gebildete Biotin – Oligo(dT) – mRNA Komplex kann dann mit einem einfachen Trennmagneten von der übrigen RNA separiert werden. Die Isolation der mRNA aus gesamt kardialen RNA wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (Atlas Pure Total RNA Labeling System, Clontech, Palo Alto, USA) durchgeführt.

Alle nachfolgend erwähnten Chemikalien und Substanzen wurden dem o.g. Kit entnommen, die Durchführung erfolgt nach der Arbeitsvorschrift des Herstellers. Während der Aufbereitung von mRNA durften keine Pausen zwischen den einzelnen Arbeitsschritten auftreten.

a) Die Perlen mussten vor der Verwendung vorbereitet werden

- Die magnetischen Perlen wurden durch sanftes Verkippen der Behälter resuspendiert.
- Je Probe wurden jeweils 15 µl Perlen in ein 0,5 ml fassendes Reaktionsgefäß gegeben.
- Die Perlen wurden mittels eines Magneten separiert und der Überstand abpipettiert und verworfen.
- Die Perlen wurden im Anschluss mit 150 µl 1x Bindungspuffer gewaschen und gemischt.
- Nach erneuter Abtrennung mit dem Magneten wurde der Überstand erneut abgetrennt und verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde insgesamt dreimal wiederholt.
- Abschließend wurden die Perlen in 15 µl 1x Bindungspuffer suspendiert.

b) Anreicherung der Poly A+ RNA

- Ein Heizelement wurde auf eine Temperatur von 70° C vorgeheizt.
- Nach der Vorbereitung der Perlen (s.o.) wurden 50 µg kardiale gesamt RNA in ein 0,5 ml fassendes Gefäß eingesetzt und 45 µl deionisiertes Wasser hinzugefügt.
- In jede Probe wurde 1 µl biotinylierte Oligo (dT) (Clontech, Palo Alto, USA) hinzugefügt und die Suspension gründlich durch auf und abpipettieren vermischt.
- Die Proben wurden für 2 min in dem auf 70° C vorgeheizten Thermozykler inkubiert.
- Anschließend wurden die Proben 10 min lang bei Raumtemperatur abgekühlt.
- Den Proben wurden 45 µl 2x Bindungspuffer zugesetzt und durch Pipettieren gut durchmischt.
- Die in Schritt a) zuvor mehrfach gewaschenen Perlen wurden durch Pipettieren resuspendiert und den vorbereiteten RNA – Proben hinzugefügt (je 15 µl/ Probe). Die Suspensionen wurden gut vermischt.
- Die Proben wurden auf einem Schüttler für ca. 25 min bei 1500 Umdrehungen/ min⁻¹ gemischt. (Es war entscheidend, dass während dieser Prozedur die magnetischen Kügelchen auch in Suspension blieben, um ein optimales Mischungsverhältnis der beiden Komplexe zu gewährleisten).
- Die Perlen wurden magnetisch abgetrennt und der Überstand vorsichtig abpipettiert und verworfen.

3. Material und Methoden

- Die Perlen wurden in 50 µl 1x Waschpuffer suspendiert und erneut separiert, sowie der Überstand wiederum verworfen. Dieser Arbeitsschritt wurde einmal wiederholt.
- Schließlich wurden die Proben in 50 µl 1x Reaktionspuffer gelöst, erneut separiert und der Überstand verworfen.

Abschließend wurden die gereinigte mRNA in 3 µl dH₂O suspendiert und die cDNA Probensynthese konnte beginnen. Die Detektion der Signale auf den von uns verwendeten cDNA Arrays basiert auf der Anregung eines fluoreszierenden Schirmes durch radioaktive Isotope (³²P). Daher musste die mRNA in Übereinstimmung mit dem Protokoll des Herstellers zunächst zu einer radioaktiven (³²P) cDNA revers transkribiert werden. Die Synthese der cDNA entsprach den Angaben des Herstellers (Atlas Pure Total RNA Labeling System, Clontech, Palo Alto, USA).

3.13 cDNA Synthese und radioaktive Markierung für Array Hybridisierung

In einem 0,5 ml fassenden Eppendorf Reaktionsgefäß wurde bei Raumtemperatur ein sogenannter Mastermix angesetzt. Für je vier Proben wurde ein für fünf Proben ausreichender Reaktionsansatz vorbereitet, um ein sicher ausreichend großes Volumen je Probe zu erhalten.

Master Mix

5 x Reaktionspuffer	20 µl
10x dNTP Mix	10 µl
[α ³² P] dATP (3.000 Ci/mmol, 10 µCi/µl)	25 µl
DTT (100 mM)	10 µl
Gesamtvolumen	65 µl

- Ein Heizelement wurde auf eine Temperatur von 65° C vorgeheizt.
- Ein Wasserbad wurde auf eine Temperatur von 50° C vorgewärmt.
- Der vorab durch die Streptavidinhaltigen magnetischen Perlen separierten mRNA wurde je 4 µl CDS Mix hinzugefügt und gut gemischt.
- Die Suspensionen wurden in dem auf 65° C vorgeheizten Thermocycler zwei Minuten lang inkubiert.
- Die mRNA Proben wurden in das auf 50° C vorgewärmte Wasserbad (WB 14) umgesetzt.
- Die Proben wurden für 2 min bei 50°C inkubiert. Währenddessen wurde dem Mastermix bei Raumtemperatur je 2 µl MMLV (für fünffachen Ansatz 10 µl) reverse Transkriptase hinzugefügt.
- Jeder mRNA Probe wurden 13,5 µl des MMLV – haltigen Master Mix zugegeben und durch auf und abpipettieren sorgfältig vermischt.
- Die mRNA Proben wurden 25 min lang bei einer Temperatur von 50° C in cDNA umgeschrieben.
- Die Reaktion wurde durch die Zugabe von je 2 µl Termination Mix beendet.

Die gewonnene cDNA war durch die enthaltenen Radioisotope schwach radioaktiv und konnte für die Hybridisierung auf den Arrays verwendet werden.

3.14 Expressionsanalyse durch cDNA Arrays

Allgemeines Prinzip

Um die vermuteten Unterschiede in der Genexpression unter dem Einfluss chronischer Hypoxie erfassen zu können, wurden sog. Expressions – Arrays eingesetzt. Diese Arrays bestanden zum Zeitpunkt der Versuche aus Nylon – Membranen, auf denen DNA – Fragmente einer großen Anzahl von Genen aufgebracht worden sind. Durch Inkubation dieser Membranen mit radioaktiv markierten cDNAs, binden die komplementären cDNA – Stränge an die auf den Membranen fixierten DNA – Fragmente und können im Anschluss detektiert werden. Die Membranen dürfen niemals – auch nicht partiell – antrocknen. Berührung darf nur mit einer Pinzette und immer nur an den Rändern, niemals auf der präparierten Fläche erfolgen; länger andauernder Kontakt mit Umgebungsluft ist aufgrund der Austrocknungs – und Kontaminationsgefahr zu vermeiden und die Membranen sollten nach Gebrauch sobald wie möglich wieder verschweißt werden. Die Membranen sollten bis zum Gebrauch bei – 20°C gelagert werden.

Das Genexpressionsprofil von 2353 Genen wurde mittels cDNA Arrays Atlas™ Maus 1.2 Arrays Version I und II (Clontech, Palo Alto, USA) ermittelt. Hierzu wurden in der Version I (n= 18; 10 Normoxie, 8 Hypoxie) Membranen hybridisiert und in der Version II (n= 16; je 8 unter Normoxie und Hypoxie). Die Version II unterschied sich von der Vorserie (Version I) durch die Verfügbarkeit von weiteren 1176 Genen auf dem Array. Alle Reagenzien, die zur Synthese von radioaktiv markierten cDNA – Sonden und zur Hybridisierung notwendig sind, sind Bestandteil des Kits.

Die auf den Filtern fixierten DNAs sind Fragmente unterschiedlicher von Mauszellen exprimierte Gene. Die genaue Anordnung der einzelnen DNAs auf den Membranen und die Namen der zugehörigen Gene sind aus den von Clontech bereitgestellten Unterlagen ersichtlich.

Die Durchführung der Hybridisierungsversuche war für beide Versionen identisch. Zur Synthese der radioaktiv markierten cDNA – Sonden wurde Gesamt – RNA verwendet, die mit dem Qiagen RNeasy Midi Kit gewonnen wurde, die reverse Transkriptase zur cDNA wurde im Gegensatz zur cDNA Synthese zur PCR mit dem kommerziell erhältlichen Atlas Pure Total RNA Labeling System durchgeführt.

Der im Kit enthaltene dNTP – Mix enthält die Desoxynukleosid – Triphosphate dCTP, dGTP und dTTP in einer Konzentration von je 5 mM. Um die Synthese und gleichzeitige radioaktive Markierung der cDNA – Sonde zu erreichen, wurde der dNTP Mix mit [α ³²P]dATP (3 000 Ci/mM, 10 mCi/ml) (Hartmann Analytik) ergänzt.

3.15 Säulenchromatographie

Um die radioaktiv markierte cDNA von nicht eingebauten ³²P markierten Nukleotiden, sowie kleinen cDNA Fragmenten zu reinigen (<0,1 Kb), wurden die synthetisierte cDNA Proben mittels Chromatographiesäulen (Clontech, Palo Alto, USA) aufgereinigt.

- Jede cDNA Probe wurde mit dem mitgelieferten Puffer NT2 (Clontech, Palo Alto, USA) auf ein Gesamtvolumen von 200 µl verdünnt und durch sorgfältiges auf – und abpipettieren vermischt.
- Die Chromatographiesäule (NucleoSpin® Extraction Spin Column) wurde in ein 2 ml Sammelröhrchen gegeben und die Proben aufgetragen.

3. Material und Methoden

- Anschließend wurden die Säulen bei für eine Minute bei 14000 Umdrehungen/min⁻¹ zentrifugiert, und der radioaktive Überstand in den dafür vorgesehenen Abwurf entsorgt.
- Die Chromatographiesäulen wurden in neue 2 ml Probengefäße übertragen und 400 µl des mitgelieferten Puffers NT3 (Clontech, Palo Alto, USA) aufgetragen. Es erfolgte ein erneuter Zentrifugationsschritt bei 14000 Umdrehungen/min⁻¹ und der Überstand wurde verworfen (dieser Arbeitsschritt wurde noch zwei mal wiederholt).
- Im Anschluss wurden die Säulen in ein 1,5 ml Probengefäß gestellt und 100 µl NE Puffer (Clontech, Palo Alto, USA) zugegeben, der 2 min lang einwirkte.
- Durch die abschließende einminütiger Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen/min⁻¹ wurden die gereinigten radioaktiven cDNA Proben von den Säulen gewaschen.

3.16 Messung des ³²P

Die Radioaktivität der generierten cDNA – Sonden wurde mit einem Szintillationszähler (Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter, PerkinElmer Wallac, Düsseldorf) gemessen. Alle radioaktiven Abfälle wurden in speziell hierfür vorgesehene Behälter entsorgt.

3.17 Array Hybridisierung der cDNA Proben

3.17a Vorhybridisierung

Zunächst wurde eine Lösung aus ExpressHyb™ (Clontech, Palo Alto, USA) und Lachssperma DNA (Sigma, München) hergestellt.

- Hierzu wurden 5 ml ExpressHyb in einem Wasserbad (WB 14) bei einer Temperatur von 68 °C vorgewärmt, bis die Lösung völlig klar und homogen war.
- 0,5mg Lachssperma DNA wurde für 5 min bei 95 °C denaturiert und anschließend rasch auf Eis gekühlt.
- Die hitzedenaturierte DNA wurde in die vorgewärmte ExpressHyb Lösung hinzugegeben und die Suspension wurde bis zum Gebrauch bei einer Temperatur von 68 °C belassen.
- Ein Hybridisierungsgefäß (Clontech, Palo Alto, USA) wurde mit deionisiertem Wasser gefüllt und die Testmembran mit einer Pinzette in die Flasche gegeben. Das Wasser wurde vorsichtig abgelassen, so dass die Membran glatt auf der Oberfläche anlag, ohne dass sich Stellen überlappen oder Luftbläschen zwischen Membran und Wand einschließen können.
- Auf die Membran wurden 5 ml der vorbereiteten ExpressHyblösung zugegeben und schnell gleichmäßig über die Membran verteilt, ohne die Membran antrocknen zu lassen.
- Die Membranen wurden bei einer Temperatur von 68°C in den Hybridisierungsgefäßen für 30 min unter kontinuierlicher Bewegung bei 5 – 7 Umdrehungen/min⁻¹ im Hybridisierungssofen vorhybridisiert (OV 3 Shaker, Biometra, Göttingen).

3.17b Hybridisierung

- Den durch die mittels Säulenchromatographie aufgereinigten radioaktiven cDNA Proben wurde 5 µl C₀t – 1 DNA (Clontech, Palo Alto, USA) zugegeben.

3. Material und Methoden

- Im Anschluss wurden die Proben für je 2 min in kochendem Wasser (95 – 100°C) denaturiert und dann 2 min lang auf Eis abgekühlt.
- Das Probengemisch wurde mit der Prähybridisierungslösung vermischt und auf die Testmembranen aufgebracht. Es war darauf zu achten, dass die radioaktiv markierten Proben nur verdünnt Kontakt mit der Membran hatten.
- Abschließend wurden die Membranen bei einer Temperatur von 68°C unter kontinuierlicher Bewegung bei 5 – 7 Umdrehungen/min⁻¹ über Nacht hybridisiert. Um sicherzustellen, dass die gesamte Oberfläche der Membranen mit Flüssigkeit benetzt wurde, wurden noch zusätzlich 2 – 3 ml der vorgewärmten ExpressHyb Lösung hinzugegeben.

3.17c Waschungen

- Nicht hybridisierte Bestandteile wurden am nächsten Tag von den Membranen herabgewaschen.
- Hierzu wurden zwei Waschlösungen bestehend aus 2x SSC und 1% SDS, sowie 0,1x SSC und 0,5 % SDS auf eine Temperatur von 68 °C vorgewärmt.
- Die Flüssigkeit in den Hybridisierungsgefäßen wurde in den für radioaktive Abfälle vorgesehenen Behälter entsorgt.
- Die Flaschen wurden zu etwa 80 % (etwa 50 ml) mit der ersten vorgewärmten Waschlösung gefüllt.
- Die Arrays wurden unter kontinuierlicher Bewegung (12 – 15 Umdrehungen/min⁻¹) bei einer Temperatur von 68 °C für etwa 30 min gewaschen. Dieser Waschschrift wurde dreimal wiederholt.
- Anschließend wurden unter den gleichen Bedingungen zwei erneute 30 min dauernde Waschschrift mit 200 ml der vorgewärmten zweiten Waschlösung durchgeführt.
- Abschließend wurde bei Raumtemperatur ein letzter 5 minütiger Waschschrift mit 200 ml 2x SSC durchgeführt.
- Die Membranen wurden mit einer Pinzette entnommen und überflüssige Flüssigkeit wurde abtropfen gelassen, ohne die Membran antrocknen zu lassen. (Ein auch nur partielle Antrocknen der Membran hätte die Entfernung der aufgetragenen Proben von der Membran (sog. Stripping) und somit die Wiederverwendung der Membran sehr erschwert).
- Unmittelbar danach wurden die Membranen luftblasenfrei und mit einem dünnen Flüssigkeitsfilm in eine Plastikhülle eingeschweißt, um eine Austrocknung zu verhindern.

3.18 Exposition der Arrays

Die verschweißten Arrays wurde mit der Signalseite nach oben in eine Entwicklerkassette gelegt. Darauf wurde eine Imaging Plate (Fuji) mit der weißen Seite nach unten platziert. Die Kassette wurde für die Dauer der Exposition fest verschlossen. Die Radioaktivität auf der Membran wurde über das Einlesen der Phosphorimagerplatten in ein Phosphorimager – System (Fuji) vermessen. Erfahrungsgemäß ist eine Exposition über eine Nacht nicht ausreichend, um die Hybridisierungssignale von schwach bis mäßig exprimierten Genen zu erfassen (nach Angaben des Herstellers seien nur 5 – 20 % der cDNA sichtbar), speziell wenn ³²P als Marker verwendet wurde (Herstellerangaben). Daher wurden Expositionszeiten zwischen 3 – 7 Tagen empfohlen.

3. Material und Methoden

3.19 cDNA Stripping der Arrays

Durch das Entfernen (sog. „Strippen“) der radioaktiven cDNA – Sonden von den Membranen können die Filter für weitere Versuche wieder verwendet werden. Der Vorgang des Strippons kann laut Angaben des Herstellers für die Atlas™ Mouse Nylon Arrays bis zu dreimal wiederholt werden, ohne dass ein nennenswerter Qualitätsverlust auftritt.

- 500 ml einer 0,5% SDS Lösung werden in einem Becherglas bis zum Kochen erhitzt.
- Die Membran wird vorsichtig mit der Pinzette aus der Hülle entnommen, ohne ein Antrocknen zu ermöglichen, und sofort in die kochend heiße Lösung überführt.
- Die Lösung wird im Anschluss für 5 – 10 min gekocht und die Nylonmembran im Anschluss bei Raumtemperatur 10 min lang auskühlen gelassen.
- Danach wird die Membran in der Waschlösung I (2X SSC, 1% SDS) gespült und sofort feucht in eine Plastikmembran eingeschweißt und bis zum erneuten Gebrauch bei – 20°C gelagert.
- Bei erfolgreichem Strippen ist durch den Geigerzähler auf der Membran im Idealfall keine Radioaktivität mehr nachweisbar. Ansonsten können die Strippen – Schritte (s.o.) wiederholt werden, bis auf der Membran keine Radioaktivität mehr nachweisbar ist.

3.20 Datenanalyse

Die Signale der Autoradiographien wurden durch die AtlasImage Software (Clontech) ausgewertet. Bevor ein Vergleich der Signalintensitäten (und somit der Genexpression) zwischen den Arrays möglich ist, musste für zunächst jedes Hybridisierungssignal manuell auf die auf der Membran vorhandenen Genfragmente ausgerichtet werden. Auf den Membranen sind randständige Orientierungspunkte vorhanden, mit deren Hilfe die Software ein virtuelles Gitternetz über die Autoradiographie projizieren kann. Mithilfe dieses projizierten Gitters ist die Zuweisung von Hybridisierungssignalen zu den spezifischen Genen möglich. Die Gene sind dabei als Kreise dargestellt, die im Idealfall die radioaktiven Signalspots umringen sollten. Da sich allerdings die Nylonmembranen durch die Hybridisierung (Temperaturunterschiede etc.) in der Regel bereits etwas verziehen, ist das idealtypische Raster in praxi nicht mehr mit den Signalen auf den Arrays völlig in Übereinstimmung zu bringen. Infolgedessen mussten die Zuordnungen noch manuell nachbearbeitet werden. Als Orientierungspunkte wurden die starken Signale der auf dem Array vertretenen Housekeeping Gene (u.a. Ubiquitin, Phospholipase A2, α – Tubulin, β – Aktin, G3PDH) verwendet. Dabei handelt es sich laut Hersteller um Gene, die in allen Säugergetierzellen und Geweben exprimiert werden, um den basalen Metabolismus aufrecht zu erhalten. Im Gegensatz zu den untersuchten cDNAs, die wie von uns vermutet, einer engen transkriptionalen Kontrolle unterliegen sollten, handelt es sich um Gentranskripte, die in verschiedenen Geweben, Zellen, Entwicklungsstufen und Erkrankungen relativ unverändert bleiben. Daher wurden Sie auch vom Hersteller als universell verwendbare Positivkontrolle empfohlen.

Das sogenannte Normalisierungsverfahren dient dazu, mögliche Signalstärkenunterschiede die durch eine unterschiedlich starken unspezifischen Hintergrund oder durch lokale Unterschiede in der Verteilung der Radioaktivität verursacht werden, auszugleichen.

3. Material und Methoden

Die Signalintensitäten mussten zunächst auf die Gesamtsignalintensität aller Gene auf dem jeweiligen Array normalisiert werden, um vergleichbare Aussagen machen zu können (siehe Abbildung 3.4).

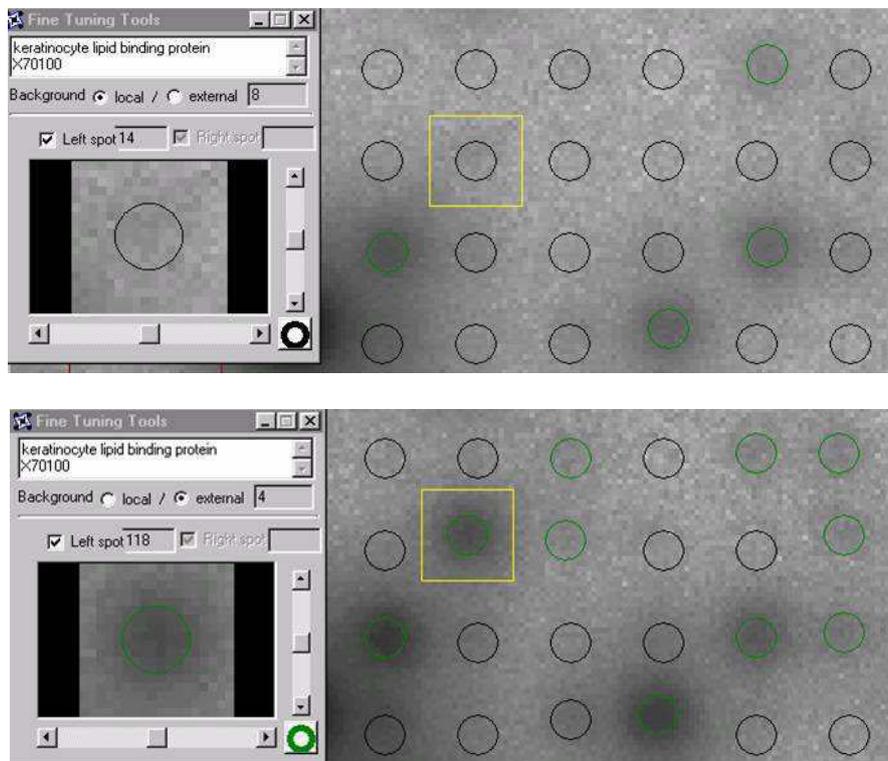


Abbildung 3.4: Datenanalyse der Arrays – Vergleich der relativen Signalintensität am Beispiel KLBP 5. WT/ Normoxie (oben) vs. Myo^{-/-}/ Hypoxie (unten); Quelle: selbst.

Die gezeigten Werte sind Mittelwerte von 4 – 5 Experimenten aus jeder Gruppe. Die Ergebnisse für Keratinozyte Lipid Binding Protein (KLBP), der Cytochrome c Oxidase 5b (COX5b) und HIF 1 α sollten durch eine zweite Methode bestätigt werden. Hierzu wurde die Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR) verwendet.

3.21 Reverse Transkription für PCR / RT PCR

Bei der reversen Transkription (RT) wird aus einem RNA – Strang ein komplementärer DNA – Strang (sog. cDNA) hergestellt. Dabei wird ein OligodT Primer an die Poly A Sequenz der mRNA angelagert und transkribiert diese mit Hilfe einer reversen Transkriptase in 5' \rightarrow 3' Richtung in eine komplementäre cDNA Sequenz. Bei der sogenannten reversen Transkriptase handelt es sich um eine RNA abhängige DNA Polymerase. In der Natur ermöglichen es die reversen Transkriptasen einem Retrovirus nach der Infektion einer Eukaryontenzelle die eigene virale RNA in einen komplementären DNA – Strang zu transkribieren. Aus dem dadurch entstehenden RNA – DNA – Hybrid wird durch die RNase – H – Aktivität des natürlichen Enzyms der RNA – Strang aus dem Hybrid entfernt, und der verbliebene DNA – Einzelstrang verbleibt zur Replikation.

Als reverse Transkriptase wurde eine RNA abhängige DNA Polymerase aus dem Moloney – Maus – Leukämie Virus (MMLV) verwendet.

3. Material und Methoden

Der Reaktionsansatz für die RT (RT Mastermix) bestand aus

5x RT Puffer	4,0 µl
dNTP's (2,5 mM)	8,0 µl
Oligo(dt) ₂₀ (25 ng/µl)	4,0 µl
RNAse – Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl

Um RNA Sekundärstrukturen aufzubrechen, sowie eventuell noch verbliebene DNAsen zu zerstören, wurde der RNA Mix für 10 min auf eine Temperatur von 60°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt.

RNA Mix:	RNA 2,5 µg/µl	1,0 µl
	DEPC – H ₂ O	5,0 µl

Der RNA Mix wurde mit 15 µl RT – Mix und je 1 µl Reverse Transkriptase aus dem Maus – Moloney Leukämie Virus (MMLV) vermischt und in einem Wasserbad (WB 14) eine Stunde lang bei einer Temperatur von 37° C inkubiert. Die so synthetisierte cDNA wurde bis zur Verwendung in den PCR Experimenten bei – 20° C im Gefrierschrank gelagert.

3.22 PCR

Die PCR ermöglicht es, eine spezifische Nukleinsäure – Sequenz aus einem komplexen Nukleinsäure – Gemisch anzureichern. Die DNA – Vervielfachung wird durch einen sich bis zu 40 mal wiederholenden Reaktionszyklus aus Hitzedenaturierung der Doppelstrang – DNA, der Anlagerung sogenannter Primer an die DNA (Annealing) und einer enzymatischen DNA – Synthese durch eine hitzestabile DNA – Polymerase (Extension) erreicht. Primer werden, wie auch die vier Oligonukleotide (dNTPs), zu Beginn der Reaktion in großem Überschuss eingesetzt. Da die Produkte aus einer Reaktion als Ausgangsmatrizen für den nächsten Reaktionsschritt dienen, nimmt die Menge des vervielfältigten DNA – Segmentes theoretisch exponentiell mit der Zyklenzahl zu.

In der Praxis führt die begrenzte Verfügbarkeit der Reaktionskomponenten allerdings dazu, dass nach etwa 17 Reaktionszyklen eine Abweichung vom exponentiellen Wachstum eintritt und das Maximum an zu erzielendem Produkt nach ca. 35 Runden vorliegt. Das vorliegende Reaktionsprodukt wurde gegenüber der Ausgangssituation um etwa den Faktor 10⁶ vermehrt.

Da aus den Herzen RNA isoliert worden ist, musste diese zunächst mittels einer reversen Transkriptasereaktion in eine cDNA umgeschrieben werden, da RNA selbst kein Substrat der Taq – Polymerase ist und somit nicht unmittelbar durch eine PCR amplifiziert werden kann.

Alle Primersequenzen wurden zunächst mittels einer PCR ausgetestet, und erst bei zufrieden stellendem Ergebnis eine RT – PCR gefahren. Für diese Reaktionen wurde aus ein Reaktionsansatz aus 10 x Puffer, MgCl₂, Taq – Polymerase, Oligonukleotiden und Primern angesetzt.

Reaktionsansatz

Konzentration	Substanz	Volumen
10x	PCR – Taq Puffer	50 µl
1µg/µl	Primer (Forward)	1 µl
1µg/µl	Primer (Reverse)	1 µl
25 mM	dNTP	1 µl
1,8 mM	MgCl ₂	20 µl
5 u/ µl	Taq Polymerase	2 µl

3. Material und Methoden

Steriles H ₂ O	375 µl
Gesamt	450 µl

Es wurden 45 µl dieses Reaktionsansatzes mit 5 µl cDNA gemischt.

Zum Schutz der Reaktionsmischung gegen etwaige Verdunstung wurden die Reaktionsansätze mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Im DNA Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, Düsseldorf) wurde die PCR mit folgenden Parametern durchgeführt:

Denaturierung	94°C	1 min 30 Sek.
Annealing	55°C	2 min
Extension	72°C	1 min 30 Sek.

Nach 40 Zyklen folgt ein abschließender 5 minütiger Elongationsschritt bei einer Temperatur von 72°C, um eine möglichst vollständige Elongation aller Fragmente zu erreichen. Im Anschluss wurde die Temperatur auf 4°C gesenkt. Die erhaltenen DNAs wurden auf einem 1% igen Agarosegel aufgetrennt und fotografiert.

Geeignete Primer konnten mit der Software Primer Express[®] ermittelt werden. Die Primer wurden lyophilisiert geliefert, und mussten vor der Verwendung in der vom Hersteller angegebenen Menge in bidestilliertem Wasser zur Herstellung einer 100 µM Lösung gelöst werden. Primer wurden bis zur Verwendung bei -20°C eingefroren. Es wurden folgende Primersequenzen verwendet (Metabion, Martiensried).

Gen	Forward primer	Reverse primer
Aktin	5'-AGG CCC AGA GCA AGA GAG GT-3'	5'-CGT CCC AGT TGG TAA CAA TGC-3'
Keratinocyte lipid Binding protein	5'-ATG GCC AGC CTT AAG GAT CTG GAA G-3'	5'-CAC AGT CGT CTT CAC TGT GCT CTC-3'
Cytochrome c Oxidase 5b	5'-TCC ATG GCT TCT GGA GGT G-3'	5'-TCT CCC TCT CCA GCC CAG T -3'
HIF – 1 α	5'-TCA GAG GAA GCG AAA AAT GGA-3'	5'-CCC GGT TGC TGC AAT AAT GT-3'

3.23 RT PCR

Nachdem die Qualität der entworfenen Primerpaare für Aktin, Keratinozyt Lipid Binding Protein (KLBP), der Cytochrome c Oxidase 5b (COX5b) und HIF 1 α durch die reguläre PCR bestätigt wurde, schloss sich eine semiquantitative Realtime PCR (RT – PCR) mittels eines GeneAmp 5700 Sequenzdetektionssystems (PE Applied Biosystems) an. SYBR Green ist ein Farbstoff, der sich an die kleine Furche (sog. Minor groove) von doppelsträngiger DNA binden kann. Es emittiert im ungebundenen Zustand nur ein schwaches Fluoreszenzsignal, das durch Bindung an die DNA verstärkt wird. Durch die Messung des Fluoreszenzsignals zum Ende jeder Elongationsphase kann der Verlauf der DNA Vervielfältigung verfolgt werden.

Als fluoreszierender Farbstoff wurde der SYBR – Green PCR Master Mix von (Applied Biosystems, UK) verwendet. Dieser Reaktionsansatz beinhaltet PCR Puffer, Nukleotide und die Taq – Polymerase (AmpliTaq Gold – Enzym). Jeder Probenansatz enthielt 50% SYBR – Green – PCR – Mix, 40% H₂O, 10% Probe und 0,2 µl/µg Primer.

Es wurde nur cDNA verwendet, bei deren Synthese aus mRNA zuvor ein DNase Verdau durchgeführt worden ist.

2X SYBR Green PCR Master Mix	25	µl
Primer (Forward)	0,8	µl
Primer (Reverse)	0,8	µl
Probe	5	µl
H ₂ O	18,4	µl

Je Primer – Paar wurde ein 4 facher Reaktionsansatz zusammengestellt (No template Control: NTC, – RT, + RT und Reserve).

Der Reaktionsansatz bestand aus: 100 µl 2x – SYBR – Green – PCR – Mix (PE), 80µl H₂O und je 0,8 µl Primer (Vorwärts und Rückwärts – Primer). Es ergab sich somit ein Gesamtvolumen von 50 µl je Well (45 µl PCR –Mix + 5 µl Probe). Als Wells wurden MicroAmp Optical (PerkinElmer) verwendet. Während der Amplifikation wurde ein Dissoziationsprotokoll der entstehenden Produkte erstellt. Im Anschluss an die Reaktion wurde ein Schmelzkurve angezeigt, aus der das PCR Produkt oder mögliche Nebenprodukte identifiziert werden konnte.

Mit Primerkonzentrationen analog zur Verwendung der Core Reagenzien. Die Amplifikation erfolgte nach dem Real Time PCR Standard Protokoll von Applied Biosystems:

Aktivierung der Polymerase („hot start“)	95° C	1 0 min
Denaturierung	95° C	15 s
Annealing:	60° C	1 min
Stopp	4° C	

Für die relative Quantifizierung wurde die komparative C_T Methode.

Der Schwellenwert (Threshold Cycle, C_T Wert), korreliert negativ mit den Ziel mRNA Leveln und wurde bestimmt als diejenige Zykluszahl, bei der die fluoreszierende Emission des SYBR Green über den Schwellenwert ansteigt. Die Relative Quantifizierung wurde durchgeführt, indem die die Zykluszahl in das Verhältnis zu Aktin und dem korrespondierendem Gen an C_T 0,2 und C_T 0,4 bestimmt wurde. Da die Zykluseffizienz in diesem Bereich zwischen 1,9 und 2 (annähernd 100%) beträgt, wurde die relative Menge berechnet mittels der Formel $2^{-\Delta CT}$, wobei ΔCT die Differenz zwischen Aktin und dem untersuchten Gen angibt.

3.24 Statistik

Alle Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung angegeben. Für die Vergleiche zwischen zwei Gruppen wurde der Student T – Test verwandt. Für multiple Vergleiche wurde eine ANOVA mit Bonferronitest durchgeführt. Die MNR Daten waren gepaart, alle anderen Daten nicht gepaart. Die Signifikanzgrenze wurde bei p<0,05 gesetzt.

4. Ergebnisse

4.1 Tiergewichte

Die Wildtyp und Myo^{-/-} Mäuse wurden unter Kontrollbedingungen (21% O₂) oder nach zweiwöchiger Hypoxie (10% O₂) untersucht. Alle untersuchten Tiere überlebten die Exposition an eine Umgebung mit 10% Sauerstoffgehalt. Während der Hypoxiephase zeigten die Myo^{-/-} keinerlei Auffälligkeiten im Vergleich zu ihren unter identischen Bedingungen gehaltenen hypoxischen wildtypischen Artgenossen. Die Kontrollgruppen, die unter normoxischen Bedingungen gehalten wurden, waren allerdings erwartungsgemäß wesentlich aktiver.

Alle unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Gruppen verloren unter hypoxischen Bedingungen an Gewicht (Wildtyp – 5,6 % Körpergewicht, respektive Myoglobin KO – 7,4% Körpergewicht), während die Alters- und Gewichtsgematchten unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Kontrollgruppen leicht an Gewicht zugenommen haben (Wildtyp +6,8% Körpergewicht und Myoglobin KO + 15,5% Körpergewicht), allerdings erreichten die beobachteten Gewichtsveränderungen nicht das Signifikanzniveau (siehe Abbildung 4.1).

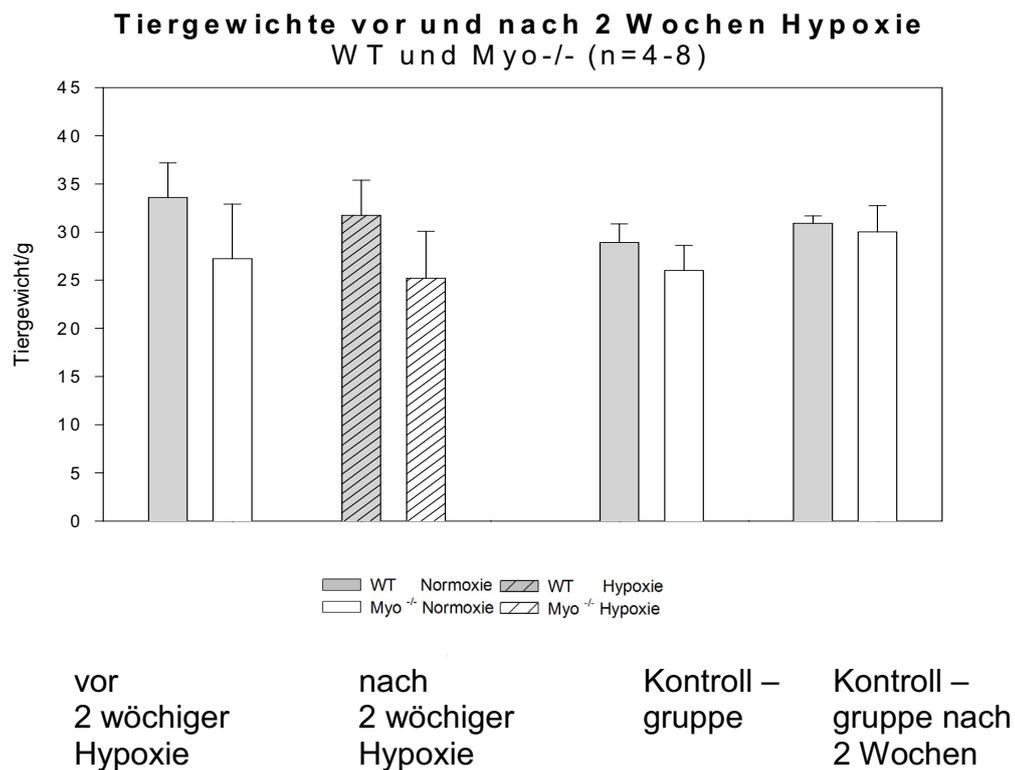


Abbildung 4.1 Tiergewichte der Myo^{-/-} und WT Mäuse vor und nach 2 Wochen Hypoxie (links) und Kontrollgruppe (rechts).

4. Ergebnisse

4.2 Arterielle Blutgasanalyse

Abbildung 4.2 fasst die Ergebnisse der arteriellen Blutgasanalyse zusammen (n = 18). Man sieht, dass sich normoxische Myoglobin^{-/-} und WT Gruppen nur in Bezug auf den Plasmabicarbonatspiegel unter Ausgangsbedingungen signifikant unterscheiden.

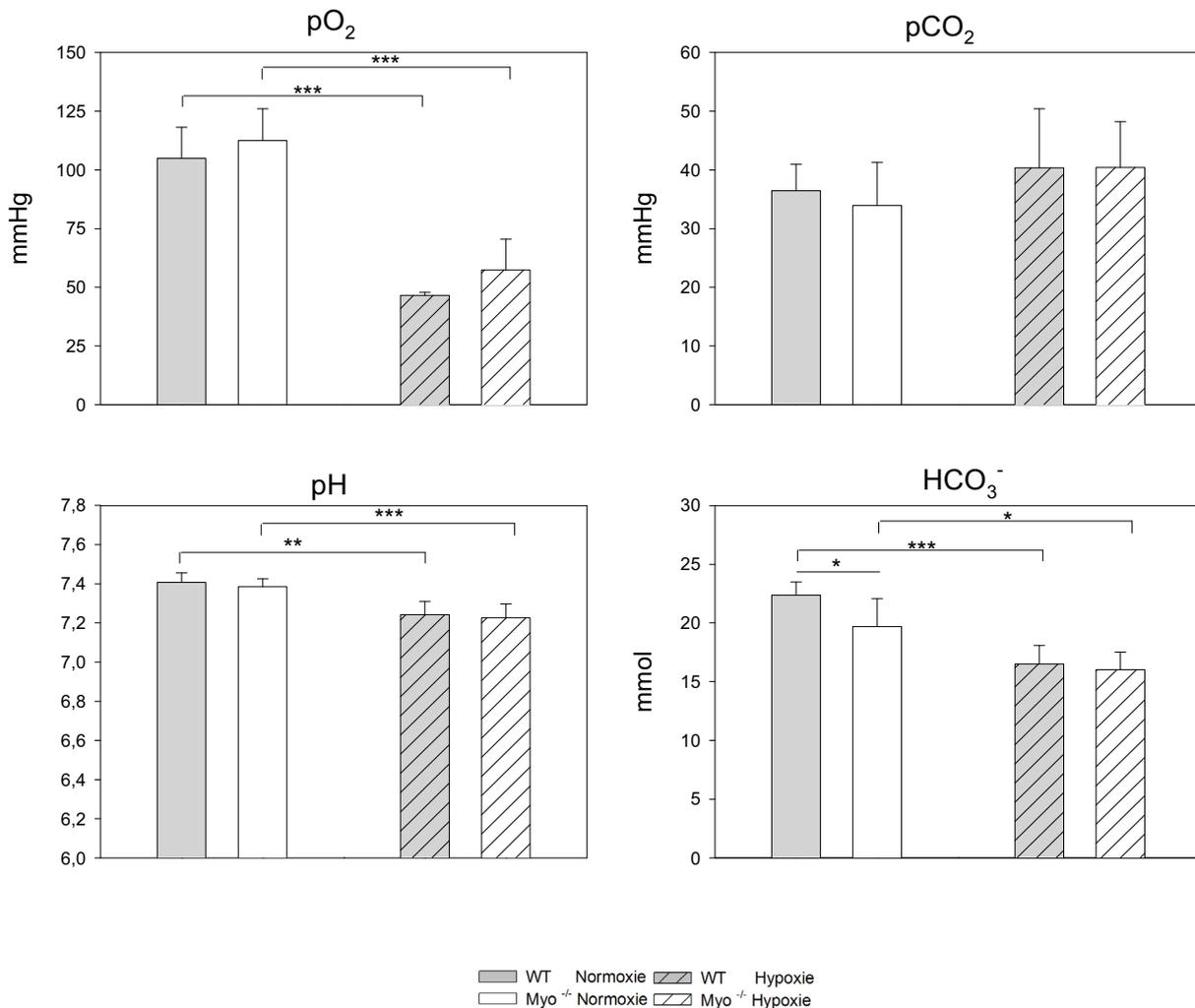


Abbildung 4.2

Arterielle Blutgasanalyse der normoxischen und hypoxischen Myo^{-/-} and WT Mäuse (n = 3 – 7). * p < 0.05; ** p < 0.01, *** p < 0.001.

In Bezug auf pO₂, pCO₂ und pH bestehen jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen WT und Myo^{-/-}. Der pO₂ nahm unter hypoxischen Bedingungen sowohl in Wildtyptieren, als auch in der Myo^{-/-} Gruppe signifikant ab. In der Wildtypgruppe fiel der pO₂ von 104.9 ± 13.2 mmHg (Normoxie) auf 46.5 ± 1.3 mmHg (Hypoxie), in der Myo^{-/-} Gruppe sank der pO₂ von 112.5 ± 13.6 mmHg (Normoxie) auf 57.4 ± 13.0 (Hypoxie). Zwischen Wildtyp und Myo^{-/-} Tieren untereinander bestand aber weder unter normoxischen, noch unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Unterschied im pO₂.

4. Ergebnisse

Der $p\text{CO}_2$ stieg in beiden Gruppen unter hypoxischer Belastung leicht an, die Steigerung erreichte aber nicht das Signifikanzniveau. In Wildtyptieren stieg der $p\text{CO}_2$ von initial 36.4 ± 4.5 mmHg auf 40.4 ± 10.1 mmHg unter hypoxischen Bedingungen und bei $\text{Myo}^{-/-}$ von anfänglich 34.0 ± 7.3 mmHg auf 40.4 ± 7.8 mmHg. Erneut zeigte sich zwischen Wildtyp und $\text{Myo}^{-/-}$ Tieren untereinander weder unter normoxischen, noch unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Unterschied.

Der pH sank unter Hypoxie in beiden Gruppen signifikant ab. In der Wildtypgruppe von 7.41 ± 0.05 auf 7.24 ± 0.07 und bei ihren transgenen Artgenossen von 7.39 ± 0.04 auf 7.23 ± 0.07 .

Lediglich der Plasmabicarbonat Spiegel (HCO_3^-) war bereits unter Ausgangsbedingungen signifikant in der $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe erniedrigt (WT: 22.4 ± 1.1 mmol vs. $\text{Myo}^{-/-}$: 19.7 ± 2.4 mmol). In beiden Gruppen fiel der Plasmabicarbonat Spiegel unter hypoxischen Bedingungen signifikant ab, auf: 16.5 ± 1.6 mmol (WT), bzw. 16.0 ± 1.5 mmol ($\text{Myo}^{-/-}$). Da in Wildtyptieren ein stärkerer Abfall des Plasmabicarbonat Spiegels zu beobachten ist als in der $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe, besteht in Hypoxie kein signifikanter Unterschied mehr zwischen beiden Gruppen.

4.3 Änderungen des venösen Blutbilds

Die zweiwöchige Hypoxiephase verursacht in den venösen Blutparametern ($n = 17$), deutliche Veränderungen. Innerhalb von zwei Wochen steigt der Hämatokrit in beiden Gruppen signifikant an. In der WT Gruppe von initial $44,1 \text{ Vol}\% \pm 2,6$ auf $71,4 \text{ Vol}\% \pm 7,2$, und in der $\text{Myo}^{-/-}$ von $47,8 \text{ Vol}\% \pm 3,6$ auf $71,9 \text{ Vol}\% \pm 3,3$, siehe Abbildung 4.3a). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen besteht vor und nach Hypoxie nicht.

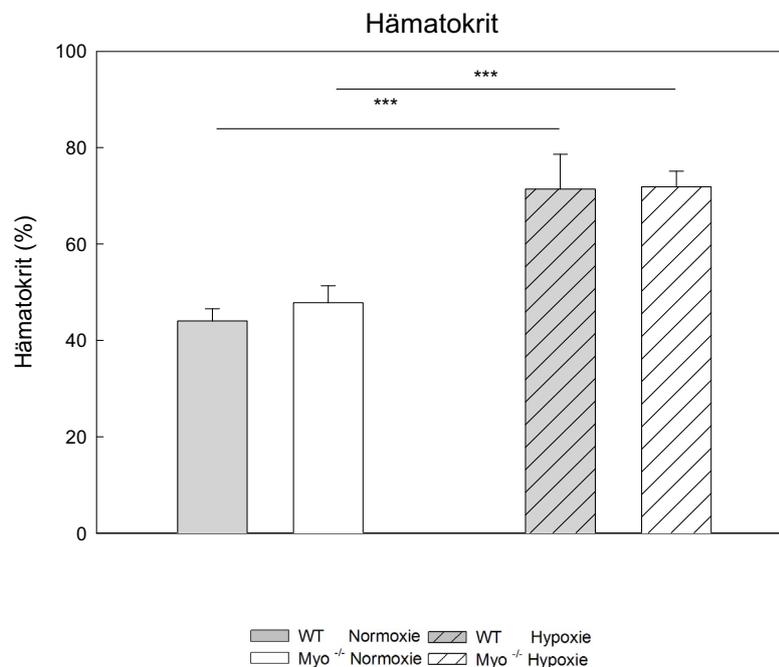


Abbildung 4.3a Zunahme des Hämatokrits infolge der zweiwöchigen Hypoxie.
*** $p < 0.001$ ($n = 4 - 5$).

4. Ergebnisse

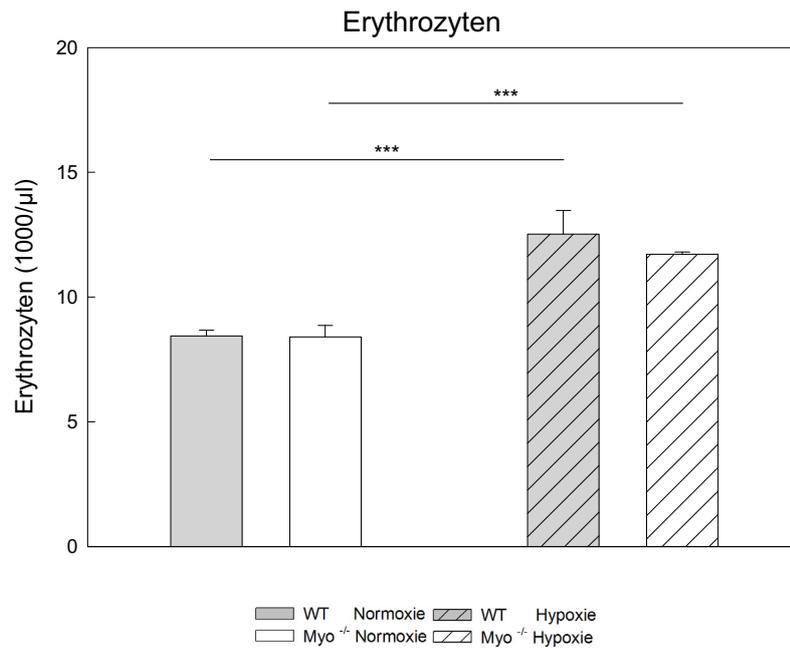


Abbildung 4.3b Veränderung der Erythrozytenzahl. *** $p < 0.001$ ($n = 4 - 5$).

Die Erythrozytenzahlen stiegen signifikant nach zweiwöchiger Hypoxie von einem relativ ähnlichen Ausgangslevel an ($8,44 \pm 0,24 \times 10^6/\mu\text{l}$ auf $12,5 \pm 0,95 \times 10^6/\mu\text{l}$ (WT) bzw. von $8,41 \pm 0,46 \times 10^6/\mu\text{l}$ auf $11,71 \pm 0,09 \times 10^6/\mu\text{l}$ (Myo^{-/-})). Jedoch besteht auch in Bezug auf die Erythrozytenzahl zwischen transgenen Tieren und ihren wildtypischen Artgenossen kein signifikanter Unterschied (Abbildung 4.3b).

Die absolute Retikulozytenzahl war in den Myo^{-/-} Kollektiven, sowohl unter den hypoxischen, als auch unter basalen Bedingungen verringert.

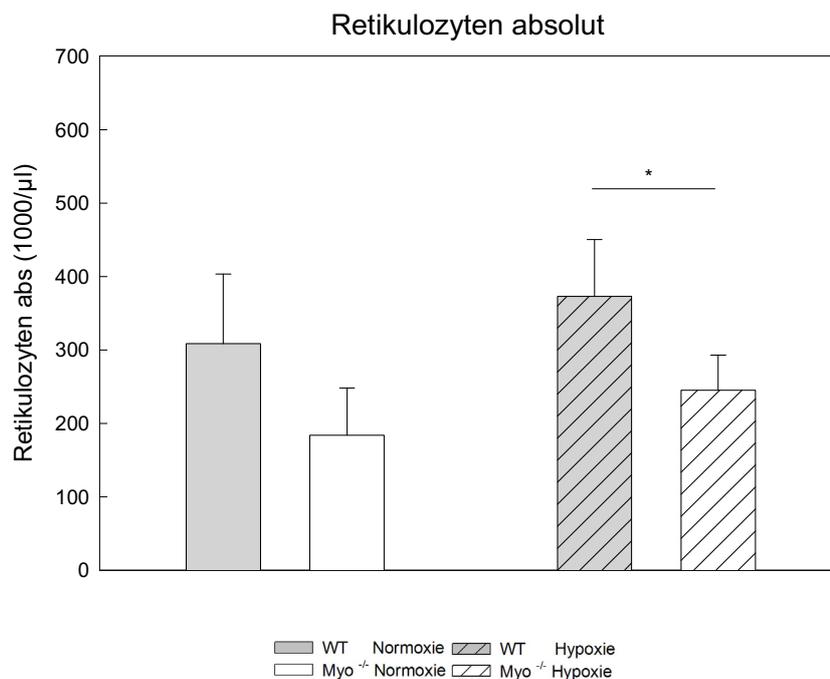


Abbildung 4.3c Absolute Retikulozytenzahl. * $p < 0.05$ ($n = 4 - 5$).

4. Ergebnisse

Die absolute Retikulozytenzahl stieg in der Wildtypgruppe von $309 \pm 95 \times 10^3$ auf $373 \pm 77 \times 10^3$ an und in der $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe von $184 \pm 64 \times 10^3$ auf $245 \pm 48 \times 10^3$ an. Die geringere Retikulozytenzahl unter normoxischen Bedingungen ist auffällig und verfehlt knapp das Signifikanzniveau. Nach zweiwöchiger Hypoxie ist die Retikulozytenzahl in der Wildtypgruppe auf ein höheres Niveau angestiegen, als in der $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe (Abbildung 4.3c) und der Unterschied zwischen beiden Gruppen erreicht nun das Signifikanzniveau. Die vergleichsweise niedrigere Retikulozytenzahl in der $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe korreliert auch mit dem vergleichsweise stärkeren Anstieg der Erythrozytenzahl und des Hämatokrits in der Wildtypgruppe korreliert (siehe Abbildungen 4.3a und 4.3b).

Durch den starken Anstieg der Erythrozytenzahl sinkt der prozentuale Anteil der Retikulozyten an der Gesamtzahl der Erythrozyten, trotz Anstieg der absoluten Retikulozytenzahl. Von $3,65 \pm 1,1\%$ auf $2,98 \pm 0,56\%$ (WT), entsprechend in der $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe von $2,23 \pm 0,79\%$ auf $2,10 \pm 0,42\%$.

Die Analyse des Erythrozytenvolumens (MCV) ergab einen kleinen, aber signifikanten Anstieg in beiden Gruppen (Abbildung 4.3d), darüber hinaus haben die Erythrozyten in der $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe ein signifikant größeres mittleres korpuskuläres Volumen als die Erythrozyten der wildtypischen Artgenossen.

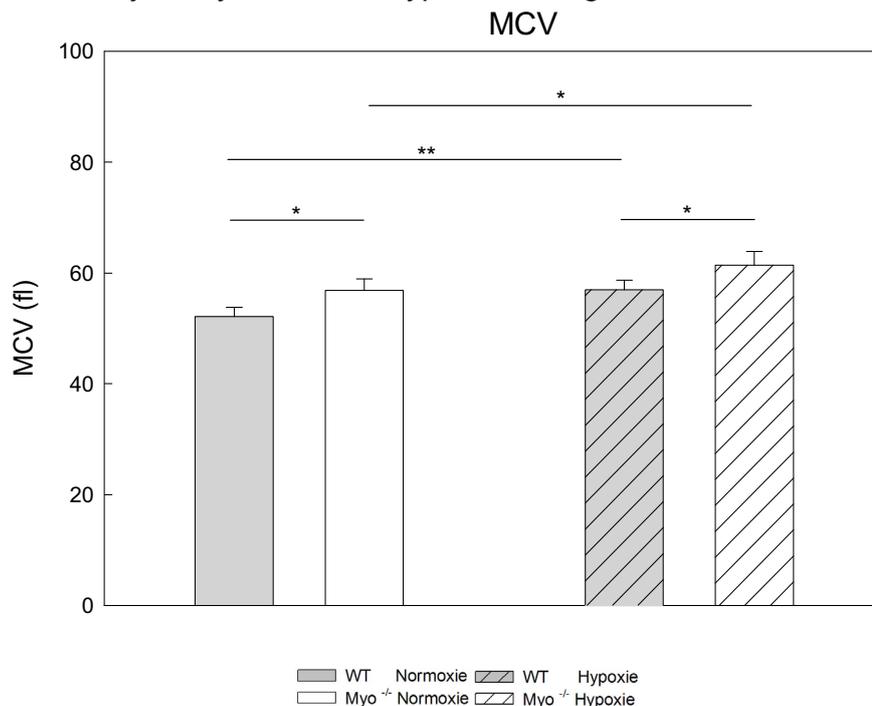


Abbildung 4.3d Mittleres korpuskuläres Volumen. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ ($n = 4 - 5$).

Das MCV stieg in der Wildtypgruppe von $52 \pm 1,7$ fl auf $57 \pm 1,7$ fl an, in der Myoglobin^{-/-} Gruppe von knapp $56,9 \pm 2,1$ fl auf $61,4 \pm 2,5$ fl.

4. Ergebnisse

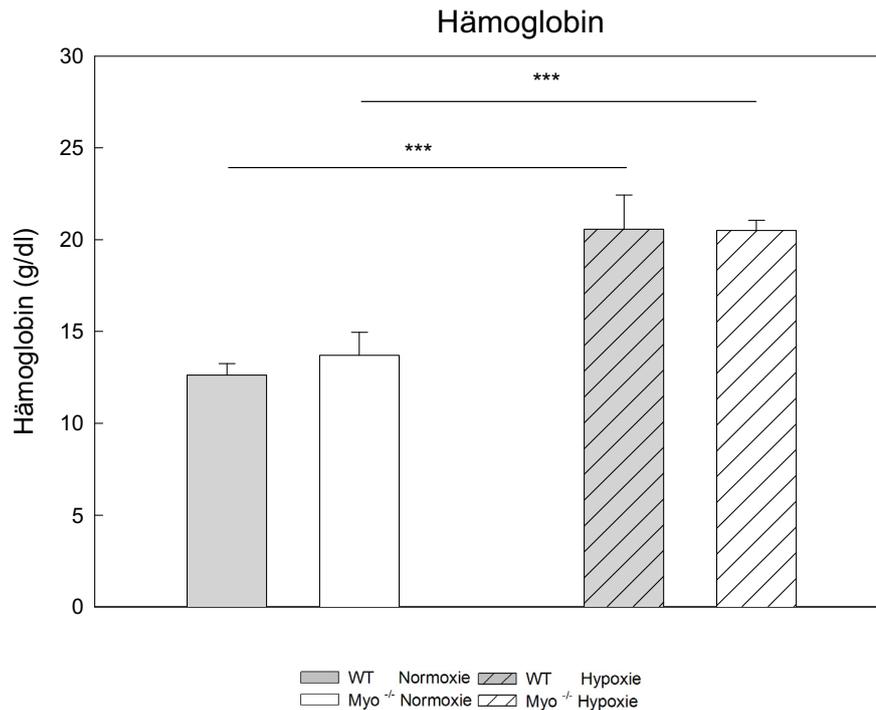


Abbildung 4.3e Hämoglobingehalt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ ($n = 4 - 5$).

Der Hämoglobingehalt betrug vor Hypoxie $12,6 \pm 0,6$ (WT) bzw. $13,7 \pm 1,3$ g/dl (Myo^{-/-}). Tendenziell enthalten die Erythrozyten von Myo^{-/-} Tieren etwas mehr Hämoglobin als die Erythrozyten der Wildtyp Gruppe, das Signifikanzniveau wird jedoch knapp verfehlt. Die Hypoxie verursachte in beiden Versuchsgruppen einen signifikanten Anstieg auf $20,6 \pm 1,9$ (WT) bzw. auf $20,5 \pm 0,5$ g/dl (Myo^{-/-}), transgene Tiere und wildtypische Artgenossen sind untereinander nach Hypoxie nicht signifikant verschieden (Abbildung 4.3e).

Die Thrombozytenzahlen waren unter basalen Bedingungen zwischen WT und Myo^{-/-} Tieren nicht signifikant unterschiedlich ($827 \pm 248 \times 10^3/\mu\text{l}$ in der Wildtypgruppe und $674 \pm 143 \times 10^3/\mu\text{l}$ in der Myo^{-/-} Gruppe). Zwar weisen die Myo^{-/-} Tiere sowohl in Normoxie, als auch Hypoxie tendenziell geringere Thrombozytenzahlen auf, der Unterschied erreicht aber nicht das Signifikanzniveau.

Der zweiwöchige hypoxische Stress verringerte die Thrombozytenzahlen in beiden Gruppen signifikant auf $405 \pm 45 \times 10^3/\mu\text{l}$ (WT) bzw. $349 \pm 36 \times 10^3/\mu\text{l}$ (Myo^{-/-}) (Abbildung 4.3f).

4. Ergebnisse

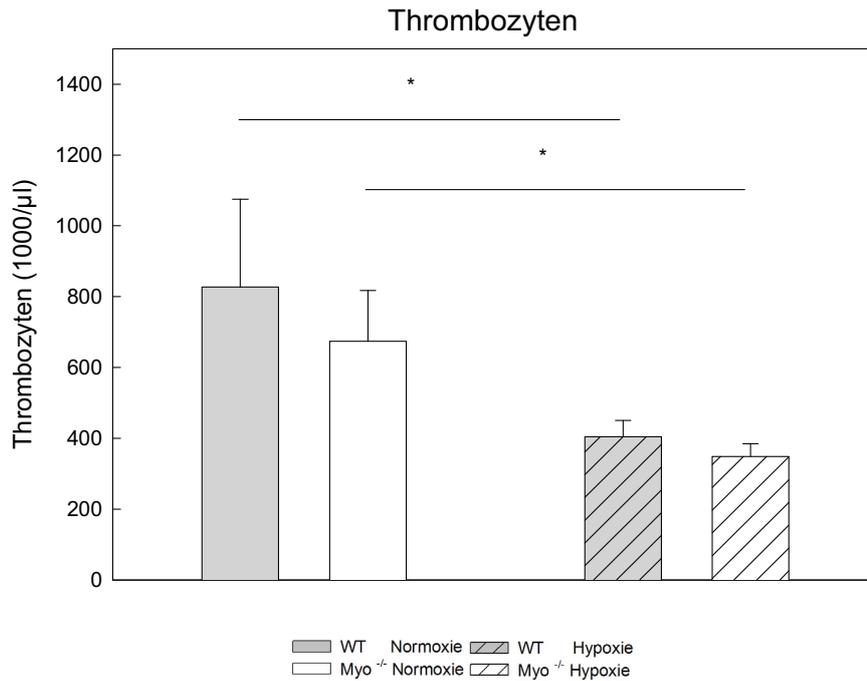


Abbildung 4.3f Thrombozytenzahlen vor und nach Hypoxie. * $p < 0.05$

4.4 Histologie

Die histologische Analyse ($n = 16$) ergab eine Kapillardichte von 4234 ± 596 Kapillaren pro mm^2 in der normoxischen $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe, welche sich unter Hypoxie auf 5405 ± 443 pro mm^2 erhöhte. Bei den Wildtypkontrollen erhöhte sich die Zahl der Kapillaren von basal $4361 \pm 723/ \text{mm}^2$ (unter normoxischen Bedingungen) auf $5604 \pm 622/ \text{mm}^2$ nach zweiwöchiger Hypoxie (siehe Abbildung 4.4).

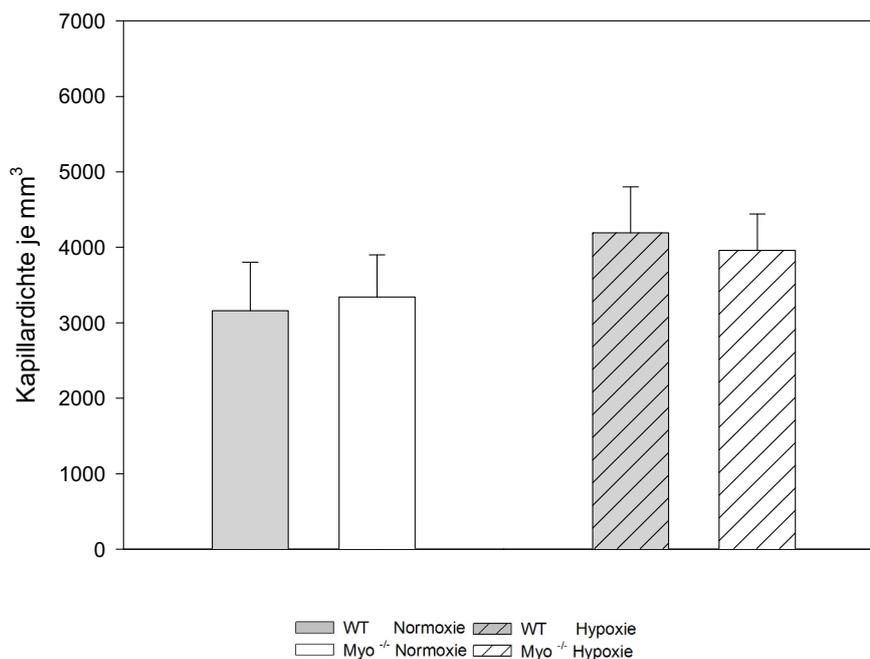


Abbildung 4.4 Kapillardichte der Herzmuskulatur unter Normoxie und Hypoxie.

4. Ergebnisse

4.5 Hämodynamische Parameter

Abbildung 4.5 fasst die Ergebnisse der mittels Katheterisierung ($n = 18$) der rechten Arteria Carotis erhobenen hämodynamischen Parameter wie Herzfrequenz, systolische und diastolische Blutdrücke von normoxischen und hypoxischen $Myo^{-/-}$ zusammen.

Man sieht, dass $Myo^{-/-}$ tendenziell eine leicht höhere Herzfrequenz, einen leicht erhöhten mittleren arteriellen Druck, sowie einen höheren systolischen und diastolischen RR als ihre wildtypischen Artgenossen, die angedeuteten Unterschiede verfehlen allerdings das Signifikanzniveau.

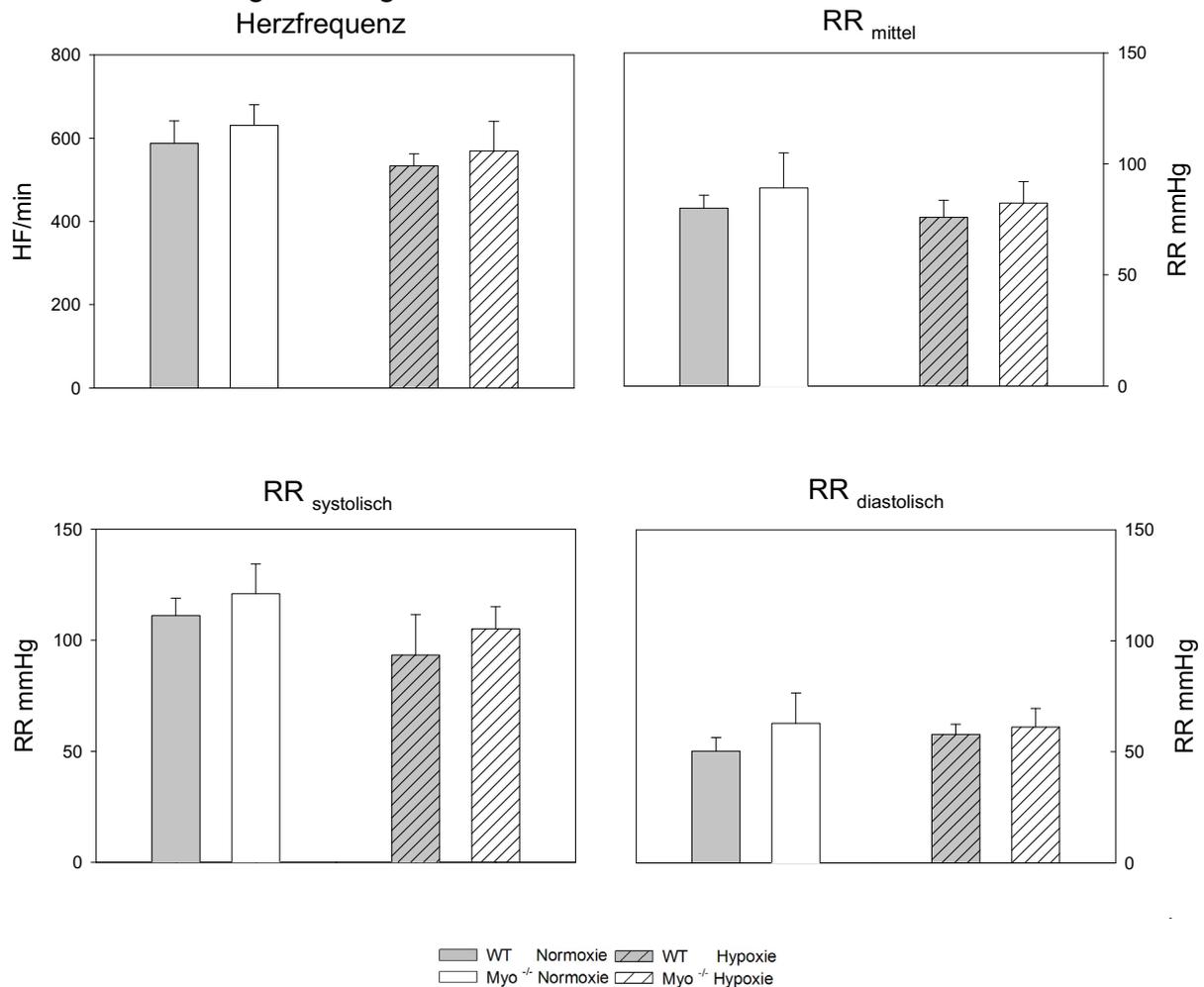


Abbildung 4.5 Hämodynamische Parameter im Herzkatheter, $n = 3 - 5$.

Die Herzfrequenz sinkt in Wildtyptieren von $587,3 \pm 54,2 \times \text{sec}^{-1}$ (Normoxie) auf $533,6 \pm 71 \times \text{sec}^{-1}$ (Hypoxie), bei Myoglobin $^{-/-}$ Tieren sinkt die Herzfrequenz von $630,4 \pm 49,3 \times \text{sec}^{-1}$ (Normoxie) auf $569,5 \pm 71,0 \times \text{sec}^{-1}$ (Hypoxie, alles Abbildung 4.5).

Der mittlere arterielle Druck nimmt bei Wildtyptieren von $80,1 \pm 5,8 \text{ mmHg}$ auf $75,9 \pm 7,8 \text{ mmHg}$ ab. Auch die $Myo^{-/-}$ Gruppe weist einen unter hypoxischen Bedingungen einen verringerten mittleren arteriellen Druck auf (Abfall von $89,1 \pm 15,9 \text{ mmHg}$ in Normoxie auf $82,4 \pm 9,6 \text{ mmHg}$ in Hypoxie). Der systolische Druck sinkt bei Wildtyptieren von initial $111,1 \pm 7,9 \text{ mmHg}$ (Normoxie) auf $93,3 \pm 18,3 \text{ mmHg}$ (Hypoxie). Bei $Myo^{-/-}$ Tieren von initial $121,0 \pm 13,4 \text{ mmHg}$ auf $105,1 \pm 10,1 \text{ mmHg}$.

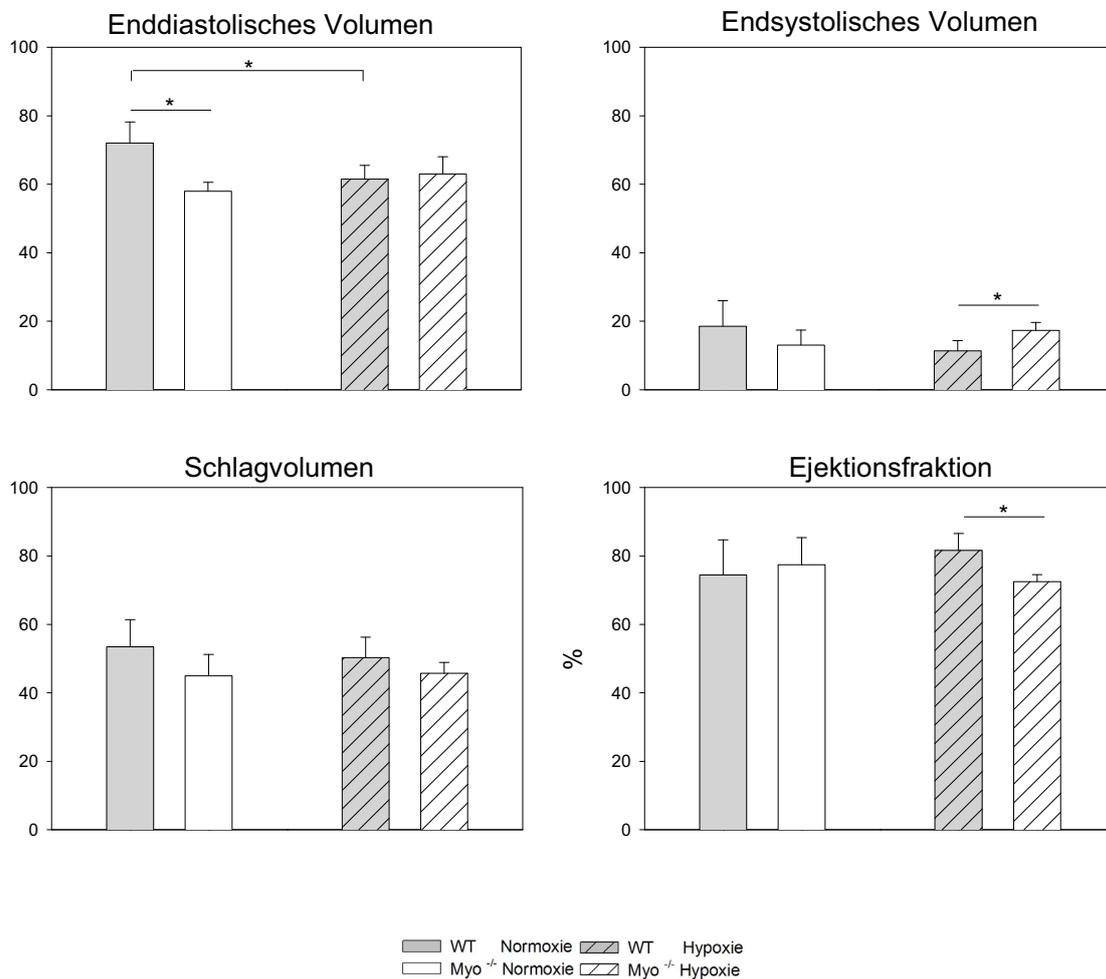
4. Ergebnisse

Der diastolische Druck sinkt in der WT Gruppe von 50.3 ± 6.2 mmHg (Normoxie) auf 57.9 ± 4.5 mmHg (Hypoxie), und in der $Myo^{-/-}$ Gruppe von 62.8 ± 13.7 mmHg (Normoxie) auf 61.1 ± 8.5 mmHg (Hypoxie, alles Abbildung 4.5).

4.6 Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT)

Um evtl. vorhandene funktionelle Unterschiede in der linksventrikulären Pumpfunktion aufzudecken, wurden MRT Aufnahmen angefertigt. Die zu diesem Zweck eingesetzten Tiere ($n = 7$) wurden zunächst vor dem hypoxischen Stimulus gemessen und im Anschluss danach. Während der Messungen erhielten Sie dasselbe Gasgemisch. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.6 dargestellt.

Abbildung 4.6 Hämodynamische Parameter in der MR Bildgebung. * $p < 0.05$



Man sieht, dass $Myo^{-/-}$ Mäuse unter normoxischen Bedingungen tendenziell ein geringeres endsystolisches und enddiastolisches Volumen, sowie ein geringeres Schlagvolumen als ihre wildtypischen Artgenossen aufweisen. Jedoch erreicht unter Normoxie nur das geringere enddiastolische Volumen das Signifikanzniveau (WT: 72.0 ± 6.2 μ l vs. 58.0 ± 2.6 μ l $Myo^{-/-}$). Unter hypoxischen Bedingungen ist jedoch kein signifikanter Unterschied mehr nachweisbar, da das EDV in der WT Gruppe stärker abfällt, als in der $Myo^{-/-}$ Gruppe, deren EDV leicht zunimmt (WT: 61.5 ± 4.4 μ l vs. 63.0 ± 5.0 μ l $Myo^{-/-}$).

4. Ergebnisse

Während WT Tiere den hypoxischen Stress mit einem Abfall des enddiastolischen und endsystolischen Volumens, sowie mit einer Abnahme des Schlagvolumens beantworten, steigen die genannten drei Größen in Myo^{-/-} Tieren unter hypoxischen Bedingungen leicht an.

Signifikanzniveau erreicht diese Tendenz nur in Bezug auf das endsystolische Volumen. Während in der WT Gruppe das ESV von $18.5 \pm 7.5 \mu\text{l}$ (Normoxie) auf $11.3 \pm 2.6 \mu\text{l}$ (Hypoxie) abfällt, steigt es in der Myo^{-/-} Gruppe von $13.0 \pm 4.4 \mu\text{l}$ (Normoxie) auf $17.3 \pm 2.3 \mu\text{l}$ (Hypoxie) an.

Während unter normoxischen Bedingungen WT Tiere ein gering höheres Schlagvolumen als Myo^{-/-} Tiere haben (WT: $53.5 \pm 7.9 \mu\text{l}$ vs. Myo^{-/-}: $45.0 \pm 6.2 \mu\text{l}$), fällt dieses bei Hypoxie in der WT Gruppe ab, während das Schlagvolumen in der Myo^{-/-} Gruppe trotz hypoxischer Belastung nahezu unverändert bleibt (WT: $50.2 \pm 5.6 \mu\text{l}$ vs. Myo^{-/-}: $45.7 \pm 3.2 \mu\text{l}$).

Die Ejektionsfraktion entwickelte sich in beiden Gruppen nach hypoxischem Stress unterschiedlich. Während bei Wildtyptieren die Ejektionsfraktion von $74.4 \pm 10.3\%$ unter normoxischen Bedingungen auf 81.6 ± 4.7 anstieg, fiel Sie bei Myo^{-/-} Tieren von ca. $77.4 \pm 8.0\%$ auf $72.5 \pm 2.0 \%$ ab, so dass unter hypoxischen Bedingungen ein signifikanter Unterschied zwischen Myoglobin^{-/-} und wildtypischen Artgenossen besteht.

Die Herzfrequenz betrug 502 ± 56 Schläge in der Minute in der Wildtypgruppe und 549 ± 42 im Myo^{-/-} Kollektiv. Während der Hypoxie wurden zwischen beiden Gruppen keine Veränderungen der Herzfrequenz festgestellt, wenn die Tiere mit Urethan anästhesiert wurden. Unter der kombinierten Isofluran/ Diazepamnarkose jedoch verringerte sich die Herzfrequenz in der Myo^{-/-} Gruppe auf 356 ± 68 Schläge in der Minute, während die Herzfrequenz der WT Kontrollgruppe nur leicht abfiel (490 ± 5 Schläge, alles Abbildung 4.6).

4.7 Genexpressionsanalyse

Um evtl. vorhandene Unterschiede in der Genexpression zwischen WT und Myo^{-/-} Mäusen aufzudecken, wurde eine cDNA Analyse mithilfe der Clontech Maus 1,2[®] Arrays (n = 4 – 5) auf Nylon Membranen durchgeführt. Von den 2352 untersuchten Genen konnten 612 Gene verlässlich detektiert und ausgewertet werden. Die durchschnittliche biologische Variabilität der Genexpression betrug 35 % (n= 4 – 5).

Unter normoxischen Bedingungen unterscheiden sich die Myo^{-/-} von den WT Tiere signifikant in der Expression von 15 Genen (Tabelle 4.1).

In der Myo^{-/-} Gruppe auffällig erhöht exprimiert wurden unter anderem das Keratinocyte Lipid Binding Protein (KLBP) mit einer um mehr als das vierfache erhöhten Expression (425 %). Darüber hinaus wurden insbesondere der Benzodiazepine Receptor (+ 86%), die Fumarat Hydratase 1 (Steigerung um 46 %), sowie die Cytochrom C Oxidase Vb (Steigerung um 34 %) verstärkt exprimiert.

In der Myo^{-/-} Gruppe deutlich vermindert exprimiert wurden unter anderem das VE – Cadherin (-61%), das Chaperon HSP86 (- 51 %), Translin (- 48%) und die Liver alkaline phosphatase 2 (- 43%).

4. Ergebnisse

Die Expression des herzspezifischen Fatty acid Binding Protein (H – FABP) war nicht signifikant verschieden. Tabelle 4.1 fasst die wesentlichen unter basalen Bedingungen unterschiedlich exprimierten Gene zusammen.

Tabelle 4.1

Signifikante Unterschiede im kardialen Genexpressionsmuster zwischen den normoxischen Myo^{-/-} und Wildtypkontrollen (*p < 0.05, **p < 0.01; n = 4 – 5). Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte, wie Sie durch die Analyse mittels Clontech Atlas Image Software erstellt wurden.

Gen	WT	Myo ^{-/-}	Relativer Unterschied
Zellstruktur			
Desmin	594 ± 100	742 ± 31 *	+25%
VE Cadherin	45 ± 19	17 ± 10 *	-61%
Rezeptoren			
AXL Receptor Tyrosine kinase	112 ± 12	76 ± 11 **	-32%
Thyroid hormone Receptor α 1	108 ± 17	85 ± 14 *	-21%
Benzodiazepine Receptor	41 ± 6	76 ± 21 *	+86%
Protein + RNA			
HSC 70	958 ± 113	766 ± 39 *	-20%
HSP 86	38 ± 12	19 ± 4 *	-51%
Translin	36 ± 15	19 ± 7 *	-48%
Immunmodulatoren			
Complement component factor h	69 ± 9	46 ± 5 **	-34%
Metabolismus			
Cytochrom c Oxidase Vb	2256 ± 310	3023 ± 268 **	+34%
Fumarat Hydratase 1	233 ± 62	342 ± 55 *	+46%
Adipocyte Protein aP2	583 ± 70	684 ± 24 *	+17%
Keratinocyte Lipid Binding Protein	9 ± 2	48 ± 18 **	+425%
Ferrochelatase	138 ± 13	101 ± 17 *	-27%
Liver alkaline phosphatase 2	43 ± 8	25 ± 9 *	-43%

Wie aus Tabelle 4.2 ersichtlich wird, induziert der zweiwöchige hypoxische Stimulus in WT Mäusen eine ganze Reihe von signifikant unterschiedlich exprimierten Genen. Exemplarisch zeigt sich eine deutliche Erhöhung mehrerer an der Zellstruktur beteiligter Gene, wie beispielsweise Vimentin (+97%), Procollagen 3α1 (+233%) und Fibronectin 1 (+168%), sowie der im Metabolismus bedeutsamen KLBP (+397%), Adipocyte Proteine aP2 (+ 88%) etc. Gene wie beispielsweise VEGF oder das S100 Calcium Binding Protein A1 hingegen werden in Hypoxie jedoch deutlich vermindert exprimiert (– 50% resp. – 56%, alles Tabelle 4.2).

4. Ergebnisse

Tabelle 4.2

Signifikante Unterschiede im kardialen Genexpressionsmuster zwischen hypoxischen (2 Wochen 10% O₂) und normoxischen WT Kontrollen (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001; n = 4 – 5). Es wurden nur Gene aufgeführt, deren Expression sich um mehr als 50% verändert haben.

Gene	Normoxie	Hypoxie	Relativer Unterschied
Zellstruktur			
Vimentin	199 ± 55	393 ± 63 **	+97%
Non muscle myosin light chain 3	95 ± 27	146 ± 20 *	+53%
Procollagen 1 α 1	92 ± 13	163 ± 31 **	+77%
Procollagen 1 α 2	41 ± 8	80 ± 19 **	+94%
Procollagen 3 α 1	56 ± 14	188 ± 46 **	+233%
VE Cadherin	45 ± 19	79 ± 13 *	+76%
Fibronectin 1	20 ± 6	53 ± 7 ***	+168%
VEGF	202 ± 25	101 ± 23 ***	-50%
FGF Receptor 1	37 ± 7	12 ± 12 *	-68%
Signaltransduktion			
CD 81 Antigen	72 ± 48	148 ± 15 *	+106%
Tyrosine – Protein Kinase ryk	22 ± 9	52 ± 7 ***	+137%
MAP Kinase 3	27 ± 5	44 ± 9 *	+63%
Protein phosphatase 1 γ	15 ± 5	35 ± 11 *	+131%
Annexin A2	47 ± 12	83 ± 11 **	+77%
Metabolismus			
Adipocyte Protein aP2	583 ± 70	1097 ± 111 ***	+88%
Keratinocyte lipid Binding Protein	9 ± 2	45 ± 17 **	+397%
Cytochrome b –245 α	35 ± 5	57 ± 9 **	+64%
S100 Calcium binding protein A1	1724 ± 592	765 ± 107 *	-56%
Liver alkaline phosphatase	43 ± 8	20 ± 9 **	-54%
Protein + RNA			
D box – binding Protein	64 ± 41	237 ± 117 *	+272%
High mobility group protein I	56 ± 10	19 ± 7 ***	-67%
Peptidylprolyl isomerase B	58 ± 17	124 ± 28 **	+116%
Immunmodulatoren			
Complement component 1 q subcomponent – binding protein	26 ± 13	83 ± 19 **	+217%
Interleukin 10 Receptor β	99 ± 17	41 ± 17 **	-58%

4. Ergebnisse

Tabelle 3 zeigt, dass sich WT und Myo^{-/-} Mäuse nach Hypoxie signifikant in der Expression von 15 Genen unterscheiden. Erneut war die biologische Variabilität durchschnittlich eher gering ausgeprägt. Auffällig erhöht war die Expression des Benzodiazepine Receptors (+68%) und der High mobility group protein I (+107%) in der Myo^{-/-} Gruppe. Deutlich vermindert waren beispielsweise die Expression der RNA Polymerase II3 (-47%), der MAPK Kinase 7 (-50%). Tabelle 4.3 fasst die Ergebnisse der unterschiedlichen Expression zwischen hypoxischen WT und Myo^{-/-} zusammen.

Tabelle 4.3

Signifikante Unterschiede im kardialen Genexpressionsmuster zwischen hypoxischen Myo^{-/-} und WT Kontrollen (* p < 0.05, ** p < 0.01; n = 4).

Gen	WT	Myo ^{-/-}	Relativer Unterschied
Zellstruktur			
Vimentin	393 ± 63	256 ± 59 *	-35%
Non-muscle myosin light chain 3	146 ± 20	109 ± 12 *	-26%
Rezeptoren			
AXL Receptor Tyrosine Kinase	113 ± 19	88 ± 4 *	-22%
Benzodiazepine Receptor	56 ± 17	95 ± 17 *	+68%
Protein Synthese & Degradation			
RNA Polymerase II 3	69 ± 4	36 ± 12 *	-47%
Ubiquitin	7483 ± 1800	4880 ± 1050 *	-35%
Ubiquitin – conjugating Enzyme E2	162 ± 27	115 ± 28 *	-29%
Calpain 4	70 ± 19	43 ± 6 *	-38%
Metabolismus			
Cytochrome c Oxidase VIIa1	886 ± 174	569 ± 33 *	-36%
Glutamate oxaloacetate transaminase 1	285 ± 26	355 ± 44 *	+24%
Signaltransduktion			
CD8 beta opposite strand	75 ± 5	106 ± 17 *	+42%
High mobility group protein I	19 ± 7	39 ± 12 *	+107%
Annexin A2	82 ± 11	53 ± 14 *	-36%
MAPK Kinase 7	30 ± 3	15 ± 4 **	-50%
Immunmodulatoren			
Complement component 1 q subcomponent –binding protein	83 ± 19	46 ± 11	-44%

4.8 RT – PCR

Um die in der Genexpressionsanalyse erhaltenen Daten zu verifizieren, wurden semiquantitative RT – PCR an drei ausgewählten Genen durchgeführt (Cytochrome Oxidase Vb, KLBP und HIF 1 α , gemessen gegen Aktin). Die Expression von Cytochrome Oxidase 5b war in der Myo^{-/-} Gruppe um 50% erhöht und die Expression von KLBP 5 in der Myo^{-/-} Gruppe um 57% erhöht. Die Expression des bekannten Hypoxiemarkers HIF 1 α blieb in hypoxischen Myo^{-/-} und WT Kollektiven allerdings unverändert.

5. Diskussion

Die in dieser Arbeit durchgeführten funktionellen und histologischen Untersuchungen sollten den Phänotyp der transgenen $Myo^{-/-}$ Maus genauer beschreiben. Darüber hinaus sollte untersucht werden, ob sich nach einem erhöhten physiologischen Stress (chronische Hypoxie) in der Mangelmutante Anzeichen für eine funktionelle Dekompensation ausmachen lassen und ob sich die Veränderungen in der Genexpression niederschlagen.

5.1 Methodenkritik

5.1a Erfolgreiche Erzeugung einer Hypoxie

Auf Meereshöhe liegt der Sauerstoffanteil bei 21%. Ein Sauerstoffanteil von 10% entspricht in etwa den Verhältnissen in ca. 5500 m Höhe. Die Kontrollgruppe wurde unter normoxischen Bedingungen (Raumluft) für zwei Wochen beobachtet. Die Erzeugung einer hypoxischen Umgebung mittels luftdichten Plexiglasboxen mit kontrollierbarem Zuflüssen mit Gasmischungen ist für Zellkulturen³⁵ und Labormäuse²³² als sichere und zuverlässige Methode zur Erzeugung einer hypoxischen Umgebung etabliert. Während unsere Box für unsere Zwecke durch die feinmechanische Werkstatt der Universität Düsseldorf hergestellt worden war, sind mittlerweile von unterschiedlichen Anbietern Fertigboxen für experimentelle Zwecke erhältlich. Aufgrund der pO_2 Messungen in der arteriellen BGA und der Veränderungen im venösen Blutbild, ist von einem effektiven hypoxischen Stimulus auszugehen.

5.1b Anästhesie

Es ist bekannt, dass die Reaktion des Tieres auf das verwendete Anästhetikum in erster Linie vom Geschlecht, Gewicht und Alter des Tieres abhängig ist, wobei ältere und übergewichtige Tiere im allgemeinen eine geringere Dosis benötigen^{109, 134, 217}. Im Gegensatz zu Großtieren und Menschen ist es bei Mäusen jedoch nicht notwendig, die Anästhesie im nüchternen Zustand durchzuführen, da Mäuse keine Tendenz zur Regurgitation aufweisen.

Wie von Rao et al beschrieben, ist Urethan in kardiovaskulären Studien das Narkosemittel der Wahl, da es eine sichere und stabile Narkose gewährleistet²¹⁷. Daher wurde es von uns in einer Dosierung von $1.5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ intraperitoneal verabreicht. Lediglich bei der NMR Bildgebung und der RNA Probengewinnung wurde von der Verwendung von Urethan als Anästhetikum abgesehen, und eine Inhalationsnarkose mit Isofluran in Kombination mit Diazepam angewandt, wie Sie durch Rohrer et al beschrieben wurde.

Isofluran wird in der Literatur gegenüber Methoxyfluran bevorzugt, weil es zum einen die Narkose rascher induziert und geringere kardiodepressive Eigenschaften aufwies, sowie die Mäuse eine kürzere Erholungszeit benötigten^{217, 225}. Die Dosierung betrug 1,2% Isofluran in Kombination mit $2,5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Diazepam i.p. Für die Betäubung zum Zweck der Gewebegewinnung wurde eine Kombination aus Ketavet und Rompun verwendet, wie sie durch den Tierschutzbeauftragten der Universität empfohlen wurde ($100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Ketavet und $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ Rompun (2%)). Aufgrund ihrer großen Körperoberfläche im Verhältnis zu ihrer geringen Masse und ihres hohen Stoffwechselumsatzes sind anästhesierte Mäuse in besonderem Masse anfällig für eine Hypothermie^{201,217}. Daher wurden die für anästhesierte Tiere die Lagerung auf erwärmbaren Kontrolltischen, oder unter Wärmelampen gelagert.

5.1c Arterielle Blutgasanalyse

Es ist in der Literatur beschrieben, dass adulte Mäuse die Entnahme von maximal bis zu 3x 70 µl Blut ohne hämodynamische Dekompensation tolerieren können^{87,217}. Da die Tiere aus der BGA Gruppe nach der kardialen Punktion für keine weitergehenden Untersuchungen benötigt wurden, fiel dies jedoch nicht ins Gewicht.

5.1d Bildgebung

Zum Zeitpunkt der Untersuchungen waren am Institut zwei nicht – invasive bildgebende Verfahren etabliert, um an der Maus Aussagen über die Herzmorphologie zu machen und daraus funktionelle Parameter abzuleiten: die Echokardiographie und die NMR – Bildgebung (MRI). Unter Verwendung der am 2D – Bild ausgerichteten Echokardiographie können Bilder des Herzens erzeugt werden, mit denen die Wandstärke und Lumendurchmesser des linken Ventrikels in Systole und Diastole bestimmt werden können.

Aus diesen Daten wiederum können die fraktionelle Verkürzung, die zirkumferente Kontraktionsgeschwindigkeit und Ejektionsfraktion sowie linksventrikuläre Volumina und Massen abgeleitet werden^{139, 217}. Die Echokardiographie ist sensitiv genug, um auch Veränderungen der Pumpleistung des Herzens während der Embryonalentwicklung zu bestimmen¹¹⁰. Es befinden sich derzeit Systeme mit erhöhter Wandler – Frequenz in der Entwicklung, und es ist zu erwarten, dass sich damit die räumliche Auflösung der zweidimensionalen Echokardiographie in Zukunft noch weiter verbessern wird. Alle mittels sonographischer Methoden erhobenen Daten zur Volumenquantifizierung unterliegen jedoch geometrischen Annahmen (ellipsoidale Form des linken Ventrikels), die im Fall einer Herzschädigung mit Formänderung des Ventrikels (asymmetrische Dilatation, Remodelling nach MI) bekanntermaßen nicht länger zutreffen.

Die NMR – Bildgebung als genuin dreidimensionales Verfahren hingegen, bietet die Möglichkeit, Volumenquantifizierungen völlig unabhängig von geometrischen Vorbedingungen durchzuführen. Obwohl die MNR Bildgebung für den Menschen bereits seit ca. 30 Jahren in der klinischen Versorgung zur Verfügung stand, erfolgte der Einsatz von MNR Bildgebung für die experimentelle Forschung an Nagern erst seit Ende der 90' er Jahre⁷⁰.

Für die murine Bildgebung werden meist höhere Feldstärken zwischen 4,7 und 11,7 Tesla eingesetzt, um ein möglichst optimales Signal/Rausch Verhältnis und eine bessere Auflösung zu erhalten⁷⁰. Für die Bestimmung von Parametern wie beispielsweise der Wanddicke, Form des Herzens, ventrikulärer Volumina und Myokardmasse bewies die NMR – Bildgebung eine hohe Messgenauigkeit und Reproduzierbarkeit sowohl in Tierstudien⁸⁰, als auch am Menschen⁵³ und stellt nach wie vor den Goldstandard zur Volumenquantifizierung dar. Siri et al waren die ersten Autoren, die mit Hilfe von EKG – getriggerten MRI bei 9.4 Tesla quantitative Daten über die Dimensionen des linken Ventrikels der Maus unter Kontroll – und Hypertrophiebedingungen veröffentlicht und diese mit gravimetrischen Messungen validiert haben²⁴².

Die zeitliche und räumliche Anwendung von MRI konnte durch Ruff et al mithilfe der Anwendung optimierter Pulsfrequenzen (FLASH) mit kürzest möglicher Echo – Zeit und einer Repetitionszeit von <10 ms nochmals erheblich gesteigert werden^{227, 278}. Seitdem ist es möglich, hochauflösende Bildgebung am murinen Herzen in situ durchzuführen, und damit funktionelle relevante Größen am Herzen zu bestimmen.

Wiesman et al beschrieben bereits Untersuchungen an Tieren mit einem Gewicht von lediglich 2 g, somit ist es sogar möglich die Entwicklung des Herzens kontinuierlich vom juvenilen bis zum adulten Tier zu verfolgen²⁷⁸.

5.2 Gewichtsveränderungen

Die detaillierte Analyse offenbart, dass beide unter hypoxischen Bedingungen gehaltenen Kollektive (Wildtyp und $Myo^{-/-}$) leicht an Gewicht verloren haben (Wildtyp – 5,6 % Abnahme Körpergewicht, respektive $Myo^{-/-}$ – 7,4% Abnahme Körpergewicht; nicht signifikant), während die vom Alters- und Gewicht her vergleichbaren unter normoxischen Bedingungen gehaltenen Kontrollgruppen leicht an Gewicht zugenommen haben (Wildtyp + 6,8% Zunahme Körpergewicht und $Myo^{-/-}$ + 15,5% Zunahme Körpergewicht; nicht signifikant, siehe Abbildung 4.1).

Die Gewichtsabnahme in den unter Hypoxie gehaltenen Gruppen kann eine Folge des allgemein verminderten Aktivitätsniveaus mit den daraus resultierenden Veränderungen des Fressverhaltens der hypoxischen Tiere sein. Eine verminderte Aufnahme von Wasser und Futter in hypoxischer Umgebung gehaltenen Tieren ist ein bekanntes Phänomen und nicht überraschend. Hunter und Clegg vermuteten in der Gewichtsabnahme einen Adaptionsmechanismus, der über eine Herabsetzung des Stoffwechsels (hypoxischer Hypometabolismus) eine Minderung des Sauerstoffbedarfs bewirken soll, und als Konsequenz ein geändertes Fress – und Trinkverhalten verursachte¹³². Darüber hinaus scheint unter hypoxischen Bedingungen neben dem Stoffwechsel auch die Körpertemperatur herunterreguliert zu werden, wobei Spezies mit kleiner Körpermasse tendenziell einen größeren Temperaturabfall aufweisen⁸².

5.3 Funktionelle Parameter

5.3a Arterielle Blutgasanalyse

Wie in Abbildung 4.2 dargestellt, waren unter normoxischen Ausgangsbedingungen zwischen Wildtyp und $Myo^{-/-}$ Tieren in Bezug auf den pO_2 keine signifikanten Unterschiede festzustellen (WT: 105 mmHg vs. $Myo^{-/-}$: 113 mmHg), ebenso ist der pCO_2 in beiden Gruppen vergleichbar (WT: 36 mmHg vs. $Myo^{-/-}$: 34 mmHg) und der pH im Blut in beiden Gruppen nahezu neutral (WT: pH 7,41 vs. $Myo^{-/-}$ pH: 7,39), wobei die Myoglobingruppe unter Raumluftbedingungen – nicht signifikant – leicht ins saure Milieu tendiert. Lediglich der Plasmabicarbonat Spiegel war unter den Raumluftbedingungen in der $Myo^{-/-}$ Gruppe signifikant erniedrigt (WT: 22,4 mmol vs. $Myo^{-/-}$: 19,7mmol, Abb. 4.2). Plasmabicarbonat ist bekanntermaßen ein regulatorischer Bestandteil der Säure/ Basehomöostase.

Nach 2 wöchiger Exposition an eine hypoxische Umgebung fiel der pO_2 erwartungsgemäß sowohl in der Wildtyp um knapp 55 %, als auch der $Myo^{-/-}$ Gruppe um knapp 49 % signifikant gegenüber den Ausgangsbedingungen ab (WT: 47 mmHg vs. $Myo^{-/-}$: 57 mmHg), was ein Nachweis für die effektive Etablierung einer hypoxischen Umgebung ist, jedoch waren die Unterschiede zwischen Wildtyp und $Myo^{-/-}$ Mäusen untereinander in Hypoxie nicht signifikant. Der Abfall des pO_2 wurde in beiden Gruppen von einem nicht signifikanten Anstieg des pCO_2 begleitet (beide: 40,4 mmHg).

Der in Normoxie nahezu neutrale pH fällt unter hypoxischen Bedingungen in beiden Gruppen in deutlich azide Bereiche (WT pH: 7,24 vs. $Myo^{-/-}$ pH: 7,23). Abermals waren die Unterschiede zwischen Wildtyp und $Myo^{-/-}$ Mäusen untereinander trotz Hypoxie nicht signifikant.

Eine ganze Reihe von humanen Erkrankungen ist durch eine verminderte O₂ Verfügbarkeit im Sinne einer hypoxischen Hypoxie (im Gegensatz zur anämischen, ischämischen oder zytotoxischen Hypoxie) gekennzeichnet, darunter pulmonale Erkrankungen mit Störung der Ventilation/ Perfusion (z.B. COPD, Asthma, Lungenembolie, zystische Fibrose), restriktive Lungenerkrankungen mit Verminderung der O₂ Diffusionskapazität (beispielsweise Pneumonie, Atelektasen, Lungenödem, pulmonale Fibrose etc.), Erkrankungen mit Rechts – Linksshunt (persistierender Ductus arteriosus botalli), Störungen des Atemantriebs oder der Atemmuskulatur (z.B. Myotonie, Myasthenia gravis, Intoxikationen etc.)¹²³.

Eine hypoxische Umgebung stellt eine physiologische Herausforderung an die Kompensationsmechanismen des Organismus dar, wobei die Menge des zur Verfügung stehenden Sauerstoffs dem Produkt aus HZV und der arteriellen O₂ Konzentration entspricht. Bereits eine Minderung des arteriellen pO₂ unter 60 mmHg stellt einen deutlichen Anreiz für die peripheren Chemosensoren für die Einleitung einer Gegenregulation dar²⁵³. Die hierauf einsetzende Gegenreaktion ist in der frühen Phase durch eine Hyperventilation mit Hypokapnie mit pH Anstieg gekennzeichnet. Da die peripheren Chemosensoren ebenfalls pH/pCO₂ sensibel sind, nimmt der Atemantrieb ab. Über die vermehrte renale Ausscheidung von Plasmabikarbonat kommt es zu einer Kompensation der initialen respiratorischen Alkalose mit konsekutivem Abfall des pH. Die Anpassung an hypoxische Umgebungsbedingungen finden nach Spezies allerdings unterschiedlich schnell statt²¹⁶¹³¹. Ein aktueller und umfassender Überblick über die ventilatorische Adaption an Hypoxie ist bei Teppema et al zu finden²⁵⁵.

In unseren Versuchen war der Abfall des Bikarbonatspiegels jeweils signifikant im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen, jedoch waren die Differenzen zwischen beiden hypoxischen Gruppen *untereinander* nicht signifikant (WT: 16,5 mmol vs. Myo^{-/-}: 16,0 mmol, Abb. 4.2). Auch eine knapp zweiwöchige hypoxische Umgebungsbedingung scheint die Myo^{-/-} Maus in Bezug auf die Blutgase nicht an die Grenzen ihrer Adaptionfähigkeit zu bringen. Bereits unter basalen Bedingungen scheint in der Myo^{-/-} Maus im Vergleich zur Wildtypmaus ein leicht azides Milieu vorzuherrschen, da ihr Plasmabikarbonatspiegel signifikant niedriger ist.

5.3b Venöses Blutbild

Die zweiwöchige Hypoxiephase induzierte im venösen Blutbild (n = 17), deutliche Veränderungen. Die chronische Hypoxie verursacht in beiden Gruppen einen deutlichen und hochsignifikanten kompensatorischen Anstieg des Hämatokrits in der Wildtyp Gruppe (von 44 Vol% auf 71 Vol%) und in den Myo^{-/-} Mäusen (von 48 Vol% auf 72 Vol%, Abbildung 4.3a). *Untereinander* war der Hämatokritanstieg jedoch zwischen beiden Gruppen ähnlich stark ausgeprägt und nicht signifikant verschieden.

Hypoxie ist ein wirksamer Stimulator für die Erythropoese¹⁴¹, über das in der Niere exprimierte Hormon Erythropoietin (EPO) wird die Proliferation und Differenzierung von Erythrozytenvorläufern (von der Erythropoietin responsive cell über mehrere Zwischenstufen hin zum reifen Erythrozyten) stimuliert. Dabei stimuliert die Hypoxie die Verfügbarkeit von heterodimeren (α/β) HIF Transkriptionsfaktoren (insb. von HIF 2), die ihrerseits wiederum die EPO Bildung beeinflussen¹⁴¹. Infolgedessen stiegen die Erythrozytenzahlen in beiden Gruppen von einem relativ ähnlichen Ausgangslevel von etwa $8,4 \times 10^6/\mu\text{l}$ (WT: $8,44 \times 10^6/\mu\text{l}$ und Myo^{-/-}: $8,41 \times 10^6/\mu\text{l}$) hochsignifikant an (WT: $12,5 \times 10^6/\mu\text{l}$, Myo^{-/-}: $11,71 \times 10^6/\mu\text{l}$, Abbildung 4.3b).

Untereinander war die Zunahme der Erythrozytenzahl jedoch nicht signifikant verschieden.

Da MB als zusätzliches O₂ Transportprotein entfällt, sind in der Myo^{-/-} Gruppe bereits unter normoxischen Bedingungen kompensatorische Mechanismen aktiv (u.a. Erhöhung des Hb Gehaltes, Abbildung 4.3e)¹⁰².

Obwohl die reaktive Zunahme des HKT und der Erythrozytenzahl sowohl in der Wildtyp, als auch der Myo^{-/-} Gruppe ähnlich ausgeprägt war, und obwohl durch den Wegfall von Myoglobin als O₂ Transportprotein ein erhöhter Bedarf für eine Kompensation über Hämoglobin vorhanden ist, sind interessanterweise sowohl die relative, als auch die absolute Retikulozytenzahl in der Myo^{-/-} Population im Vergleich zum Wildtyp Kollektiv niedriger.

Die absolute Retikulozytenzahl erlaubt eine orientierende Aussage über die effektive Erythrozytenproduktion aus dem Knochenmark unter den Bedingungen einer veränderten Erythrozytenproduktion (Erhöhung oder Verminderung)¹²⁰. Die Hypoxie verursachte in der Wildtypgruppe einen Anstieg der absoluten Retikulozytenzahl um ca. 20 % (309 x 10³/μl auf 373 x 10³/μl), in der Myo^{-/-} Gruppe, ausgehend von einem niedrigeren Basalwert, um ca. 33% von (184 x 10³/μl auf 245 x 10³/μl, Abbildung 4.3 c).

Obwohl die *absolute* Retikulozytenzahl anstieg, nahm ihr *relativer Anteil* im Verhältnis zur Gesamtzahl der Erythrozyten ab, da die Erythrozytenzahl noch stärker anstieg als die Retikulozytenzahl (Wildtyp: Abnahme von 3,7 % der Erythrozytenzahl auf 3 % der Erythrozytenzahl; Myo^{-/-}: Abnahme von 2,2 % der Erythrozytenzahl auf 2,1 % der Erythrozytenzahl, Abbildung 4.3b). Die sowohl unter Normoxie, als auch Hypoxie verminderte Retikulozytenzahl in der Myo^{-/-} Gruppe könnte ein Hinweis auf eine vergleichsweise weniger effektive Erythropoese bei Myo^{-/-} sein, dies spiegelt sich aber nicht in der absoluten Zahl der Erythrozyten wieder. Zwar sind sowohl unter normoxischen, als auch hypoxischen Bedingungen die Erythrozytenzahlen in der WT Gruppe etwas höher, der Unterschied erreicht aber nicht das Signifikanzniveau.

Da vergleichsweise weniger Erythrozyten in der Myo^{-/-} Gruppe zur Verfügung stehen, sich aber der Hb Gehalt in beiden Gruppen in etwa vergleichbarer Größenordnung bewegt, müssten die Erythrozyten in der Myo^{-/-} Gruppe etwas größer sein, als in der WT Gruppe. Wie in Abbildung 4.3d graphisch dargestellt, zeigt die Analyse des Erythrozytenvolumens (MCV) tatsächlich einen kleinen, aber signifikanten Anstieg in der Gruppe der Myo^{-/-} Tiere. Die Myo^{-/-} Erythrozyten sind im Verhältnis zu Wildtyp Erythrozyten bereits unter normoxischen Bedingungen leicht makrozytär (WT: 52 fl vs. Myo^{-/-}: 57 fl). Die Hypoxie verursacht in beiden Gruppen eine signifikante Zunahme ihres mittleren korpuskulären Volumens. Auch nach hypoxischem Stimulus sind die Myo^{-/-} Erythrozyten vergleichsweise größer als die Erythrozyten von Wildtyp Tieren (WT: 57,0 fl vs. Myo^{-/-}: 61 fl, Abbildung 4.3d).

Die Hämoglobinwerte betragen ursprünglich 12,6 g/dl (WT) und 13,7 g/dl (Myo^{-/-}). Die zweiwöchige Hypoxie verursachte sowohl in Wildtyp, als auch in den Myo^{-/-} Gruppen einen gleichgerichteten, signifikanten Anstieg auf ein ähnliches Niveau von 20,6 g/dl (WT) bzw. auf 20,5 g/dl (Myo^{-/-}), wobei die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant waren (Abbildung 4.3e).

Für in Höhenlagen lebende Menschen und Tiere wurde eine Erhöhung der Erythrozytenzahl bei gleichzeitig erniedrigtem MCV berichtet^{28, 290, 295}.

Eine Vergrößerung des MCV bei gleichzeitiger Erniedrigung der Retikulozytenzahl könnte für unsere transgenen Tiere ein Hinweis auf eine Problematik im Bereich der Erythrozytenproduktion sein. Funktionell scheint sich dies jedoch trotz einer Halbierung des O₂ Gehaltes nicht messbar nachteilig auf die Myo^{-/-} Gruppe auszuwirken.

Die Thrombozytenzahlen waren unter basalen Bedingungen zwischen WT und Myo^{-/-} Tieren nicht signifikant unterschiedlich (827 x 10³/μl und 674 x 10³/μl) war. Wie aus Abbildung 4.3f ersichtlich reduzierte der zweiwöchige Stress die Thrombozytenzahlen signifikant in beiden Gruppen auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes (WT: 405 x 10³/μl, Myo^{-/-} 349 x 10³/μl).

In der Literatur finden sich Hinweise, dass kurzfristige Hypoxiephasen bei Mäusen zu erhöhten Plättchenzahlen, während längere Hypoxiephasen zu verminderten Plättchenzahlen führen^{20, 182}. Darüber hinaus werden in der Literatur unterschiedliche Normwerte für die murine Plättchenzahl angegeben, die Angaben schwanken zwischen ~0.4 x 10⁶ μL⁻¹ und maximal ~1.6 x 10⁶ μL⁻¹, wobei in der Arbeit von Peters et al. an mehr als 30 gängigen Mausstämmen eine durchschnittliche Plättchenanzahl von ~1.1 x 10⁶ μL⁻¹, bei einer Variation bis um den Faktor 2,5 innerhalb unterschiedlicher Mausstämmen, angegeben wird^{142,207}.

Die in unseren Versuchsreihen detektierten Thrombozytenzahlen liegen im genannten Bereich.

5.3c Histologie

Gödecke et al. konnten einen signifikanten Unterschied in der kardialen Kapillardichte nachweisen, der einen zusätzlichen Faktor in der phänotypisch guten Kompensation der Myo Defizienz darstellen könnte (WT: 3.111 /mm⁻² vs. Myo^{-/-}: 4.140 /mm⁻²)¹⁰³.

Diese Differenz konnte in unserer Versuchsreihe mehr nicht nachvollzogen werden. Zwar lag die Kapillardichte der Myo^{-/-} Herzen in einer ähnlichen Größenordnung, wie in der Arbeit von Gödecke (Kapillardichte Myo^{-/-}: 4.234 / mm⁻²), jedoch war die Kapillardichte in unserer Wildtypkontrollpopulation mit 4361 / mm⁻² deutlich höher als in der Vorarbeit von Gödecke et al., so dass der vorherbeschriebene Unterschied in der kardialen Kapillardichte wegen der höheren Kapillarisation in unserer Kontrollpopulation nicht mehr zum Tragen kam. Wie in Abbildung 4.4 dargestellt, reagierten beide Gruppen mit einer deutlichen Zunahme der kardialen Kapillarisation nach zweiwöchiger normobarer Hypoxie (Kapillarisation WT_{Hyp}: 5604 / mm⁻²; Kapillarisation Myo^{-/-}_{Hyp}: 5405 / mm⁻²). Es blieb aber unklar, warum der in unserer Versuchsreihe als Wildtyp benutzte NMRI Stamm in unseren Versuchen eine höhere Kapillardichte aufwies, als in der früheren Arbeit von Gödecke et al.

Eine mögliche Erklärung könnte darauf beruhen, dass die Wildtyp Kontrollpopulation in der früheren Arbeit einen gemischten genetischen Hintergrund aus Abkömmlingen einer Kreuzung zwischen einem NMRI und einem SV 129 Stamm besaß¹⁰².

5.3d Invasive Messungen

Die Ergebnisse der invasiven Messungen sind in Abbildung 4.5 zusammengefasst. Während die Herzfrequenz der WT Maus von ca. 588 sec⁻¹ in Raumluft auf ca. 533 sec⁻¹ unter hypoxischen Bedingungen abfällt, sinkt die Herzfrequenz der Myo^{-/-} von ca. 630 sec⁻¹ auf 570 sec⁻¹. Man sieht, dass die Myo^{-/-} tendenziell sowohl unter normoxischen, als auch hypoxischen Umweltbedingungen eine höhere Herzfrequenz aufweist, jedoch erreicht der beobachtete Unterschied nicht das Signifikanzniveau.

Generell verursacht eine Hypoxie eine Absenkung der systolischen Blutdruckverhältnisse. So sinkt der systolische RR in normoxischen WT von ca. 111 mmHg auf ca. 93 mmHg ab und in $Myo^{-/-}$ Tieren von ca. 120 mmHg auf ca. 105 mmHg. Der mittlere arterielle Druck sinkt in normoxischen WT von ca. 80 mmHg auf ca. 76 mmHg und in $Myo^{-/-}$ Tieren von ca. 89 mmHg auf ca. 82 mmHg.

Erneut lassen sich in der $Myo^{-/-}$ Gruppe im Durchschnitt höhere systolische und mittlere arterielle Druckverhältnisse beobachten als in der WT Gruppe, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen. Dies gilt für die Verhältnisse in Normoxie, als auch in Hypoxie. Während der diastolische RR in normoxischen WT von ca. 50 mmHg unter Sauerstoffmangel auf 58 mmHg ansteigt, fällt er in $Myo^{-/-}$ Tieren von 63 mmHg auf 61 mmHg leicht ab. Zusammenfassend zeigte sich sowohl in Normoxie und in Hypoxie in allen hämodynamischen Untersuchungen *tendenziell* stets eine höhere kardiovaskuläre Beanspruchung des $Myo^{-/-}$ Kollektiv im Vergleich zur Kontrollgruppe (höhere Herzfrequenz, höherer systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Druck), erreicht aber nicht das Signifikanzniveau. Offensichtlich sind die $Myo^{-/-}$ funktionell nicht eingeschränkt, bzw. können den Verlust eines wesentlichen Proteins vollständig kompensieren.

5.3e Kardiale Parameter in der MR Bildgebung

Das systolische Volumen war in allen vier Gruppen miteinander vergleichbar. Normoxische WT Mäuse weisen ein SV von ca. 54 μ l auf, das in Hypoxie auf etwa 50 μ l nachlässt. Das SV der normoxischen $Myo^{-/-}$ Mäuse hingegen ist mit ca. 45 μ l etwas geringer und bleibt unter Hypoxie nahezu unverändert bei etwa 46 μ l (siehe Abbildung 4.6). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen liegt nicht vor.

Das Schlagvolumen ist neben anatomischen Einflussgrößen (Herzgröße, Funktionsfähigkeit der Klappen) vor allem von funktionalen Einflussgrößen abhängig (insb. der myokardialen Kontraktilität, sowie der Nachlast engl. „Afterload“ und der Vorlast, der sog. „Preload“). Von der myokardialen Kontraktilität ist bekannt, dass Sie unter Hypoxie nachlässt. Die Nachlast des linken Ventrikels ist im Wesentlichen durch den systemischen Gefäßwiderstand bestimmt, welcher durch dem Gesamtquerschnitt aller Gefäße im Körperkreislauf entspricht. Größenordnungsmäßig entspricht die Nachlast in etwa dem diastolischen arteriellen Blutdruck, welcher wie bereits erwähnt in den $Myo^{-/-}$ Gruppen sowohl in Normoxie als auch Hypoxie gegenüber der Wildtypgruppe leicht, aber nicht signifikant erhöht war, s.o.). Die Vorlast ist vor allem durch das Ausmaß der Muskelvorspannung am Ende der Diastole bestimmt. Die Vordehnung der Muskelfasern bewirkt auf subzellulärer Ebene eine bessere Verzahnung der Myosinfilamente und führt in gesunden Herzen über den Frank – Starling Mechanismus in Grenzen zu einer relativen Verbesserung der Muskelkontraktion, wobei die Vordehnung im wesentlichen durch das enddiastolische Ventrikelvolumen bestimmt ist.

Unter normoxischen Bedingungen besteht im endsystolischen Volumen zwischen transgenen und Wildtyparten kein signifikanter Unterschied.

Unter hypoxischen Bedingungen offenbart sich ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen. Während in der WT Gruppe das ESV auf etwa 11 μ l deutlich abfällt, steigt es in der $Myo^{-/-}$ Gruppe auf ca. 17 μ l an (Abbildung 4.6). Unter normoxischen Bedingungen hingegen sind die Verhältnisse genau umgekehrt. Das endsystolische Volumen normoxischer WT Tiere ist mit ca. 19 μ l höher als bei normoxischen $Myo^{-/-}$ Mäusen, die ein ESV von ca. 13 μ l aufweisen (Abbildung 4.6). Somit ist das ESV bei $Myo^{-/-}$ Mäusen in Raumluft angedeutet niedriger als bei wildtypischen Artgenossen und die Ejektionsfraktion in $Myo^{-/-}$ unter

normoxischen Bedingungen tendenziell höher als bei WT Tieren, ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen.

Es könnte postuliert werden, dass das Herz – Kreislaufsystem der Myo^{-/-} Maus durch den Wegfall eines O₂ Transportproteins bereits unter Raumluftbedingungen gezwungen ist, ökonomischer zu arbeiten als WT Herzen und eine zusätzliche Belastung durch einen O₂ Mangel in der Umgebung die Myo^{-/-} an die Grenzen der Kompensationsfähigkeit führt. Das höhere enddiastolische Volumen bei gleichzeitig verminderter Ejektionsfraktion (s.u.) in der Myo^{-/-} Gruppe unter hypoxischen Bedingungen ist ein Hinweis auf eine schlechtere Anpassungsfähigkeit der transgenen Myo^{-/-} Maus unter erschwerten Umweltbedingungen. Zwar erscheint die Maus phänotypisch noch kompensiert, jedoch führt der Wegfall von Myoglobin als O₂ Transporter unter hypoxischen Umweltbedingungen zu funktionellen Veränderungen. Dieser Befund passt gut zu der in der Literatur vermuteten Beteiligung von Myoglobin in der Pufferung kurzfristiger O₂ Mangelzustände (wie beispielsweise während der Systole des Herzens)⁶⁹.

Das enddiastolische Ventrikelvolumen ist in normoxischen Bedingungen bei Myo^{-/-} Mäusen signifikant niedriger als in der Wildtyp Gruppe. Während Myo^{-/-} Mäuse in Raumluft ein EDV von ca. 58 µl haben, liegt das EDV von WT Mäusen mit etwa 72 µl deutlich höher (Abbildung 4.6). Während Myo^{-/-} Mäuse ein geringeres EDV als ihre Wildtyp Kontrollpopulation aufweisen und somit eine geringere Vorlast haben, ist ihr Schlagvolumen zwar ebenfalls geringer als die verglichene Wildtypgruppe (s.o.), jedoch nicht signifikant.

Auch dies wäre ein Hinweis, dass trotz geringerer Vorlast die Herzaktion in Myo^{-/-} Mäusen „ökonomischer“ und effizienter arbeiten muss, denn die Ejektionsfraktion ist in der Myo^{-/-} Gruppe leicht höher als in der Wildtypgruppe.

Unter hypoxischen Rahmenbedingungen ist das EDV in beiden Gruppen größenordnungsmäßig ähnlich ausgeprägt (EDV WT: 62 µl vs. EDV Myo^{-/-} 63,0 µl, Abbildung 4.6). Während in der Wildtypgruppe das EDV um knapp 17% abnahm, stieg es in der Myo^{-/-} Gruppe um ca. 9% an und verwischte den in Normoxie feststellbaren Unterschied zwischen beiden Gruppen. Das EDV wird vom venösen Rückstrom zum Herzen und dem Gefäßtonus und dem Speichervolumen der präkardialen venösen Blutleiter beeinflusst. Der Gefäßtonus wird durch die Balance zwischen vasokonstringierenden und vasodilatierenden Einflüssen bestimmt.

Die Reaktion des Gefäßsystems auf einen hypoxischen Stimulus ist abhängig vom jeweiligen Gefäßsystem und spezieabhängig.

Ob letztlich in der Summe ein konstriktiver oder dilatierender Effekt auftritt, ist hängt von den lokalen Effekten der Hypoxie und der systemischen Auswirkung auf vegetative Innervation des Gefäßtonus ab, wobei die Effekte bei Mensch und Tier unterschiedlich ausfallen^{56, 224}. Möglicherweise handelt es sich um einen NO medierten Effekt. Wie Rassaf an Langendorf perfundierten Herzen nachweisen konnte, fungiert MB nicht nur als Dioxygenase und Radikalfänger, sondern unter hypoxischen Bedingungen (Deoxymyoglobin) als NO Produzent.

Unter hypoxischen Bedingungen wiesen Wildtypmäuse eine Abnahme der O₂ Utilisation und des Linksventrikulären Druckes auf, während Myo^{-/-} Mäuse unter hypoxischen Bedingungen diese Einschränkungen nicht zeigten²¹⁸. Deoxymyoglobin konvertiert in den Wildtyptieren Nitrit zu NO, welches sich dann mit dem Zytochrom verbindet und den kardialen Energiehaushalt verändert. Dies führt zu einer verminderten O₂ Aufnahme und Kontraktilität. Rassaf schlägt vor, dass es sich um einen protektiven Mechanismus ähnlich dem bekannten „Perfusion – Contraction

Matching“ (verminderte Kontraktilität bei verminderter koronarer Perfusion des Herzens) handelt.

Da Myo^{-/-} Tiere naturgemäß kein Deoxymyoglobin aufweisen, kann die Hypoxie in diesen Tieren keine NO Produktion mit verminderter Kontraktilität auslösen, umgekehrt kann allerdings in den Myo^{-/-} Tieren unter normoxischen Bedingungen das fehlende Myoglobin nicht als Dioxygenase fungieren und NO abfangen, was eine Erklärung für die relativ ähnliche Leistung der Myo^{-/-} Herzen unter normoxischen Bedingungen sein könnte.

5.4 Expressionsanalyse

Die Genexpressionsanalyse ergab eine ganze Reihe von Genen, die zwischen Myo^{-/-} Mäusen und ihren wildtypischen Artgenossen signifikant unterschiedlich exprimiert werden. Teils bestehen die Expressionsunterschiede bereits unter basalen Bedingungen, teils erst nach hypoxischer Stimulation. Viele der betroffenen Gene haben eine funktionelle Bedeutung in der zellulären Ultrastruktur, dem Stoffwechsel und der Proteinsynthese und Degradation.

Im Allgemeinen sind die gemessenen Expressionsunterschiede unter Raumluftbedingungen eher klein (durchschnittlich um 35%), aber einige Gene werden drastisch überexprimiert, bzw. herunterreguliert.

KLBP beispielsweise wird unter normoxischen Bedingungen in Myo^{-/-} Mäusen um 425% stärker exprimiert, als in WT Tieren. Nachfolgend sollen die wichtigsten betroffenen Gene und ihre mögliche Bedeutung für die Myoglobin^{-/-} Maus besprochen werden.

Tabelle 4.1 fasst die unterschiedlichen Gene zwischen Myo^{-/-} und WT Stamm unter normoxischen Bedingungen zusammen. In der Myo^{-/-} Gruppe fand sich unter basalen normoxischen Bedingungen die Expression von **Desmin** gegenüber dem Wildtypstamm signifikant um +25% gesteigert. Desmin ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und dient in Kardiomyozyten als wichtiges intermediäres Filamentprotein. Ein intaktes Zytoskeletts spielt nicht nur eine kritische Rolle in der Organisation des Zytoplasmas und der Proliferation, sondern dient darüber hinaus der intra – und interzellulären Kommunikation¹⁸³.

Störungen der Desminstruktur können zu unterschiedlichen Myopathien führen. Insbesondere in Kardiomyozyten können diese Myopathien fatale Konsequenzen besitzen, da das Herz im Gegensatz zur quergestreiften Muskulatur, nie zu Ruhe kommt und seine Regenerationsfähigkeit begrenzt ist¹⁸³. Vererbte oder neu entstandene Desmin Mutationen können die sogenannte „Desmin – related (Cardio) Myopathy“ (DRM) verursachen, welche eine klinisch variable Manifestation aufweist^{54, 183}. Eine kardiale Manifestation äußert sich häufig durch Störungen der Erregungsweiterleitungen, die ggf. eine Schrittmacherimplantation erforderlich machen kann. Darüber hinaus führen die Veränderungen im Zytoskelett zu einer verminderten Kontraktilität, Störungen im Ca²⁺ Haushalt, sowie Entwicklung einer Kardiomyopathie und zu einem Kardiomyozytenverlust¹⁰⁷.

Darüber hinaus führen DRM Mutationen zu Veränderungen in der Mitochondrienstruktur und Anzahl¹⁷⁵, wobei Desmin eine Rolle spielt in der korrekten Positionierung der Mitochondrien in der Sarkomerregion¹². Desmin Pathologien gehen mit einer phänotypisch geringeren Muskelkraft und leichter Ermüdbarkeit einher¹⁸³.

Übertragen auf unser Modell, wäre die Erhöhung der Desminexpression in der Myo^{-/-} Gruppe ein weiterer möglicher Baustein, der auf der Ebene der Kardiomyozyten mit zu der guten phänotypischen Kompensation des Myoglobinmangels beiträgt.

Die Expression von **VE – Cadherin** hingegen ist unter normoxischen Bedingungen in der Myo^{-/-} Gruppe im Vergleich zur Wildtypgruppe um – 61% signifikant vermindert (Tabelle 4.1). Cadherine sind kalziumabhängige transmembranöse Adhäsionsproteine, die über Ankerproteine mit dem Aktin Zytoskelett verbunden sind¹³⁵, dabei spielen Sie nicht nur eine Rolle in der Regulation der Stabilität, sondern nehmen auch an der intrazellulären Signalübermittlung teil^{57,215}.

VE – Cadherin (Cadherin 5) ist spezifisch für die Adhäsionsverbindungen (adhering junctions) von Endothelzellen¹⁶¹. Die Expression ist in Arterien, Arteriolen und Kapillaren deutlich ausgeprägter als in Venolen und Venen²¹⁵. Durch den Verlust von Myoglobin als Sauerstofftransport und Speicherprotein liegt in der Myo^{-/-} Maus eine kompensatorische Vermehrung der Vaskularisation vor. Tatsächlich konnte in späteren Forschungsarbeiten nach Abschluss unserer Untersuchungen der Nachweis erbracht werden, dass eine *vermehrte* Expression von VE – Cadherin die zelluläre Reaktion auf VEGF *mindert*⁵⁷.

Wie bereits erwähnt, sind Cadherine nicht nur Strukturproteine, sondern auch in der intrazellulären Signalübermittlung beteiligt. Es mehren sich die Hinweise, dass Cadherine nicht nur die Adhäsionsfähigkeit mitregulieren, sondern auch eine Rolle in der Migration, Proliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose von Endothelzellen spielen können²¹⁵. Die funktionelle Rolle, die dem VE – Cadherin im biologischen Verhalten von Endothelzellen in vivo zukommt, ist letztlich noch nicht abschließend aufgeklärt, da allerdings viele Erkrankungen mit einer endothelialen Dysfunktion und /oder Störung der vaskulären Barrierefunktion einhergehen (z.B. Arteriosklerose, Sepsis, Diabetes, Filialisierung von malignen Zellen etc.), bleibt die genauere Erforschung der Regulation der adhering junctions in Endothelzellen im Fokus des Interesses^{57, 276}. In unserem Kontext ist davon auszugehen, dass Myo^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Artgenossen eine schlechtere O₂ Versorgung kompensieren müssen. Da eine vermehrte Expression von VE – Cadherin mit einer verminderten zellulären Empfindlichkeit für VEGF einhergeht⁵⁷, könnte unser Befund der um knapp – 60% signifikant verminderten VE – Cadherinexpression einen weiteren Kompensationsmechanismus auf zellulärer Ebene darstellen.

Unter hypoxischen Bedingungen verminderte sich im Myo^{-/-} Kollektiv die Expression von **Vimentin** signifikant um – 35% (Tabelle 4.3). Vimentin gehört zur Familie der Intermediären Filamentproteine und ist als solches Bestandteil des Zytoskeletts⁷¹.

Die initiale Charakterisierung eines in den 90er Jahren generierten Vimentin^{-/-} Mausmodells zeigte keine offensichtlichen phänotypischen Ausfälle⁴⁸. Eine knapp 5 Jahre später durchgeführte detailliertere Analyse des Phänotyps durch dieselbe Arbeitsgruppe konnte jedoch Veränderungen in der Morphologie von Gliazellen nachweisen⁴⁹. Darüber hinaus, weisen Fibroblasten in Vimentin^{-/-} Mäusen eine verminderte Motilität und Kontraktilität auf, mit der Konsequenz, dass die Wundheilung in Vimentin^{-/-} Mäusen verlangsamt ablief⁶⁶.

Da Vimentin nicht unter basalen Bedingungen zwischen Myo^{-/-} und Wildtyptieren unterschiedlich exprimiert wird, sondern erst nach hypoxischer Stimulation, muss es sich um einen spezifischen Effekt der Hypoxie auf die Myo^{-/-} Mäuse handeln. Tatsächlich konnte Liu vor kurzem nachweisen, dass Vimentin durch Hypoxie reguliert wird und dass in einer hypoxischen Umgebung eine intrazelluläre Umverteilung von Vimentin stattfindet und ein extensives filamentöses Netzwerk

ausgebildet wird¹⁶⁷. Er schlägt vor, dass dieses Netzwerk eine Rolle in der Stabilisierung der endothelialen Barriere unter hypoxischen Bedingungen spielen könnte. Neben der Funktion als Strukturprotein scheint Vimentin auch im Stoffwechsel von Fettsäuren eine Rolle im Lipidstoffwechsel zu spielen²³¹. Eine Verminderung der Vimentinexpression in *Myo*^{-/-} Mäusen könnte also im Zusammenhang mit einer Änderung in der Substratauswahl des Stoffwechsels stehen. Auf diesen Aspekt werde ich später noch gesondert eingehen.

Neben den genannten Genen, die vor allem für die zelluläre Ultrastruktur bedeutsam sind, werden auch Gene, die für die Ausbildung von Rezeptoren und Signalübertragungen bedeutsam sind, differentiell exprimiert.

So ist die Expression der **AXL Receptor Tyrosine Kinase** in *Myo*^{-/-} Mäusen sowohl unter normoxischen (-32 %, Tabelle 4.1), als auch unter hypoxischen Bedingungen (-22%, Tabelle 4.3) signifikant vermindert.

Rezeptor – Tyrosinkinase (RTK) umfassen eine große Familie von transmembranösen Proteinen, die durch Stimulation eines Rezeptors eine Signaltransduktion aktiviert werden kann. Die Axl Receptor Tyrosine Kinase gehört zur sog. „TAM“ (für: „Tyro3, Axl, Mer“) Subfamilie und wurde erstmals 1991 in Proben zweier an chronisch myeloischer Leukämie erkrankter Patienten entdeckt (die Benennung erfolgte daher nach dem griechischen Wort „anexelekto“, was „unkontrolliert“ bedeutet)¹⁹⁶. Die Expression in Endothelzellen lässt darauf schließen, dass es eine Rolle bei der Verarbeitung von Stresssituationen spielt, sowie bei Remodelling nach Infarkten und auch in der Tumorangio-genese¹¹⁵. Knockout Mäuse für alle 3 Rezeptoren (*Tam*^{-/-}) waren zunächst lebens – und vermehrungsfähig, sowie phänotypisch in den ersten Wochen im wesentlichen unauffällig¹⁷⁰, nach längerer Beobachtung manifestierte sich jedoch eine lymphoproliferative Störung mit Manifestation von autoimmunologischen Störungen¹⁷¹. Im Herz – Kreislaufsystem spielen TAM Rezeptoren eine regulatorische Rolle in der Homöostase glatter Gefäßmuskelzellen, in dem Sie über Gas 6 und Axl eine antiapoptotische Wirkung aufweisen¹⁸⁵, und Remodellingprozesse im Gefäßbett beeinflussen¹⁸⁵.

Axl spielt auch in der Plättchenfunktion und Thrombusstabilisierung eine Rolle, so konnte die Gruppe um Angelillo – Scherrer nachweisen, dass eine *Gas 6*^{-/-} defiziente Maus ist vor arteriellen und venösen Thrombosen geschützt ist⁶, dabei sind alle 3 Tyrosinkinase (Tyr3, Axl, Mer) in vivo für den beobachteten Effekt gleich wichtig und der Ausfall eines Rezeptors ist bereits ausreichend für den beobachteten Effekt⁷.

In unserem Kontext kann die Herabregulierung von Axl der *Myo*^{-/-} Maus dazu beigetragen haben, trotz der kompensatorischen Erhöhung des Hämatokrits vor der Ausbildung von thrombembolischen Ereignissen zu schützen. Eine hypoxische Umgebung hätte erwartungsgemäß ggf. zu einer weiteren Verminderung der Axl Receptor Kinase im Vergleich zu basalen Bedingungen führen sollen, allerdings war die Expressionsminderung in beiden Gruppen in einer ähnlichen Größenordnung ausgeprägt. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass in *Myo*^{-/-} Mäusen bereits unter basalen Bedingungen im Vergleich zu Wildtypieren ein anderes genetisches Programm abläuft, und eine weitere Hypoxie keinen zusätzlichen Stimulus mehr für eine noch stärker verminderte ARK Expression darbietet.

Neben dem Axl Rezeptor war in $Myo^{-/-}$ Mäusen unter basalen Bedingungen auch der **Thyroid hormone Receptor $\alpha 1$** um – 21% signifikant niedriger exprimiert (Tabelle 4.1). Schilddrüsenhormone kommen in allen Wirbeltieren vor, wo Sie die Expression von Entwicklungs – und funktionalen Programmen steuern (z.B. die Metamorphose in Amphibien)⁹⁰. In homöothermen Spezies wird durch Schilddrüsenhormone unter anderem die Thermogenese gesteuert²⁴¹. Die nukleären Rezeptorproteine (α und β) vermitteln die Wirkung von T_3 (Trijodthyronin) in allen Wirbeltieren. In Säugetieren übt T_3 vor allem Funktionen in der Entwicklung und Homöostase aus.

Ein Thyroidhormonmangel kann sich negativ auf die Entwicklung (vermindertes Wachstum, Störung der Neurogenese)⁶⁵ oder auf den Metabolismus auswirken (verminderter Sauerstoffbedarf, Schwäche, Bradykardie)⁹⁴, wobei auch noch postnatal ein Schilddrüsenhormonmangel zu schweren neurologischen Defiziten führen kann (Kretinismus). Der Thyroid hormone Receptor $\alpha 1$ kommt vor allem in kardialer und Skelettmuskulatur vor und wird durch das THRA Gen exprimiert.

Ein $THR\alpha^{-/-}$ Modell war zwar lebensfähig, wies aber ein vermindertes Wachstum, Verzögerung der Knochenreifung, eine moderate Hypothermie und eine reduzierte Dicke der intestinalen Mukosa auf⁹⁴.

Da Schilddrüsenhormone über die Erhöhung des Grundumsatzes den O_2 Bedarf in allen Geweben deutlich erhöhen, wäre eine verminderte Expression des entsprechenden Rezeptors in der $Myo^{-/-}$ Maus ggf. ein Mechanismus, um das durch den Wegfall von Myoglobin als Sauerstofftransport – und Speicherprotein verminderte O_2 Angebot zu kompensieren. Das Phänomen des hypoxischen Hypometabolismus und einer Minderung des Sauerstoffbedarfs VO_2 bei kleinen Säugern ist gut bekannt⁹⁵, wobei das Ausmaß des Hypometabolismus auch von der Größe des beobachteten Organismus abhängig ist^{95, 127}.

Da der Grundumsatz nicht unbeschränkt herunterreguliert werden kann, wäre erklärbar, warum unter hypoxischen Bedingungen keine signifikant verminderte Expression des Thyroid hormone Receptor $\alpha 1$ vorliegt, da nun sowohl die WT als auch $Myo^{-/-}$ Tiere O_2 einsparen müssen und ein etwaiger Unterschied zwischen beiden Gruppen verwischt wird.

Die Expression des **Benzodiazepinrezeptors** ist sowohl unter normoxischen (+86 %, Tabelle 4.1), als auch hypoxischen Bedingungen (+68 %, Tabelle 4.3) in $Myo^{-/-}$ Mäusen im Vergleich zu WT Tieren deutlich heraufreguliert.

Der Benzodiazepinrezeptor wurde initial von Braestrup und Squires in den 70'er Jahren als Benzodiazepin Bindungsstelle beschrieben, dabei ist der periphere Benzodiazepinrezeptor vom zentralen Benzodiazepinrezeptor, der ausschließlich im ZNS exprimiert wird, zu unterscheiden²³. Periphere Benzodiazepinrezeptoren (PBR) werden im kardiovaskulären System deutlich exprimiert, unter anderem im Endothel, der Herzmuskulatur und der glatten Gefäßmuskulatur^{163, 269}.

Die Mehrheit der peripheren Benzodiazepinrezeptoren wird auf der Außenseite der Mitochondrienmembran exprimiert²⁴⁹, kommen jedoch auch außerhalb der Mitochondrienmembran vor, so zum Beispiel in der Plasmamembran²⁸⁸.

Der periphere Benzodiazepinrezeptor wurde zwischenzeitlich in „Translocator Protein“ (TSPO, mitochondriales Translokatorprotein mitoTSPO, respektive: nukleäres Translokatorprotein nucTSPO) umbenannt, die Bezeichnung als peripherer Benzodiazepinrezeptor („PBR“) bleibt aber weiter geläufig²⁰⁵.

Wie könnte die vermehrte Expression des PBR der Myo^{-/-} Maus nützlich sein? In der Literatur werden dem PBR mehrere Funktionen zugewiesen. In Ischämie/Reperfusionstudien gelang der Nachweis, dass verschiedene selektive Liganden am mitochondrialen Benzodiazepam Rezeptor die kardiale Funktion verbessern und das Auftreten von Rhythmusstörungen vermindern^{197,2,24}.

Darüber hinaus spielt der PBR eine Rolle in der Protektion des Herzens vor ROS. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen der Generierung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und ihrer Inaktivierung. Störungen des Gleichgewichts durch vermehrte Produktion von ROS oder Verminderung der ROS Fänger resultieren in oxidativen Stress. Dieser wiederum kann zu mitochondrialer Dysfunktion, apoptischem Zelltod und persistierender kontraktiver Dysfunktion führen^{155, 249, 270}.

Eine Heraufregulation des PBR in Myo^{-/-} Mäusen sowohl unter basalen Bedingungen, als auch unter Sauerstoffmangel kann ein Hinweis auf eine vermehrte Gefährdung des Herzens durch reaktive Sauerstoffspezies sein. Tatsächlich gelang Flögel et al. nach Abschluss der vorliegenden Arbeit der Nachweis, dass Myoglobin als Radikalfänger fungiert und metabolisch dazu beiträgt, das Herz vor oxidativem Stress zu schützen und bestätigte diese Vermutung⁷⁵.

Die Myoglobindefizienz hat offensichtlich auch Auswirkungen auf die zelluläre Chaperonausstattung. So ist die Expression von **HSC 70** und **HSP 86** in Myo^{-/-} Mäusen um – 20% bzw. – 50% signifikant vermindert (Tabelle 4.1).

Chaperone sind weit verbreitete Proteine, die in der Zelle diverse Funktionen ausüben. Da Sie dabei „unangebrachte Verbindungen“ zwischen verschiedenen potentiellen Partnern wie in den Ribosomen hergestellten Polypeptidketten verhindern bzw. lösen, wurde diese Proteinfamilie „Chaperone“ nach dem englisch Terminus für Anstandsdamen benannt⁶⁸.

Die korrekte dreidimensionale Faltung eines Proteins ist die wesentliche Voraussetzung für seine Funktion, bereits kleine Veränderungen können zu einer Konformationsänderung und damit verbundener Inaktivierung bzw. ggf. sogar der Auslösung einer toxischen Proteinwirkung¹⁴⁰ vergesellschaftet sein. Veränderungen der Umweltbedingungen können das austarierte intrazelluläre Proteingleichgewicht empfindlich stören, so dass Zellen auf diese Störungen durch die rasche Induktion von remodulierenden Faktoren und Chaperonen reagieren muss. Diesen kollektiv als „Heat shock Proteinen“ benannten Gruppe kommt infolgedessen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Proteinhomeostase zu.

Die Klasse der 70 kD Heatshock Proteine gehört zu einer der am weitesten verbreiteten Klassen von Chaperonen¹⁴⁵. Sie sind an einer ganzen Reihe von intrazellulären Prozessen beteiligt so unter anderem: Translokation von Proteinen durch Organellenmembranen, akkurate Proteinfaltung, Formation multimerer Komplexe und der Degradation anormal gefalteter Proteine. Bekannte Effekte unter pathologischen Bedingen sind beispielsweise die Reparatur denaturierter Proteine, Faltung und Transport neu gebildeter (Ersatz –) Proteine, die Degradation von irreparabel beschädigten Proteinen und die Inhibition der Apoptose und Stabilisation des Zytoskeletts¹⁴⁸.

Für das HSP 70 System wird eine zentrale Rolle in der Proteinfaltung und Kontrolle der Proteostase diskutiert. So wurde eine vermehrte Expression von HSP 70 eine präventive Rolle in Bezug auf toxische Proteinaggregationen zugewiesen, und ist nicht nur unter pathologischen, sondern auch unter physiologischen Bedingungen

aktiv^{11, 116}. Das HSP 70 System fördert die Auflösung von unlöslichen Aggregaten und die erneute Faltung von Polypeptiden, darüber hinaus stabilisiert es ungefaltete Vorläuferproteine vor ihrem endgültigen Zusammenbau im Zytosol oder ihrer Translokation ins endoplasmatische Retikulum / Mitochondrien. Es trägt auch dazu bei, frisch translozierte Proteine in ungefaltetem Zustand zu belassen, bevor Sie endgültig gefaltet und in Organellen versammelt werden^{113, 116}.

Die HSP 90 Familie umfasst Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 82 und 90 kD. Unter physiologischen Bedingungen macht HSP 90 bereits 1% der totalen Proteinmasse aus und die Expression kann sich unter Stressbedingungen verdoppeln¹⁴⁰, wobei HSP 90 in nahezu allen Kompartimenten einer eukaryoten Zelle gefunden werden kann³⁷. Aufgrund der hohen Expressionsspiegel von HSP 90 argumentiert Jarosz, dass im Bedarfsfall (Einwirkung von Stressfaktoren auf die Zelle), ein rasch verwendbares Chaperonreservoir zur Verfügung steht. HSP 90 ist dabei nicht nur mit einigen intrazellulären Strukturproteinen vergesellschaftet, darunter Actin, Calmodulin, Tubulin, sondern verbindet sich in Abwesenheit ihrer Liganden beispielsweise auch mit zytoplasmatischen Steroidhormonrezeptoren und hält sie im bindungsfähigen Zustand²⁴⁴, sowie für eine ganze Reihe von Rezeptor Kinasen^{43,113}. An Hefen konnte nachgewiesen werden, dass HSP 90 bei einer ganzen Reihe wesentlicher Vorgänge beteiligt ist, so beispielsweise in der Signaltransduktion, im Proteintransport, Zellzyklus usw.^{140, 180}.

Der Umstand, dass sowohl HSC 70, als auch HSP 86 in $Myo^{-/-}$ anders als in den Wildtyptieren exprimiert wird, ist angesichts des phänotypisch robusten $Myo^{-/-}$ Verhalten nicht überraschend. Auf Proteinebene sind vermutlich eine Vielzahl von bislang nicht erfassten Veränderungen vorhanden, so dass auch die Expression der Chaperone dementsprechend verändert sein muss.

Unter hypoxischen Bedingungen war weder eine weitere Herab-, noch eine Heraufregulierung beider Chaperone festzustellen, was darauf hindeuten könnte, dass bereits unter basalen Bedingungen durch die Myo Defizienz per se Veränderungen in der Proteinhomöostase induziert wurden und die Hypoxie als weiterer Umweltstimulus nicht mehr wesentlich zum Tragen kommt.

Jarosz schlägt vor, dass HSP 90 die Auswirkungen von genetischen Veränderungen sowohl abpuffern, als auch verstärken kann. So argumentiert er, dass das große Reservoir von HSP 90 unter normalen Wachstumsbedingungen für die Aufrechterhaltung der zellulären Signalwege ohne phänotypische Manifestation sorgt. Störungen des HSP 90 Reservoirs hingegen können vorher verborgene genetische Variationen zum Vorschein bringen.

Aber auch der umgekehrte Fall ist denkbar: genetische Varianten, die instabil sind, oder HSP 90 abhängige Klientenproteine benötigen, können bei Störungen des HSP 90 Reservoirs rasch phänotypisch auffällig werden¹⁴⁰. In unserem Fall ist die Veränderung der Chaperonexpression ein deutlicher Hinweis darauf, dass die gute phänotypische Kompensation der Myoglobin Defizienz vermutlich auch die Folge von Veränderungen in der Proteinhomöostase sein dürfte.

Tatsächlich konnten Flögel und Lausmann nach Abschluss unserer Versuche in einer Proteomanalyse nachweisen, dass sich mindestens 21 Proteine zwischen Wildtyp und $Myo^{-/-}$ unterscheiden und ca. die Hälfte der betroffenen Proteine Schlüsselenzyme der β Oxidation der Fettsäuren betrifft⁷⁶.

Auch in unserer Untersuchung weist der deutliche Expressionsunterschied von KLBP (Keratinocyte Lipid Binding Protein) zwischen Wildtyp und Myo^{-/-} Tieren bereits auf mögliche Veränderungen im Stoffwechsel hin (siehe unten).

In den normoxischen Myo^{-/-} Mäusen wurde **Translin** um – 48% signifikant vermindert exprimiert (Tabelle 4.1). Für Translin werden in der Literatur verschiedene Rollen diskutiert: es hat eine enge Beziehung zu einem Bindungspartnerprotein (TRAX „Translin Associated – Factor – x“), und wird in einer ganzen Reihe von unterschiedlichen Spezies exprimiert. Die Generierung einer Translin^{-/-} Maus hat aber nachweisen können, dass es anscheinend nicht zwingend zum Überleben notwendig zu sein scheint. Zwar waren diese Mäuse vermindert fruchtbar und wiesen einige Verhaltensauffälligkeiten und Veränderungen in der Genexpression des ZNS auf, aber dennoch prinzipiell zum Überleben befähigt^{39, 138}.

Translin defiziente männliche Mäuse weisen eine geringere Fruchtbarkeit auf und produzieren weniger Spermatozoen als Wildtypkontrollen. Darüber hinaus entwickeln sich einige Keimzellen nicht über die erste Metaphase hinaus und Translin defiziente weibliche Mäuse werfen kleinere Abkömmlinge⁸. In unserem Modell hingegen, bleibt die funktionelle Bedeutung der verminderten Translinexpression unklar. Zwar berichtete die Gruppe um Garry, dass ihr Myo^{-/-} Mausmodell in utero eine erhöhte Sterblichkeitsrate aufweist¹⁸⁴, aber unser Myo^{-/-} Stamm weicht in mehreren Aspekten von ihrem Myo^{-/-} Stamm ab. So wies unser Myo^{-/-} Mausmodell weder eine erhöhte Sterblichkeit in utero, noch eine verminderte Fruchtbarkeit auf.

Unter hypoxischen Bedingungen ist in Myo^{-/-} Mäusen die **RNA Polymerase II (Pol II) Subeinheit 3 (RPB3)** um – 47% signifikant vermindert exprimiert (Tabelle 4.3). In eukaryoten Zellen ist die RNA Polymerase II für die Synthese aller Protein codierender RNA Stränge, sowie der meisten nicht Protein codierenden RNA Stränge (wie small nuclear RNA, small nucleolar snoRNA, microRNA miRNA) verantwortlich¹⁵⁸. RPB3 wird beim Menschen in hohem Masse in Herz – und Skelettmuskulatur exprimiert⁷². In einem Mausmodell mit mutierter RPB 3 war die Myogeninaktivität und die Muskeldifferenzierung erheblich beeinträchtigt, während die Überexpression von RPB 3 zu einer gesteigerten Myogeninaktivität führte. Somit scheint RPB 3 eine Rolle in der gewebespezifischen Transkription und Entwicklung des Muskelgewebes zu haben⁵¹. Myogenin ist ein essentieller Transkriptionsfaktor für die Entwicklung der Muskulatur. Myogenin^{-/-} Mäuse überleben zwar die fetale Entwicklungsphase, sterben aber bereits kurz nach der Geburt¹¹⁸.

Zwar ist eine unterschiedliche Expression einer an der Muskeldifferenzierung beteiligten RNA Polymerase in Myoglobin^{-/-} Mäusen nicht überraschend, aber die funktionelle Bedeutung einer um knapp die Hälfte verminderten Expression in Myo^{-/-} Mäusen unter hypoxischen Bedingungen bleibt zunächst spekulativ.

Neben den bereits erwähnten Genen, finden sich auch signifikante Expressionsunterschiede an einigen Genen, denen eine Rolle in der Regulation der Proteinsynthese, Proteinprozessierung und der Proteindegradation zukommt. Darunter **Ubiquitin** und das mit ihm funktionell verbundene **Ubiquitin –conjugating Enzyme E2**, welche unter hypoxischen Bedingungen in Myo^{-/-} Mäusen signifikant vermindert exprimiert (– 35%, bzw. – 29%), sowie das **Calpain 4**, welches um – 38% signifikant vermindert exprimiert wird (Tabelle 4.3).

Wie der Name vermuten lässt, wird **Ubiquitin** in allen eukaryoten Geweben exprimiert. Neben der Funktion als „Qualitätskontrolle“ für Proteine (über das

Ubiquitin – Proteasomen System, „UPS“) werden dem Ubiquitinsystem eine Funktion in einer ganzen Reihe von biologischen Prozessen zugeschrieben, darunter: Verarbeitung von Antigenen, Apoptose, Biogenese von Organellen, Modulation von Oberflächenrezeptoren und Ionenkanälen etc.

Interessanterweise spielt das UPS eine Rolle in der Regulation des Proteinumsatzes im Herzen. Das UPS markiert gewissermaßen für den Abbau vorgesehene Proteine. Solomon und Goldberg konnten 1996 in einem Kaninchenmodell nachweisen, dass Myosin, Aktin, Troponin und Tropomyosin in einem Proteasomenabhängigen Prozess abgebaut werden können²⁴⁵. Seitdem konnte in einer ganzen Reihe von Krankheitsmodellen nachgewiesen werden, dass die Expression und Aktivität von verschiedenen Bestandteilen des UPS eine Rolle spielt (so z.B. Atrophie in Skelettmuskulatur etc.)^{21, 165}. Auch in der Atrophie der Herzmuskulatur spielt das UPS eine Rolle²⁷⁹. Der E2 Familie der Ubiquitin conjugating Enzyme kommt dabei eine regulatorische Funktion im UPS System zu, indem Sie über unterschiedliche Mechanismen die UPS Aktivität beeinflussen und das Ergebnis (Proteinlokalisierung, Proteininstabilität oder Proteindegradation) modifizieren²⁶⁵.

Die Calpain small subunit 1 (vormals als **Calpain 4** bezeichnet) wird in hypoxischen $Myo^{-/-}$ um – 38% signifikant vermindert exprimiert (Tabelle 4.3).

Das Calpain System („Calcium Ion dependent papain like“) umfasst eine Familie von Ca^{2+} abhängigen, nicht lysosomalen Cysteinproteasen, die sowohl in atrophischen als auch hypertrophischen Zuständen eine Rolle spielt²¹³. Es handelt sich hierbei um eine regulatorische Subeinheit sowohl von μ -Calpain, als auch m -Calpain (respektive Calpain I und II). Ein homozygoter Knockout Modell für das Calpain 4 ist nicht überlebensfähig. Die Embryos sterben am 10 Tag nach der Empfängnis ab, und weisen Defekte in der vaskulären Entwicklung auf.

Von Calpain 4^{-/-} stammende Fibroblasten weisen eine verminderte Zellmigration auf, und ihr Aktin Zytoskelett, die Ausbildung von Filopodien und die Verteilung der von Integrin abhängigen fokalen Adhäsionskomplexe sind in diesen Zellen vermindert⁶¹.

Die Beteiligung von Calpain I und II wurde für verschiedene kardiale Erkrankungen nachgewiesen. Patienten mit Herzinsuffizienz (NYHA II) wiesen einen erhöhten Proteingehalt von Calpain I, aber nicht Calpain II auf. Verschlechterte sich die Herzinsuffizienz (NYHA III und IV) wurden beide Proteine vermehrt exprimiert, so dass angenommen wird, dass Calpain eine Rolle bei Erkrankungen, die durch eine Geweberemodellierung gekennzeichnet sind zukommt²²⁰.

Da in unserem $Myo^{-/-}$ Mausmodell sowohl die RNA Polymerase II, die Ubiquitinexpression und die Expression des an der Regulation von Ubiquitin beteiligte E2 conjugating Enzymes, sowie die Expression von Calpain I und II kontrollierende Calpain small subunit (vormals Calpain 4) signifikant erniedrigt waren, kann daher spekuliert werden, dass der hypoxische Stimulus in den Kardiomyozyten von $Myo^{-/-}$ auf struktureller Ebene Veränderungen in Bezug auf die Proteinlokalisierung, Proteininstabilität bzw. Proteindegradation in Gang setzt, die in der Summe zum Erhalt der Leistungsfähigkeit des Phänotyps beitragen.

Verschiedene an der Signaltransduktion beteiligte Proteine sind unter hypoxischen Bedingungen bei $Myo^{-/-}$ Mäusen differentiell exprimiert.

So wird das **High mobility group protein I** um +107% heraufreguliert, während **Annexin A2** um – 36% und die **MAPK Kinase 7** um – 50% signifikant vermindert exprimiert werden (Tabelle 4.3).

Die High mobility Group (HMG) umfasst eine Familie von nicht Histon gebundenen Proteinen, die an der Transkription, Replikation, Rekombination und DNS Reparatur beteiligt sind. Diese Proteinfamilie wurde vor über 30 Jahre entdeckt und nach ihrer Beweglichkeit in Polyacrylamidgelen benannt¹⁹¹.

In normal ausdifferenzierten Zellen befindet sich die HMGA Expression auf einem niedrigen Niveau²²¹. Eine experimentelle Überexpression sowohl von HMGA I Proteinen induziert in normalen Zellen eine maligne Transformation und fördert neoplastische Progression, sowie Metastasierungen^{59, 222}. Proteine sind als Modulatoren der chromosomalen Chromatinstruktur in der Regulation von mehr als 100 unterschiedlichen Genen involviert. Eine Übersicht über die HMGA assoziierten Funktionen findet sich bei Cleynen und van de Ven⁴⁴.

Die vermehrte Expression von HMGA 1 in Myo^{-/-} nach hypoxischem Stimulus ist ein deutlicher Hinweis auf die Induktion kompensatorischer Gene, um dem weiter verminderten O₂ Angebot phänotypisch besser begegnen zu können. Hinweise eine erhöhte Rate an malignen Veränderungen fanden sich in unserem Mausmodell nicht. Allerdings wurden die meisten Versuchstiere nach Beendigung der Versuchsreihe verwertet, und in unserer Versuchsreihe keine gezielte Langzeitbeobachtung einer Kohorte über mehrere Monate durchgeführt. Allerdings ist die Myo^{-/-} Mauslinie an unserem Institut bereits seit Jahren etabliert und es hat sich bislang noch keine erhöhte Rate an malignen Erkrankungen offenbart. Andererseits werden die Tiere im Regelfall aber unter normoxischen Bedingungen gehalten, unter der sich in unserem Versuch keine erhöhte HMGA I Expression nachweisen ließ.

Annexin A2 wird in hypoxischen Myo^{-/-} Mäusen um – 36% signifikant vermindert exprimiert (Tabelle 4.3). Annexine beinhalten eine große Familie strukturell verwandter Proteine, ihre gemeinsame Eigenschaft besteht darin, Ca²⁺ abhängig reversibel negativ geladene Phospholipide zu binden.

Für Annexin A2 werden unterschiedliche Funktionen diskutiert. So bindet es F – Aktin und verursacht Ca²⁺ abhängig eine Filamentbündelung^{98, 119}, was möglicherweise in der Organisation von auf der Zelloberfläche gelegenen cholesterolreichen Membrandomänen eine Rolle spielen könnte, darüber hinaus könnte durch die Verbindung zum Zytoskelett Annexin A2 eine Rolle bei endo – und exozytotischen Vorgängen zukommen⁴⁵.

Im Myokard ist Annexin A2 vor allem in den intramyokardialen Kapillaren, der extrazellulären Matrix und den Endothelzellen der Koronarien nachweisbar²⁶⁰. Sowohl in einem Tiermodell (Meerschweinchen), als auch beim Menschen konnten bei Vorliegen einer Herzinsuffizienz erhöhte Expressionen Annexin A2 nachgewiesen werden^{15, 260}. Dabei war das Annexin A2 vor allem im Interstitium zwischen den Kardiomyozyten und um die Koronarien lokalisiert, nicht jedoch in den Kardiomyozyten. Ling et al konnten in einem homozygot Annexin A2 negativen Mausmodell nachweisen, dass Annexin A2 in der Regulation der Fibrin Homöostase und an der Neoangiogenese beteiligt ist^{79, 166}. Darüber hinaus sind Annexin A2 defiziente Mäuse etwas kleiner als Wildtypiere und zeigten eine verminderte Fähigkeit arterielle Thromben aufzulösen. Die Überexpression von Annexin A2 in leukämischen Blasten während der Promyelozytenleukämie hingegen kann zu einem hyperfibrinolytischen Zustand mit ausgeprägter Blutungsneigung führen^{79, 186}. Die Bedeutung von Annexin A2 in der vaskulären Homöostase wird anschaulich bei Flood dargestellt⁷⁹.

Phänotypisch war in unseren $Myo^{-/-}$ Mäusen trotz erhöhtem Hb Spiegel und erhöhtem HKT kein vermehrtes Vorkommen von arteriellen oder venösen Thromben festzustellen. Möglicherweise ist eine um ca. 36% verminderte Expression von Annexin A2 auch nicht ausreichend, um einen solchen phänotypisch eindeutigen Effekt auf die Fibrin Homöostase auszuüben. Eine detaillierte Analyse der Gerinnungsparameter war nicht Bestandteil unseres Versuchsaufbaus, es ist allerdings denkbar, dass unter hypoxischen Bedingungen in $Myo^{-/-}$ Mäusen das Gleichgewicht zwischen Fibrinolyse und Fibrinbildung verschoben wird, oder das ein etwaiger prothrombotischer Effekt durch die verminderte Expression von Axl (s.o.) wieder ausgeglichen wird.

Die Expression der **MAPK Kinase 7** (Mitogen activated protein Kinase Kinase 7) ist in $Myo^{-/-}$ Mäusen nach zweiwöchiger Hypoxie um – 50% signifikant vermindert. MAPK Kaskaden sind Signalübertragungswege, die über mehrstufige Enzymreaktionen via Phosphorylierung/ Dephosphorylierungsprozesse die intrazelluläre Genexpression modifizieren.

In der Maus wird MAPKK 7 in allen Geweben exprimiert und aktiviert JNKs (c – Jun NH2 Terminal protein Kinase), in der Maus wird allerdings zusätzlich auch MAPKK 4 für die Aktivierung benötigt²⁷⁵. MAPKK 4 bzw. MAPKK 7 null Mäuse sind nicht überlebensfähig und sterben im Embryonalstadium ab, der Erhalt des jeweiligen anderen Signalübertragungsweges (MAPKK 4 bzw. 7) reicht nicht aus^{271, 275}.

Ein Mausmodell mit einer dominanten mutierten Form von MAPKK 7 entwickelte eine signifikante Zunahme der JNK Aktivierung. Diese Mäuse entwickelten eine diastolische Funktionsstörung und starben nach ca. 7 Wochen unter Zeichen einer Herzinsuffizienz, bildeten allerdings keine kardiale Hypertrophie auf. Die Compliance dieser Herzen war vermindert, die vermehrte Steifheit wurde auf eine vermehrte interstitielle Akkumulation von Fibronectin zurückgeführt²⁰⁸. Eine Mikroarray Analyse der Genexpression konnte nachweisen, dass die Aktivierung des MAPKK 7/ JNK Signalwegs eine Reihe von Genen beeinflusst, die in der Angiogenese, K^+ Homöostase und für die extrazelluläre Matrix von Bedeutung sind¹⁸⁸.

Die konkrete funktionelle Bedeutung der um die Hälfte abgenommenen MAPK Kinase 7 Expression unter hypoxischen Bedingungen bleibt in unserem Modell zunächst unklar, vermutlich besteht aber ein Zusammenhang mit Veränderungen im MAPKK 7/JNK Signalweg.

Über die bereits diskutierten Veränderungen in der Expression von Struktur – und Signalgenen, sowie von Kontrollgenen der Proteinsynthese und Proteindegradation, kommt es auch zu auffälligen Expressionsänderungen von an Stoffwechselprozessen beteiligten Genen.

So ist beispielsweise in $Myo^{-/-}$ Mäusen die Expression der **Cytochrome Oxidase Vb (COX 5b)** in $Myo^{-/-}$ Mäusen mit + 34% signifikant gesteigert (Tabelle 4.1). Die Cytochrome Oxidase (COX) ist das letzte Enzym in der mitochondrialen Elektronentransportkette, bei der Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Bei Säugern besteht das Enzym aus 13 Untereinheiten, das sowohl in der mitochondrialen als auch genomischen DNS verschlüsselt wird²⁶¹. Die Expression der Subeinheit Vb variiert in unterschiedlichen Geweben, wobei Gewebe mit höheren metabolischen Anforderungen im Regelfall auch die höchste Expression der COX 5b aufweisen. So ist die Expression von COX 5b im Mäuseherz bzw. Mäuseniere 10 bis 20 – fach erhöht gegenüber der Mausleber¹⁴.

Darüber hinaus ist die gesteigerte Cytochromoxidaseexpression ein weiterer Beweis für die effektive Generierung einer hypoxischen Situation, denn wie Burke an Hefen nachweisen konnte, wird COX 5b nur unter hypoxischen Bedingungen exprimiert (Expression von COX: erst unter 10 $\mu\text{M O}_2$; Raumluft enthält ca. 200 $\mu\text{M O}_2$)³⁰.

Zwar ist die genaue Funktion der Subeinheit 5b noch nicht bekannt, aber Experimente an Zellkulturen lassen auf eine regulatorische Rolle bei der Zusammenstellung des Cytochrome Oxidase Komplexes schließen. Darüber hinaus führte die Verminderung des COX5b Gehaltes zu einer insgesamt verminderten Cytochromoxidase Funktion mit einer geringeren ATP Produktion bei gleichzeitig vermehrter Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)⁸⁸. Menschen mit Cytochrom C Oxidase Defekten entwickeln unter anderem hypertrophe und dilatative Kardiomyopathien^{128, 177}.

Die Elektronentransportkette kann reaktive Sauerstoffspezies generieren, insbesondere, wenn der Elektronentransport durch Inhibitoren beeinträchtigt wird oder von der oxidativen Phosphorylierung entkoppelt wird³⁶. Auch Hypoxie kann den oxidativen Stress und den ROS Spiegel erhöhen, wobei derzeit noch nicht geklärt ist, ob der erhöhte ROS Spiegel infolge einer gesteigerten ROS Produktion oder infolge vermindertem ROS Abbau zu erklären ist³⁶. Castello und Woo schlagen darüber hinaus vor, dass auch die Cytochromoxidase, genau wie Hämoglobin und Myoglobin, als NO^{2-} Reduktase fungieren kann und NO generiert. In einem Zellkulturmodell an Hefen konnte die Gruppe nachweisen, dass die COX 5b Isoform eine höhere NO Rate aus NO^{2-} generiert, als COX 5a³⁶.

Da COX 5b vor allem unter hypoxischen Bedingungen vermehrt exprimiert wird, ist die Steigerung der COX 5b Expression in der $\text{Myo}^{-/-}$ Gruppe gegenüber der Wildtypgruppe um knapp +34% hinreichend erklärbar. Es ist denkbar, dass die vermehrte COX5b Expression – trotz normoxischer Bedingungen – einen Kompensationsmechanismus zum Ausgleich der verstärkten ROS Belastung darstellt, da Myoglobin als NO Reduktase nicht mehr zur Verfügung steht.

Die deutlichste Expressionsänderung zeigte sich bei **KLBP**, welches unter normoxischen Bedingungen in $\text{Myo}^{-/-}$ Mäusen um +425 % gesteigert wird (Tabelle 4.1). Das Keratinocyte Lipid Binding Protein gehört zur Familie der intracellulär Lipid Binding Proteins (iLBP) und firmiert mittlerweile als FABP 5 (Fatty acid binding protein 5). Es sind mittlerweile 14 Mitglieder dieser Familie bekannt und es kann derzeit noch nicht allen eine spezifische biologische Funktion zugewiesen werden.

FABP 5 (vormals auch als KLBP oder Mal -1 bezeichnet) wurde erstmals 1993 von Krieg in einem experimentellen Hautkrebsmodell der Maus beschrieben. Die Expression der meisten FABPs ist gewebespezifisch. FABP 4 und 5 kommen vor allem in Fettgewebe¹⁷² vor und beide Isoformen haben eine hohe Affinität zu hydrophoben Liganden wie gesättigten und ungesättigten Fettsäuren.

Hauptsächlich dient FABP 5 dazu, intrazellulär Fettsäuren zu den Organellen zu transportieren. FABP 5 negative Mäuse haben eine etwas verbesserte Insulinsensibilität, ohne größere Veränderungen an der Körperfettmasse aufzuweisen¹⁷². FABP 5 überexprimierende Mäuse hingegen zeigen sowohl basal, als auch unter Isoproterenolstimulation eine erhöhte Lipolyserate,¹²⁴ sowie eine erhöhte Insulinresistenz mit erhöhtem basalem Glukosespiegel¹⁷².

In $\text{FABP4}^{-/-}$ Mäusen ist die Expression von FABP 5 kompensatorisch deutlich erhöht, so dass es schwierig war, die physiologische Bedeutung der FABP 4 Defizienz isoliert zu erfassen. Maeda und Mitarbeiter haben daher in einem kombiniertes FABP

4 und FABP 5 defizientes Mausmodell generiert. Die kombinierte Defizienz ändert die metabolische Regulation und schützt die betroffene Knockout Maus vor der Entwicklung eines metabolischen Syndroms¹⁷³, was auf eine zentrale Bedeutung dieser beiden Chaperone in der metabolischen Regulation hindeutet und potentiellen Zielrezeptoren für eine therapeutische Beeinflussung des metabolischen Syndroms macht. Tatsächlich konnte die orale Substitution von aP2 (FABP4) in einem Mausmodell zur Therapie von Diabetes mellitus 2 und Arteriosklerose eingesetzt werden.⁸⁵ Die gleiche Arbeitsgruppe konnte im weiteren Verlauf nachweisen, dass die Inaktivierung beider FABPs (Double Knockoutmodell) in Adipozyten zu einer verminderten Zytokinexpression in Makrophagen führt, während die Inaktivierung in Makrophagen wiederum eine verbesserten Insulinwirksamkeit und verbesserter Glukoseaufnahme in Adipozyten verursacht⁸⁶. Angesichts der volkswirtschaftlich und gesundheitsökonomischen Bedeutung des metabolischen Syndroms und der mit ihr assoziierten Erkrankungen (Diabetes mellitus, KHK, Arteriosklerose etc.), ist die Erforschung der molekularen Regulationsvorgänge lohnenswert. Da die FABP5 Expression in Myo^{-/-} Mäusen unter basalen Bedingungen um mehr als das vierfache erhöht ist, wäre es in zukünftigen Untersuchungen zu prüfen, ob sich histologisch an der Leber Anzeichen für eine erhöhte Lipolyse zeigen und ob Myo^{-/-} Mäuse auch einen erhöhten basalen Glukosespiegel aufweisen.

Zusätzlich könnte die murine FABP 5 auch eine Rolle als Radikalfänger spielen. Im murinen FABP 5 befindet sich zwischen dem Cys 120 und 127 eine Disulfidbrücke innerhalb der Bindungsstelle und in direkter Nachbarschaft zu OH Gruppe der zu bindenden Fettsäure. Bernlohr et al haben nachgewiesen, dass das Cys 120 durch 4 – Hydroxynoneal (ein Lipid, das vor allem unter oxidativen Stress und in Alterungsprozessen gebildet wird) kovalent modifiziert wird. Die Autoren schlagen vor, dass FABP 5 durch die kovalente Modifikation am Cys 120 eine Rolle im Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies spielen könnte. Da in unserem Modell durch den Wegfall von Myoglobin ein protektiver Faktor gegen reaktive Sauerstoffspezies entfällt, wäre dieses Konzept schlüssig¹⁶.

Die iLBPs dienen jedoch nicht nur dem Transport von Fettsäuren und Retinoiden, sondern können auch mit nukleären, Ligandenaktivierten Transkriptionsfaktoren interagieren. Für FABP 5 wurde nachgewiesen, dass es sich mit dem Cellular Retinoic Acid – Binding Protein II (CARBP – II) verbindet und gemeinsam mit dem nukleären Transkriptionsfaktor RAR (Retinoic Acid Receptor) den nukleären Transkriptionsfaktor bzw. PPAR β/δ (Peroxisome Proliferator – Activated Receptor) aktiviert (FABP 4 aktiviert PPAR γ)²⁵². Der so aktivierte Rezeptor PPAR β/δ (Peroxisome Proliferator – Activated Receptor) selbst besitzt antioxidative Eigenschaften, so schützt er in einem Zellkulturmodell Kardiomyoblasten vor einer H₂O₂ induzierten Apoptose²⁰⁶. Retinoic Acid (RA) kann sich inhibitorisch auf das Zellwachstum auswirken, sich in einigen Geweben jedoch paradoxerweise förderlich auf das Zellüberleben auswirken und Hyperplasie fördern. Die Gruppe um Schug konnte 2007 nachweisen, dass RA in Abhängigkeit vom intrazellulärem Verhältnis von CRABP – II / FABP5 entweder pro – apoptotisch oder wachstumsfördernd auswirkt. So wirkt es in Zellen mit einem hohen CRABP – II / FABP 5 Verhältnis pro – apoptotisch, in Zellen mit hohem FABP 5 Spiegel hingegen fördert RA via PPAR β/δ das Zellüberleben²³⁷.

In unserem Zusammenhang ist die Aktivierung des Rezeptors PPAR β/δ durch eine erhöhte FABP 5 Expression aber eher aus einer metabolischen Betrachtungsweise

her von Interesse. Der aktivierte PPAR β/δ Rezeptor ist ein potenter Inhibitor der PPAR α Aktivität, einem Schlüsselenzym der β – Oxidation von Fettsäuren.

Das Herz verstoffwechselt zur Gewinnung von energiereichen Phosphaten Fettsäuren und Glukose^{169, 250}. Es ist bekannt, dass in einigen kardialen Erkrankungen wie beispielsweise der ischämischen Kardiomyopathie, Herzinsuffizienz oder beispielsweise der dilatativen Kardiomyopathie auch eine vermehrte Verstoffwechslung von Glukose anstelle von Fettsäuren stattfindet²²⁹. Darüber hinaus zeigte O'Brien, dass bei dilatativen und ischämischen Kardiomyopathien auch ein um ca. 50% verminderter Myoglobingehalt nachweisbar ist¹⁹⁵.

Es lag daher nahe, die Hypothese zu testen, ob eine reine Koinzidenz vorliegt, oder ein verminderter Myoglobingehalt in einem kausalen Zusammenhang mit der vermehrten Verstoffwechslung von Glukose stehen könnte.

Tatsächlich gelang Flögel und Gödecke nach Abschluss unserer Untersuchungen der Nachweis, dass ein Myoglobinmangel einen Wechsel in der kardialen Substratelektion verursacht. Mittels PET konnte nachgewiesen werden, dass die Myo^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtypieren mehr Glukose und weniger Fettsäuren verbrennen. Darüber hinaus war die Expression von PPAR α als wesentlichem Schlüsselenzym der β Oxidation in Myo^{-/-} Mäusen um ca. 40% vermindert, während die Expression des wichtigsten kardialen Glukosetransporters Glut 4 gesteigert war⁷⁶. Dies erscheint physiologisch sinnvoll, da die myokardiale Verstoffwechslung von Fettsäuren in vivo bis zu 48% mehr O₂ beansprucht als die Verstoffwechslung von Glukoseabkömmlingen¹⁵⁴, insofern wäre eine Änderung der Substratauswahl ein additiver Mechanismus zur O₂ Einsparung.

Im Lichte dieser Erkenntnisse, ist es denkbar, dass dieser Effekt in der Myo^{-/-} Maus auch über den durch FABP 5 aktivierten PPAR β/δ vermittelt wird (leider ist der durch FABP 5 aktivierte Rezeptor selbst nicht auf dem Array repräsentiert). Wie bereits erwähnt, ist der strukturell verwandte PPAR α Rezeptor ein Schlüsselenzym im Fettsäurestoffwechsel und aktiviert Enzyme, die an der Fettsäureaufnahme und Oxidation beteiligt sind¹³³.

Transgene Mäuse mit einer herzspezifischen Überexpression von PPAR α entwickeln einen metabolischen Phänotyp, der dem diabetischen Herz ähnelt: erhöhte Rate der Fettsäureoxidation, verminderte Glukoseverwertung, Triazylglizeridakkumulation in den Myozyten und Kardiomyopathie²⁹. Transgene PPAR β/δ defiziente Mäuse entwickeln eine myokardiale Lipidakkumulation und Kardiomyopathie. Kardiales PPAR β/δ überexprimierende Mäuse hingegen wiesen keine Kardiomyopathie auf, sondern wiesen eine vermehrte Glukoseverwertung auf und ebenfalls eine vermehrte Expression des Glukosetransporters Glut 4²⁹, wie Sie auch von Flögel für die Myo^{-/-} Maus nachgewiesen wurde⁷⁶.

Diese Befunde lassen darauf schließen, dass PPAR α Schlüsselenzyme im Glukosestoffwechsel unterdrückt, während der strukturell ähnlich aufgebaute PPAR β/δ Rezeptor den Glukosestoffwechsel und eine wichtige Rolle in der kardiale Lipidhomöostase spielt fördert.

Es liegt somit nahe, zu vermuten, dass tatsächlich eine funktionelle Beziehung zwischen der Myoglobin Defizienz und dem Wechsel in der kardialen Substratauswahl vorliegt, und dass dieser möglicherweise vermittelt wird über die vermehrte Expression von FABP5 und die Aktivierung von PPAR β/δ . Ein solcher Zusammenhang ist in der Literatur noch nicht beschrieben.

5.5 Fazit und Ausblick

Unsere Versuche dienten der besseren Charakterisierung der Myoglobin Mangelmutante und der Beantwortung der Frage, ob die unter basalen Bedingungen phänotypisch gut kompensierten Myo^{-/-} Mäuse unter dem erhöhtem physiologischem Stress einer chronischen Hypoxie (zwei Wochen, bei 10% O₂ Konzentration) am Phänotyp der Myoglobin^{-/-} Mutanten Anzeichen einer funktionellen Dekompensation aufweisen. Ein solches Funktionsdefizit liess sich jedoch nicht nachweisen.

Tatsächlich sind die von Gödecke berichteten kompensatorischen Anpassungen in der Myo^{-/-} Maus offensichtlich ausreichend, um selbst unter normobarer Hypoxie einen im wesentlichen kaum beeinträchtigten Phänotyp hervorzubringen¹⁰². Isolierte Herzen des Düsseldorfer Myo^{-/-} Mausstammes zeigten sich in der Erstbeschreibung durch Gödecke im Vergleich zu Wildtyptieren sowohl unter basalen Bedingungen, als auch nach β adrenerger Stimulation weder im Hinblick auf Energiehaushalt, noch im Sauerstoffverbrauch verschieden¹⁰². In ähnlicher Weise konnte durch die vorliegende Arbeit auch am lebenden Organismus gezeigt werden: verschiedene Hämodynamische Parameter, Herzfrequenz, mittlerer arterieller Druck etc. waren unter basalen Bedingungen zwischen den verschiedenen Kollektiven nicht unterschiedlich. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen sank die Ejektionsfraktion in Myo^{-/-} Mäusen signifikant ab und das enddiastolische Volumen nahm signifikant zu.

In unserer detaillierteren Analyse zeigen sich zwar auf funktioneller Ebene vereinzelte Unterschiede zwischen Wildtyp und Myo^{-/-} Mäusen. So war beispielsweise in den Myo^{-/-} Tieren war der Plasma Bikarbonatgehalt erniedrigt, ebenso die Anzahl der Retikulozyten bei zeitgleich geringem, dennoch signifikanten Anstieg des MCV der Erythrozyten (was auf eine leicht beeinträchtigte Erythrozytenproduktion im Myo^{-/-} Kollektiv hindeuten könnte), diese Unterschiede zeigen aber, dass auf der Ebene des Stoffwechsels kompensiert wird.

Die Fähigkeit der Myo^{-/-} Mäuse trotz des Verlustes eines wichtigen O₂ Transport und Speicherproteins sich an die Bedingungen einer verlängerten hypoxischen Periode adaptieren können, ist erstaunlich. Im Verlauf unserer MRT Untersuchungen haben wir außerdem die Beobachtung gemacht, das Myo^{-/-} Mäuse, die mittels Isofluran anästhesiert waren unter Hypoxie eine Verringerung der Herzfrequenz aufwiesen, während eine Anästhesie mittels Urethan keinen Einfluss auf die Herzfrequenz hatte. Darüber hinaus, waren keine Veränderung der Herzfrequenz bei einer Myoglobin Knockout Maus feststellbar, die zwei Wochen via Telemetrie beobachtet worden war (unpubliziert).

Daher scheint das Isofluran unter den spezifischen Bedingungen des Sauerstoff und Myoglobinmangels bei gleichzeitig aktivierten Kompensationsmechanismen hierfür verantwortlich gewesen zu sein.

Ausgehend von der Überlegung, dass Myo^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Wildtyptieren einem erhöhten nitrosativen und oxidativen Stress ausgesetzt sind (beides Faktoren, von denen bekannt ist, dass Sie zu Veränderungen in der Genexpression führen können), stellten wir uns die Frage, ob eine detaillierte Analyse der Genexpression mögliche Unterschiede zwischen beiden Gruppen offenbaren würde.

Tatsächlich offenbarte die cDNA Array Analyse eine Reihe von differentiell exprimierten Genen, die in der Summe auf zellulärer Ebene zur Kompensation der Myoglobindefizienz beitragen können (beispielsweise durch verändert exprimierte

Proteine des im kardialen Metabolismus oder von Strukturproteinen des Zytoskeletts).

Das Herz als niemals ruhender Muskel ist auf die permanente Versorgung energiereicher Phosphatverbindungen angewiesen. Die Aufnahme von freien Fettsäuren durch das Herz beruht auf hochaffinen Bindungen an Membranproteinen und passiven Flip – Flop Mechanismen durch die Phospholipiddoppelschicht, woran sich ein intrazellulärer Transport via zytosolischer FABPs zu den Mitochondrien anschließt. Die Expression der KLBP (respektive FABP 5) ist in dem $Myo^{-/-}$ sowohl unter basalen (+425%) Bedingungen deutlich erhöht. Zusätzlich ist auch die Expression der Adipozyten FABP mRNA im $Myo^{-/-}$ Kollektiv unter basalen Bedingungen signifikant (+ 17%) erhöht²³⁴. Wie Flögel und Laussmann nach Abschluss unserer Arbeit nachweisen konnten, ist bei $Myo^{-/-}$ Mäusen die Expression mehrerer Enzyme der β – Oxidation substantiell vermindert, was auf eine Verschiebung des Stoffwechsels von der Fettsäureverbrennung in Richtung Glukoseutilisation unter den Bedingungen des Myoglobinmangels hinweist⁷⁶ und möglicherweise einen metabolischen Beitrag zur O_2 Einsparung darstellt, da die Verstoffwechslung von Glukose bis zu 48% weniger O_2 benötigt, als die Verstoffwechslung von Fettsäuren¹⁵⁴. Als möglicher Mediator dieser Veränderungen in der $Myo^{-/-}$ Maus könnte auf zellulärer Ebene die Aktivierung des PPAR β/δ Rezeptors über die vermehrte Expression von FABP5 in Betracht kommen. Ein solcher Zusammenhang ist aber in zukünftigen Arbeiten erst noch nachzuweisen.

Bereits die initiale Beobachtung, dass an einem $Myo^{-/-}$ Mausstamm keine offensichtlichen Defizite bei $Myo^{-/-}$ Mäusen auftraten, war erstaunlich⁹³. Garry folgerte, dass Myoglobin in vivo wohl keine wesentliche Funktion auszuüben scheint, und auf bislang ungeklärtem Weg der evolutionären Deletion entgangen sei. Diese Schlussfolgerung wurde durch die Etablierung und erste Charakterisierung eines anderen $Myo^{-/-}$ Stammes durch Gödecke et al. widerlegt. Es zeigte sich, dass in der $Myo^{-/-}$ Maus der O_2 Gradient zu den Mitochondrien steiler gestellt wird. Unter anderem lag in $Myo^{-/-}$ Mäusen eine Erhöhung des Hämatokrits, der Kapillarisation und des Koronarflusses vor¹⁰².

Sowohl die Gruppe um Garry als auch wir in der vorliegenden Arbeit haben unser transgenes $Myo^{-/-}$ Mausmodell einem erhöhten physiologischen Stress unter hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, allerdings mit konträren Ergebnissen. Garry et al berichteten über Anzeichen einer kardialen Dekompensation unter Hypoxie, darüber hinaus sei die Sterblichkeitsrate in utero bei $Myo^{-/-}$ Mäusen erhöht^{176,184}. Eine Exposition unter hypoxischen Bedingungen habe in seinem $Myo^{-/-}$ Stamm echokardiographisch zu einer Verringerung der systolischen Pumpleistung um bis zu 30% geführt, die bei Reexposition zu normoxischen Bedingungen reversibel gewesen sei¹⁷⁶. Wir hingegen konnten weder eine erhöhte Sterblichkeits – oder Missbildungsrate in der $Myo^{-/-}$ Gruppe, noch eine wesentliche Funktionsminderung unter hypoxischen Bedingungen feststellen. Vermutlich liegen die Gründe im unterschiedlichen genetischen Background der Tiere. Während Garry et al (lt. persönlichen Angaben) einen C57BL/6 Stamm verwendeten⁹³, basieren unsere Versuchstiere auf einem NMRI Stamm²³⁸.

Dass ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund zu unterschiedlichen Phänotypen führen kann, ist bekannt. So zeigten bereits Danksy et al, das transgene Apolipoprotein defiziente Mäuse (ApoE) in Abhängigkeit vom verwendeten Stamm ein unterschiedliches Ausmaß von Arteriosklerose aufwiesen.

Beispielsweise weisen die von einem C57BL/6 abstammenden ApoE^{-/-} Mäuse im Vergleich zu Abkömmlingen aus einem FVB Stamm eine 5 – fach erhöhte Rate an arteriosklerotischen Läsionen auf, obwohl Sie geringere Serumcholesterinspiegel aufwiesen^{55,234}. Auch transgene Mäuse ohne die mitochondriale Superoxid Oxidase (SOD2) wiesen unterschiedlichen Phänotypen in Abhängigkeit zum verwendeten Stamm auf. Transgene Tiere die aus einem CD1 Stamm gezüchtet wurden, entwickelten Kardiomyopathien, während Tiere aus anderen Stämmen (129/Sv & C57BL/6) anstelle von Kardiomyopathien eher neurologische Störungen aufwiesen und eine längere Überlebenszeit hatten^{130, 234}.

Das je nach genetischem Background ein unterschiedlicher Phänotyp resultiert, ist ein generelles biologisches Phänomen. Auch bei Fruchtfliegen konnte nachgewiesen werden, dass der resultierende Phänotyp je nach verwendetem genetischen Background deutlich unterschiedlich ausfallen kann und dass von HSP90 möglicherweise eine Pufferfunktion für genetische Veränderungen ausgeht^{140, 228}.

Untersuchungen an Hefen haben gezeigt, dass selbst wenn 80% der Gene ausgeschaltet werden, kein phänotypisch unterschiedliches Wachstumsverhalten resultiert¹⁴⁰.

In ähnlicher Weise weist unsere zeitaufwendige, ausführliche funktionelle und molekularbiologische Analyse am Myo^{-/-} Stamm nach, dass im Detail Veränderungen auf vielerlei Ebenen (struktureller Aufbau, metabolische Regulation und Substratauswahl, Signaltransduktion etc.) stattfinden. Rein makroskopisch sind beide Mausstämmen jedoch – bis auf die hellere Färbung des Herzmuskels in der Myo^{-/-} Maus – zunächst nicht voneinander zu unterscheiden.

Ein Erklärungsansatz für „no Phenotype Knockouts“ liegt in der angenommenen Existenz „genetischer Puffermechanismen“, die aufgrund der Redundanz mehrerer regulatorischer Netzwerke in der Lage sind, einen funktionell und morphologisch kompensierten Phänotyp trotz verändertem Genotyp zu schaffen^{117,140}.

Bislang ist jedoch noch verhältnismäßig wenig über die Prinzipien der Geninteraktion bekannt, sowie bis zu welchem Ausmaß ein unterschiedlicher genetischer Hintergrund den beobachteten Phänotyp zu beeinflussen vermag. Es mehren sich jedoch die Hinweise, dass die Protein Homöostase einen wesentlichen Einfluss auf das Verhältnis von Genotyp zu Phänotyp nimmt. Viele Proteine sind inhärent instabil und selbst geringe Störungen können die Konvertierung vom funktionell aktiven Konformationszustand in einen fehlerhaft – oder entfalteten, inaktiven, ggf. sogar toxischen Zustand verursachen.

Insofern kommt den Homöostasemechanismen (z.B. Chaperone wie HSP 90, Generierung von osmotisch wirksamen Stoffen etc.) eine wichtige Bedeutung zu.

Da Myoglobin ein stark exprimiertes Protein ist und der Verlust trotz Hypoxie vollständig kompensiert werden kann, könnte die Myo^{-/-} Mutante ein geeigneter Modellorganismus für die Detektion von molekularen Regelkreisen sein, die den Funktionserhalt gewährleisten.

Die zum Zeitpunkt der Untersuchungen eingesetzten Genarrays waren zwar in der Lage Tausende von Genen zu analysieren, aber es gibt Schätzungen, dass das Proteom möglicherweise mehr als 200.000 Proteine enthält²³⁴. Heutige Array

Technologien können inzwischen mehrere Zehntausend Gene analysieren. Darüber hinaus ist es heute mit massenspektrometrischen Methoden möglich, die differentielle Proteinexpression z.B. zwischen WT und Myo^{-/-} Mäusen genauer zu analysieren. Damit wird es in Zukunft möglich sein, diejenigen Regelkreise genauer zu identifizieren, die nach Verlust eines wichtigen Proteins des Herzens wie dem Myoglobin, aktiviert werden und einen Funktionserhalt gewährleisten.

6. Zusammenfassung

Obwohl Myoglobin ein wichtiges O₂-Transport und -Speicherprotein ist, weisen Myoglobin^{-/-} Mäuse im Vergleich zu ihren wildtypischen Artgenossen keine offensichtlichen funktionellen Defizite auf. Eine detailliertere Phänotyp Analyse konnte auf funktioneller Ebene multiple Kompensationsmechanismen nachweisen, die in der Summe zum vermeintlich unauffälligen Phänotyp beitragen. Wir vermuteten daher, dass prolongierte Exposition an eine hypoxische Umgebung diese Mechanismen erschöpfen, eine funktionelle Dekompensationen (RR, HZV, Schlagvolumina, MRI, Blutgase etc.) offenbaren, und darüber hinaus zu detektierbaren Veränderungen der Genexpression führen würde.

Myoglobin Verlustmutanten und wildtypische Kontrollen wurden bei Normoxie und bei Hypoxie (2 Wochen bei 10% O₂) untersucht. Unter normoxischen Bedingungen fanden sich nur geringfügige funktionelle Unterschiede zwischen den Gruppen: so zeigte die Myo^{-/-} Gruppe eine höhere Herzfrequenz und mittlerer Blutdruck, bei geringerem endsystolischem und diastolischem Schlagvolumen. Bei Hypoxie reagierten beide experimentellen Gruppen mit einem signifikanten Abfall des pO₂ bei deutlichem Anstieg des pCO₂ und auch die Kapillarisation des Herzens nahm in beiden Gruppen deutlich zu. Der hypoxische Stress demaskierte die unter Normoxie bestehenden geringfügigen Unterschiede. Myo^{-/-} Mäuse wiesen nun ein signifikant höheres endsystolisches Volumen bei gleichzeitig verminderter Ejektionsfraktion auf. In Bezug auf die Hämatopoese besaßen Erythrozyten der Mangelmutanten sowohl bereits basal, als auch unter Hypoxie ein signifikant höheres MCV. Zusätzlich besaßen hypoxische Mutanten signifikant weniger Retikulozyten und der prozentuale Anteil der Retikulozyten im Verhältnis zur Erythrozytenzahl war signifikant erniedrigt. Die Blutgasanalyse ergab in Myo^{-/-} Tieren bei Normoxie bereits einen signifikant verminderten Plasmabicarbonat Spiegel (HCO³⁻). Dies korrelierte mit dem gering azideren Milieu in den Myo^{-/-} Mäusen, wobei die pH Differenz aber nicht das Signifikanzniveau erreichte.

Die Expressionsanalyse identifizierte eine Reihe von Genen, die in Myo^{-/-} Mäusen teils bereits bei Normoxie, teils erst nach Hypoxie signifikant unterschiedlich exprimiert werden. Den identifizierten Genen können vor allem Funktionen bei Stoffwechselprozessen, zellulärer Ultrastruktur, Signalverarbeitung und Proteinsynthese/ Degradation zugewiesen werden. Exemplarisch sei hier die Expressionssteigerung des KLBP 5 um + 425 % bereits bei normoxischen Myo^{-/-} Mäusen erwähnt. Für KLBP 5 ist bekannt, dass es über Zwischenschritte ein Schlüsselenzym der β – Oxidation von Fettsäuren hemmen kann. Dieses Ergebnis ergänzt sehr gut neuere Befunde, denen zufolge eine Myoglobindefizienz mit O₂ einsparenden Veränderungen der kardialen Substratselektion hin zu einer bevorzugten Glukoseutilisation einhergeht. Man kann daher vermuten, dass die erhöhte KLBP 5 Expression ursächlich an dieser Substratselektion beteiligt war.

Zusammenfassend belegen sowohl die funktionellen, als auch die Genarray Analysen, dass in der Myo^{-/-} Mutante auf verschiedenen Ebenen (Herz – Kreislaufsystem, Hämatopoese, Atmung, Kapillarisation, Genexpression) kompensatorische Mechanismen aktiv sind, die in der Summe dazu beitragen, dass die Tiere phänotypisch unauffällig erscheinen und dass sich diese Mechanismen durch Hypoxie weiter stimulieren lassen.

7. Anhang verwendeter Materialien

Chemikalien		
Glycerin	Merck	Darmstadt
Bromphenolblau	Merck	Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck	Darmstadt
Ketavet	Pharmacia & Upjohn	Erlangen
Urethan	Riedel de Haen	Seelze
Rompun 2%	Bayer	Leverkusen
β – Merkcaptoethanol	Merck	Darmstadt
Ethanol	Merck	Darmstadt
Formaldehyd (37 %)	Merck	Darmstadt
Proteinase K	Qiagen	Hilden
Liquemin (Heparin Natrium)	Hoffmann La Roche	Grenzach – Wyhlen
Ethidiumbromid	Merck	Darmstadt
3 – Morpholino- propansulfonsäure (MOPS)	Merck	Darmstadt
50 mM Na – Acetat	Merck	Darmstadt
Formamid	Merck	Darmstadt
³² P Radioisotop	Hartmann Analytik	Braunschweig
Lachssperma DNA	Sigma	München
N ₂ Gas	Linde Technische Gase	Düsseldorf
Cacodylat	Merck	Darmstadt
Enzyme		
Maus – Moloney Leukämie Virus (MMLV)	Gibco – BRL	Eggenstein, CH
RNAse – Inhibitor RNAGuard RNAse Inhibitor	Amersham Pharmacia	Freiburg i. Br.
Primer		
Aktin	Metabion	Martinsried
Keratinocyte Lipid Binding Protein	Metabion	Martinsried
Cytochrome C Oxidase 5b	Metabion	Martinsried
HIF 1 Alpha	Metabion	Martinsried
Verbrauchsmaterialien		
Agarose ultra PURE	Gibco – BRL	Eggenstein, CH
Cellstar	Greiner Labortechnik	Kremsmuenster, AT
Tierfutter	SSNIFF Spezialdiäten	Soest
Kanülen	Terumo	Leuven, BG
BGA Röhrchen	Kabe	Nürnberg
Wells Mikro Amp Optical	Perkin Elmer	Düsseldorf

7. Anhang verwendeter Materialien

Kits		
RNeasy Midi Kit	Qiagen	Hilden
RNase free DNase Set	Qiagen	Hilden
Atlas Pure Total RNA Labeling System	Clontech	Heidelberg
Atlas Mouse 1.2	Clontech	Palo Alto, USA
Atlas Mouse 1.2 II	Clontech	Palo Alto, USA
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems	UK
Arbeitsgeräte		
Homogenisierer (Ultra Turrax T 18)	IKA	Staufen
Wasserbad (WB 14)	Memmert	Schwabach
Zentrifuge (Megafuge 1.0)	Heraeus	Hanau
Spektralphotometer (Lamda 20)	Perkin Elmer	Düsseldorf
Heizelement (Thermomixer 5437)	Eppendorf	Hamburg
Mikrowelle	AEG	Nürnberg
Szintillationszähler (Wallac 1409)	Perkin Elmer Wallac	Düsseldorf
Hybridisierungssofen (OV 3 Shaker)	Biometra	Göttingen
Kühlschrank	Liebherr	Biberach
Imaging Plate (BAS 2040)	Fuji Photo Film (Europe)	Düsseldorf
Phosphorimager (Fuji Fluoreszent image analyzer FLA 2000)	Fuji Photo Film (Europe)	Düsseldorf
UV Lichtkamera (Hoefer –Mighty Bright)	Serva	Heidelberg
Mikrofederschere	Äsculap	Tüttlingen
Nagelschere	Äsculap	Tüttlingen
Pinzette	Äsculap	Tüttlingen
	Feinmechanische Werkstatt	Universität Düsseldorf
Hypoxiebox		
Silikonschläuche	Reichert	Heidelberg
Gasmischpumpe (ZUA – 82 –GME 3/2 – MA Gasmischelement)	Föhr Medical Instruments	Seeheim
Gasdurchflussmesser (Snap In Kleindurchflussmesser)	ABB	Göttingen
Mikrokatheter Millar Micro Tip	Millar	Houston, USA
Blutgasanalysegerät (Radiometer ABL 505)	Diamond Diagnostics Inc.	Holliston, USA
Blutanalysgerät (Sysmex SE 9000)	Sysmex	Kobe, Japan
Ultramikrotom	Spurr Serva	Heidelberg
NMR Spektrometer (Bruker DRX 9,4 Tesla Wide Bore)	Bruker	Rheinstetten
EKG (Physiogard SM 785)	Bruker Medical SA.	Wissenbourg, FA
Kontrolltisch	Hugo Sachs Elektronik	March – Hugstetten
PCR Gerät (DNA Thermal Cycler 480)	Perkin Elmer	Düsseldorf
RT PCR (Gene Amp 5700)	Perkin Elmer	Düsseldorf

7. Anhang verwendeter Materialien

Software		
Histologiesoftware (AnalySIS ^B 5.0)	Soft Imaging Systems	Münster
Xwin 5.1 TM	Bruker	Rheinstetten
Atlas Image TM	Clontech	Palo Alto, USA
Primer Express TM	Perkin Elmer	Düsseldorf
GeneAmp 5700 Sequence Detection Software TM Ver. 1.3	PE Applied Biosystems	Foster City, USA
ExpressHyb TM	Clontech	Palo Alto, USA
Endnote X4 TM	Research Soft	Berkeley, USA
Excel TM	Microsoft	Redmont, USA
Word for Windows 2010 TM	Microsoft	Redmont, USA

8. Abkürzungsverzeichnis

-/-	Knock Out
ARK	(murine) Axl Receptor Kinase
BGA	(arterielle) Blutgasanalyse
CcO	Cytochrome Oxidase
COX5b	Cytochrome Oxidase 5b
CD	Cluster of Differentiation
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
CYGB	Cytoglobin
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
DRM	Desmin – related (cardio) Myopathy
EDV	Enddiastolisches Volumen
EF	Ejektionsfraktion
ESV	Endsystolisches Volumen
EtBr	Ethidiumbromid
fl	Femtoliter
SV	Schlagvolumen
HB	Hämoglobin
HIF	Hypoxia inducible Factor
HZV	Herz Zeit Volumen
iLBP	intracellular lipid binding Protein
K	Tausend
KO	Knock Out
MB	Myoglobin
Myo	Myoglobin
Myo ^{-/-}	Myoglobin Knockout
MCV	Mean Corpuscular Volume
MHC	Major Histocompatibility Complex
MRT	Magnet Resonanz Tomographie
NGB	Neuroglobin
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
pCO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
PBR	Peripherer Benzodiazepin Rezeptor
PPAR α	Peroxisome Proliferator activated Receptor Alpha
PPAR β/δ	Peroxisome Proliferator activated Receptor Beta/ Delta
ROS	Reactive Oxygen Species
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
TAM	Tyros3, Axl, Mer Kinase
TCR	T – Cell Receptor
UPS	Ubiquitin Proteasome System
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
WT	Wildtyp

9. Literaturverzeichnis

1. Ahmed SA, Williamson JR, Roberts R, Clark RE, Sobel BE (1976) The association of increased plasma MB CPK activity and irreversible ischemic myocardial injury in the dog. *Circulation* 54: 187-193
2. Akar FG, Aon MA, Tomaselli GF, O'Rourke B (2005) The mitochondrial origin of postischemic arrhythmias. *The Journal of clinical investigation* 115: 3527-3535
3. Alayash AI (2001) Oxidative mechanisms of hemoglobin-based blood substitutes. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology* 29: 415-425
4. Alayash AI (2004) Oxygen therapeutics: can we tame haemoglobin? *Nature reviews Drug discovery* 3: 152-159
5. Alho H, Varga V, Krueger KE (1994) Expression of mitochondrial benzodiazepine receptor and its putative endogenous ligand diazepam binding inhibitor in cultured primary astrocytes and C-6 cells: relation to cell growth. *Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research* 5: 1005-1014
6. Angelillo-Scherrer A, de Frutos P, Aparicio C, Melis E, Savi P, Lupu F, Arnout J, Dewerchin M, Hoylaerts M, Herbert J, Collen D, Dahlback B, Carmeliet P (2001) Deficiency or inhibition of Gas6 causes platelet dysfunction and protects mice against thrombosis. *Nature medicine* 7: 215-221
7. Angelillo-Scherrer A, Burnier L, Flores N, Savi P, DeMol M, Schaeffer P, Herbert JM, Lemke G, Goff SP, Matsushima GK, Earp HS, Vesin C, Hoylaerts MF, Plaisance S, Collen D, Conway EM, Wehrle-Haller B, Carmeliet P (2005) Role of Gas6 receptors in platelet signaling during thrombus stabilization and implications for antithrombotic therapy. *The Journal of clinical investigation* 115: 237-246
8. Aoki K, Suzuki K, Sugano T, Tasaka T, Nakahara K, Kuge O, Omori A, Kasai M (1995) A novel gene, Translin, encodes a recombination hotspot binding protein associated with chromosomal translocations. *Nature genetics* 10: 167-174
9. Armstrong PW, Granger CB, Adams PX, Hamm C, Holmes D, Jr., O'Neill WW, Todaro TG, Vahanian A, Van de Werf F (2007) Pexelizumab for acute ST-elevation myocardial infarction in patients undergoing primary percutaneous coronary intervention: a randomized controlled trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 297: 43-51
10. Atlas M, Head D, Behm F, Schmidt E, Zeleznik-Le NH, Roe BA, Burian D, Domer PH (1998) Cloning and sequence analysis of four therapy-related leukemia breakpoints. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 12: 1895-1902
11. Auluck PK, Chan HY, Trojanowski JQ, Lee VM, Bonini NM (2002) Chaperone suppression of alpha-synuclein toxicity in a *Drosophila* model for Parkinson's disease. *Science* 295: 865-868
12. Bar H, Strelkov SV, Sjoberg G, Aebi U, Herrmann H (2004) The biology of desmin filaments: how do mutations affect their structure, assembly, and organisation? *Journal of structural biology* 148: 137-152
13. Barsh GS, Farooqi IS, O'Rahilly S (2000) Genetics of body-weight regulation. *Nature* 404: 644-651
14. Basu A, Lenka N, Mullick J, Avadhani NG (1997) Regulation of murine cytochrome oxidase Vb gene expression in different tissues and during

- myogenesis. Role of a YY-1 factor-binding negative enhancer. *The Journal of biological chemistry* 272: 5899-5908
15. Benevolensky D, Belikova Y, Mohammadzadeh R, Trouve P, Marotte F, Russo-Marie F, Samuel JL, Charlemagne D (2000) Expression and localization of the annexins II, V, and VI in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 80: 123-133
 16. Bennaars-Eiden A, Higgins L, Hertzell AV, Kapphahn RJ, Ferrington DA, Bernlohr DA (2002) Covalent modification of epithelial fatty acid-binding protein by 4-hydroxynonenal in vitro and in vivo. Evidence for a role in antioxidant biology. *The Journal of biological chemistry* 277: 50693-50702
 17. Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF, Shively JE (1989) Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 4897-4901
 18. Binder MD, Kilpatrick TJ (2009) TAM receptor signalling and demyelination. *Neuro-Signals* 17: 277-287
 19. Birdsall HH, Green DM, Trial J, Youker KA, Burns AR, MacKay CR, LaRosa GJ, Hawkins HK, Smith CW, Michael LH, Entman ML, Rossen RD (1997) Complement C5a, TGF-beta 1, and MCP-1, in sequence, induce migration of monocytes into ischemic canine myocardium within the first one to five hours after reperfusion. *Circulation* 95: 684-692
 20. Birks JW, Klassen LW, Gurney CW (1975) Hypoxia-induced thrombocytopenia in mice. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 86: 230-238
 21. Bodine SC, Latres E, Baumhueter S, Lai VK, Nunez L, Clarke BA, Poueymirou WT, Panaro FJ, Na E, Dharmarajan K, Pan ZQ, Valenzuela DM, DeChiara TM, Stitt TN, Yancopoulos GD, Glass DJ (2001) Identification of ubiquitin ligases required for skeletal muscle atrophy. *Science* 294: 1704-1708
 22. Bogdan C (2001) Nitric oxide and the regulation of gene expression. *Trends in cell biology* 11: 66-75
 23. Braestrup C, Squires RF (1977) Specific benzodiazepine receptors in rat brain characterized by high-affinity (3H)diazepam binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74: 3805-3809
 24. Brown DA, Aon MA, Akar FG, Liu T, Sorrairain N, O'Rourke B (2008) Effects of 4'-chlorodiazepam on cellular excitation-contraction coupling and ischaemia-reperfusion injury in rabbit heart. *Cardiovascular research* 79: 141-149
 25. Buerke M, Murohara T, Lefer AM (1995) Cardioprotective effects of a C1 esterase inhibitor in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 91: 393-402
 26. Buerke M, Pruffer D, Dahm M, Oelert H, Meyer J, Darius H (1998) Blocking of classical complement pathway inhibits endothelial adhesion molecule expression and preserves ischemic myocardium from reperfusion injury. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 286: 429-438
 27. Bukowska A, Lendeckel U, Bode-Boger SM, Goette A (2010) Physiologic and Pathophysiologic Role of Calpain: Implications for the Occurrence of Atrial Fibrillation. *Cardiovascular therapeutics*
 28. Bunn HF, Poyton RO (1996) Oxygen sensing and molecular adaptation to hypoxia. *Physiological reviews* 76: 839-885
 29. Burkart EM, Sambandam N, Han X, Gross RW, Courtois M, Gierasch CM, Shoghi K, Welch MJ, Kelly DP (2007) Nuclear receptors PPARbeta/delta and

- PPARalpha direct distinct metabolic regulatory programs in the mouse heart. *The Journal of clinical investigation* 117: 3930-3939
30. Burke PV, Raitt DC, Allen LA, Kellogg EA, Poyton RO (1997) Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. *The Journal of biological chemistry* 272: 14705-14712
 31. Burmester T, Weich B, Reinhardt S, Hankeln T (2000) A vertebrate globin expressed in the brain. *Nature* 407: 520-523
 32. Burmester T, Ebner B, Weich B, Hankeln T (2002) Cytoglobin: a novel globin type ubiquitously expressed in vertebrate tissues. *Mol Biol Evol* 19: 416-421
 33. Bushnell DA, Kornberg RD (2003) Complete, 12-subunit RNA polymerase II at 4.1-A resolution: implications for the initiation of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 6969-6973
 34. Caldwell CC, Kojima H, Lukashev D, Armstrong J, Farber M, Apasov SG, Sitkovsky MV (2001) Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *Journal of immunology* 167: 6140-6149
 35. Cangul H (2004) Hypoxia upregulates the expression of the NDRG1 gene leading to its overexpression in various human cancers. *BMC genetics* 5: 27
 36. Castello PR, Woo DK, Ball K, Wojcik J, Liu L, Poyton RO (2008) Oxygen-regulated isoforms of cytochrome c oxidase have differential effects on its nitric oxide production and on hypoxic signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 8203-8208
 37. Chen B, Zhong D, Monteiro A (2006) Comparative genomics and evolution of the HSP90 family of genes across all kingdoms of organisms. *BMC genomics* 7: 156
 38. Chen W, Zhang J, Eljgelshoven MH, Zhang Y, Zhu XH, Wang C, Cho Y, Merkle H, Ugurbil K (1997) Determination of deoxymyoglobin changes during graded myocardial ischemia: an in vivo 1H NMR spectroscopy study. *Magnetic resonance in medicine: official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 38: 193-197
 39. Chennathukuzhi V, Stein JM, Abel T, Donlon S, Yang S, Miller JP, Allman DM, Simmons RA, Hecht NB (2003) Mice deficient for testis-brain RNA-binding protein exhibit a coordinate loss of TRAX, reduced fertility, altered gene expression in the brain, and behavioral changes. *Molecular and cellular biology* 23: 6419-6434
 40. Chiappetta G, Avantaggiato V, Visconti R, Fedele M, Battista S, Trapasso F, Merciai BM, Fidanza V, Giancotti V, Santoro M, Simeone A, Fusco A (1996) High level expression of the HMGI (Y) gene during embryonic development. *Oncogene* 13: 2439-2446
 41. Chuma M, Saeki N, Yamamoto Y, Ohta T, Asaka M, Hirohashi S, Sakamoto M (2004) Expression profiling in hepatocellular carcinoma with intrahepatic metastasis: identification of high-mobility group I(Y) protein as a molecular marker of hepatocellular carcinoma metastasis. *The Keio journal of medicine* 53: 90-97
 42. Chuzhanova N, Chen JM, Bacolla A, Patrinos GP, Ferec C, Wells RD, Cooper DN (2009) Gene conversion causing human inherited disease: evidence for involvement of non-B-DNA-forming sequences and recombination-promoting motifs in DNA breakage and repair. *Human mutation* 30: 1189-1198

9. Literaturverzeichnis

43. Citri A, Harari D, Shohat G, Ramakrishnan P, Gan J, Lavi S, Eisenstein M, Kimchi A, Wallach D, Pietrokovski S, Yarden Y (2006) Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *The Journal of biological chemistry* 281: 14361-14369
44. Cleynen I, Van de Ven WJ (2008) The HMGA proteins: a myriad of functions (Review). *International journal of oncology* 32: 289-305
45. Cockrell E, Espinola RG, McCrae KR (2008) Annexin A2: biology and relevance to the antiphospholipid syndrome. *Lupus* 17: 943-951
46. Cole RP, Wittenberg BA, Caldwell PR (1978) Myoglobin function in the isolated fluorocarbon-perfused dog heart. *The American journal of physiology* 234: H567-572
47. Coll AP, Farooqi IS, O'Rahilly S (2007) The hormonal control of food intake. *Cell* 129: 251-262
48. Colucci-Guyon E, Portier MM, Dunia I, Paulin D, Pournin S, Babinet C (1994) Mice lacking vimentin develop and reproduce without an obvious phenotype. *Cell* 79: 679-694
49. Colucci-Guyon E, Gimenez YRM, Maurice T, Babinet C, Privat A (1999) Cerebellar defect and impaired motor coordination in mice lacking vimentin. *Glia* 25: 33-43
50. Cooper CE (1999) Nitric oxide and iron proteins. *Biochimica et biophysica acta* 1411: 290-309
51. Corbi N, Di Padova M, De Angelis R, Bruno T, Libri V, Iezzi S, Floridi A, Fanciulli M, Passananti C (2002) The alpha-like RNA polymerase II core subunit 3 (RPB3) is involved in tissue-specific transcription and muscle differentiation via interaction with the myogenic factor myogenin. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 16: 1639-1641
52. Cossins AR, Williams DR, Foulkes NS, Berenbrink M, Kipar A (2009) Diverse cell-specific expression of myoglobin isoforms in brain, kidney, gill and liver of the hypoxia-tolerant carp and zebrafish. *The Journal of experimental biology* 212: 627-638
53. Cranney GB, Lotan CS, Dean L, Baxley W, Bouchard A, Pohost GM (1990) Left ventricular volume measurement using cardiac axis nuclear magnetic resonance imaging. Validation by calibrated ventricular angiography. *Circulation* 82: 154-163
54. Dalakas MC, Park KY, Semino-Mora C, Lee HS, Sivakumar K, Goldfarb LG (2000) Desmin myopathy, a skeletal myopathy with cardiomyopathy caused by mutations in the desmin gene. *The New England journal of medicine* 342: 770-780

55. Dansky HM, Charlton SA, Sikes JL, Heath SC, Simantov R, Levin LF, Shu P, Moore KJ, Breslow JL, Smith JD (1999) Genetic background determines the extent of atherosclerosis in ApoE-deficient mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 19: 1960-1968
56. Daugherty RM, Jr., Scott JB, Dabney JM, Haddy FJ (1967) Local effects of O₂ and CO₂ on limb, renal, and coronary vascular resistances. *The American journal of physiology* 213: 1102-1110
57. Dejana E (2004) Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature reviews Molecular cell biology* 5: 261-270

58. Dewhirst MW, Cao Y, Moeller B (2008) Cycling hypoxia and free radicals regulate angiogenesis and radiotherapy response. *Nature reviews Cancer* 8: 425-437
59. Dhar A, Hu J, Reeves R, Resar LM, Colburn NH (2004) Dominant-negative c-Jun (TAM67) target genes: HMGA1 is required for tumor promoter-induced transformation. *Oncogene* 23: 4466-4476
60. Dickerson REG, I (1983) *Hemoglobin: Structure, Function, Evolution, and Pathology* Benjamin-Cummings Publishing Co., Subs. of Addison Wesley Longman, US (May 1983)
61. Dourdin N, Bhatt AK, Dutt P, Greer PA, Arthur JS, Elce JS, Huttenlocher A (2001) Reduced cell migration and disruption of the actin cytoskeleton in calpain-deficient embryonic fibroblasts. *The Journal of biological chemistry* 276: 48382-48388
62. Doyle MP, Hoekstra JW (1981) Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins. *Journal of inorganic biochemistry* 14: 351-358
63. Dr. Hannemann - Pohl K (2003) *Entwicklung eines Computermodells zur Beschreibung des Myoglobinverlaufs im Blut nach akuten Myokardinfarkten mit und ohne Lysetherapie und zum Verständnis des Einflusses der Nierenfunktion auf diesen Verlauf.* Medizinische Dissertationsschrift, Universität Hamburg
64. Dragon-Durey MA, Sethi SK, Bagga A, Blanc C, Blouin J, Ranchin B, Andre JL, Takagi N, Cheong HI, Hari P, Le Quintrec M, Niaudet P, Loirat C, Fridman WH, Fremeaux-Bacchi V (2010) Clinical features of anti-factor H autoantibody-associated hemolytic uremic syndrome. *Journal of the American Society of Nephrology* 21: 2180-2187
65. Dussault JH, Ruel J (1987) Thyroid hormones and brain development. *Annual review of physiology* 49: 321-334
66. Eckes B, Colucci-Guyon E, Smola H, Nodder S, Babinet C, Krieg T, Martin P (2000) Impaired wound healing in embryonic and adult mice lacking vimentin. *Journal of cell science* 113 (Part 13): 2455-2462
67. Eich RF, Li T, Lemon DD, Doherty DH, Curry SR, Aitken JF, Mathews AJ, Johnson KA, Smith RD, Phillips GN, Jr., Olson JS (1996) Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* 35: 6976-6983
68. Ellis RJ, Hemmingsen SM (1989) Molecular chaperones: proteins essential for the biogenesis of some macromolecular structures. *Trends in biochemical sciences* 14: 339-342
69. Endeward V, Gros G, Jurgens KD (2010) Significance of myoglobin as an oxygen store and oxygen transporter in the intermittently perfused human heart: a model study. *Cardiovascular research* 87: 22-29
70. Epstein FH (2007) MR in mouse models of cardiac disease. *NMR in biomedicine* 20: 238-255
71. Eriksson JE, Dechat T, Grin B, Helfand B, Mendez M, Pallari HM, Goldman RD (2009) Introducing intermediate filaments: from discovery to disease. *The Journal of clinical investigation* 119: 1763-1771
72. Fanciulli M, Bruno T, Di Padova M, De Angelis R, Lovari S, Floridi A, Passananti C (1998) The interacting RNA polymerase II subunits, hRPB11 and hRPB3, are coordinately expressed in adult human tissues and down-regulated by doxorubicin. *FEBS letters* 427: 236-240
73. Faust M, Ebensperger C, Schulz AS, Schleithoff L, Hameister H, Bartram CR, Janssen JW (1992) The murine ufo receptor: molecular cloning, chromosomal localization and in situ expression analysis. *Oncogene* 7: 1287-1293

74. Flögel U, Merx MW, Gödecke A, Decking UK, Schrader J (2001) Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 735-740
75. Flögel U, Gödecke A, Klotz LO, Schrader J (2004) Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 1156-1158
76. Flögel U, Laussmann T, Gödecke A, Abanador N, Schafers M, Fingas CD, Metzger S, Levkau B, Jacoby C, Schrader J (2005) Lack of myoglobin causes a switch in cardiac substrate selection. *Circulation research* 96: e68-75
77. Flögel U, Dang CV (2009) Myoglobin tames tumor growth and spread. *The Journal of clinical investigation* 119: 766-768
78. Flonta SE, Arena S, Pisacane A, Michieli P, Bardelli A (2009) Expression and functional regulation of myoglobin in epithelial cancers. *The American journal of pathology* 175: 201-206
79. Flood EC, Hajjar KA (2011) The annexin A2 system and vascular homeostasis. *Vascular pharmacology* 54: 59-67
80. Florentine MS, Grosskreutz CL, Chang W, Hartnett JA, Dunn VD, Ehrhardt JC, Fleagle SR, Collins SM, Marcus ML, Skorton DJ (1986) Measurement of left ventricular mass in vivo using gated nuclear magnetic resonance imaging. *Journal of the American College of Cardiology* 8: 107-112
81. Franco F, Thomas GD, Giroir B, Bryant D, Bullock MC, Chwialkowski MC, Victor RG, Peshock RM (1999) Magnetic resonance imaging and invasive evaluation of development of heart failure in transgenic mice with myocardial expression of tumor necrosis factor-alpha. *Circulation* 99: 448-454
82. Frappell P, Lanthier C, Baudinette RV, Mortola JP (1992) Metabolism and ventilation in acute hypoxia: a comparative analysis in small mammalian species. *The American journal of physiology* 262: R1040-1046
83. Fraser J, de Mello LV, Ward D, Rees HH, Williams DR, Fang Y, Brass A, Gracey AY, Cossins AR (2006) Hypoxia-inducible myoglobin expression in nonmuscle tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 2977-2981
84. Frauenfelder H, McMahon BH, Fenimore PW (2003) Myoglobin: the hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 8615-8617
85. Furuhashi M, Tuncman G, Gorgun CZ, Makowski L, Atsumi G, Vaillancourt E, Kono K, Babaev VR, Fazio S, Linton MF, Sulsky R, Robl JA, Parker RA, Hotamisligil GS (2007) Treatment of diabetes and atherosclerosis by inhibiting fatty-acid-binding protein aP2. *Nature* 447: 959-965
86. Furuhashi M, Fucho R, Gorgun CZ, Tuncman G, Cao H, Hotamisligil GS (2008) Adipocyte/macrophage fatty acid-binding proteins contribute to metabolic deterioration through actions in both macrophages and adipocytes in mice. *The Journal of clinical investigation* 118: 2640-2650
87. Furukawa S, MacLennan MJ, Keller BB (1998) Hemodynamic response to anesthesia in pregnant and nonpregnant ICR mice. *Laboratory animal science* 48: 357-363
88. Galati D, Srinivasan S, Raza H, Prabu SK, Hardy M, Chandran K, Lopez M, Kalyanaraman B, Avadhani NG (2009) Role of nuclear-encoded subunit Vb in the assembly and stability of cytochrome c oxidase complex: implications in mitochondrial dysfunction and ROS production. *The Biochemical journal* 420: 439-449

9. Literaturverzeichnis

89. Galluzzo M, Pennacchiotti S, Rosano S, Comoglio PM, Michieli P (2009) Prevention of hypoxia by myoglobin expression in human tumor cells promotes differentiation and inhibits metastasis. *The Journal of clinical investigation* 119: 865-875
90. Galton VA (1992) The role of thyroid hormone in amphibian metamorphosis. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM* 3: 96-100
91. Galvez AS, Diwan A, Odley AM, Hahn HS, Osinska H, Melendez JG, Robbins J, Lynch RA, Marreez Y, Dorn GW, 2nd (2007) Cardiomyocyte degeneration with calpain deficiency reveals a critical role in protein homeostasis. *Circulation research* 100: 1071-1078
92. Gao GF, Jakobsen BK (2000) Molecular interactions of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-cell receptor. *Immunology today* 21: 630-636
93. Garry DJ, Ordway GA, Lorenz JN, Radford NB, Chin ER, Grange RW, Bassel-Duby R, Williams RS (1998) Mice without myoglobin. *Nature* 395: 905-908
94. Gauthier K, Plateroti M, Harvey CB, Williams GR, Weiss RE, Refetoff S, Willott JF, Sundin V, Roux JP, Malaval L, Hara M, Samarut J, Chassande O (2001) Genetic analysis reveals different functions for the products of the thyroid hormone receptor alpha locus. *Molecular and cellular biology* 21: 4748-4760
95. Gautier H (1996) Interactions among metabolic rate, hypoxia, and control of breathing. *Journal of applied physiology* 81: 521-527
96. Gayeski TE, Honig CR (1991) Intracellular PO₂ in individual cardiac myocytes in dogs, cats, rabbits, ferrets, and rats. *The American journal of physiology* 260: H522-531
97. George P, Irvine DH (1951) Reaction of methmyoglobin with hydrogen peroxide. *Nature* 168: 164-165
98. Gerke V, Moss SE (2002) Annexins: from structure to function. *Physiological reviews* 82: 331-371
99. Ghai R, Waters P, Roumenina LT, Gadjeva M, Kojouharova MS, Reid KB, Sim RB, Kishore U (2007) C1q and its growing family. *Immunobiology* 212: 253-266
100. Giardina B, Ascenzi P, Clementi ME, De Sanctis G, Rizzi M, Coletta M (1996) Functional modulation by lactate of myoglobin. A monomeric allosteric hemoprotein. *The Journal of biological chemistry* 271: 16999-17001
101. Glabe A, Chung Y, Xu D, Jue T (1998) Carbon monoxide inhibition of regulatory pathways in myocardium. *The American journal of physiology* 274: H2143-2151
102. Gödecke A, Flögel U, Zanger K, Ding Z, Hirchenhain J, Decking UK, Schrader J (1999) Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 10495-10500
103. Gödecke A, Flögel U, Zanger K, Ding Z, Hirchenhain J, Decking UK, Schrader J (1999) Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: 10495-10500
104. Gödecke A (2006) On the impact of NO-globin interactions in the cardiovascular system. *Cardiovascular research* 69: 309-317
105. Gödecke A (2010) Myoglobin: safeguard of myocardial oxygen supply during systolic compression? *Cardiovascular research* 87: 4-5

106. Gödecke A (2002) Transgene Tiermodelle zur Untersuchung kardiovaskulärer Funktionen von Stickstoffmonoxid (NO) und Myoglobin. Habilitationsschrift, Univ. Düsseldorf
107. Goldfarb LG, Dalakas MC (2009) Tragedy in a heartbeat: malfunctioning desmin causes skeletal and cardiac muscle disease. *The Journal of clinical investigation* 119: 1806-1813
108. Graeber TG, Osmanian C, Jacks T, Housman DE, Koch CJ, Lowe SW, Giaccia AJ (1996) Hypoxia-mediated selection of cells with diminished apoptotic potential in solid tumours. *Nature* 379: 88-91
109. Green CJ, Knight J, Precious S, Simpkin S (1981) Ketamine alone and combined with diazepam or xylazine in laboratory animals: a 10 year experience. *Laboratory animals* 15: 163-170
110. Gui YH, Linask KK, Khowsathit P, Huhta JC (1996) Doppler echocardiography of normal and abnormal embryonic mouse heart. *Pediatric research* 40: 633-642
111. Günther H (1921) Über den Muskelfarbstoff. *Virchows Arch* 230: 146-178
112. Gupta RK, Wittenberg BA (1991) ³¹P-NMR studies of isolated adult heart cells: effect of myoglobin inactivation. *The American journal of physiology* 261: H1155-1163
113. Gupta SC, Sharma A, Mishra M, Mishra RK, Chowdhuri DK (2010) Heat shock proteins in toxicology: how close and how far? *Life sciences* 86: 377-384
114. Guyton GP, Stanek KS, Schneider RC, Hochachka PW, Hurford WE, Zapol DG, Liggins GC, Zapol WM (1995) Myoglobin saturation in free-diving Weddell seals. *Journal of applied physiology* 79: 1148-1155
115. Hafizi S, Dahlback B (2006) Gas6 and protein S. Vitamin K-dependent ligands for the Axl receptor tyrosine kinase subfamily. *The FEBS journal* 273: 5231-5244
116. Hartl FU, Bracher A, Hayer-Hartl M (2011) Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* 475: 324-332
117. Hartman JLt, Garvik B, Hartwell L (2001) Principles for the buffering of genetic variation. *Science* 291: 1001-1004
118. Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN, Klein WH (1993) Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature* 364: 501-506
119. Hayes MJ, Shao D, Bailly M, Moss SE (2006) Regulation of actin dynamics by annexin 2. *The EMBO journal* 25: 1816-1826
120. Heimpel H, Busch D, Schubothe H (1968) Erythrocyte elimination and erythrocyte turnover in various hereditary hemolytic anemias. *Klinische Wochenschrift* 46: 490-497
121. Hendgen-Cotta UB, Flögel U, Kelm M, Rassaf T (2010) Unmasking the Janus face of myoglobin in health and disease. *The Journal of experimental biology* 213: 2734-2740
122. Hernando V, Inserte J, Sartorio CL, Parra VM, Poncelas-Nozal M, Garcia-Dorado D (2010) Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *Journal of molecular and cellular cardiology* 49: 271-279
123. Herold G (2011) Innere Medizin 2011, Lehrbuch
124. Hertzell AV, Bennaars-Eiden A, Bernlohr DA (2002) Increased lipolysis in transgenic animals overexpressing the epithelial fatty acid binding protein in adipose cells. *Journal of lipid research* 43: 2105-2111

125. Hill AV (1928) The diffusion of oxygen and lactic acid through tissues. *Proc R Soc Lond Ser B Biol Sci* 104
126. Hill JH, Ward PA (1971) The phlogistic role of C3 leukotactic fragments in myocardial infarcts of rats. *The Journal of experimental medicine* 133: 885-900
127. Hill JR (1959) The oxygen consumption of new-born and adult mammals. Its dependence on the oxygen tension in the inspired air and on the environmental temperature. *The Journal of physiology* 149: 346-373
128. Holmgren D, Wahlander H, Eriksson BO, Oldfors A, Holme E, Tulinius M (2003) Cardiomyopathy in children with mitochondrial disease; clinical course and cardiological findings. *European heart journal* 24: 280-288
129. Horstick G, Heimann A, Gotze O, Hafner G, Berg O, Bohmer P, Becker P, Darius H, Rupprecht HJ, Loos M, Bhakdi S, Meyer J, Kempfski O (1997) Intracoronary application of C1 esterase inhibitor improves cardiac function and reduces myocardial necrosis in an experimental model of ischemia and reperfusion. *Circulation* 95: 701-708
130. Huang TT, Carlson EJ, Raineri I, Gillespie AM, Kozy H, Epstein CJ (1999) The use of transgenic and mutant mice to study oxygen free radical metabolism. *Annals of the NY Academy of Science* 893: 95-112
131. Huey KA, Low MJ, Kelly MA, Juarez R, Szewczak JM, Powell FL (2000) Ventilatory responses to acute and chronic hypoxia in mice: effects of dopamine D(2) receptors. *Journal of applied physiology* 89: 1142-1150
132. Hunter C, Clegg EJ (1973) Changes in body weight of the growing and adult mouse in response to hypoxic stress. *Journal of anatomy* 114: 185-199
133. Huss JM, Kelly DP (2004) Nuclear receptor signaling and cardiac energetics. *Circulation research* 95: 568-578
134. Hydbring E, Cvek K, Olsson K (1999) Telemetric registration of heart rate and blood pressure in the same unrestrained goats during pregnancy, lactation and the non-pregnant, non-lactating period. *Acta physiologica Scandinavica* 165: 135-141
135. Hynes RO (1992) Specificity of cell adhesion in development: the cadherin superfamily. *Current opinion in genetics & development* 2: 621-624
136. Ignarro LJ, Byrns RE, Buga GM, Wood KS (1987) Endothelium-derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circulation research* 61: 866-879
137. Ignarro LJ, Fukuto JM, Griscavage JM, Rogers NE, Byrns RE (1993) Oxidation of nitric oxide in aqueous solution to nitrite but not nitrate: comparison with enzymatically formed nitric oxide from L-arginine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90: 8103-8107
138. Jaendling A, McFarlane RJ (2010) Biological roles of translin and translin-associated factor-X: RNA metabolism comes to the fore. *The Biochemical journal* 429: 225-234
139. James JF, Hewett TE, Robbins J (1998) Cardiac physiology in transgenic mice. *Circulation research* 82: 407-415
140. Jarosz DF, Taipale M, Lindquist S (2010) Protein homeostasis and the phenotypic manifestation of genetic diversity: principles and mechanisms. *Annual review of genetics* 44: 189-216
141. Jelkmann W (2011) Regulation of erythropoietin production. *The Journal of physiology* 589: 1251-1258

142. Jirouskova M, Shet AS, Johnson GJ (2007) A guide to murine platelet structure, function, assays, and genetic alterations. *Journal of thrombosis and haemostasis* : JTH 5: 661-669
143. Jones DP, Kennedy FG (1982) Intracellular O₂ gradients in cardiac myocytes. Lack of a role for myoglobin in facilitation of intracellular O₂ diffusion. *Biochemical and biophysical research communications* 105: 419-424
144. Jurgens KD, Peters T, Gros G (1994) Diffusivity of myoglobin in intact skeletal muscle cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91: 3829-3833
145. Kampinga HH, Craig EA (2010) The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature reviews Molecular cell biology* 11: 579-592
146. Kannan-Thulasiraman P, Seachrist DD, Mahabeleshwar GH, Jain MK, Noy N (2010) Fatty acid-binding protein 5 and PPARbeta/delta are critical mediators of epidermal growth factor receptor-induced carcinoma cell growth. *The Journal of biological chemistry* 285: 19106-19115
147. Keilin D, Hartree EF (1955) Cyanide compounds of ferropoxidase and myoglobin and their reversible photodissociation. *The Biochemical journal* 61: 153-171
148. Kelly KJ (2005) Heat shock (stress response) proteins and renal ischemia/reperfusion injury. *Contributions to nephrology* 148: 86-106
149. Kendrew JC, Bodo G, Dintzis HM, Parrish RG, Wyckoff H, Phillips DC (1958) A three-dimensional model of the myoglobin molecule obtained by x-ray analysis. *Nature* 181: 662-666
150. Kendrew JC (1959) Structure and function in myoglobin and other proteins. *Federation proceedings* 18: 740-751
151. Kiss A, Reinhart W (1956) Determination of myoglobin in serum and in urine after heart infarction. *Wiener klinische Wochenschrift* 68: 154-155
152. Klocke FJ, Copley DP, Krawczyk JA, Reichlin M (1982) Rapid renal clearance of immunoreactive canine plasma myoglobin. *Circulation* 65: 1522-1528
153. Koebel CM, Vermi W, Swann JB, Zerafa N, Rodig SJ, Old LJ, Smyth MJ, Schreiber RD (2007) Adaptive immunity maintains occult cancer in an equilibrium state. *Nature* 450: 903-907
154. Korvald C, Elvenes OP, Myrmet T (2000) Myocardial substrate metabolism influences left ventricular energetics in vivo. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 278: H1345-1351
155. Kowaltowski AJ, Vercesi AE (1999) Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free radical biology & medicine* 26: 463-471
156. Krogh A (1919) The number and distribution of capillaries in muscles with calculations of the oxygen pressure head necessary for supplying the tissue. *The Journal of physiology* 52: 409-415
157. Krogh A (1919) The supply of oxygen to the tissues and the regulation of the capillary circulation. *The Journal of physiology* 52: 457-474
158. Kuehner JN, Pearson EL, Moore C (2011) Unravelling the means to an end: RNA polymerase II transcription termination. *Nature reviews Molecular cell biology* 12: 283-294
159. Kwast KE, Burke PV, Poyton RO (1998) Oxygen sensing and the transcriptional regulation of oxygen-responsive genes in yeast. *The Journal of experimental biology* 201: 1177-1195
160. Lam TK (2010) Neuronal regulation of homeostasis by nutrient sensing. *Nature medicine* 16: 392-395

161. Lampugnani MG, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco LP, Dejana E (1992) A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *The Journal of cell biology* 118: 1511-1522
162. Lawrie RA (1953) The activity of the cytochrome system in muscle and its relation to myoglobin. *The Biochemical journal* 55: 298-305
163. Le Fur G, Guilloux F, Rufat P, Benavides J, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Gueremy C (1983) Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. II. In vivo studies. *Life sciences* 32: 1849-1856
164. Le Fur G, Perrier ML, Vaucher N, Imbault F, Flamier A, Benavides J, Uzan A, Renault C, Dubroeuq MC, Gueremy C (1983) Peripheral benzodiazepine binding sites: effect of PK 11195, 1-(2-chlorophenyl)-N-methyl-N-(1-methylpropyl)-3-isoquinolinecarboxamide. I. In vitro studies. *Life sciences* 32: 1839-1847
165. Lecker SH, Jagoe RT, Gilbert A, Gomes M, Baracos V, Bailey J, Price SR, Mitch WE, Goldberg AL (2004) Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program of changes in gene expression. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 18: 39-51
166. Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, Hempstead B, Mark WH, Hajjar KA (2004) Annexin II regulates fibrin homeostasis and neoangiogenesis in vivo. *The Journal of clinical investigation* 113: 38-48
167. Liu T, Guevara OE, Warburton RR, Hill NS, Gaestel M, Kayyali US (2010) Regulation of vimentin intermediate filaments in endothelial cells by hypoxia. *American journal of physiology Cell physiology* 299: C363-373
168. Liu WF, Nelson CM, Tan JL, Chen CS (2007) Cadherins, RhoA, and Rac1 are differentially required for stretch-mediated proliferation in endothelial versus smooth muscle cells. *Circulation research* 101(5): e44-52
169. Lopaschuk GD, Belke DD, Gamble J, Itoi T, Schonekess BO (1994) Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochimica et biophysica acta* 1213: 263-276
170. Lu Q, Gore M, Zhang Q, Camenisch T, Boast S, Casagrande F, Lai C, Skinner MK, Klein R, Matsushima GK, Earp HS, Goff SP, Lemke G (1999) Tyro-3 family receptors are essential regulators of mammalian spermatogenesis. *Nature* 398: 723-728
171. Lu Q, Lemke G (2001) Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 293: 306-311
172. Maeda K, Uysal KT, Makowski L, Gorgun CZ, Atsumi G, Parker RA, Bruning J, Hertzler AV, Bernlohr DA, Hotamisligil GS (2003) Role of the fatty acid binding protein mal1 in obesity and insulin resistance. *Diabetes* 52: 300-307
173. Maeda K, Cao H, Kono K, Gorgun CZ, Furuhashi M, Uysal KT, Cao Q, Atsumi G, Malone H, Krishnan B, Minokoshi Y, Kahn BB, Parker RA, Hotamisligil GS (2005) Adipocyte/macrophage fatty acid binding proteins control integrated metabolic responses in obesity and diabetes. *Cell metabolism* 1: 107-119
174. Mahaffey KW, Granger CB, Nicolau JC, Ruzyllo W, Weaver WD, Theroux P, Hochman JS, Filloon TG, Mojcik CF, Todaro TG, Armstrong PW (2003) Effect of pexelizumab, an anti-C5 complement antibody, as adjunctive therapy to fibrinolysis in acute myocardial infarction: the COMPLEMENT inhibition in myocardial infarction treated with thromboLYtics (COMPLY) trial. *Circulation* 108: 1176-1183

175. Maloyan A, Sanbe A, Osinska H, Westfall M, Robinson D, Imahashi K, Murphy E, Robbins J (2005) Mitochondrial dysfunction and apoptosis underlie the pathogenic process in alpha-B-crystallin desmin-related cardiomyopathy. *Circulation* 112: 3451-3461
176. Mammen PP, Kanatous SB, Yuhanna IS, Shaul PW, Garry MG, Balaban RS, Garry DJ (2003) Hypoxia-induced left ventricular dysfunction in myoglobin-deficient mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 285: H2132-2141
177. Marin-Garcia J, Goldenthal MJ, Pierpont EM, Ananthakrishnan R, Perez-Atayde A (1999) Is age a contributory factor of mitochondrial bioenergetic decline and DNA defects in idiopathic dilated cardiomyopathy? *Cardiovascular pathology : the official journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 8: 217-222
178. Marshall HE, Merchant K, Stamler JS (2000) Nitrosation and oxidation in the regulation of gene expression. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14: 1889-1900
179. Matteo RG, Moravec CS (2000) Immunolocalization of annexins IV, V and VI in the failing and non-failing human heart. *Cardiovascular research* 45: 961-970
180. McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J (2007) Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* 131: 121-135
181. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, Abrams SL, Wong EW, Chang F, Lehmann B, Terrian DM, Milella M, Tafuri A, Stivala F, Libra M, Basecke J, Evangelisti C, Martelli AM, Franklin RA (2007) Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta* 1773: 1263-1284
182. McDonald TP, Cottrell M, Cliff R (1978) Effects of short-term hypoxia on platelet counts of mice. *Blood* 51: 165-175
183. McLendon PM, Robbins J (2011) Desmin-Related Cardiomyopathy: An Unfolding Story. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 301(4):H1220-8.
184. Meeson AP, Radford N, Shelton JM, Mammen PP, DiMaio JM, Hutcheson K, Kong Y, Elterman J, Williams RS, Garry DJ (2001) Adaptive mechanisms that preserve cardiac function in mice without myoglobin. *Circulation research* 88: 713-720
185. Melaragno MG, Cavet ME, Yan C, Tai LK, Jin ZG, Haendeler J, Berk BC (2004) Gas6 inhibits apoptosis in vascular smooth muscle: role of Axl kinase and Akt. *Journal of molecular and cellular cardiology* 37: 881-887
186. Menell JS, Cesarman GM, Jacovina AT, McLaughlin MA, Lev EA, Hajjar KA (1999) Annexin II and bleeding in acute promyelocytic leukemia. *The New England journal of medicine* 340: 994-1004
187. Merx MW, Flögel U, Stumpe T, Gödecke A, Decking UK, Schrader J (2001) Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15: 1077-1079
188. Mitchell S, Ota A, Foster W, Zhang B, Fang Z, Patel S, Nelson SF, Horvath S, Wang Y (2006) Distinct gene expression profiles in adult mouse heart following targeted MAP kinase activation. *Physiological genomics* 25: 50-59
189. Monzen K, Ito Y, Naito AT, Kasai H, Hiroi Y, Hayashi D, Shiojima I, Yamazaki T, Miyazono K, Asashima M, Nagai R, Komuro I (2008) A crucial role of a high

- mobility group protein HMGA2 in cardiogenesis. *Nature cell biology* 10: 567-574
190. Mörner KAH (1897) Beobachtungen über den Muskelfarbstoff. *Nord Med Ark* 30: 1-8
191. Moussavi Nik SH, Newman M, Lardelli M (2011) The response of HMGA1 to changes in oxygen availability is evolutionarily conserved. *Experimental cell research* 317: 1503-1512
192. Nieminen M, Henttinen T, Merinen M, Marttila-Ichihara F, Eriksson JE, Jalkanen S (2006) Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nature cell biology* 8: 156-162
193. Nishino J, Kim I, Chada K, Morrison SJ (2008) Hmga2 promotes neural stem cell self-renewal in young but not old mice by reducing p16Ink4a and p19Arf Expression. *Cell* 135: 227-239
194. O'Brien PJ, O'Grady M, McCutcheon LJ, Shen H, Nowack L, Horne RD, Mirsalimi SM, Julian RJ, Grima EA, Moe GW, et al. (1992) Myocardial myoglobin deficiency in various animal models of congestive heart failure. *Journal of molecular and cellular cardiology* 24: 721-730
195. O'Brien PJ, Gwathmey JK (1995) Myocardial Ca(2+)- and ATP-cycling imbalances in end-stage dilated and ischemic cardiomyopathies. *Cardiovascular research* 30: 394-404
196. O'Bryan JP, Frye RA, Cogswell PC, Neubauer A, Kitch B, Prokop C, Espinosa R, 3rd, Le Beau MM, Earp HS, Liu ET (1991) axl, a transforming gene isolated from primary human myeloid leukemia cells, encodes a novel receptor tyrosine kinase. *Molecular and cellular biology* 11: 5016-5031
197. Obame FN, Zini R, Souktani R, Berdeaux A, Morin D (2007) Peripheral benzodiazepine receptor-induced myocardial protection is mediated by inhibition of mitochondrial membrane permeabilization. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 323: 336-345
198. Ohashi T, Sugaya Y, Sakamoto N, Sato M (2007) Hydrostatic pressure influences morphology and expression of VE-cadherin of vascular endothelial cells. *Journal of biomechanics* 40: 2399-2405
199. Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese circulation journal* 27: 282-293
200. Olson EB, Jr., Dempsey JA (1978) Rat as a model for humanlike ventilatory adaptation to chronic hypoxia. *Journal of applied physiology: respiratory, environmental and exercise physiology* 44: 763-769
201. Olson ME, Renchko P (1988) Azaperone and azaperone-ketamine as a neuroleptic sedative and anesthetic in rats and mice. *Laboratory animal science* 38: 299-304
202. Ordway GA, Garry DJ (2004) Myoglobin: an essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol* 207: 3441-3446
203. Palmiter RD, Chen HY, Brinster RL (1982) Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* 29: 701-710
204. Papadopoulos S, Jurgens KD, Gros G (2000) Protein diffusion in living skeletal muscle fibers: dependence on protein size, fiber type, and contraction. *Biophysical journal* 79: 2084-2094
205. Papadopoulos V, Baraldi M, Guilarte TR, Knudsen TB, Lacapere JJ, Lindemann P, Norenberg MD, Nutt D, Weizman A, Zhang MR, Gavish M (2006) Translocator protein (18kDa): new nomenclature for the peripheral-type

- benzodiazepine receptor based on its structure and molecular function. *Trends in pharmacological sciences* 27: 402-409
206. Pesant M, Sueur S, Dutartre P, Tallandier M, Grimaldi PA, Rochette L, Connat JL (2006) Peroxisome proliferator-activated receptor delta (PPARdelta) activation protects H9c2 cardiomyoblasts from oxidative stress-induced apoptosis. *Cardiovascular research* 69: 440-449
207. Peters LL, Cheever EM, Ellis HR, Magnani PA, Svenson KL, Von Smith R, Bogue MA (2002) Large-scale, high-throughput screening for coagulation and hematologic phenotypes in mice. *Physiological genomics* 11: 185-193
208. Petrich BG, Eloff BC, Lerner DL, Kovacs A, Saffitz JE, Rosenbaum DS, Wang Y (2004) Targeted activation of c-Jun N-terminal kinase in vivo induces restrictive cardiomyopathy and conduction defects. *The Journal of biological chemistry* 279: 15330-15338
209. Pickering MC, Cook HT, Warren J, Bygrave AE, Moss J, Walport MJ, Botto M (2002) Uncontrolled C3 activation causes membranoproliferative glomerulonephritis in mice deficient in complement factor H. *Nature genetics* 31: 424-428
210. Pinckard RN, Olson MS, Giclas PC, Terry R, Boyer JT, O'Rourke RA (1975) Consumption of classical complement components by heart subcellular membranes in vitro and in patients after acute myocardial infarction. *The Journal of clinical investigation* 56: 740-750
211. Piper HM, Schwartz P, Spahr R, Hutter JF, Spieckermann PG (1984) Early enzyme release from myocardial cells is not due to irreversible cell damage. *Journal of molecular and cellular cardiology* 16: 385-388
212. Poellinger L, Johnson RS (2004) HIF-1 and hypoxic response: the plot thickens. *Current opinion in genetics & development* 14: 81-85
213. Portbury AL, Willis MS, Patterson C (2011) Tearin' up my heart: proteolysis in the cardiac sarcomere. *The Journal of biological chemistry* 286: 9929-9934
214. Qiu Y, Sutton L, Riggs AF (1998) Identification of myoglobin in human smooth muscle. *The Journal of biological chemistry* 273: 23426-23432
215. Quadri SK (2011) Cross talk between focal adhesion kinase and cadherins: Role in regulating endothelial barrier function. *Microvasc Res.* 2012 Jan;83(1):3-11. Epub 2011 Aug 16. Review.
216. Rahn H, Otis AB (1949) Man's respiratory response during and after acclimatization to high altitude. *The American journal of physiology* 157: 445-462
217. Rao S, Verkman AS (2000) Analysis of organ physiology in transgenic mice. *American journal of physiology Cell physiology* 279: C1-C18
218. Rassaf T, Flögel U, Drexhage C, Hendgen-Cotta U, Kelm M, Schrader J (2007) Nitrite reductase function of deoxymyoglobin: oxygen sensor and regulator of cardiac energetics and function. *Circulation research* 100: 1749-1754
219. Raynal P, Hullin F, Ragab-Thomas JM, Fauvel J, Chap H (1993) Annexin 5 as a potential regulator of annexin 1 phosphorylation by protein kinase C. In vitro inhibition compared with quantitative data on annexin distribution in human endothelial cells. *The Biochemical journal* 292 (Part 3): 759-765
220. Razeghi P, Volpini KC, Wang ME, Youker KA, Stepkowski S, Taegtmeier H (2007) Mechanical unloading of the heart activates the calpain system. *Journal of molecular and cellular cardiology* 42: 449-452
221. Reeves R (2001) Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function. *Gene* 277: 63-81

222. Reeves R, Edberg DD, Li Y (2001) Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Molecular and cellular biology* 21: 575-594
223. Richardson RS, Noyszewski EA, Kendrick KF, Leigh JS, Wagner PD (1995) Myoglobin O₂ desaturation during exercise. Evidence of limited O₂ transport. *The Journal of clinical investigation* 96: 1916-1926
224. Robert RC, Roach PDW, Hackett PH (2003) Hypoxia: through the lifecycle, Reihe: *Advances in experimental Medicine and Biology*, Band 543
225. Rohrer DK, Schauble EH, Desai KH, Kobilka BK, Bernstein D (1998) Alterations in dynamic heart rate control in the beta 1-adrenergic receptor knockout mouse. *The American journal of physiology* 274: H1184-1193
226. Rossen RD, Michael LH, Hawkins HK, Youker K, Dreyer WJ, Baughn RE, Entman ML (1994) Cardiolipin-protein complexes and initiation of complement activation after coronary artery occlusion. *Circulation research* 75: 546-555
227. Ruff J, Wiesmann F, Hiller KH, Voll S, von Kienlin M, Bauer WR, Rommel E, Neubauer S, Haase A (1998) Magnetic resonance microimaging for noninvasive quantification of myocardial function and mass in the mouse. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 40: 43-48
228. Rutherford SL, Lindquist S (1998) Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* 396: 336-342
229. Sambandam N, Lopaschuk GD, Brownsey RW, Allard MF (2002) Energy metabolism in the hypertrophied heart. *Heart failure reviews* 7: 161-173
230. Sargent LM, Ensell MX, Ostvold AC, Baldwin KT, Kashon ML, Lowry DT, Senft JR, Jefferson AM, Johnson RC, Li Z, Tyson FL, Reynolds SH (2008) Chromosomal changes in high- and low-invasive mouse lung adenocarcinoma cell strains derived from early passage mouse lung adenocarcinoma cell strains. *Toxicology and applied pharmacology* 233: 81-91
231. Sarria AJ, Panini SR, Evans RM (1992) A functional role for vimentin intermediate filaments in the metabolism of lipoprotein-derived cholesterol in human SW-13 cells. *The Journal of biological chemistry* 267: 19455-19463
232. Sato Y, Kitani K, Kanai S, Nokubo M, Ohta M (1991) Differences in tolerance to hypoxia/anoxia in mice of different ages. *Research communications in chemical pathology and pharmacology* 73: 209-220
233. Schelling JR, Gentry DJ, Dubyak GR (1996) Annexin II inhibition of G protein-regulated inositol trisphosphate formation in rat aortic smooth muscle. *Am J Physiol* 270: F682-690
234. Schlieper G, Kim JH, Molojavyi A, Jacoby C, Laussmann T, Flögel U, Gödecke A, Schrader J (2004) Adaptation of the myoglobin knockout mouse to hypoxic stress. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 286: R786-792
235. Schoenborn BP, Watson HC, Kendrew JC (1965) Binding of xenon to sperm whale myoglobin. *Nature* 207: 28-30
236. Scholander PF (1960) Oxygen transport through hemoglobin solutions. *Science* 131: 585-590
237. Schug TT, Berry DC, Shaw NS, Travis SN, Noy N (2007) Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors. *Cell* 129: 723-733
238. Schwartz MW, Porte D, Jr. (2005) Diabetes, obesity, and the brain. *Science* 307: 375-379

239. Semenza GL (2001) HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Current opinion in cell biology* 13: 167-171
240. Semenza GL (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* (407): cm8
241. Silva JE (2006) Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiological reviews* 86: 435-464
242. Siri FM, Jelicks LA, Leinwand LA, Gardin JM (1997) Gated magnetic resonance imaging of normal and hypertrophied murine hearts. *The American journal of physiology* 272: H2394-2402
243. Slawson SE, Roman BB, Williams DS, Koretsky AP (1998) Cardiac MRI of the normal and hypertrophied mouse heart. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine* 39: 980-987
244. Smith DF, Toft DO (2008) Minireview: the intersection of steroid receptors with molecular chaperones: observations and questions. *Molecular endocrinology* 22: 2229-2240
245. Solomon V, Goldberg AL (1996) Importance of the ATP-ubiquitin-proteasome pathway in the degradation of soluble and myofibrillar proteins in rabbit muscle extracts. *The Journal of biological chemistry* 271: 26690-26697
246. Souvatzis X (1996) Die Aussagekraft von Creatinkinase-MB und Myoglobin bei Reperfusion nach Okklusion einer Koronararterie. *Med. Dissertationsschrift, Heinrich - Heine Universität*
247. Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K, Piantadosi CA (1997) Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276: 2034-2037
248. Steelman LS, Franklin RA, Abrams SL, Chappell W, Kempf CR, Basecke J, Stivala F, Donia M, Fagone P, Nicoletti F, Libra M, Ruvolo P, Ruvolo V, Evangelisti C, Martelli AM, McCubrey JA (2011) Roles of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway in leukemia therapy. *Leukemia : official journal of the Leukemia Society of America, Leukemia Research Fund, UK* 25: 1080-1094
249. Surinkaew S, Chattipakorn S, Chattipakorn N (2011) Roles of mitochondrial benzodiazepine receptor in the heart. *The Canadian journal of cardiology* 27: 262 e263 -213
250. Taegtmeyer H, Wilson CR, Razeghi P, Sharma S (2005) Metabolic energetics and genetics in the heart. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1047: 208-218
251. Taketani S, Kohno H, Furukawa T, Tokunaga R (1995) Involvement of peripheral-type benzodiazepine receptors in the intracellular transport of heme and porphyrins. *Journal of biochemistry* 117: 875-880
252. Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne B, Wahli W, Noy N (2002) Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Molecular and cellular biology* 22: 5114-5127
253. Tansey EA (2008) Teaching the physiology of adaptation to hypoxic stress with the aid of a classic paper on high altitude by Houston and Riley. *Advances in physiology education* 32: 11-17
254. Taylor DJ, Matthews PM, Radda GK (1986) Myoglobin-dependent oxidative metabolism in the hypoxic rat heart. *Respiration physiology* 63: 275-283

255. Teppema LJ, Dahan A (2010) The ventilatory response to hypoxia in mammals: mechanisms, measurement, and analysis. *Physiological reviews* 90: 675-754
256. Terrados N (1992) Altitude training and muscular metabolism. *International journal of sports medicine* 13 Suppl 1: S206-209
257. Thornell L, Carlsson L, Li Z, Mericskay M, Paulin D (1997) Null mutation in the desmin gene gives rise to a cardiomyopathy. *Journal of molecular and cellular cardiology* 29: 2107-2124
258. Tilton RF, Jr., Kuntz ID, Jr., Petsko GA (1984) Cavities in proteins: structure of a metmyoglobin-xenon complex solved to 1.9 Å. *Biochemistry* 23: 2849-2857
259. Tommaso CL, Salzeider K, Arif M, Klutz W (1980) Serial myoglobin vs. CPK analysis as an indicator of uncomplicated myocardial infarction size and its use in assessing early infarct extension. *American heart journal* 99: 149-154
260. Trouve P, Legot S, Belikova I, Marotte F, Benevolensky D, Russo-Marie F, Samuel JL, Charlemagne D (1999) Localization and quantitation of cardiac annexins II, V, and VI in hypertensive guinea pigs. *The American journal of physiology* 276: H1159-1166
261. Tsukihara T, Aoyama H, Yamashita E, Tomizaki T, Yamaguchi H, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yoshikawa S (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 Å. *Science* 272: 1136-1144
262. Turnberg D, Botto M (2003) The regulation of the complement system: insights from genetically-engineered mice. *Molecular immunology* 40: 145-153
263. Tzima E, Irani-Tehrani M, Kiosses WB, Dejana E, Schultz DA, Engelhardt B, Cao G, DeLisser H, Schwartz MA (2005) A mechanosensory complex that mediates the endothelial cell response to fluid shear stress. *Nature* 437: 426-431
264. van der Meer DL, van den Thillart GE, Witte F, de Bakker MA, Besser J, Richardson MK, Spaink HP, Leito JT, Bagowski CP (2005) Gene expression profiling of the long-term adaptive response to hypoxia in the gills of adult zebrafish. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 289: R1512-1519
265. van Wijk SJ, Timmers HT (2010) The family of ubiquitin-conjugating enzymes (E2s): deciding between life and death of proteins. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24: 981-993
266. Varki AP, Roby DS, Watts H, Zatushni J (1978) Serum myoglobin in acute myocardial infarction: a clinical study and review of the literature. *American heart journal* 96: 680-688
267. Vaupel P (2004) The role of hypoxia-induced factors in tumor progression. *The oncologist* 9 Suppl 5: 10-17
268. Vaupel P, Mayer A (2007) Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer metastasis reviews* 26: 225-239
269. Veenman L, Gavish M (2006) The peripheral-type benzodiazepine receptor and the cardiovascular system. Implications for drug development. *Pharmacol Ther* 110: 503-524
270. von Harsdorf R, Li PF, Dietz R (1999) Signaling pathways in reactive oxygen species-induced cardiomyocyte apoptosis. *Circulation* 99: 2934-2941
271. Wada T, Joza N, Cheng HY, Sasaki T, Kozieradzki I, Bachmaier K, Katada T, Schreiber M, Wagner EF, Nishina H, Penninger JM (2004) MKK7 couples

- stress signalling to G2/M cell-cycle progression and cellular senescence. *Nature cell biology* 6: 215-226
272. Walport MJ (2001) Complement. First of two parts. *N Engl J Med* 344: 1058-1066
273. Walport MJ (2001) Complement. Second of two parts. *The New England journal of medicine* 344: 1140-1144
274. Wan L, Twitchett MB, Eltis LD, Mauk AG, Smith M (1998) In vitro evolution of horse heart myoglobin to increase peroxidase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 12825-12831
275. Wang X, Destrumont A, Tournier C (2007) Physiological roles of MKK4 and MKK7: insights from animal models. *Biochimica et biophysica acta* 1773: 1349-1357
276. Weber GF, Bjerke MA, DeSimone DW (2011) Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *Journal of cell science* 124: 1183-1193
277. Weekes J, Wheeler CH, Yan JX, Weil J, Eschenhagen T, Scholtysik G, Dunn MJ (1999) Bovine dilated cardiomyopathy: proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis* 20: 898-906
278. Wiesmann F, Ruff J, Hiller KH, Rommel E, Haase A, Neubauer S (2000) Developmental changes of cardiac function and mass assessed with MRI in neonatal, juvenile, and adult mice. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 278: H652-657
279. Willis MS, Rojas M, Li L, Selzman CH, Tang RH, Stansfield WE, Rodriguez JE, Glass DJ, Patterson C (2009) Muscle ring finger 1 mediates cardiac atrophy in vivo. *American journal of physiology Heart and circulatory physiology* 296: H997-H1006
280. Wittenberg BA, Wittenberg JB, Katz IR (1985) Oxygen transport in isolated cardiac myocytes. *Basic research in cardiology* 80 Suppl 2: 75-77
281. Wittenberg BA, Wittenberg JB (1989) Transport of oxygen in muscle. *Annual review of physiology* 51: 857-878
282. Wittenberg JB (1959) Oxygen transport: a new function proposed for myoglobin. *Biol Bull* 117
283. Wittenberg JB (1966) The molecular mechanism of hemoglobin-facilitated oxygen diffusion. *The Journal of biological chemistry* 241: 104-114
284. Wittenberg JB (1970) Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiological reviews* 50: 559-636
285. Wittenberg JB, Wittenberg BA (1990) Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Annual review of biophysics and biophysical chemistry* 19: 217-241
286. Wittenberg JB, Wittenberg BA (2003) Myoglobin function reassessed. *The Journal of experimental biology* 206: 2011-2020
287. Wixson SK, White WJ, Hughes HC, Jr., Lang CM, Marshall WK (1987) A comparison of pentobarbital, fentanyl-droperidol, ketamine-xylazine and ketamine-diazepam anesthesia in adult male rats. *Laboratory animal science* 37: 726-730
288. Woods MJ, Williams DC (1996) Multiple forms and locations for the peripheral-type benzodiazepine receptor. *Biochemical pharmacology* 52: 1805-1814
289. Wu H (1923) Studies on hemoglobin III. An ultra- micro-method for the determination of hemoglobin as peroxidase. *J Biochem (Tokyo)* 2, 189 - 194

290. Wu T, Wang X, Wei C, Cheng H, Li Y, Ge D, Zhao H, Young P, Li G, Wang Z (2005) Hemoglobin levels in Qinghai-Tibet: different effects of gender for Tibetans vs. Han. *Journal of applied physiology* 98: 598-604
291. Wu XQ, Hecht NB (2000) Mouse testis brain ribonucleic acid-binding protein/translin colocalizes with microtubules and is immunoprecipitated with messenger ribonucleic acids encoding myelin basic protein, alpha calmodulin kinase II, and protamines 1 and 2. *Biology of reproduction* 62: 720-725
292. Yang S, Hecht NB (2004) Translin associated protein X is essential for cellular proliferation. *FEBS letters* 576: 221-225
293. Yasojima K, Schwab C, McGeer EG, McGeer PL (1998) Human heart generates complement proteins that are upregulated and activated after myocardial infarction. *Circulation research* 83: 860-869
294. Yuan J, Narayanan L, Rockwell S, Glazer PM (2000) Diminished DNA repair and elevated mutagenesis in mammalian cells exposed to hypoxia and low pH. *Cancer research* 60: 4372-4376
295. Zhang H, Wu CX, Chamba Y, Ling Y (2007) Blood characteristics for high altitude adaptation in Tibetan chickens. *Poultry science* 86: 1384-1389
296. Zhang H, Zhang G, Gonzalez FJ, Park SM, Cai D (2011) Hypoxia-Inducible Factor Directs POMC Gene to Mediate Hypothalamic Glucose Sensing and Energy Balance Regulation. *PLoS biology* 9: e1001112, Epub 2011 Jul 26.
297. Zhou X, Benson KF, Ashar HR, Chada K (1995) Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. *Nature* 376: 771-774

10. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

11. Danksagung

Herrn Univ.–Prof. Dr. Schrader danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der notwendigen Versuchsmittel, sowie für die Bereitschaft, sich dieser „Altlast“ anzunehmen. Ihm und Herrn PD. Dr. Heiß danke ich insbesondere für die zeitnahe Korrektur.

Herrn Dr. Ulrich Flögel (MR- Bildgebung) und Dr. Andrej Molojavyi (invasive Hämodynamische Untersuchungen) danke ich für ihre hilfreiche Mitbegleitung des Projektes und für konstruktive Kritik.

Ganz besonderer Dank gebührt Herrn Dr. Georg Schlieper für seine durchgehende und stets hervorragende Betreuung über die gesamte Dauer des umfangreichen Projektes.

Ich danke all meinen Kollegen und klinischen Lehrern im In und Ausland, die mich in all den Jahren unterstützt, begleitet, gefördert und auch gefordert haben.

Selbstverständlich gebührt all meinen Freunden grosser Dank, die mit mir Höhen und Tiefen durchstanden haben, und mit denen ich so manche launige Stunde verbracht, die meinen Horizont erweitert und meine Launen ertragen haben.

Ganz besonders danke Ich meinen Eltern und meiner ganzen Familie, denen ich ausnahmslos alles verdanke und die mir das Erlernen eines wunderbaren Berufes ermöglicht haben. Ihnen und ihrer Generation widme ich diese Arbeit.

Dieser Generation, auf deren Rücken dieses arme und vom Bruderkrieg verheerte Land wieder errichtet wurde, die unermüdlich aus Trümmern und Asche Tagores „Lampe des Ostens“ schufen.

Jenen zahllosen Unglückseligen, die ihre Familien, Freunde und die Heimat für viele Jahre verlassen mussten, nur um nach einem harten, entbehrungsreichen Arbeitsleben festzustellen, dass ihre alte Heimat wieder reich, stolz und frei aber auch so merkwürdig fremd geworden ist. Die in jungen Jahren in die Welt hinausgegangen sind- nichts in den Händen haltend ausser einem Koffer, grossen Hoffnungen und dem unbändigen Willen zum Erfolg. Zeitlebens die eigenen Wünsche und Bedürfnisse dem Wohl ihrer Familien und des Landes untergeordnet haben. Darüber alt, oft auch krank geworden sind und sich nun sowohl in ihrer alten als auch der neuen Heimat fremd fühlen... viele Jahre sind vergangen, die Kinder sind groß und fort. Und mögen diese auch in fremden Sprachen sprechen, neue Träume träumen, anderen Ideen und sogar Fahnen folgen- all ihre Erfolge sind euer Verdienst. Mögen euer aller Entbehrungen nicht vergebens gewesen sein, mögen sich meine und auch kommende Generationen eurem Beispiel und eurer Opfer als würdig erweisen. Euer Vermächtnis ist uns Verpflichtung, euch gilt unser ewiger Dank.

임금 사랑하기를 아버지 사랑하듯 하였고
나라 걱정하기를 집안 근심처럼 하였다
밝은 해 아래 세상을 굽어보사
내 단심과 충정 밝디 밝게 비취주소서

조광조

12. Lebenslauf

Jie-Hoon Thomas Kim

Persönliche Angaben

Geburtsdatum -Ort: 08.11.1977/ Kamp – Lintfort

Familienstand: Ledig

Aufbaustudium

09/2009 – 11/2011
Aufbaustudium „Master of Science in Clinical Ophthalmology“ Institute of Ophthalmology University College London (UCL), GB

Facharztanerkennungen

08/2009
Facharzt für Augenheilkunde,
Ärztekammer Nordrhein

05/2009
Europäischer Facharzt für Augenheilkunde
(FEBO, „Fellow of the European Board of Ophthalmology“)

Weiterer Werdegang

Ab 09/2010
Oberärztliche Tätigkeit
Universitätsaugenklinik Düsseldorf

Ab 10/2009
Fachärztliche Tätigkeit
Universitätsaugenklinik Düsseldorf

Facharztweiterbildung

06/2004 – 09/2009
AiP, bzw. Arzt in Weiterbildung
Universitätsaugenklinik Düsseldorf

Universitäre Ausbildung

09/97 – 05/2004
Studium der Humanmedizin an der
Heinrich – Heine Universität Düsseldorf

Schulische Ausbildung

1984 - 1997
Grundschule und Gymnasium in Ratingen