

**Aus dem
Institut für Herz-Kreislaufphysiologie
der
Heinrich-Heine-Universität-Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. J. Schrader**

**Rolle von Myoglobin bei der
Substratselektion am Herzen**

Dissertation

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

vorgelegt von

Nadine Abanador

2004

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

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Dekan

Referent: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Schrader

Korreferent: Prof. Dr. Malte Kelm

INHALTSVERZEICHNIS

VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	5
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 Kardialer Stoffwechsel.....	7
1.1.1 Allgemeiner historischer Hintergrund	7
1.1.2 Myokardialer Substratmetabolismus	8
1.2 Myoglobin	10
1.2.1 Myoglobin-Defizienz	11
1.3 Motivation	12
1.4 Fragestellung und experimentelles Modell.....	14
1.5 NMR-Spektroskopie	15
1.5.1 Allgemeiner historischer Hintergrund	15
1.5.2 Anwendung auf biochemische Fragestellungen	16
1.6 Metabolisierung von 1,6-¹³C₂-Glucose	17
1.7 Metabolisierung von U-¹³C₁₆-Palmitat.....	20
2 MATERIAL UND METHODEN.....	23
2.1 Versuchstiere	23
2.2 Präparation	23
2.3 Perfusion isolierter Mäuseherzen.....	24
2.3.1 Verwendete Lösungen und Substrate	25
2.3.2 Markierungsexperimente.....	26
2.3.3 Glucose vs. Octanoat / Palmitat	28
2.4 Herzextraktion schockgefrorener Herzen	28
2.5 Kernresonanzspektroskopie	29
2.6 Berechnung der Substratflüsse.....	31
3 ERGEBNISSE.....	33
3.1 Gemessene Substratflüsse in den Markierungsexperimenten	33
3.1.1 Berechnete Substratflüsse im Vergleich.....	35
3.2 Metabolitenkonzentrationen.....	36
3.3 Substratwechsel von Glucose zu Palmitat	37
3.4 Substratwechsel von Glucose zu Octanoat.....	41

4	DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG	45
5	ZUSAMMENFASSUNG	54
6	ANHANG	55
	Proteinbestimmung nach Lowry	55
	Enzymatische Bestimmung von Glutamat und Lactat	55
	Bestimmung der Glutamat-Konzentration.....	56
	Bestimmung der Lactat-Konzentration	56
	Verwendete Chemikalien und Materialien	57
7	LITERATURVERZEICHNIS	59
8	DANKSAGUNG	64
9	LEBENS LAUF	65
10	ABSTRACT	66

Verwendete Abkürzungen

ΔG_{ATP}	Freie Enthalpie nach Gibbs
ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
CF	Konstanter Fluss
CPP	Koronarer Perfusionsdruck
$C_v\text{PO}_2$	Koronar venöser Sauerstoffpartialdruck
D_2O	Deuteriertes Wasser
DCM	Dilatative Kardiomyopathie
FABP	Fettsäure-bindende Proteine
FATP	Fettsäure-transport Proteine
FDG	^{18}F -Deoxyglucose
FS	Fettsäuren
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GIDH	Glutamat-Dehydrogenase
GLUT	Glucose-Transporter-Protein
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
HF	Herzfrequenz
HIF	Hypoxie-induzierte Faktoren
i.p	intra peritoneal
INT	Jodnitrotetrazoliumchlorid
J	Kopplungskonstante
KClO_4	Kalium-Perchlorat
kDa	Kilodalton
KHB	Krebs-Henseleit-Puffer
LDH	Lactat-Dehydrogenase
LVDP	Linksventrikulärer Druck
Mb	Myoglobin
MRI	Magnet-Resonanz-Kernspintomographie
MVO_2	Sauerstoffverbrauch
$\text{Myo}^{-/-}$	Myoglobin-knockout

n	Anzahl der Versuche
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
NAD(H)	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NMR	Kernresonanz-Spektroskopie
NO	Stickstoff
PCA	Perchlorsäure
PCr	Phosphokreatin
PDH	Phosphatdehydrogenase
pdP/dt	Maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
pH _{ic}	intracellulärer pH-Wert
P _i	Phosphat
ppm	part per million
PvO ₂	Koronar-venöser Partialdruck
RQ	Respiratorischer Quotient
TFP	Trifunktionelles Protein
vgl.	Vergleiche
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Kardialer Stoffwechsel

1.1.1 Allgemeiner historischer Hintergrund

Anfang des 19. Jahrhunderts wurden erste Erkenntnisse zu chemischen Veränderungen bei Muskelarbeit, wie die Entstehung von Lactat aus Glucose berichtet und bereits 1905 wurde die Metabolisierung von Fettsäuren (FS) mittels β -Oxidation von Knoop entdeckt (1;2). Mit der Beschreibung der Intermediärprodukte der Glykolyse von Embden und Meyerhof im Jahre 1933 wurde die Basis zur Erforschung des Kohlenhydratstoffwechsels gelegt und erstmalig der Zusammenhang zwischen Glykolyse und daraus entstehender ATP-Gewinnung geklärt. Die Entdeckung des Citratzyklus, auch Tricarbonsäure-Zyklus oder Krebs-Zyklus, im Jahre 1937 bedeutete einen weiteren wichtigen Schritt zum Verständnis des komplexen Stoffwechselgeschehens: Krebs beschrieb die vollständige Verbrennung von Glucose, FS und Aminosäuren zu Kohlendioxid und Wasser und die daran gekoppelte ATP-Gewinnung mittels oxidativer Phosphorylierung (3). Mit der Entdeckung des Acetyl-Coenzym durch Lynen und Lipman konnte der Zusammenhang zwischen FS-Abbau, Glykolyse und oxidativer Phosphorylierung 1951 geklärt werden. Dies war ein weiterer Meilenstein in der Erforschung des Intermediärstoffwechsels (4). Im Jahre 1961 konnte Mitchell die Lokalisation des Citratzyklus in den Mitochondrien nachweisen (5).

1.1.2 Myokardialer Substratmetabolismus

Für die Aufrechterhaltung der Pumpleistung des Herzens ist eine kontinuierliche Bereitstellung von Energie in Form von ATP durch die Mitochondrien notwendig. Voraussetzungen für diese Energieproduktion sind zum einen ein ausreichendes Sauerstoff-Angebot, zum anderen eine adäquate Substratzufuhr. Beides wird über die Koronarperfusion vom Blut zu den Myozyten transportiert. Langkettige FS und Glucose stellen die wichtigsten Substrate für das Herz dar, eine untergeordnete Rolle spielen endogene Substrate wie Glykogen, Ketonkörper oder Aminosäuren (6). Lactat spielt eine besondere Rolle in der anaeroben Glykolyse, da es auch unter Sauerstoffmangel ATP bilden kann. Die Ausbeute liegt jedoch bei unter 10 % im Vergleich zur aeroben Glucoseverwertung im Herzen (7). Unter normalen physiologischen Bedingungen erfolgt die ATP-Gewinnung zu 60-70 % durch β -Oxidation der FS und zu 30-40 % durch Oxidation von Glucose (7). Die Substratverwertung hängt vom Ernährungs- und Belastungszustand des Organismus ab und kann sich deutlich verschieben. Außerdem führt eine vermehrte FS-Oxidation zu einer Aufnahmehemmung von Glucose, als glucosesparender Effekt. Dieser Glucose/FS-Zyklus wurde erstmalig von Randle et al. im Jahre 1963 beschrieben (8).

Die Aufnahme von Glucose aus dem Blut in die Kardiomyozyten erfolgt über den Insulin-abhängigen Glucose-Transporter GLUT 4, sowie über den konstitutiv exprimierten Transporter GLUT 1 (9). Die anschließende Glykolyse führt zu einer chemischen Umwandlung von Glucose zu Pyruvat (7). Pyruvat kann mittels der Phosphat-Dehydrogenase (PDH) zu Acetyl-CoA umgewandelt werden und somit für die weitere ATP-Gewinnung in den Citratzyklus eingeschleust werden. Insgesamt gewinnt der Organismus pro Mol Glucose 2 mol ATP aus der Glykolyse und 36-38 ATP aus dem Citratzyklus (7).

FS gelangen sowohl über passive Diffusion in die Myozyten als auch über Fettsäuretransporter-Proteine (FATP) (10;11). Intrazellulär an die sog. *Fatty Acid Binding Proteins* (FABP) gebunden, werden sie zunächst zu Acyl-CoA aktiviert und dann über das Carnitin-Transfersystem, einem speziellen, membrangebundenen Transport-System in die Mitochondrien, dem Ort der β -Oxidation transportiert (12). Hier werden sie über mehrere Einzelschritte zu Acetyl-CoA metabolisiert, um so im Citratzyklus weiter verstoffwechselt werden zu können. Insgesamt führt die Verwertung eines Moleküls langkettiger FS, z. B. Palmitat zu einer Ausbeute von 105 ATP (13). Interessanterweise führt der komplette Abbau eines Mols FS zu einem höheren Sauerstoffverbrauch pro Mol Energie (in Form von energiereichen Phosphaten) als der komplette Abbau eines Mols Glucose.

1.2 Myoglobin

Eine adäquate Versorgung des Herzens mit Sauerstoff ist eine essentielle Voraussetzung für die permanente Verbrennung der Substrate. Da Sauerstoff im Wasser schlecht löslich ist, gelangt es hauptsächlich über Transportproteine in die Zellen. Während dieser Transport im Gefäßsystem durch Hämoglobin gewährleistet wird, übernimmt Myoglobin (Mb) diese Funktion innerhalb der Zelle. Durch eine reversible Bindung transportiert Mb den Sauerstoff, der für die Zellatmung benötigt wird, vom Sarkolemma zum Mitochondrium. Mb wurde erstmalig 1932 von dem schwedischen Forscher Hugo Theorell beschrieben (14).

Die Polypeptidkette dieses Proteins besteht aus einer Sequenz von 153 Aminosäuren, mit einem Molekulargewicht von ~ 17 kDa. Die Sauerstoffbindung erfolgt über seine Hämgruppe und gibt der Muskulatur eine typisch rote Farbe (15). Hohe Konzentrationen von Mb finden sich im Myokard von Vertebraten und der roten Skelettmuskulatur. Die Funktion und Bedeutung des Mb ist seit mehreren Jahren Gegenstand ausgiebiger Forschung. Seine zentrale Rolle in der Sauerstoff-Versorgung des Muskels wurde erstmalig von Millikan 1937 beschrieben und von vielen weiteren Arbeitsgruppen detailliert analysiert (15-19). Nach heutigem Wissensstand lassen sich dem Mb mindestens drei Funktionen zuschreiben (17;19-24):

- Mb dient der Zelle als Sauerstoffspeicher und Sauerstoffpuffer.
- Es erleichtert die Sauerstoff-Diffusion in die Zelle.
- Mb kann als Radikalfänger agieren (insbesondere für NO).

Mb spielt somit eine wichtige Rolle in der Sauerstoffversorgung und Protektion der Myozyten.

1.2.1 Myoglobin-Defizienz

Die Erzeugung Mb-defizienter Tiere ($myo^{-/-}$) ermöglichte es, die Funktion des Mbs erstmals ohne den Einsatz pharmakologischer Inhibitoren (CO , NO_2^-) zu untersuchen (20;25;26). Überraschenderweise sind $myo^{-/-}$ -Mäuse lebensfähig, fertil und können durchaus dem hämodynamischen Stress körperlicher Belastungen standhalten. Phänotypisch sind sie nicht von den Wildtypen (WT) zu unterscheiden. Makroskopische Vergleiche der Muskulatur zeigten jedoch Unterschiede in der Farbe des Herzens und des Musculus soleus. Das Herz erscheint blasser als das Mb-haltiger Herzen der WT (vgl. Abb. 1).

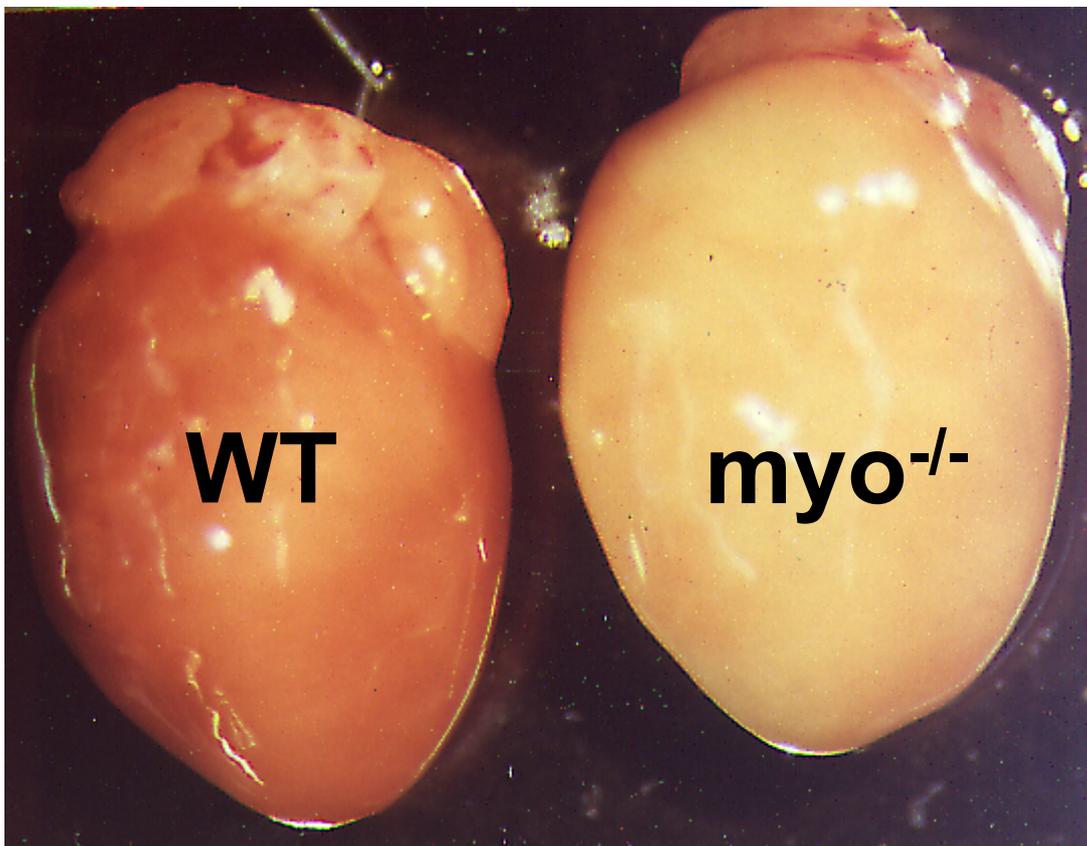


Abb. 1: Links WT-Mäuseherz, rechts $myo^{-/-}$ -Herz (Gödecke et al., 1999).

Des Weiteren zeigten detaillierte funktionelle und morphologische Analysen, dass in diesen Tieren eine Reihe von Kompensationsmechanismen induziert werden. Diese Adaptationen führen insgesamt zu einer Steigerung des Sauerstoff-Gradienten zwischen Kapillargefäß und Mitochondrium und tragen dazu bei, auf diese Weise das Fehlen von Mb zu kompensieren (20). Histologisch zeigten diese Tiere eine 20-46 % höhere Kapillardichte bei gleichzeitig verkleinertem Zellumfang der Myozyten, was insgesamt in kürzeren Sauerstoff-Diffusionswegen resultiert (20;26). Funktionell konnte eine Erhöhung des koronaren Flusses, sowie der Koronarreserve und des Hämatokrits nachgewiesen werden (20). Außerdem zeigten molekulare Untersuchungen eine vermehrte Expression von Hypoxie-induzierten Transkriptionsfaktoren (HIF-1 α und HIF-2), Hitzeschockproteinen und endothelialen Wachstumsfaktoren (26). Diese Kompensationsmechanismen zeigen, dass Mb eine wichtige Rolle in der Sauerstoffversorgung des Organismus und speziell im Herzen und in der Skelettmuskulatur zukommt.

1.3 Motivation

Weiterführende Untersuchungen am Institut für Herz-Kreislaufforschung der Heinrich-Heine-Universität (HHU) zeigten zudem einen Unterschied im myokardialen Proteom der *myo*^{-/-}-Herzen im Vergleich zu den WT (unpublizierte Ergebnisse, Tim Laussmann) (vgl. Abb. 2). Mehrere Enzyme der β -Oxidation sind in den transgenen Tieren deutlich unterexprimiert, bei gleichzeitiger Überexpression eines Schlüsselenzyms der Glycolyse (GAPDH). Zusätzlich treten Fragmente der α -Untereinheit des trifunktionellen Proteins (TFP) im *myo*^{-/-}-Herzen in höheren Konzentrationen als beim WT auf.

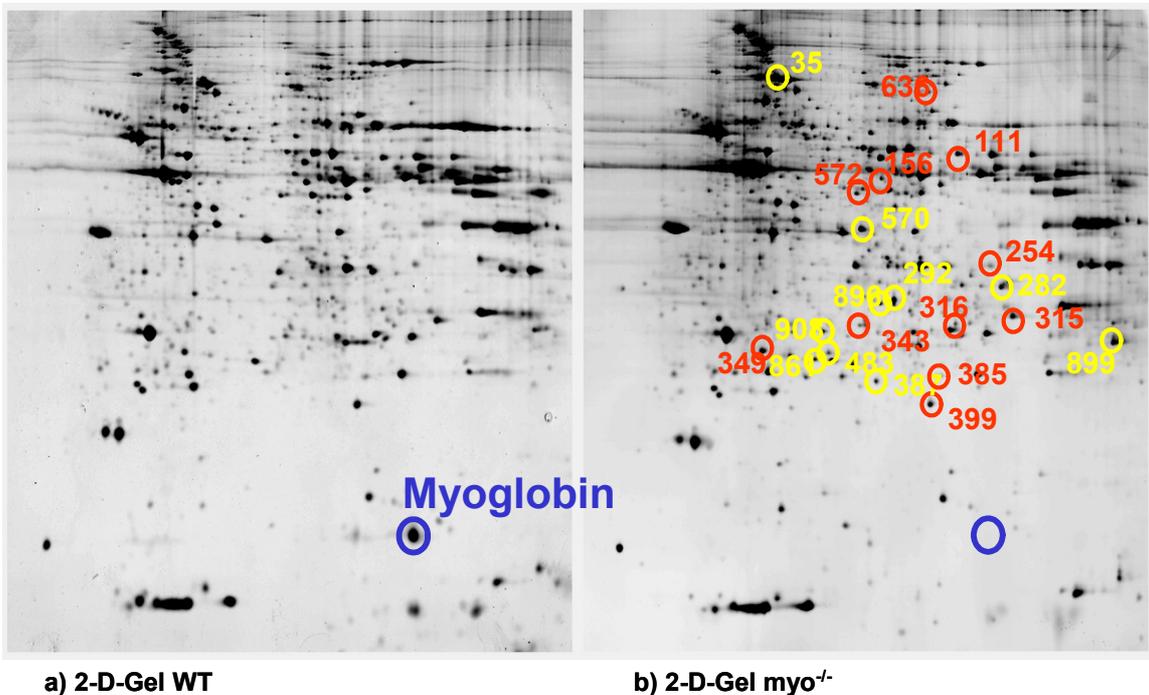


Abb. 2: 2-D Elektrophorese-Gele von WT und myo^{-/-}-Herzen. Markiert sind zehn überexprimierte Proteine (gelb) bzw. elf unterexprimierte Proteine (rot) in myo^{-/-}-Herzen.

Diese Beobachtung wurde durch weitere Westernblot-Messungen unterstützt, die eine 30 %-ige Minderexpression der β -Untereinheit desselben Enzyms in den myo^{-/-}-Herzen zeigten, was eine wichtige Rolle in der Metabolisierung langkettiger FS spielt (27;28). Diese unterschiedliche Proteinausstattung zwischen myo^{-/-}-und WT-Herzen legt die Vermutung nahe, dass im Mb-defizienten Myokard eine verstärkte Metabolisierung von Glucose erfolgt.

Diese Annahme wird durch kürzlich durchgeführte spiro-ergometrische Analysen gestützt: In einem Laufbandversuch (Marc Merx et al., unveröffentlichte Ergebnisse) wurden WT mit myo^{-/-}-Mäusen unter Belastung miteinander verglichen. Es konnte nachgewiesen werden, dass sich der respiratorische Quotient (RQ) zwischen beiden Mäusegruppen signifikant unterscheidet.

Sowohl in Ruhe, als auch unter Belastung zeigt das $\text{myo}^{-/-}$ -Tier einen erhöhten RQ gegenüber dem WT. Der RQ beschreibt das Verhältnis aus CO_2 -Abgabe zu O_2 -Aufnahme. Durch einen unterschiedlichen Sauerstoffgehalt ist der Wert des RQ bei verschiedenen Substraten verändert. So beträgt z. B. der RQ von Glucose 1, während der von Fett bei ca. 0,7 liegt. Aus der Grösse des RQ und der Menge des pro Zeiteinheit verbrauchten Sauerstoffs lässt sich der Energieumsatz eines Organismus ermitteln und indirekt auf die Art des zur Energieerzeugung genutzten Substrates rückschließen (29).

Die Beobachtungen aus beiden Studien führten zu der Hypothese, dass das Herz von $\text{myo}^{-/-}$ -Mäusen eine veränderte Glucose- bzw. FS-Utilisation im Vergleich zum WT zeigt. Auf dieser Hypothese aufbauend, untersucht diese Arbeit gezielt Veränderungen im kardialen Substratmetabolismus bei Mb-Defizienz.

1.4 Fragestellung und experimentelles Modell

Vor dem Hintergrund, daß Mb-defiziente Tiere keinen offensichtlichen Phänotyp zeigen und durch multiple Kompensationsmechanismen charakterisiert sind, stellen sich für diese Arbeit folgende Fragen:

- Bedingt nicht vorhandenes Mb tatsächlich eine veränderte Substratselektion am $\text{myo}^{-/-}$ -Herzen?
- Führt Mb-Defizienz zu erhöhter Glucose- bzw. verminderter FS-Verwertung?
- Zeigen sich funktionelle bzw. energetische Unterschiede bei Versorgung mit kurz- bzw. langkettigen FS?

Um den relativen Substratfluss von Glucose und FS in beiden Gruppen qualitativ und quantitativ messen zu können, wurden isolierte Mäuseherzen retrograd perfundiert und funktionelle sowie energetische Parameter erfasst. Nach Perfusion mit Puffer, der beide Substrate (Glucose und FS) ^{13}C -markiert enthielt, wurde das Herzgewebe unter Verwendung von ^{13}C -NMR-Spektroskopie analysiert. Dies erlaubte die Bestimmung der Fluxraten beider Substrate. Zusätzlich wurden Experimente durchgeführt, in denen untersucht wurde, ob Mb-defiziente Herzen bei alleinigem Angebot von kurzen bzw. langkettigen FS in der Lage sind, die kontraktile Funktion bei verändertem Energiestatus aufrechtzuerhalten.

1.5 NMR-Spektroskopie

1.5.1 Allgemeiner historischer Hintergrund

Den Grundstein für die Kernresonanz-Spektroskopie (NMR) legten die Physiker Felix Bloch und Edward Mills Purcell im Jahre 1946, mit der Beschreibung von Resonanzabsorptionen von Atomkernen in statischen Magnetfeldern, mit der die magnetischen Eigenschaften von Kernen gemessen werden konnten (30;31). Die Erkenntnis, dass das NMR-Signal von der chemischen Umgebung beeinflusst wird, und dass die daraus resultierende 'Chemische Verschiebung' dazu benutzt werden kann, Substanzen zu charakterisieren, sowie dass die Intensität der detektierten Signale proportional zu den Konzentrationen der gemessenen Stoffe ist, eröffnete hieraus ein neues Feld der analytischen Methodik (32;33). Durch die Anwendung supraleitender Magnete höherer Feldstärke und Verbesserungen in der Datenverarbeitung konnten in der Folgezeit Auflösung und Messempfindlichkeit erheblich verbessert werden.

Insbesondere konnte die Entwicklung der Puls-Fourier-Transformation das Signal-Rausch-Verhältnis deutlich erhöhen (34-36).

Anfang der achtziger Jahre eröffnete sich ein weiterer Zweig der NMR-Spektroskopie in der Medizin, als beobachtet wurde, dass das NMR-Signal nicht nur durch die chemische Umgebung verändert werden konnte, sondern auch durch räumliche Unterschiede in der Magnetfeldstärke (37). Diese Erkenntnis lieferte den Grundstein zur Bildgebung mittels *Magnetic Resonance Imaging* (MRI). Die MRI hat heute in der klinischen Medizin eine große Bedeutung in der morphologischen Darstellung von Gehirn, Rückenmark, aber auch anderer Organe, sowie von Weichteilen des Bewegungsapparates.

1.5.2 Anwendung auf biochemische Fragestellungen

Die NMR-Spektroskopie erlaubt die nicht-invasive Untersuchung von *in-vivo* Stoffwechselfvorgängen des menschlichen Körpers und jedes anderen Organismus, ohne dabei die chemische Struktur zu verändern. Dies hat den Vorteil, dass die Methode nicht-ionisierend, sicher und für den Organismus ungefährlich ist. In dieser Arbeit wurden mittels NMR-Spektroskopie drei Kerne (^{31}P , ^{13}C , ^1H) untersucht, um den kardialen Substratmetabolismus eingehend zu untersuchen.

1.) Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie bietet die Möglichkeit, energetische Stoffwechselprozesse im Herzen *in-vivo* zu analysieren. Hiermit können phosphatreiche Stoffwechselprodukte, wie z. B. Phosphokreatin (PCr), Adenosintriphosphat (ATP) und anorganisches Phosphat (Pi) detektiert werden.

Phosphocreatin (PCr) ist ein kurzfristiger Energiespeicher im Muskel. Durch katalysierte Reaktionen können die energiereichen Phosphatgruppen des PCr auf Adenosindiphosphat (ADP) übertragen werden und das Adenosintriphosphat (ATP), der universelle Energiespeicher des Stoffwechsels gebildet werden (29). Aus den gemessenen Daten lassen sich darüber hinaus die freie Energie nach Gibbs (ΔG_{ATP}) und der intrazelluläre pH-Wert (pH_{ic}) berechnen, die weiteren Aufschluss über den Energiehaushalt der Zelle und des Herzens geben.

2.) Die ^1H -NMR-Spektroskopie ermöglicht die Quantifizierung zahlreicher cytosolischer Metabolite, insbesondere des Glutamats, Lactats, Alanins, deren myokardialer Gehalt zusätzliche Hinweise über Veränderungen im Stoffwechsel geben kann.

3.) Unter Einsatz der ^{13}C -NMR-Spektroskopie können Flussstudien am Herzen durchgeführt werden. Der Weg von 1,6- $^{13}\text{C}_2$ -markierter Glucose und U- $^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat kann im Stoffwechsel beobachtet und somit der Anteil des jeweiligen Substrates an der Energiegewinnung bestimmt werden.

1.6 Metabolisierung von 1,6- $^{13}\text{C}_2$ -Glucose

Die Verwendung ^{13}C -markierter Substrate ermöglicht es, den Substratfluss von Glucose und FS über ^{13}C -NMR-Spektroskopie zu quantifizieren. Das Prinzip wird in folgenden Diagrammen zunächst für 1,6- $^{13}\text{C}_2$ -Glucose verdeutlicht (Abb. 3 und 4):

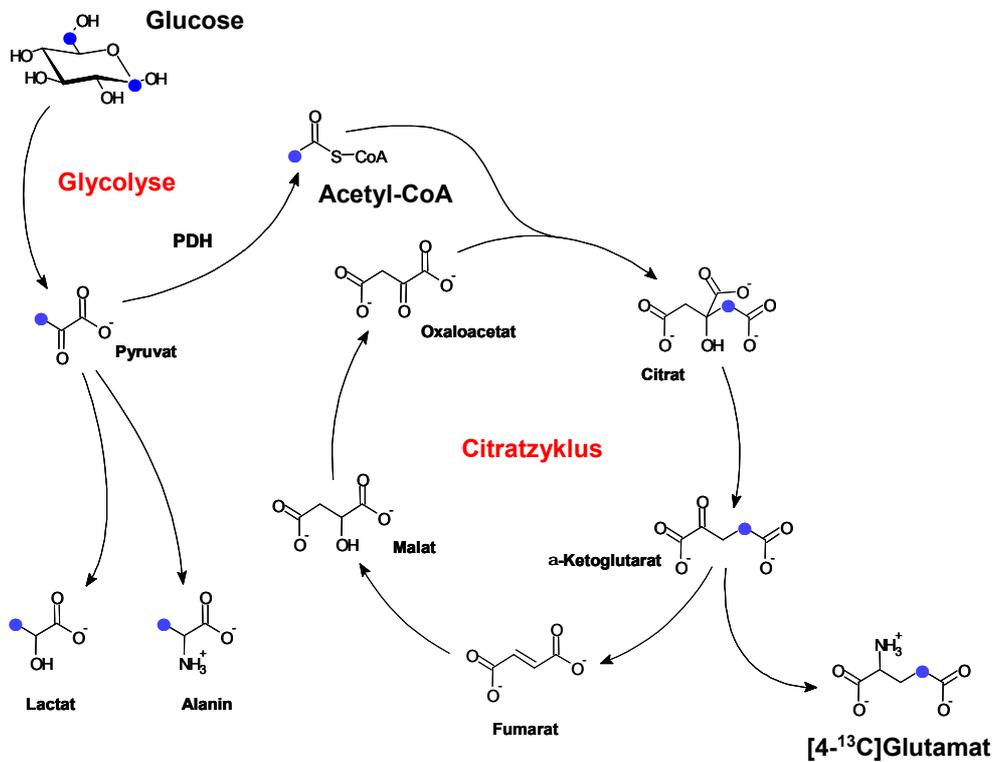


Abb. 3: 1,6-¹³C₂-Glucose Metabolisierung: 1. Durchgang (vereinfacht).

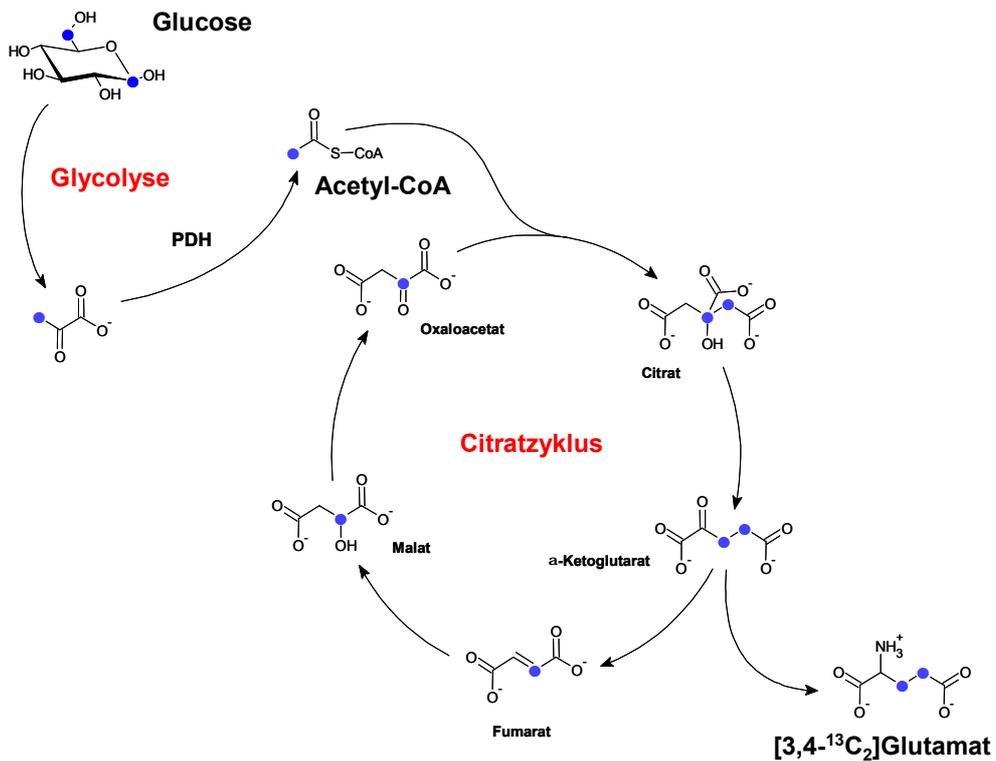


Abb. 4: 1,6-¹³C₂-Glucose Metabolisierung: 2. Durchgang.

[Bei Verbleib der Monomarkierung des α -Ketoglutarats innerhalb des Citratzyklus entsteht über einfach markiertes Fumarat und Malat 2-¹³C-Oxalacetat, an welches ein neues, einfach markiertes 2-¹³C-Acetyl-CoA angelagert wird].

Über die Glykolyse entstehen zwei Moleküle Pyruvat, welche jeweils eine Markierung am C3-Atom tragen. Anschließend erfolgt die Umsetzung zum einfach markierten Acetyl-CoA, welches dann in den Citratzyklus eingeschleust werden kann. Auf diesem Weg wird das markierte ^{13}C -Atom auf weitere Moleküle dieses Zyklus übertragen. Die Position der Markierung im Molekül ist dabei abhängig von der Lokalisation der Primärmarkierung im Ausgangsstoff. So entsteht aus dem an Position C2-markierten Acetyl-CoA das Citrat, welches die Markierung am C4-Atom trägt. Auch α -Ketoglutarat ist am C4-Atom markiert. Von hier kann die Markierung aus dem Zyklus ausgeschleust werden, indem Glutamat entsteht, welches am C4-Atom markiert ist und für die spätere NMR-Analyse von besonderer Bedeutung ist, oder die Markierung verbleibt unter Bildung von Fumarat im Zyklus. In diesem Falle wird die Markierung so lange weiterübertragen, bis schließlich 2- ^{13}C -Oxalacetat entsteht. Bei erneuter Zufuhr von 2- ^{13}C -markiertem Acetyl-CoA entsteht über Anlagerung an Oxalacetat ein zweifach 3,4- $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Citrat und darüber ein zweifach 3,4- $^{13}\text{C}_2$ -markiertes Glutamat (vgl. Abb. 4).

Nach zwei kompletten Zyklen entstehen aus 1,6- $^{13}\text{C}_2$ -Glucose zwei für diese Arbeit relevante Glutamat-Isotopomere, dessen Konzentrationen über ^{13}C -NMR-Spektroskopie gemessen werden können. Durch die unterschiedliche Markierung dieser Moleküle werden im NMR-Spektrum spezifische Kopplungsmuster hervorgerufen, die eine Differenzierung der beiden Isotopomere ermöglicht (siehe Abb. 5).

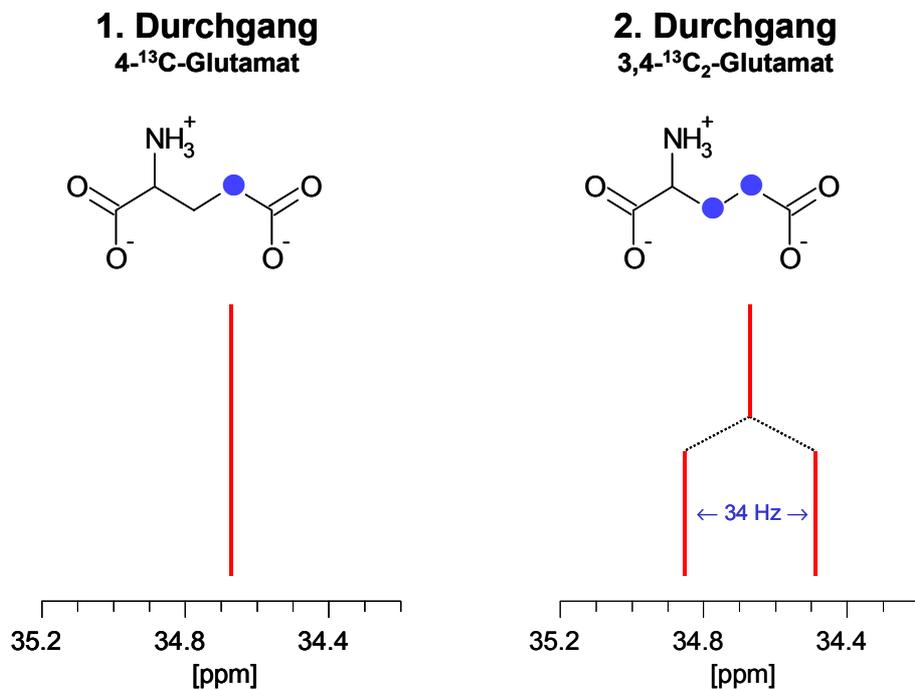


Abb. 5: Spezifische Kopplungsmuster von 4-¹³C-Glutamat und 3,4-¹³C₂-Glutamat: Singulett für monomarkiertes 4-¹³C-Glutamat. Die benachbarten ¹³C-Atome in 3,4-¹³C₂-Glutamat führen zu einer Aufspaltung dieses Signals in ein Duplett mit der Kopplungskonstante J=34 Hz.

1.7 Metabolisierung von U-¹³C₁₆-Palmitat

Die β -Oxidation von U-¹³C₁₆-Palmitat liefert zweifach markiertes 1,2-¹³C₂-Acetyl-CoA (vgl. Abb. 6 und 7). Dieses generiert über Anlagerung an Oxalacetat zweifach markiertes 4,5-¹³C₂-Citrat und zweifach markiertes 4,5-¹³C₂- α -Ketoglutarat. Durch Ausschleusung der Markierung, entsteht zweifach markiertes 4,5-¹³C₂-Glutamat. Bei Verbleib der Markierung im Zyklus kommt es bei Reaktion mit einem weiteren 1,2-¹³C₂-Acetyl-CoA zunächst zu vierfach markiertem Citrat. Durch Decarboxylierung geht jedoch ein ¹³C-markiertes C-Atom verloren und es entsteht 3,4,5-¹³C₃- α -Ketoglutarat, über welches dreifach markiertes 3,4,5-¹³C₃-Glutamat gebildet wird.

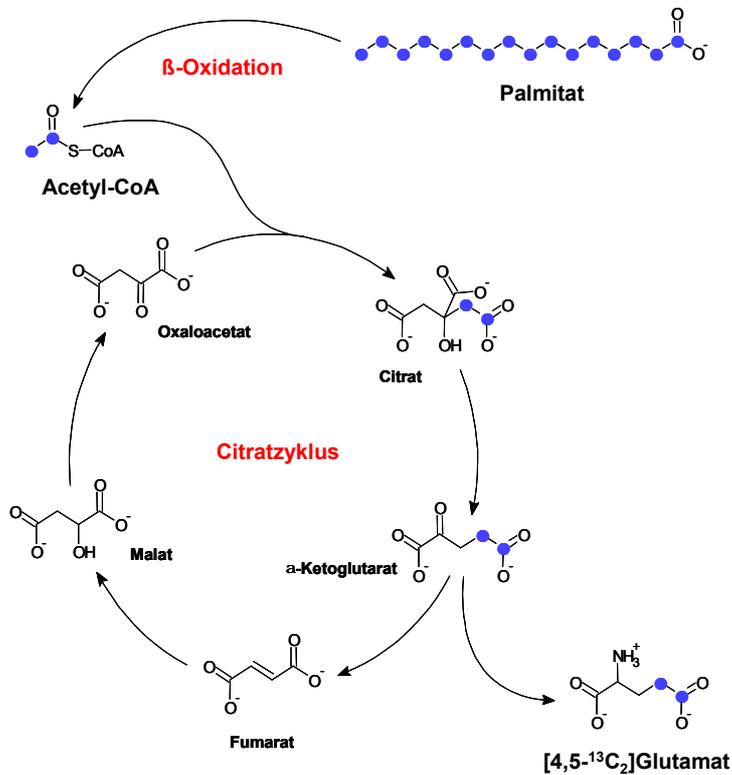


Abb. 6: $U\text{-}^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat Metabolisierung: 1. Durchgang (vereinfacht).

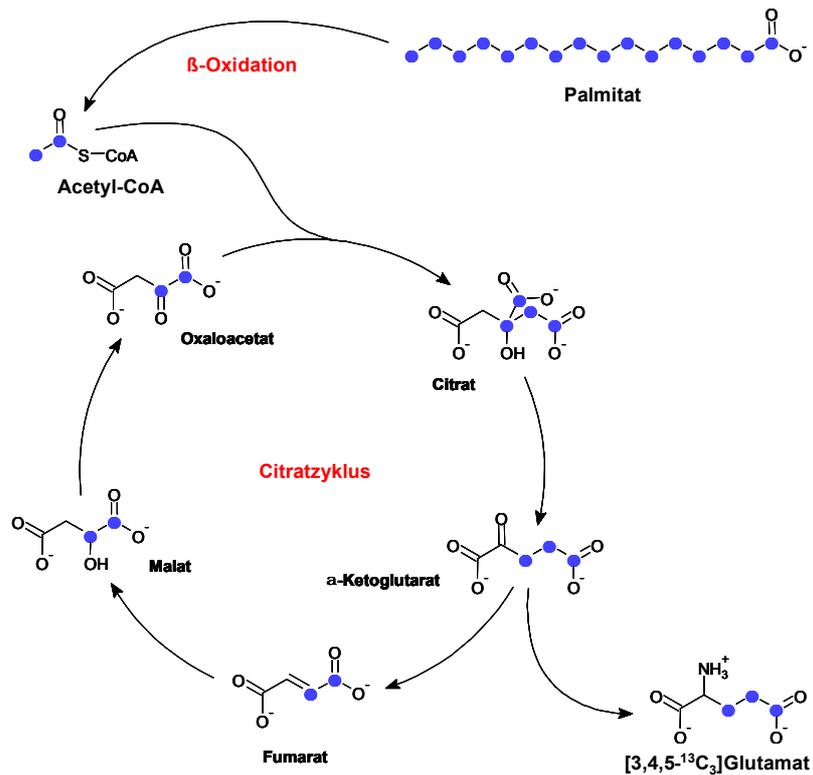


Abb. 7: $U\text{-}^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat Metabolisierung: 2. Durchgang.

[Bei Verbleib der Markierung des α -Ketoglutarats innerhalb des Citratzyklus entsteht über zweifach markiertes Fumarat und Malat 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Oxalacetat, an welches ein neues, zweifach markiertes 1,2- $^{13}\text{C}_2$ -Acetyl-CoA angelagert wird].

Analog zum vorherigen Beispiel können mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie die unterschiedlich markierten Glutamat-Moleküle ($4,5\text{-}^{13}\text{C}_2$ - und $3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3$), aus der Verstoffwechslung von $\text{U-}^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat identifiziert werden. Die spezifischen Kopplungsmuster im NMR-Spektrum erlauben sowohl ihre Differenzierung voneinander, als auch von den $4\text{-}^{13}\text{C}$ - und $3,4\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glutamat-Isotopomeren, die aus der Verstoffwechslung von $1,6\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glucose stammen (siehe Abb. 8). Die Isotopomerenanalyse des Glutamat C4 ermöglicht es somit, den Anteil des Acetyl-CoA, der aus der Verstoffwechslung von Glucose bzw. Palmitat in den Citratzyklus eingeschleust wird, zu bestimmen und wie weiter unten beschrieben die relativen Substratflüsse von Glucose und Palmitat zu berechnen.

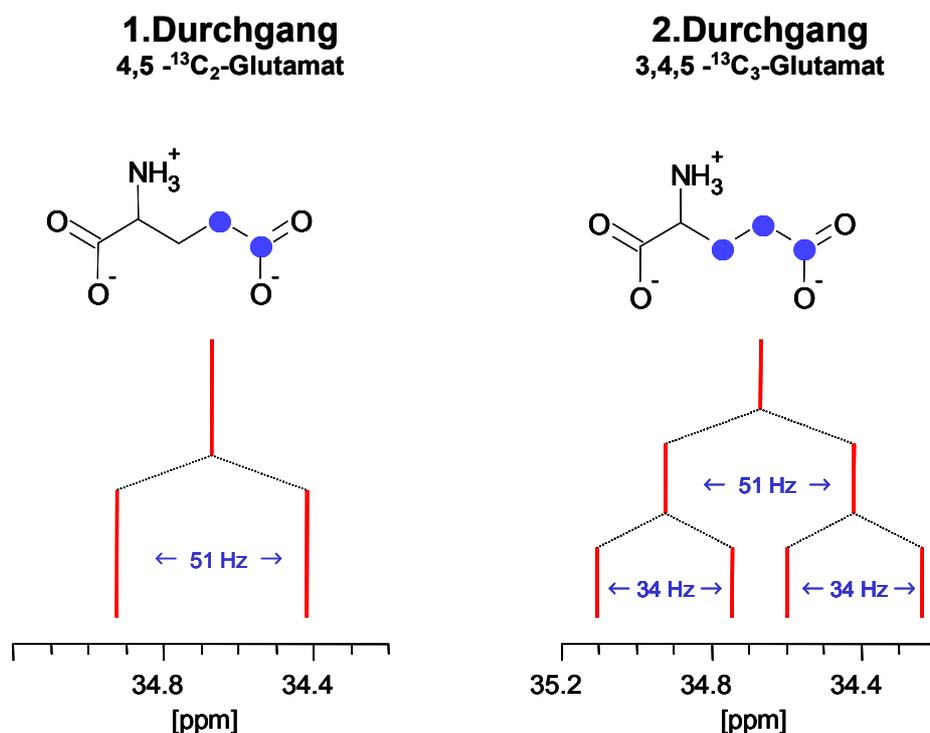


Abb. 8: Spezifisches Kopplungsmuster von $4,5\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glutamat und $3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3$ -Glutamat: Nachbarschaft von ^{13}C -Atomen an den Positionen 4 und 5 führt zu einer Aufspaltung des beobachteten Signals mit einer Kopplungskonstante von $J=51$ Hz. Die zusätzliche ^{13}C -Markierung an Position 3 führt zu einer weiteren Aufspaltung des Signals zu einem Quartett bzw. Duplett von Duplett.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Für die Versuche wurden WT und homozygote $myo^{-/-}$ -Labormäuse vom NMRI-Stamm mit einem Körpergewicht von 30-50 g und einem Herzgewicht von ca. 200-250 mg verwendet. Mb-Defizienz wurde durch Deletion des essentiellen Exon-2 induziert, welches für die Aminosäuren 31-105 der 154-Kette des Mb-Proteins kodiert (20;38). Exon 2 exprimiert sowohl die Proteine für die Häm-Bindungsstelle, als auch bestimmte Histidin-Ketten, die für die Stabilisierung der Häm-Gruppe essentiell sind. Phänotypisch zeigt die $myo^{-/-}$ -Maus Depigmentierungen am Herzen, sowie am Musculus soleus. Eine äußere Differenzierung am lebenden Tier ist zwischen beiden Mäusegruppen nicht möglich.

2.2 Präparation

Das Versuchstier wurde durch intraperitoneale Injektion von Urethan (1,5 g/kg) narkotisiert und mit 250 IE Heparin *i.p.* antikoaguliert. Anschließend wurde der Thorax durch transversale Inzision in Zwerchfellhöhe und Abtragung des vorderen Thoraxschildes eröffnet. Das Herz mitsamt Lungengewebe wurden aus dem Thorax entnommen und direkt durch eisgekühlten Krebs-Henseleit-Puffer (KHB) stillgestellt (39). Zügig wurde das Lungen- und umgebende Fettgewebe unter mikroskopischer Sicht entfernt, die Aorta freipräpariert und der linke Vorhof für spätere Messungen eröffnet.

2.3 Perfusion isolierter Mäuseherzen

Die Aorta wurde kanüliert und das Herz nach Langendorff perfundiert (40). Verwendet wurde ein modifizierter KHB, der mit Carbogen oxygeniert (95 % O₂/5 % CO₂) und auf 37 °C temperiert wurde. Der Perfusionsdruck betrug 100 mmHg und wurde zunächst über eine Wassersäule konstant gehalten. Über eine Inzision an der Arteria pulmonalis wurde das Effluat über einen selbstproduzierten Katheter, durch eine peristaltischer Pumpe (Perpex Jubile) mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min, abgesaugt und der koronar-venöse Partialdruck (PvO₂) durch eine Sauerstoffelektrode kontinuierlich gemessen (41). Um den linken Ventrikel funktionell beurteilen zu können, wurde über den eröffneten linken Vorhof ein Ballon in den linken Ventrikel eingeführt. Dieser Ballon bestand aus einer transparenten Kunststoffolie, die dicht um einen Katheter gewickelt wurde. Die vollständige Entfaltung des Ballons mit Wasser ergab einen Durchmesser von ca. 0,7 cm. Die Messung des linksventrikulären Druckes erfolgte über den Anschluss an eine Druckstation (von Isotec™). Zuletzt wurden zwei ca. 0,5 cm lange Silber-Elektroden-Nadeln (aus der Werkstatt der HHU) jeweils am linken und am rechten Herzohr platziert, um das Herz nach einer Stabilisierungsphase durch einen Schrittmacher (HSE Stimulator P, Typ 201, Hugo Sachs), mit einer Frequenz von 500 Schlägen pro Minute konstant zu stimulieren. Anschliessend wurden die in Tabelle 1 dargestellten funktionellen Parameter bei konstantem Perfusionsfluss gemessen.

Linksventrikulärer Druck	LVDP
Herzfrequenz	HF
Koronarer Perfusionsdruck	CPP
Koronarer Fluss	CF
Koronar-venöser Sauerstoff-Partialdruck	PvO ₂

Tabelle 1: Funktionelle Parameter.

2.3.1 Verwendete Lösungen und Substrate

Neben der Standardzusammensetzung des KHB zur Perfusion isolierter Mäuseherzen wurden Puffer mit markierten Substraten und kurzkettigen FS verwendet (genaue Zusammensetzung s. Tab. 2,3,4). Der Puffer für die markierten Substrate wurde nach der Methode von Barr und Lopaschuk hergestellt (42).

Glucose	10,0 mM
Insulin	100 µU
NaCl	116,0 mM
KCl	4,63 mM
MgSO ₄	1,10 mM
KH ₂ PO ₄	1,18 mM
NaHCO ₃	24,9 mM
CaCl	2,52 mM
EDTA+Na	0,5 mM

Tabelle 2: Standardlösung.

Octansäure bzw.	1 mM
Palmitinsäure	0,5 mM
NaCl	116,0 mM
KCl	4,63 mM
MgSO ₄	1,10 mM
KH ₂ PO ₄	1,18 mM
NaHCO ₃	24,9 mM
CaCl	2,52 mM
EDTA+Na	0,5 mM

Tabelle 3: Perfusionslösung mit kurz- bzw. langkettigen FS.

1,6- ¹³ C ₂ -Glucose	5 mM
U ¹³ C ₁₆ -Palmitat	0,5 mM
Albumin	3 %
Insulin	100 µU
NaCl	116,0 mM
KCl	4,63 mM
MgSO ₄	1,10 mM
KH ₂ PO ₄	1,18 mM
NaHCO ₃	24,9 mM
CaCl	2,52 mM
EDTA+Na	0,5 mM

Tabelle 4: Perfusionslösung mit markierten Substraten.

2.3.2 Markierungsexperimente

Die Mäuseherzen wurden (vgl. Kap. 2.2) präpariert und mit der Standardlösung (KHB 10 mM Glucose) zur Stabilisierung für ca. 30 min perfundiert. Anschließend wurde das Perfusions-Medium auf einen Puffer umgestellt, der beide Substrate (5 mM Glucose und 0,5 mM Palmitat) sowie 100 μ U Insulin enthielt. Zunächst wurde unmarkiertes Substrat verwendet, um nach der Pufferumstellung das Herz für ca. 20 min an das veränderte Substratgemisch adaptieren zu lassen. Für die Oxygenierung dieses Puffers wurde ein Oxygenator (angefertigt in der Glasbläserei der HHU) benötigt, da Palmitat aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften an Albumin gebunden werden muss, um in Wasser gelöst zu werden. Abschließend wurde auf den „markierten“ Puffer umgestellt, der 5 mM 1,6- $^{13}\text{C}_2$ -Glucose, 0,5 mM $\text{U}^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat und 100 μ U Insulin enthielt und das Herz für ca. 25 min perfundiert (vgl. Abb. 9). Nach jedem Experiment wurde das Herz mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend für die ^{13}C -NMR-spektroskopische Messung mit Perchlorsäure (PCA) extrahiert (vgl. Kap. 2.4).

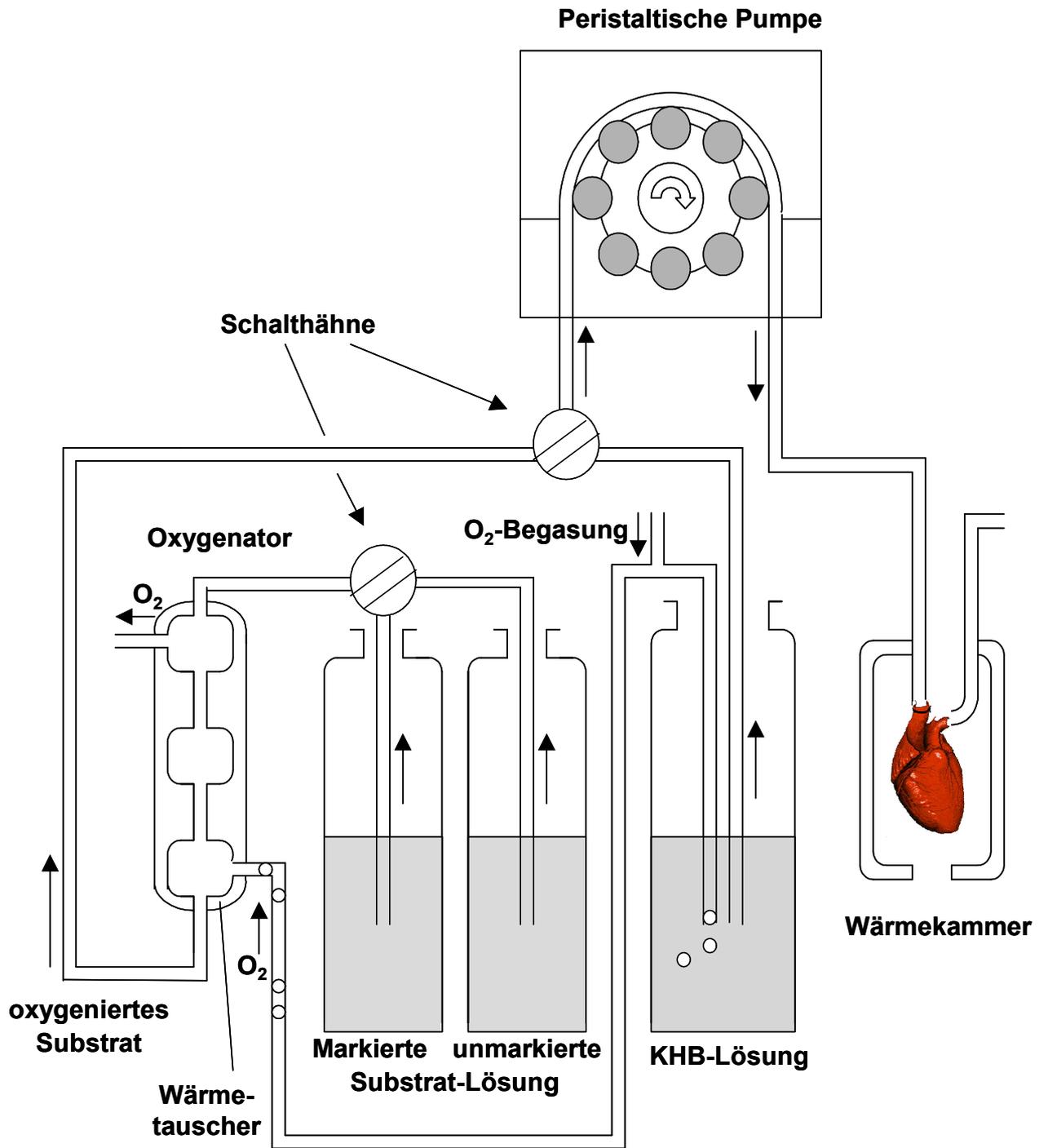


Abb. 9: Schematische Darstellung der Perfusionsapparatur.

2.3.3 Glucose vs. Octanoat / Palmitat

Neben den Analysen der Substratmetabolisierung wurden zusätzliche Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob *myo*^{-/-} und WT-Herzen bei alleinigem Angebot von kurz- bzw. langkettigen FS gleichermaßen in der Lage sind, die kontraktile Funktion und Energetik aufrechtzuerhalten. Das isolierte Mäuseherz wurde nach der Präparation mit KHB (10 mM Glucose) für 30 min perfundiert. Nach der Stabilisierungsphase wurde auf einen KHB umgestellt, der als Substrat Octanoat (1 mM), eine kurzkettige FS, bzw. Palmitat (0,5 mM), eine langkettige FS enthielt und das Herz für 30 min perfundiert. Abschließend wurde zur Simulation maximaler Arbeitsleistung eine Katecholamin-Lösung (Dobutamin-Stammlösung 20 µM; Endkonzentration von 200 nM) koinfundiert. Funktionelle Parameter (LVDP, HF, CPP, CF, CvPO₂) wurden auch hier gemessen und energetische Parameter (PCr, ATP, pH_{ic}, Pi) wurden über ³¹P-NMR-Messungen am isolierten Mäuseherzen erfasst.

2.4 Herzextraktion schockgefrorener Herzen

Für die ¹H und ¹³C-NMR-Analysen wurden lyophilisierte, mit PCA versetzte Extrakte aus den schockgefrorenen Herzen hergestellt. Dazu wurde jedes schockgefrorene Herz unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert, mit PCA (1 M) versetzt und anschließend zentrifugiert (4000 rpm/10 min/4 °C). Der Bodensatz wurde zur Bestimmung des Proteingehaltes nach Lowry mit 10 ml NaOH (1 M) versetzt. Der pH des Überstandes (ca. 1,5 ml) wurde auf 6,4 eingestellt, anschließend zentrifugiert und der erneute Überstand in 50 ml Glaskolben lyophilisiert (Lyovac GT 2). Diese PCA-Extrakte wurden für die NMR-Messungen in 0,5 ml D₂O gelöst und zentrifugiert, um überschüssiges KClO₄ zu entfernen.

2.5 Kernresonanzspektroskopie

Die ^{13}C -NMR-Spektroskopie wurde für die Messungen der Substratflüsse verwendet. Diese Spektren wurden mit einer Frequenz von 100,6 MHz in einem DRX 400 MHz NMR-Spektrometer der Firma Bruker gemessen. Für die einzelnen Spektren wurden 20000 Scans, mit einem Pulswinkel von 30° und einer Repetitionszeit von 1,7 s aufgenommen. Über einen 5-mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ Dual-Probenkopf wurde eine Spektralbreite von 25062 Hz erfasst. Der Datensatz umfasst 32 K, das Zero Filling 64 K, die Exponential-Multiplikation ergab eine Linienverbreiterung von 1 Hz. Die chemische Verschiebung wurde auf C3-Lactat bei 21,3 ppm bezogen.

Die ^1H -NMR-Spektroskopie wurde für die Gesamtkonzentrationsbestimmung essentieller Metabolite wie Glutamat, Alanin, Lactat, Taurin verwendet. Die Spektren wurden über den 5-mm $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ Dual-Probenkopf mit einer Frequenz von 400,1 MHz gemessen. Folgende Parameter wurden für jede Messung eingestellt: Jedes Spektrum wurde über eine Spektralbreite von 5580 Hz aus 512 Einzelscans aufgenommen. Der Pulswinkel betrug 40° , die Repetitionszeit 15 s. Der Datensatz umfasst 16 K, das Zero Filling 32 K. Bei jeder Messung wurde eine Wasserunterdrückung durchgeführt. Die chemische Verschiebung wurde auf das Signal von (Trimethylsilyl)-Propion-2,2,3,3, d_4 -Säure bei 0 ppm bezogen.

Energetische Parameter wurden mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie an isolierten Herzen erfasst (vgl. Tab. 5). Die Herzen wurden mit kurzkettigen (Octanoat) bzw. langkettigen (Palmitat) FS perfundiert und zur NMR-Messung in den Magneten überführt (Abb. 10). Alle Spektren wurden über einen 10-mm $^1\text{H}/^{31}\text{P}$ Dual-Probenkopf, mit einer Frequenz von 161,97 MHz und einer Spektralbreite von 5882 Hz aufgenommen. Der pH_{ic} wurde aus der chemischen Verschiebung von anorganischem Phosphat, relativ zum

Phosphokreatin (PCr) bei $-2,52$ ppm berechnet. Alle Signale wurden integriert und mit Hilfe von Sättigungsfaktoren in Konzentrationen umgerechnet (43). Mit folgenden Einstellungsparametern wurde gemessen: 240 Einzelscans, Pulsationswinkel von 75° , Repetitionszeit von 1 s, Grösse des Datensatzes von 4 K, Zero Filling von 8 K und eine Linienverbreiterung von 10 Hz bei Exponential-Multiplikation und einer Gesamtaufnahmezeit von 4 min.

Anorganisches Phosphat	Pi
Phosphokreatin	PCr
Adenosintri-phosphat	ATP
Intrazellulärer pH-Wert	pH _{ic}

Tabelle 5: Mittels ^{31}P -NMR gemessene energetische Parameter.

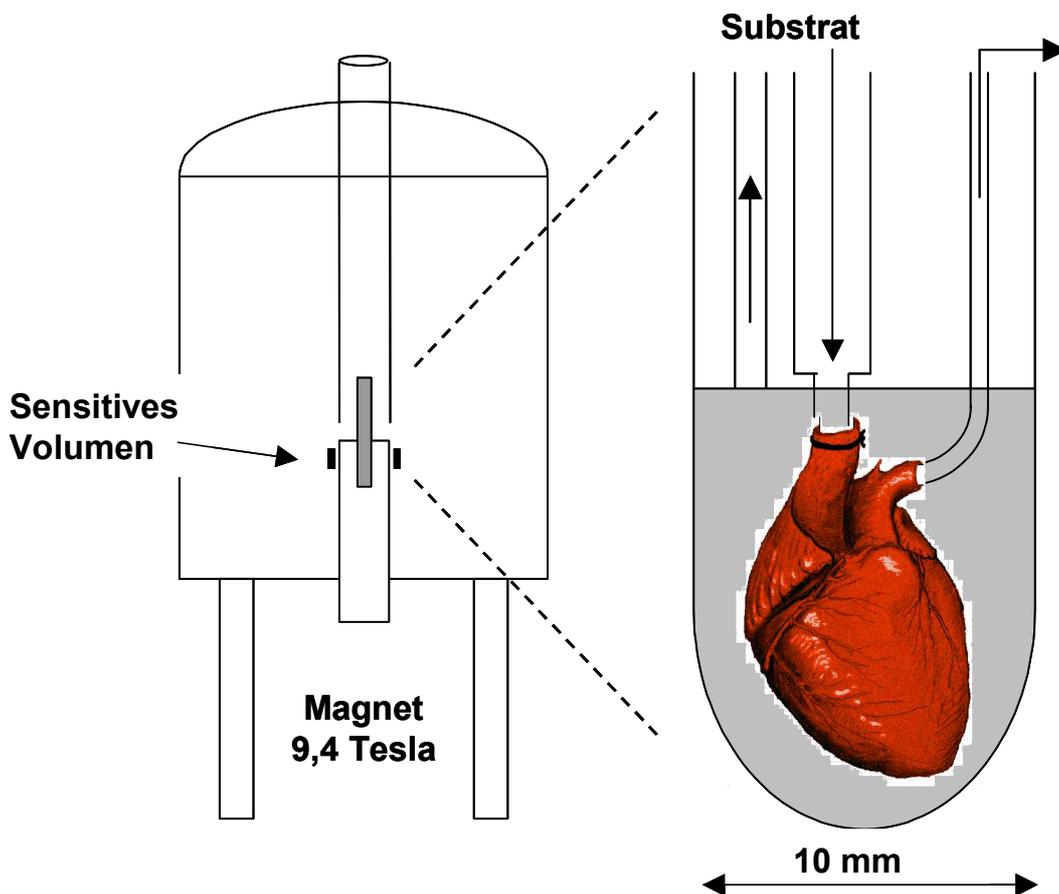


Abb. 10: ^{31}P -NMR-Spektroskopie am isolierten Mäuseherzen.

2.6 Berechnung der Substratflüsse

Für die Berechnung der relativen Substratflüsse von Glucose und Palmitat wurden ^{13}C -NMR-Spektren aufgenommen und für den Anteil des natürlich vorkommenden Isotops (1,1 %) korrigiert. Die relative Konzentration des aus Glucose oder Palmitat generierten Glutamats wurde über die Intensität der Signale aus den Isotopomer-Analysen von C3- und C4-Glutamat gemessen (vgl. Kap. 1.6 und 1.7). Unter Einbeziehung endogener Substratquellen wurden die Substratflüsse nach folgenden Formeln berechnet (44):

- (1) $F_{\text{Glucose}} = (\text{C4D34})/(\text{C4/C3})$
- (2) $F_{\text{Palmitat}} = (\text{C4Q})/(\text{C4/C3})$
- (3) $F_{\text{endogen}} = 1 - F_{\text{Glucose}} - F_{\text{Palmitat}}$

C3	Gesamt-Signalintensität C3-Glutamat
C4	Gesamt-Signalintensität C4-Glutamat
D34	Anteil der Signalintensität C3,4-Glutamat an der Gesamtintensität C4
Q	Anteil der Signalintensität C3,4,5-Glutamat an der Gesamtintensität C4

Tabelle 6

Der Substratfluss von Glucose wurde aus dem Quotienten der Signalintensitäten des 3,4-C₂-Glutamats und dem Verhältnis der Gesamtintensität von C₄- zu C₃-Glutamat berechnet. Aus dem Quotient der Signalintensitäten des Quartetts C₄-Glutamat und dem Verhältnis der Gesamtintensität von C₄- zu C₃-Glutamat wurde der Anteil des Palmitats ermittelt. Der endogene Substratfluss (z.B. aus Glykogen oder Aminosäuren) ist die Differenz beider Substratflüsse zu Eins. Zur Bezeichnung der verschiedenen Isotopomere in den oben genannten Formeln (1, 2 und 3) vergleiche Tab. 7 und Abb. 11 (Weitere Einzelheiten zur Methodik finden sich im Anhang).

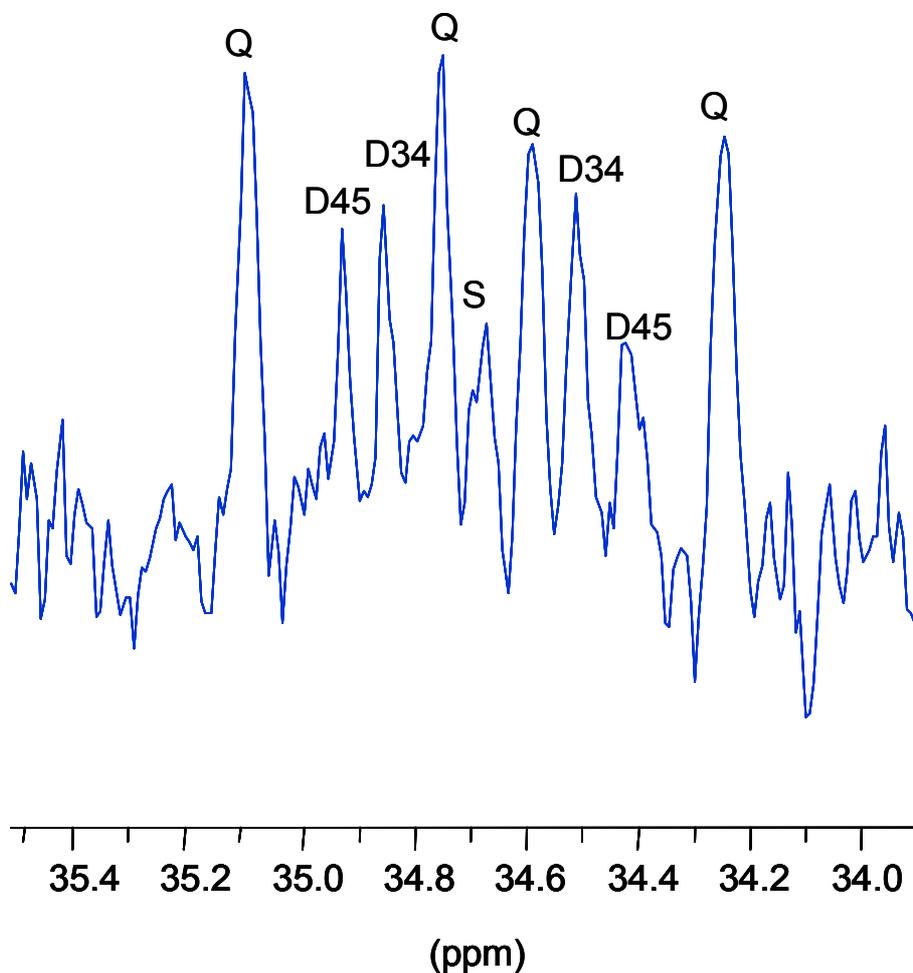


Abb. 11: Spezifische Kopplungssignale aus dem U-¹³C₁₆-Palmitat-Metabolismus: D45: Duplett resultierend aus 4,5-¹³C₂-Glutamat; Q: Quartett resultierend aus 3,4,5-¹³C₃-Glutamat Aus dem 1,6-¹³C₂-Glucose-Metabolismus: D34: Duplett resultierend aus 3,4-¹³C₂-Glutamat; S: Singulett resultierend aus 4-¹³C-Glutamat (vgl. auch Kap.1.6 und 1.7).

3 Ergebnisse

3.1 Gemessene Substratflüsse in den Markierungsexperimenten

Die Beurteilung der Substratflüsse erfolgt anhand einer ^{13}C -Isotopomeren-Analyse, da hier – wie unter 1.6 und 1.7 dargelegt – über das Kopplungsmuster des Glutamat-Kohlenstoffs 4 eine Unterscheidung zwischen Glucose und Palmitat-Utilisation möglich ist. Wie aus Abb. 12 ersichtlich ist, zeigen die resultierenden ^{13}C -Spektren der $\text{myo}^{-/-}$ -Gruppe ein verändertes Spektralmuster. Auffällig sind die beiden prominenten Signale mit der Kopplungskonstante von 34 Hz, die dem $3,4\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glutamat zuzuordnen sind. Im Spektrum der Kontrollgruppe dagegen sind diese Signale weniger ausgeprägt. Hier sind hauptsächlich die vier Signale, die dem Kopplungsmuster des $3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3$ -Glutamats entsprechen, zu beobachten.

Die Unterschiede in den Spektren zeigen, dass Mb-defiziente- und WT-Herzen offenbar unterschiedliche Substrate bevorzugen. Die erhöhte Konzentration des $3,4\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glutamats entspricht einer verstärkten Utilisation von Glucose im $\text{myo}^{-/-}$ -Herzen. Umgekehrt spricht die vermehrte Entstehung von $3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3$ -Glutamat für die vorwiegende Verbrennung von Palmitat zur Energiegewinnung in der Kontrollgruppe.

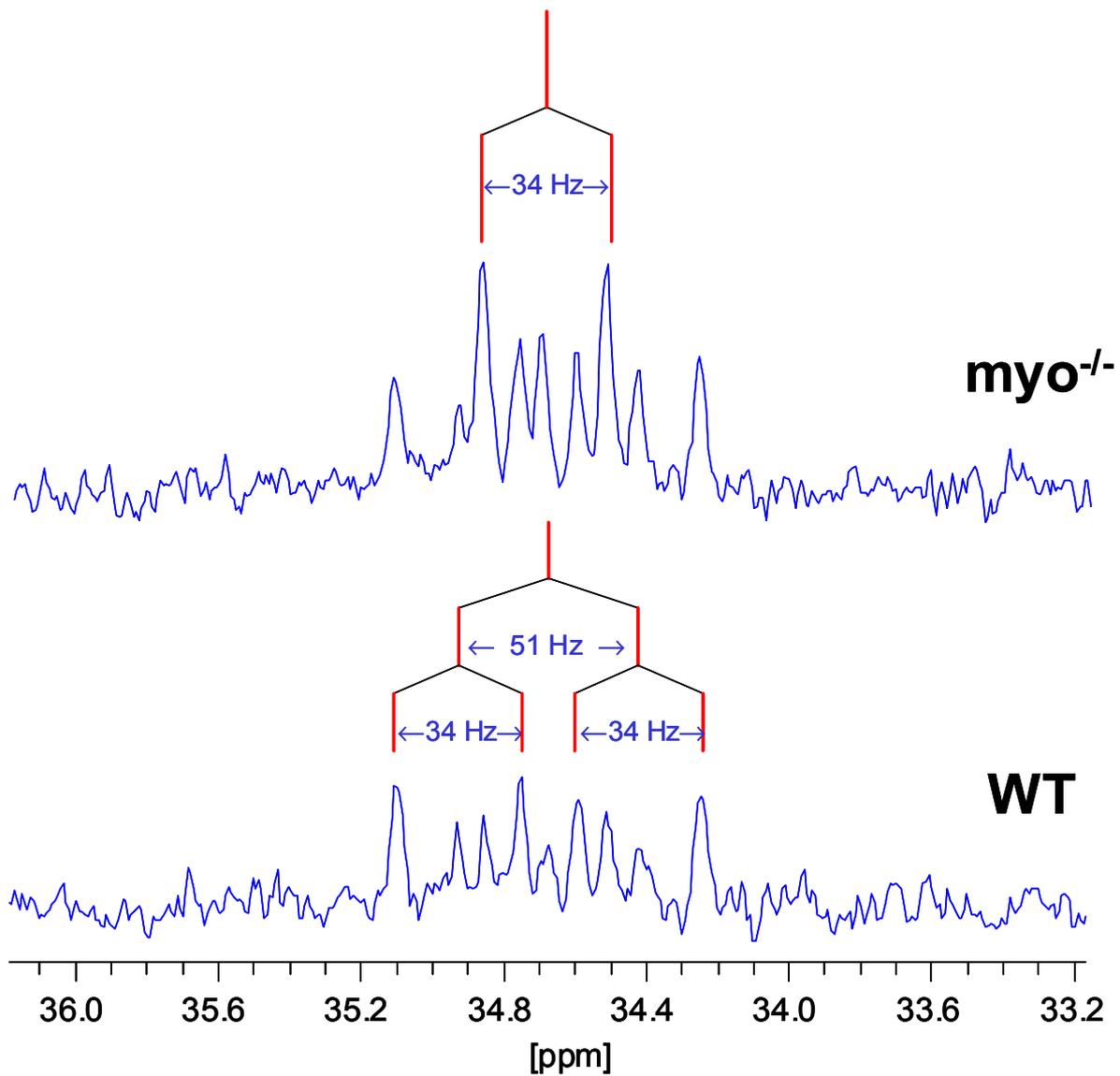


Abb. 12: Exemplarische ^{13}C -NMR-Spektren der C4-Glutamat-Region für die *myo^{-/-}*- und Kontrollgruppe. Prominentes Kopplungsmuster von 34 Hz resultierend aus der Verstoffwechslung 1,6- $^{13}\text{C}_2$ -Glucose in Mb-defizienten Herzen (oben), bzw. dominierendes Kopplungsquartett resultierend aus der Verstoffwechslung von U- $^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat in WT-Hezen (unten) (vgl. Abb. 5 und 8).

3.1.1 Berechnete Substratflüsse im Vergleich

Die Quantifizierung der Substratflüsse aus den ^{13}C -NMR-Spektren wurde mit den oben dargestellten Formeln nach Malloy et al. durchgeführt (44). Die Berechnungen bestätigten den qualitativen Eindruck aus Abb. 12 und zeigen eine signifikant veränderte Substratverwertung zwischen $\text{myo}^{-/-}$ und WT. Die Kontrollgruppe verwertet Glucose zu $22\% \pm 5\%$ und Palmitat zu $66\% \pm 11\%$, was in etwa der Substratverwertung des gesunden menschlichen Herzens entspricht (7). Im Gegensatz dazu verstoffwechseln die Mb-defizienten Tieren $38\% \pm 8\%$ Glucose und $42\% \pm 6\%$ Palmitat. Endogene Substrate, z. B. Glykogen oder Aminosäuren, werden von beiden Gruppen annähernd gleich verstoffwechselt, von der Kontrollgruppe zu $15\% \pm 8\%$, von der $\text{myo}^{-/-}$ -Gruppe zu $20\% \pm 9\%$ (Abb. 13).

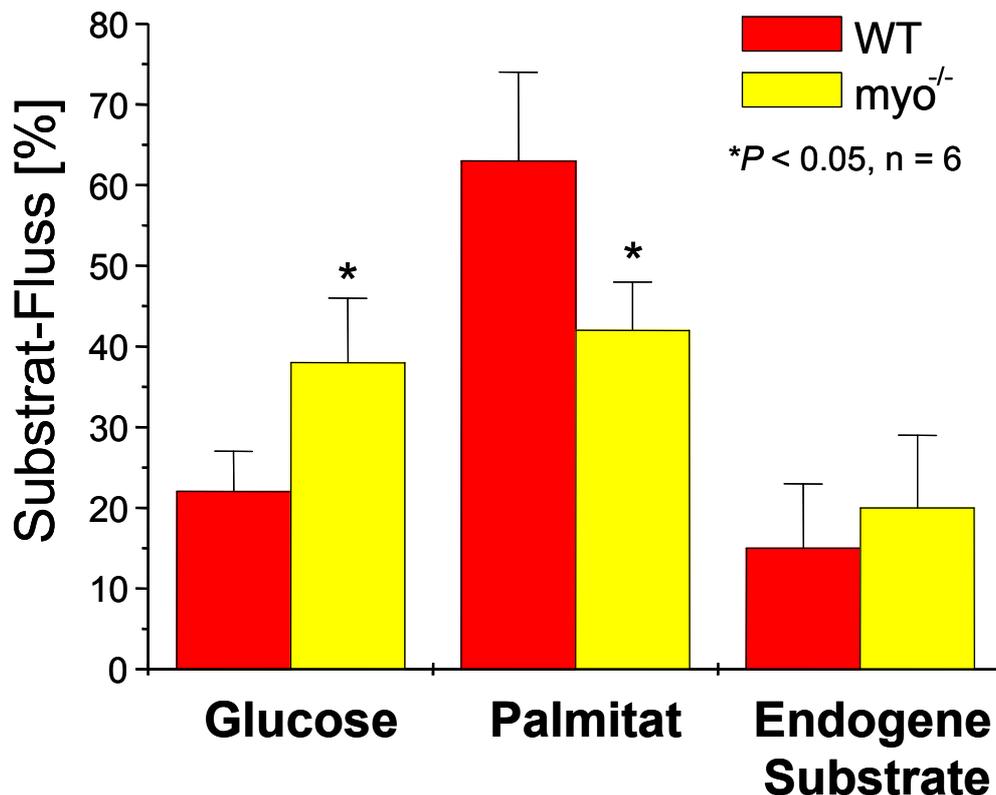


Abb. 13: Substratutilisation von WT und $\text{myo}^{-/-}$ -Herzen.

3.2 Metabolitenkonzentrationen

Im Gegensatz zu den ^{13}C -Spektren zeigten die ^1H -NMR-Spektren für die Metabolite Glutamat, Lactat, Alanin und Taurin keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (vgl. Abb. 14). Der Wert für Taurin lag in beiden Gruppen im Bereich von 29 mM, Lactat bei 4,3-4,8 mM. Glutamat zeigte sowohl in der Kontroll- als auch in der transgenen Gruppe einen Wert von 2,8 mM, das Alanin mit der niedrigsten Konzentration im Bereich von 2 mM. Dies bedeutet, dass der Gesamtpool der für die obigen Berechnungen relevanten Stoffwechselprodukte, insbesondere das Glutamat, in beiden Gruppen gleich ist.

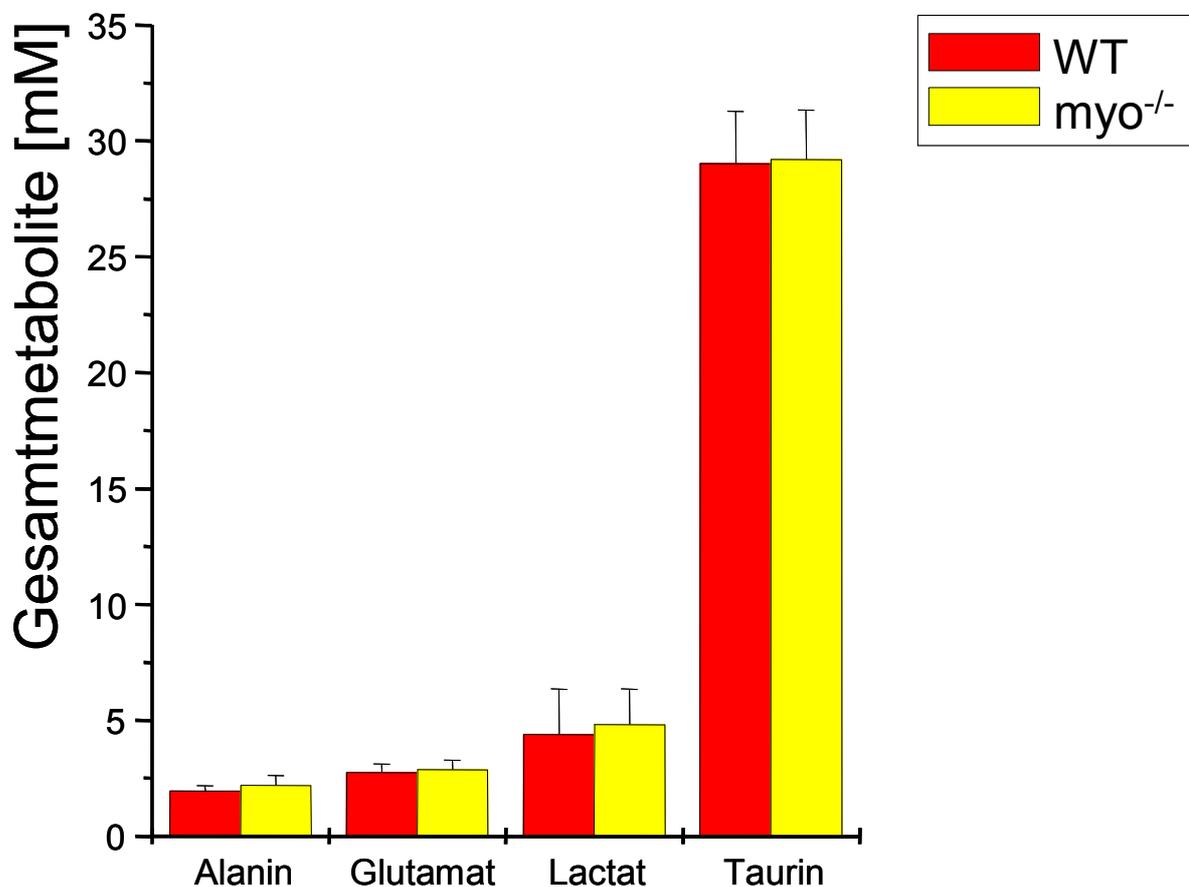


Abb. 14: Metabolitenkonzentrationen von WT und myo^{-/-}-Herzen.

3.3 Substratwechsel von Glucose zu Palmitat

Da Mb-defiziente Herzen offenbar verstärkt zu einer Verwendung von Glucose zur Energiebereitstellung neigen, sollte in zusätzlichen Versuchsreihen die Auswirkung alleiniger FS-Perfusion auf funktionelle (LVDP, dP/dt , CPP, CF und $CvPO_2$) und energetische Parameter (PCr, ATP, ADP, pH_i , und ΔG_{ATP}) von $myo^{-/-}$ -Herzen untersucht werden. Interessanterweise zeigte die $myo^{-/-}$ -Gruppe bei der Umstellung von 10 mM Glucose auf 0,5 mM Palmitat ähnliche Werte, wie sie bei der Kontrollgruppe zu beobachten waren (vgl. Abb. 15 a-f). Der LVDP lag unter Glucose-Perfusion bei der $myo^{-/-}$ -Gruppe bei $99,0 \pm 11,25$ mmHg, bei der Kontrollgruppe bei $121,50 \pm 12,10$ mmHg. Bei Umstellung auf Palmitat zeigte sich ein nur geringer Abfall im LVDP auf $82,50 \pm 20,25$ mmHg in der $myo^{-/-}$ -Gruppe, gegenüber $97,0 \pm 19,39$ mmHg in der Kontrollgruppe. Am Ende der jeweiligen Versuchsreihen während der Perfusion mit Palmitat wurde eine Maximal-Belastung der Herzen durch Katecholamin-Stimulation induziert. In beiden Gruppen kam es zu einer positiv inotropen Reaktion der Herzen bei β -adrenerger Stimulation mit 200 nM Dobutamin. Die $myo^{-/-}$ -Gruppe zeigte einen Anstieg des LVDPs auf $129,50 \pm 15,12$ mmHg, die WT-Gruppe auf $140,50 \pm 16,69$ mmHg (Abb. 15a).

Insgesamt konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen beobachtet werden, weder bei alleiniger Perfusion mit Palmitat, noch bei zusätzlicher β -adrenerger Stimulation. Analog zum LVDP zeigten sich nur geringe Veränderungen bei der maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeit (dp/dt) nach Substratumstellung, sowie ein vergleichbarer Anstieg der Werte in beiden Gruppen unter Dobutamin-Stimulation (vgl. Abb. 15b).

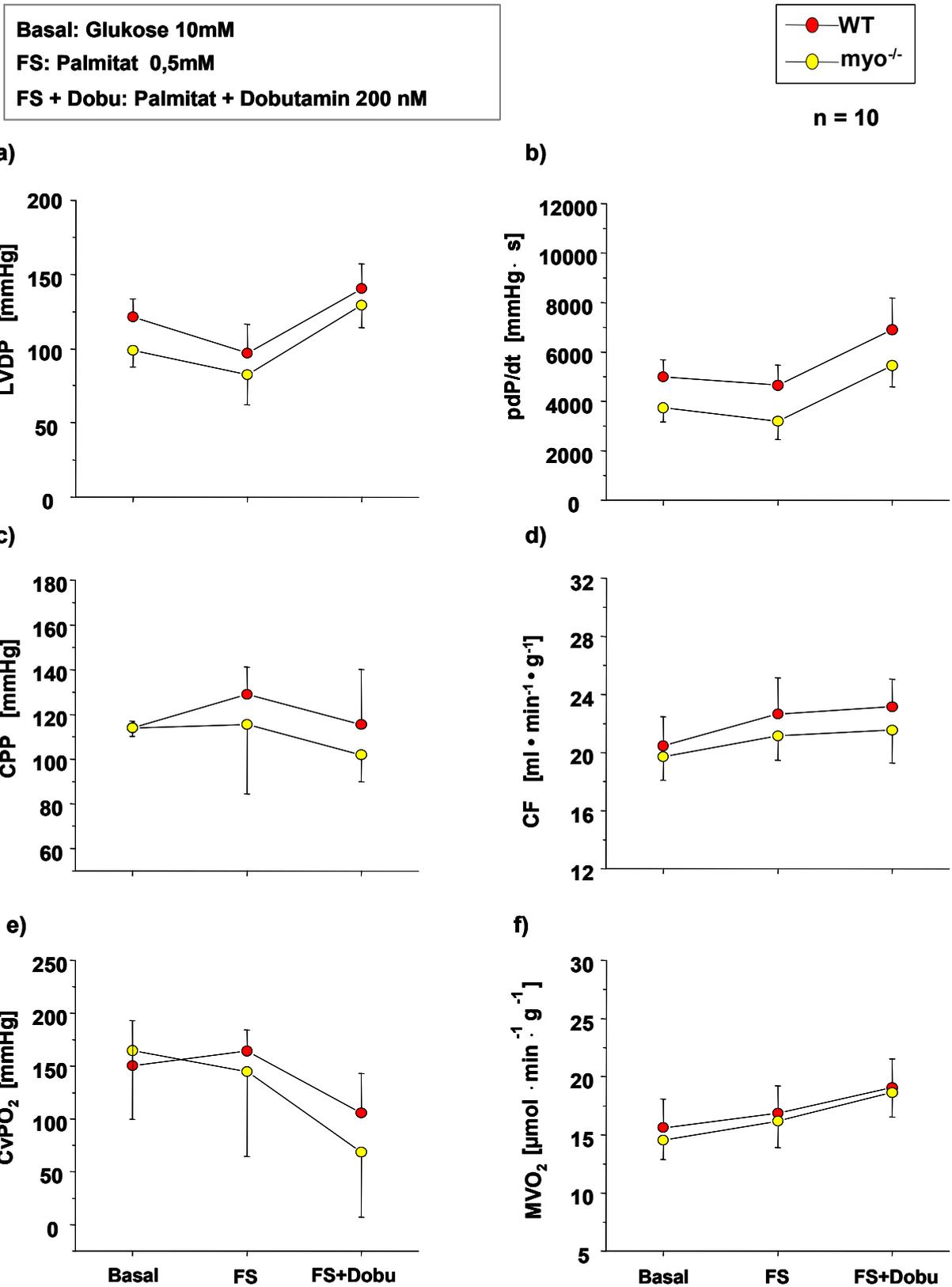


Abb. 15 a-f): Funktionelle Parameter isoliert perfundierter Herzen unter Glucose und Palmitat-Perfusion und anschließender β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin.

Ähnliche Befunde ergaben sich für den myokardialen Sauerstoffverbrauch (MVO_2), der erwartungsgemäß unter Dobutamin-Stimulation in beiden Gruppen anstieg, was sich in einem Abfall des koronar-venösen Sauerstoff-Partialdrucks ($CvPO_2$) in der $myo^{-/-}$ -Gruppe um 55 %, im WT um 35 % widerspiegelte (vgl. Abb. 15e,f). Da die Experimente unter volumenkonstanten Bedingungen durchgeführt wurden, zeigten sich nur geringe Veränderungen für den koronare Fluss (CF). Die Umstellung des Substrats von Glucose auf Palmitat führte zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg des koronaren Perfusionsdruckes (CPP) in der Kontrollgruppe, während bei β -adrenerger Stimulation ein leichter, nicht signifikanter Abfall zu beobachten war. Dieser lässt sich durch eine geringfügige Vasodilatation aufgrund erhöhten Energiebedarfs, während β -adrenerger Stimulation erklären. Die $myo^{-/-}$ -Gruppe zeigte annähernd gleiche CPPs unter beiden Substraten (Abb. 15c).

Auch die mittels ^{31}P -NMR spektroskopisch erhobenen energetischen Daten zeigten keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Gruppen bei Umstellung des Substrates von Glucose auf Palmitat. Bei abschließender β -adrenerger Stimulation kam es in beiden Gruppen zu einem Abfall der PCr-Werte auf $82,84 \pm 8,44$ % der Kontrolle für die $myo^{-/-}$ -Gruppe bzw. auf $73,54 \pm 5,61$ % in den WT. Analog zu diesem Ergebnis stieg die ADP-Konzentration in beiden Gruppen bei Dobutamin-Stimulation von $36,75 \pm 4,5$ μM auf $45,3 \pm 6,18$ μM ($myo^{-/-}$) bzw. $35,75 \pm 5,5$ μM auf $47,55 \pm 7,9$ μM (WT) an, während die Substratumstellung von Glucose auf Palmitat den Wert kaum beeinflusste (vgl. Abb. 16d). Diese Veränderungen zeigen deutlich den erhöhten Energiebedarf unter Dobutamin-Stimulation, was auch in einem Anstieg der freien Enthalpie nach Gibbs (ΔG_{ATP}) deutlich wurde (vgl. Abb. 16e). Allerdings ließen sich zwischen den Gruppen keine Unterschiede nachweisen.

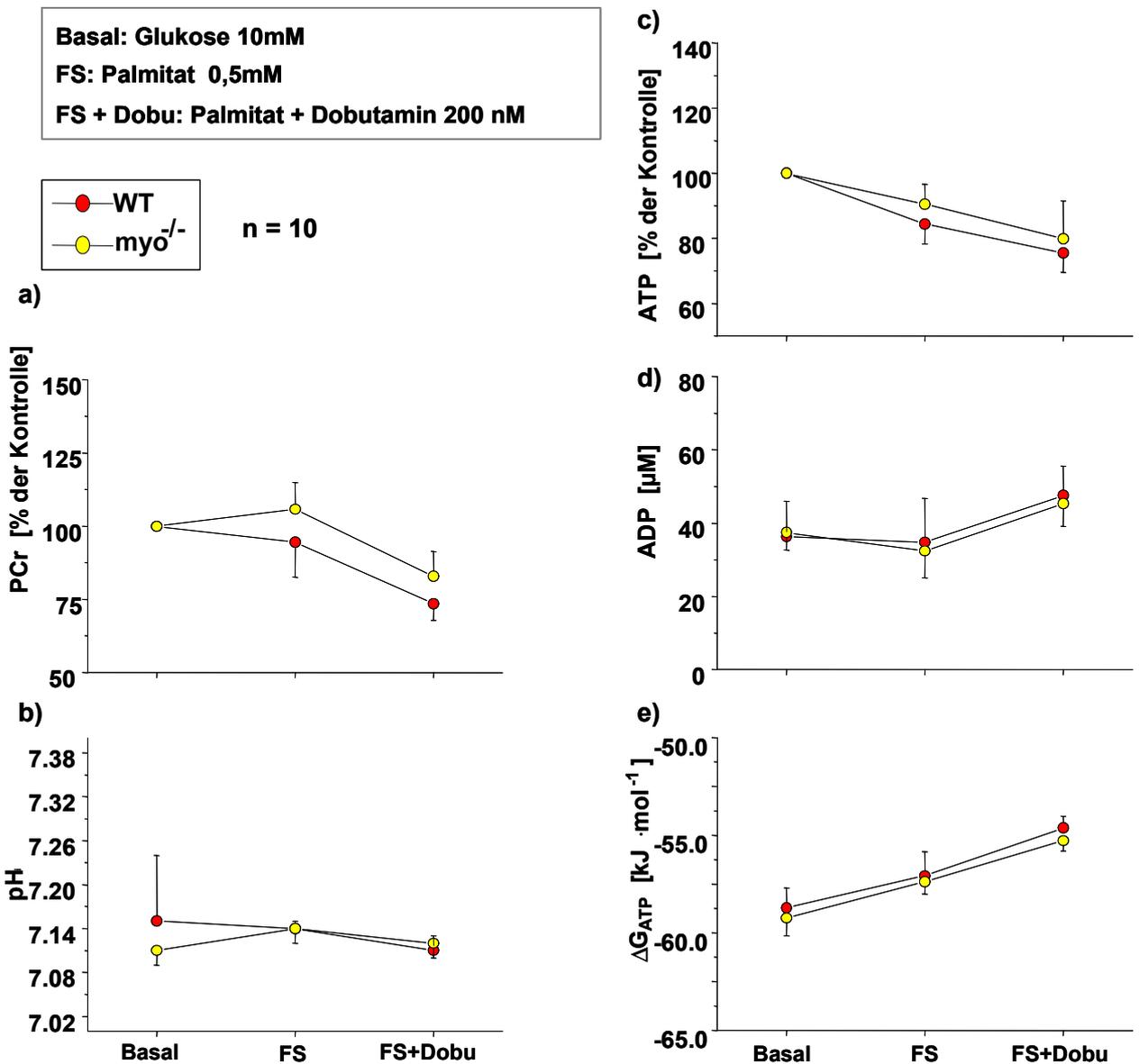


Abb. 16 a-e): Energetische Parameter isoliert perfundierter Herzen nach Glucose und Palmitat-Perfusion und anschließender β -adrenergen Dobutamin-Perfusion.

Insgesamt zeigten sowohl die energetischen (PCr, ADP, ATP, pH_{ic} , ΔG_{ATP}), als auch die funktionellen (LVDP, dP/dt , CPP, CF und CvPO_2) Parameter im Vergleich von myo^{-/-}- zur WT-Gruppe keine deutlichen Unterschiede bei der Substratumstellung von Glucose auf Palmitat; auch bei maximaler Belastung mit 200 nM Dobutamin waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen detektierbar.

3.4 Substratwechsel von Glucose zu Octanoat

In einer abschließenden Versuchsreihe wurde der Einfluss kurzketziger FS auf kardiale Funktion und Energetik in beiden Gruppen analysiert. Hierfür wurde das Substrat von 10 mM Glucose auf 1 mM Octanoat umgestellt und ebenfalls in der Abschlussphase mit 200 nM Dobutamin β -adrenerg stimuliert. Wie aus den Abbildungen 17 und 18 zu ersehen, führte die Substratumstellung von Glucose auf Octanoat zu keinen ausgeprägten Veränderungen. Es bleibt anzumerken, dass die Octanoat-Perfusion in der $myo^{-/-}$ -Gruppe im Gegensatz zum WT zu einem leichten Anstieg des LVDP führte, ohne jedoch den Signifikanz-Bereich zu erreichen. Allerdings kam es bei zusätzlicher β -adrenerger Stimulation in der $myo^{-/-}$ -Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung des Druckes auf $144,65 \pm 10,66$ mmHg, während in der Kontrollgruppe der inotrope Effekt des Dobutamins nur zu einem Druckanstieg von $126,65 \pm 14,14$ mmHg führte ($n=6$, $p<0,05$). Analog zu den Veränderungen des LVDP änderten sich die Druckanstiegsgeschwindigkeiten (dP/dt) (vgl. Abb. 17a,b). Die Substratumstellung führte auch hier zu keiner signifikanten Veränderung in der Sauerstoffextraktion. Bei β -adrenerger Stimulation kam es, wie bei den oben genannten Versuchen zu einer Zunahme des Sauerstoffverbrauches, der sich in einer kontinuierlichen Abnahme des $CvPO_2$ auf $250,83 \pm 62$ mmHg ($myo^{-/-}$) und $290,83 \pm 87,72$ mmHg (WT) in beiden Gruppen zeigte (vgl. Abb. 17e,f). Die erhöhte Kontraktilität der $myo^{-/-}$ -Herzen unter β -adrenerger Stimulation schlägt sich in einem tendenziell stärker erhöhten MVO_2 im Vergleich zur WT-Gruppe nieder. Die Belastung mittels Dobutamin-Stimulation führte zu einem signifikanten stärkeren Abfall des Perfusionsdruckes bei $myo^{-/-}$ -Herzen auf Werte von $87,48 \pm 12,42$ mmHg, wie in Abb. 17c zu erkennen ist ($n=6$, $p<0,05$). Allerdings muss hier einschränkend festgestellt werden, dass bereits die Substratumstellung auf Octanoat zu einem geringfügigen Anstieg des CPP bei Mb-defizienten Herzen geführt hat.

Basal: Glukose 10mM
 FS: Octanoat 1mM
 FS + Dobu: Octanoat + Dobutamin 200 nM

● WT
 ● myo^{-/-}

* $P < 0,05$; n = 6

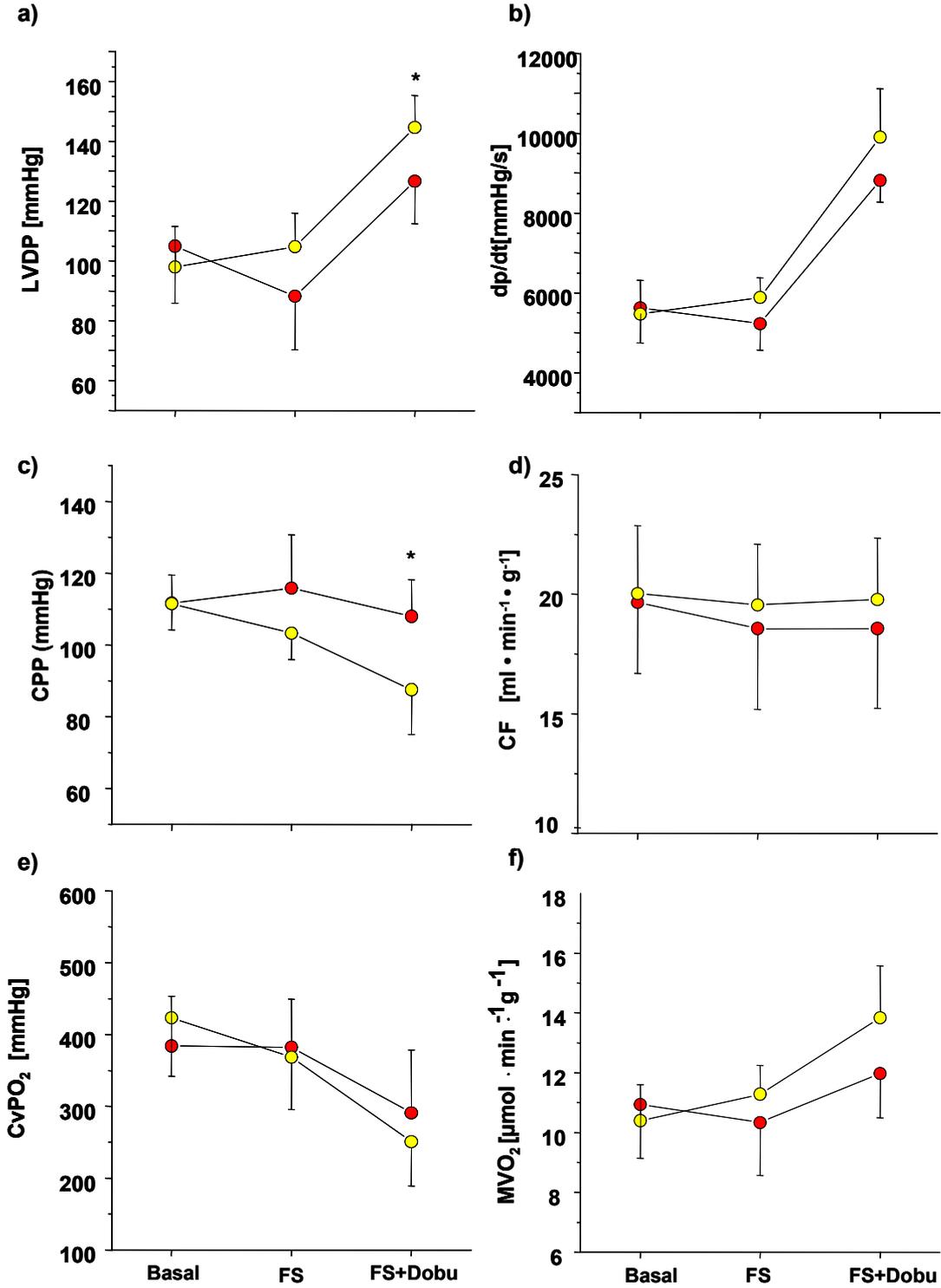


Abb. 17 a-f): Funktionelle Parameter isoliert perfundierter Herzen bei Substratumstellung von Glucose auf Octanoat und anschließender β -adrenerger Dobutamin-Stimulation.

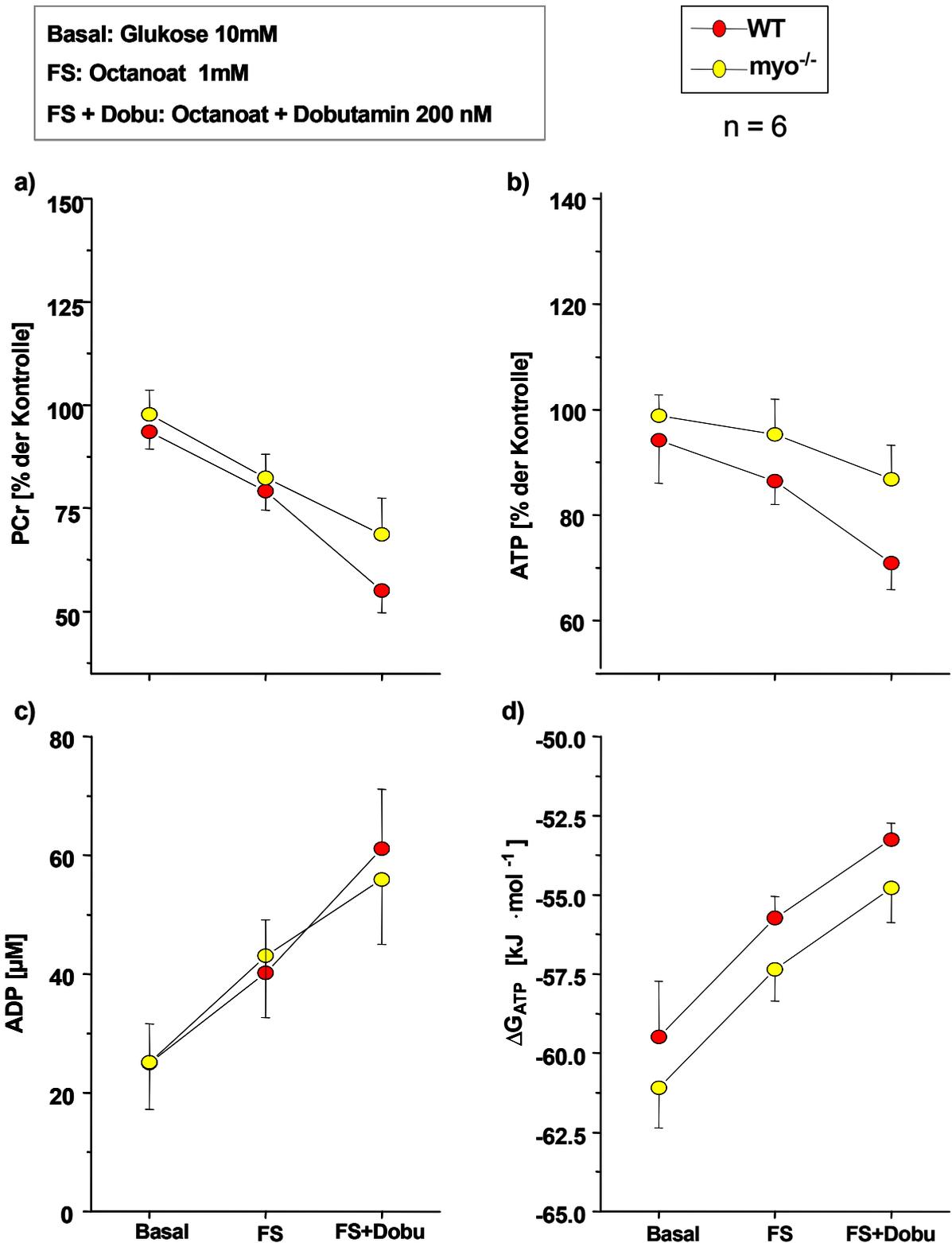


Abb. 18a-d): Energetische Parameter isoliert perfundierter Herzen bei Substratumstellung von Glucose auf Octanoat und anschließender β -adrenerger Dobutamin-Stimulation.

Ähnliche Veränderungen ließen sich auch im sensitivsten Parameter für den Energiestatus – dem PCr-Spiegel – beobachten: Die Substratumstellung auf Octanoat führte in der $myo^{-/-}$ -Gruppe zu einem leichten Konzentrationsabfall von PCr, welcher durch β -adrenerge Stimulation weiter verstärkt wurde (vgl. Abb. 18a). Demgegenüber kam es in der Kontrollgruppe erst unter β -adrenergen Stimulation zu einem geringfügigen Abfall des kardialen PCr-Gehaltes.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass Mb-defiziente Herzen auch eine Substratumstellung auf kurzkettige FS tolerieren. $Myo^{-/-}$ -Herzen zeigten zwar Anzeichen einer stärkeren Beanspruchung nach Substratumstellung und insbesondere während maximaler pharmakologischer Belastung, dennoch blieben sie bis zum Schluss der einzelnen Versuchsreihen vital und maximal belastbar.

4 Diskussion und Schlussfolgerung

Die Perfusion isolierter Mäuseherzen mit ^{13}C -markierter Glucose und FS ermöglichte eine genaue Differenzierung des relativen Flusses beider Substrate in Mb-defizienten Herzen und in der Kontrollgruppe. Dabei lassen sich die Ergebnisse dieser Arbeit folgendermaßen zusammenfassen:

- 1.) Die Stoffwechsel-Analysen ergaben bei parallelem Substratangebot eine Bevorzugung der Glucose gegenüber FS in $\text{myo}^{-/-}$ -Herzen verglichen zu den WT.
- 2.) Die Funktionsparameter-Analysen zeigten keine Beeinträchtigung funktioneller und energetischer Parameter der Mb-defizienten Mäuseherzen bei kurzfristiger Umstellung des Substrates von Glucose auf FS.
- 3.) Erst unter maximaler Arbeitsbelastung zeigten $\text{myo}^{-/-}$ -Herzen bei alleinigem FS-Angebot Anzeichen einer stärkeren energetischen Einschränkung als WT-Herzen.

Die mittels ^{13}C -NMR-Spektroskopie beobachteten Veränderungen im Substratmetabolismus von $\text{myo}^{-/-}$ -Herzen zeigen, dass die in der Einleitung beschriebenen Veränderungen auf Protein-Ebene – Herunterregulation bestimmter Schlüsselenzyme der β -Oxidation in $\text{myo}^{-/-}$ -Herzen und Heraufregulation von glykolytischen Enzymen (GAPDH) – im Vergleich zum WT von essentiellen Veränderungen im kardialen Substratmetabolismus begleitet sind. Allerdings scheint die Enzymausstattung der Mb-defizienten Tiere hinsichtlich des FS-Stoffwechsels effizient genug zu sein, um zumindest eine kurzfristige Alleinversorgung mit FS auch unter Stress zu tolerieren. Die quantitative Analyse der Substratflüsse im WT zeigte eine Substratverwertung von FS und Glucose im Verhältnis $\sim 3:1$, welches der kardialen

Substratverwertung im menschlichen Organismus entspricht (45). Im Gegensatz dazu, kommt es in der myo^{-/-}-Gruppe zu einem metabolischen „Shift“, bei der FS und Glucose annähernd gleich verstoffwechselt werden.

Dieser signifikante Unterschied stimmt mit Beobachtungen aus früheren Untersuchungen zu roter und weißer Muskulatur überein. Es konnte gezeigt werden, dass beide Muskeltypen eine unterschiedliche Enzymausstattung aufweisen: Während die rote Muskulatur primär Enzyme der β -Oxidation exprimiert, findet sich in der weißen Muskulatur ein hoher Gehalt an Enzymen der Glykolyse (46). Bei Abwesenheit von Mb ähnelt die Enzymausstattung des Myokards der weißen Muskulatur. Analog zu roter und weißer Muskulatur zeigen myo^{-/-}-Herzen im Vergleich zum WT zusätzlich einen unterschiedlichen Gehalt an α -(B)-Kristallin, einem Struktur- und Hitzeschock-Protein, welches vermehrt in Organen mit erhöhter oxidativer Kapazität, z. B. Myokard oder Skelettmuskulatur zu finden ist (46;47).

Eine Korrelation zwischen myokardialen Mb-Gehalt und FS-Stoffwechsel wurde bereits in früheren Arbeiten sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Konditionen beschrieben. Ein dementsprechender Zusammenhang konnte z.B. an Hundeherzen nachgewiesen werden, in denen das Myokard physiologisch mit einem mittleren Blutfluss unter 50 % perfundiert wurde. Genaue Untersuchungen dieses Myokard-Areals wiesen einen reduzierten Mb-Gehalt, bei gleichzeitig vermindertem Enzymgehalt der β -Oxidation und erhöhtem Gehalt an Enzymen der Glucoseverwertung auf (48). Ein verminderter Mb-Gehalt bei gleichzeitig erhöhtem Enzymgehalt des Glucosstoffwechsels und vermindertem Gehalt an Enzymen der β -Oxidation wurde zusätzlich an Kaninchen- und Rinder-Herzmodellen mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) beobachtet (49-51).

Die oben beschriebenen *in-vitro* Befunde konnten inzwischen durch kürzlich durchgeführte, nicht invasive *in-vivo* Positronen-Emissions-Tomographie-Untersuchungen (PET) bestätigt werden, bei denen Mb-defiziente Herzen eine erhöhte Anreicherung von ^{18}F -Deoxyglucose (FDG) bei unveränderter kardialer Funktion zeigten (unveröffentlichte Untersuchungen von Prof. Michael Schäfers, Abteilung für Nuklearmedizin, Universitätsklinik, Münster) (Abb. 19).

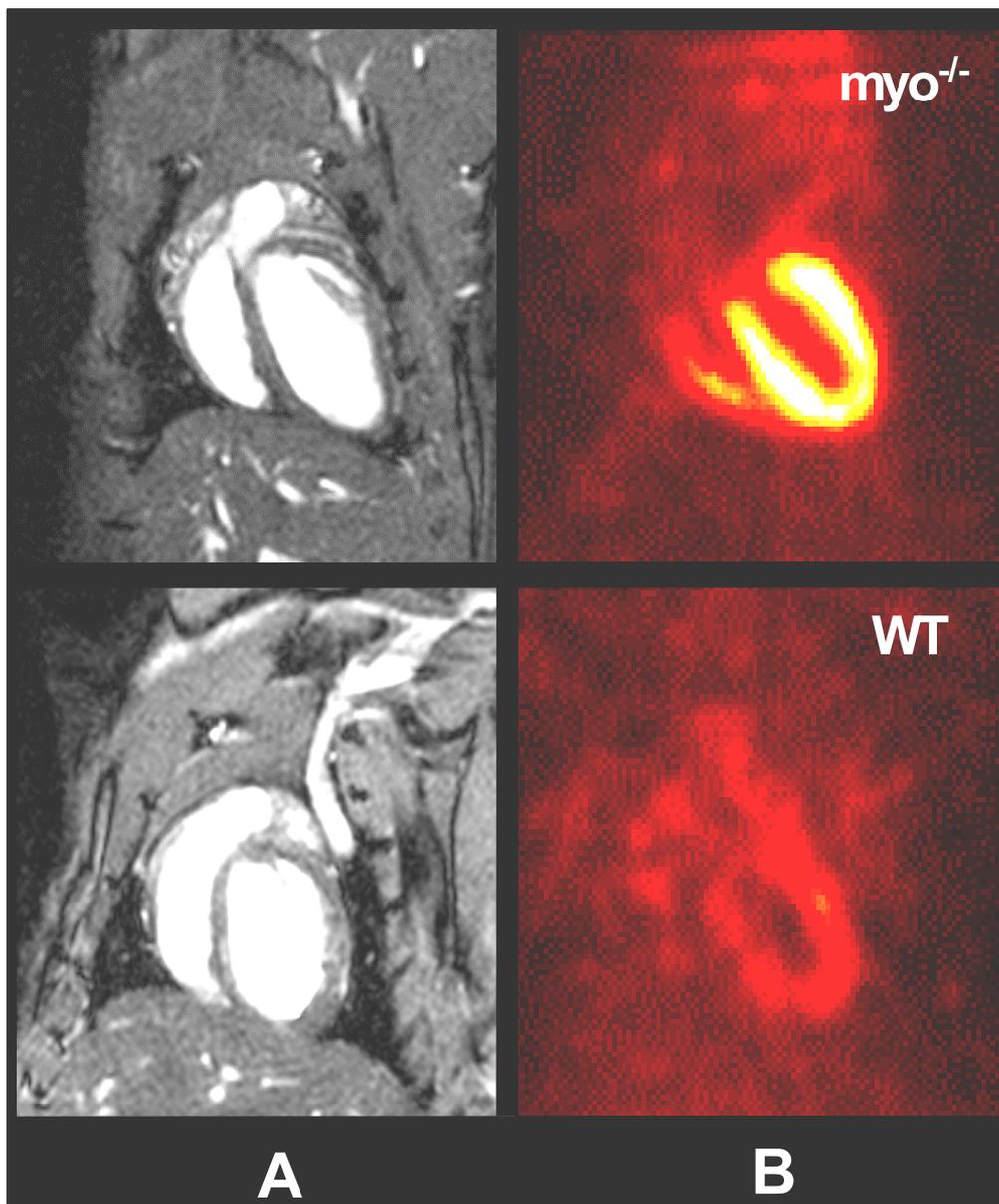


Abb. 19: A: Sagittale und axiale NMR-Aufnahmen durch den Thorax von Mäuseherzen. B: Analoge Schnitte in PET-Aufnahmen mit deutlicher Mehranreicherung von ^{18}F -FDG in *myo*^{-/-}.

Vor dem Hintergrund dieser Untersuchungen kann Mb als ein essentieller Faktor in der Regulation des muskulären Substratstoffwechsels eingestuft werden. Bei Betrachtung der bereits bekannten Funktionen des Mb sind mehrere Möglichkeiten denkbar, wie Mb den myokardialen Substratmetabolismus direkt oder indirekt beeinflussen kann, die im folgenden diskutiert werden:

Mb dient nicht nur als O₂-Transporter, sondern auch als intrazellulärer O₂-Speicher und O₂-Puffer, um den O₂-Bedarf des aeroben Muskelstoffwechsels aufrechtzuerhalten. Dabei wird O₂ cytosolisch von Mb gebunden und gelangt so zum Mitochondrium, um mittels oxidativer Phosphorylierung für die ATP-Bildung genutzt zu werden (52). Das Fehlen von Mb im Organismus bedeutet eine Veränderung des O₂-Status in der Zelle. Dieser kann zu einem Missverhältnis zwischen O₂-Angebot und O₂-Bedarf führen, bei der das Angebot durch reduzierten Transport vermindert ist. Untersuchungen an Mb-defizienten Mäusen ergaben eine Reihe von Kompensationsmechanismen hämodynamischer und morphologischer Art, als Reaktion auf den veränderten O₂-Status. Dazu zählen signifikant erhöhte Hämatokrit-Konzentrationen, ein signifikant erhöhter CF, sowie eine erhöhte Koronarreserve in den Mäuseherzen und eine erhöhte Kapillardichte gegenüber der Kontrollgruppe (20). Diese Veränderungen im transgenen Tier führen insgesamt zu einem steilen O₂-Gradienten zwischen Kapillargefäß und Mitochondrium und kompensieren die fehlende Funktion des Mb: den O₂-Transport in die Mitochondrien.

Der „metabolische Shift“ kann nun als ein weiterer Kompensationsmechanismus interpretiert werden: Es ist bekannt, dass die vollständige β -Oxidation deutlich mehr O₂ pro Mol FS verbraucht, als die vollständige Oxidation gleicher Mengen Glucose. Da die quantitative Beziehung von Sauerstoffverbrauch durch Substratoxidation und ATP-

Bildung bis heute noch nicht eindeutig geklärt ist, wurde der Begriff des P/Q-Quotienten eingeführt. Dieser beschreibt als ein Maß für die Energiekonservierung die Zahl der ATP-Moleküle, die pro Sauerstoffatom aus ADP und Pi synthetisiert werden (13). Betrachtet man den P/Q-Quotienten im Vergleich beider Substrate, so wird deutlich, dass der kardiale Sauerstoffverbrauch bei reiner FS-Verwertung um 11 % im Vergleich zur Glucose-Verwertung steigt (53;54). *In vivo* Untersuchungen legten die Vermutung nahe, dass dieser Wert deutlich zu niedrig veranschlagt ist und die β -Oxidation am unbelasteten Myokard sogar 48 % mehr O_2 verbraucht als bei Glucoseverwertung (38;55). Glucose ist somit das „Energie-sparendere“ Substrat. Es ist durchaus möglich, dass die Mb-defizienten Herzen den veränderten O_2 -Status durch vermehrte Utilisation eines oxidativ günstigeren Substrates, nämlich der Glucose, kompensieren, welches im Vergleich zur FS weniger O_2 für die Verwertung verbraucht.

Neben den oben genannten Funktionen wurde für oxygeniertes Mb auch eine wesentliche Rolle in der ATP-Produktion in kardialen Myozyten vorgeschlagen (18). Als zugrundeliegender Mechanismus wird eine verstärkte O_2 -Aufnahme, besonders von Mb-gebundenem O_2 , durch Mitochondrien postuliert, bei gleichzeitiger Unterstützung der Reduktion von Häm-gebundenem O_2 zu H_2O . Eine derartige Funktion von Mb sollte dazu führen, dass die O_2 -Extraktion bzw. der MVO_2 bei myokardialer Mb-Defizienz verringert ist. Untersuchungen an Langendorff-perfundierten *myo*^{-/-}-Mäuseherzen konnten bisher jedoch keine signifikanten Veränderungen des MVO_2 , sowie der kontraktilen Parameter bei pharmakologischer Mb-Inhibition mittels CO zeigen (21). Ausserdem führt eine verstärkte oxidative Phosphorylierung zu einer vermehrten aeroben Oxidation von beiden Substraten, welches bei Mb-Defizienz eine Verminderung beider Stoffwechselwege aber nicht einen Substratshift zur Folge hätte.

Eine weitere Möglichkeit ist der Zusammenhang von Mb und FS-Transport: Der cytosolische FS-Transport wird hauptsächlich über *Fatty Acid Binding Proteins* vermittelt, die FS an weitere Carrier-Systeme der Mitochondrienmembran abgeben, wo sie anschließend mittels β -Oxidation verstoffwechselt werden (12). Einige Arbeiten konnten für das Mb zusätzlich zu den O_2 -bindenden auch FS-bindende Eigenschaften in der Skelettmuskulatur von Rindern, Geflügel und Ratten nachweisen (56-58). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass die FS-Bindung vom Oxygenierungsgrad des Mb abhängig ist. So lässt sich für Deoxy-Mb nahezu keine Bindung von FS mehr nachweisen (57). Dementsprechend könnten – wie in Abb. 20 schematisch dargestellt – sowohl Substrat- als auch O_2 -Transport durch Mb gewährleistet und den Mitochondrien zugeführt werden, was einen erheblichen Vorteil für den aeroben Muskelstoffwechsel darstellte.

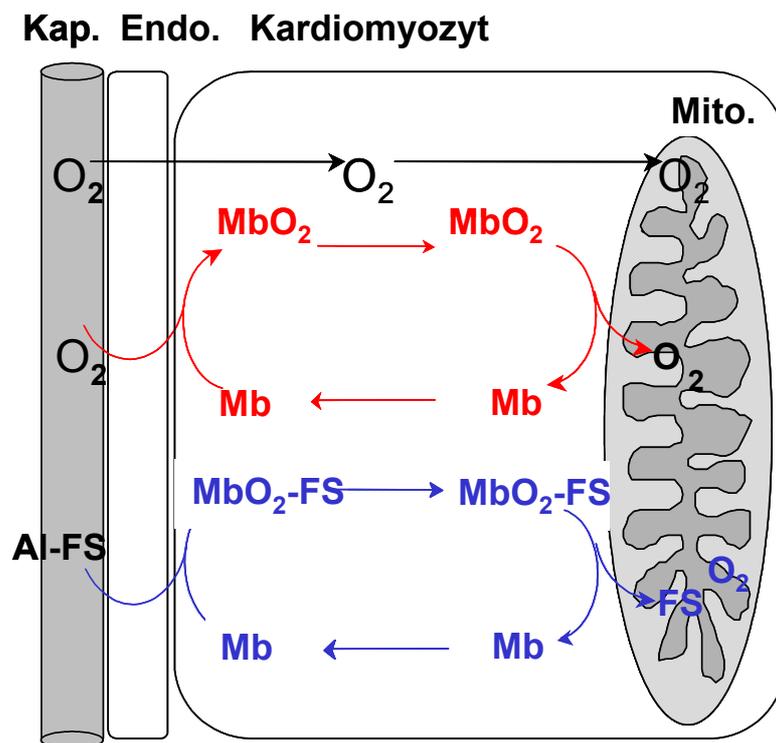


Abb. 20: Mögliche Funktion des Mb: vereinfachter cytosolischer FS-Transport zum Mitochondrium. MbO_2 : oxygeniertes Myoglobin, Mb-FS: Fettsäure-bindendes Myoglobin, Al-FS: Fettsäure -bindendes Albumin, Kap.: Kapillare, Endo.: Endothelium, Mito.: Mitochondrium

Obwohl die physiologische Relevanz des Mb-unterstützten FS-Transports noch unklar ist, könnte neben der Rolle als O₂-Transporter somit auch die Funktion als FS-Transporter für die Verschiebung der Substratverwertung verantwortlich sein. Im Falle der Mb-Defizienz wäre der FS-Transport limitiert, und somit auch die Verwertung durch stattfindende β -Oxidation. Das verstärkte Zugreifen auf andere Substrate wie Glucose, Glykogen oder andere endogene Stoffe kann in diesem Zusammenhang erneut als Kompensationsmechanismus gedeutet werden.

Des Weiteren könnte die Veränderung im kardialen Substratmetabolismus durch verminderten NO-Abbau bedingt sein. Am Institut für Herz-Kreislaufforschung der HHU durchgeführte Untersuchungen zeigten, dass Mb nicht nur den O₂-Metabolismus, sondern auch den NO-Abbau verstärkt, indem Mb als Radikalfänger agiert (59). Im Myokard wird NO durch die NO-Synthase synthetisiert und kommt sowohl im Endothel der Koronararterien und des Endokards, sowie in den Myozyten vor (60-62). Unter physiologischen Bedingungen konnte u.a. nachgewiesen werden, dass NO negative inotrope und chronotrope Effekte am Myokard bewirkt und eine regulierende Wirkung auf den Vasotonus aufweist (63-65). Es ist durchaus möglich, dass eine reduzierte NO-Degradation bei Mb-Defizienz auch den kardialen Stoffwechsel beeinflusst. Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die NO-Produktion durch die endotheliale NO-Synthase (eNOS) die Glucoseoxidation im Myokard durch cGMP-abhängige Mechanismen beeinflusst (66). Allerdings sind die verantwortlichen Regulationsmechanismen bisher noch unbekannt. Weitere Arbeiten auf diesem Gebiet haben sogar eine Reduktion der Glucoseoxidation in Ratten-Herzen bei vermehrter NO-Produktion beobachtet (67). Diese Beobachtung lässt sich jedoch nur schwer mit den Ergebnissen dieser Arbeit in Einklang bringen, da Mb-Defizienz aufgrund reduzierten NO-Abbaus zu höheren endogenen NO-Konzentrationen in den myo^{-/-}-Herzen führt.

Allerdings scheint es auch unwahrscheinlich, dass cytosolisches Mb überhaupt zu einer Veränderung der durch die im Sarkolemma lokalisierten eNOS eingestellten NO-Spiegel führen kann. Des Weiteren wurde beschrieben, dass endogenes NO den O₂-Verbrauch reduziert, indem die O₂-Nutzung während der myokardialen Kontraktion reduziert wird, ohne dabei die Effizienz der Kontraktion zu minimieren (68). Auf diese Weise könnte ein erhöhter NO-Spiegel bei Abwesenheit von Mb den O₂-Status positiv beeinflussen.

Neben den obengenannten Mechanismen könnte dem Substratshift bei Mb-Defizienz auch eine Wechselwirkung von Mb und anderen Proteinen (Protein-Protein-Interaktion), wie z.B. Schlüsselenzymen der β -Oxidation bzw. der Glucoseoxidation, zugrunde liegen. Obwohl bisher wenig über Mb-Protein-Wechselwirkungen bekannt ist, konnte kürzlich gezeigt werden, dass Mb und Cytochrom b(5) über Elektronentransfer und dynamische Ankopplung interagieren (69). Zieht man die hohe Konzentration von Mb im Cytosol (0,5 mM) in Betracht, ist es durchaus denkbar, dass eine Reihe von Wechselwirkungen mit anderen Proteinen im Cytosol stattfinden. So konnte zum Beispiel eine kürzlich veröffentlichte Arbeit zeigen, dass oxygeniertes Neuroglobin als ein Hemmstoff der Dissoziation heterotrimerer G-Proteine wirkt und auf diese Weise, zelluläre Signaltransduktionswege inhibiert, die über G α -Effektor- und G $\beta\gamma$ -Effektor-Wege zu neuronalem Zelltod führen (70). Zukünftige Untersuchungen am Myokard und an der Skelettmuskulatur könnten ähnliche Protein-Protein-Interaktionen im Falle des Mb nachweisen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Mb-Defizienz zu einer verstärkten Glucoseoxidation bei gleichzeitig verminderter FS-Oxidation führt. Aufgrund der Tatsache, dass der komplette Abbau eines Mols Fettsäure zu einem

höheren Sauerstoffverbrauch pro Mol Energie (in Form von energiereichen Phosphaten) führt, als der komplette Abbau eines Mols Glucose, liegt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem metabolischen Shift um einen weiteren Kompensationsmechanismus bei Mb-Defizienz handelt. Interessanterweise entspricht die Enzymausstattung der $myo^{-/-}$ -Herzen den der weißen Skelettmuskulatur mit einer erhöhten Konzentration von Enzymen des Glucose-Stoffwechsels. Dagegen zeigen rote Muskelfasern eine erhöhte Konzentration für Enzyme des FS-Stoffwechsels (46). Auch der Mb- und Organellengehalt ist in roten verglichen zu weißen Muskelfasern erhöht, was phänotypisch deutlich wird. Diese unterschiedliche Proteinausstattung ist optimal an die unterschiedliche Funktionen roter und weißer Muskulatur angepasst (46). Die $myo^{-/-}$ -Herzen sind somit ein vergleichbares Modell zur weißer Muskulatur und die hier vorliegenden Daten sprechen dafür, dass der Mb-Gehalt des Muskels eine essentielle Rolle in der Auswahl des bevorzugten Substrates spielt. Allerdings scheint auch eine alleinige Versorgung Mb-defizienter Herzen mit FS zumindest über einen kurzen Zeitraum bzw. unter Ruhebedingungen toleriert zu werden.

Letztendlich bleibt die Frage zu klären, welcher Mechanismus nun tatsächlich für den Substratshift bei Myoglobin-Defizienz verantwortlich ist. Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten können hier keine eindeutige Antwort geben und es liegt nahe, dass die verschiedenen Funktionen von Mb insgesamt zu einer Verschiebung des kardialen Substratmetabolismus beitragen, welche als weiterer biochemischer Kompensationsmechanismus in $myo^{-/-}$ -Mäusen interpretiert werden kann.

5 Zusammenfassung

Die kardiale Substratselektion bei Myoglobin-Defizienz wurde durch Perfusion isolierter Mäuseherzen, sowohl an WT als auch an $myo^{-/-}$ -Tieren untersucht. Unter der Verwendung von ^{13}C -NMR-Spektroskopie (Isotopomerenanalyse von 4- ^{13}C - und 3,4- $^{13}\text{C}_2$ -Glutamat bzw. von 4,5- $^{13}\text{C}_2$ - und 3,4,5- $^{13}\text{C}_3$ -Glutamat) konnte der relative Substratfluss von 1,6- $^{13}\text{C}_2$ -Glucose und U- $^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat, einer langkettigen FS zwischen beiden Gruppen analysiert werden. Funktionelle und energetische Parameter wurden zusätzlich durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie an isoliert perfundierten Herzen beider Gruppen erfasst. Außerdem wurde die alleinige FS-Perfusion untersucht und zusätzlich der Einfluss kurz- und langkettiger FS auf die Herzen beobachtet. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

Die spektroskopischen Stoffwechsel-Analysen zeigten bei parallelem Substratangebot eine Bevorzugung der Glucose gegenüber FS in $myo^{-/-}$ -Herzen im Vergleich zu den WT. Die Funktionsparameter-Analysen zeigten allerdings keine Beeinträchtigung der funktionellen und energetischen Parameter in den Mb-defizienten Mäusen bei kurzfristiger, alleiniger Perfusion mit FS. Erst bei gleichzeitiger maximaler Arbeitsbelastung zeigten $myo^{-/-}$ -Herzen Anzeichen einer stärkeren energetischen Beanspruchung als WT-Herzen.

Da die vollständige Oxidation von Glucose weniger Sauerstoff verbraucht als die FS-Verbrennung, kann der metabolische „Substratshift“ als ein weiterer Kompensationsmechanismus bei Mb-Defizienz gewertet werden.

6 Anhang

Proteinbestimmung nach Lowry

Zur Quantifizierung der NMR-Daten wurde der Proteingehalt der Herzen nach Lowry bestimmt (71). Die mittels Integration bestimmten Daten aus den NMR-Spektren wurden dann mit dem Proteingehalt der Probe korreliert und in Konzentrationen umgerechnet. Für die Messung wurde der Bodensatz der jeweiligen Probe, resultierend aus der Vorbereitung für die Herzextraktion, mit 1 M NaOH versetzt und im Wasserbad bei etwa 60 °C erwärmt. Aus dieser Lösung wurden 25 µl zu 25 µl NaOH gegeben und anschliessend zu 2 ml einer Lösung hinzugefügt, die 0,2 M Na₂CO₃ und NaOH, 1 %ige CuSO₄ und 2 %iges K-Na-Tartrat enthielt. Nach einer Einwirkungsdauer von 15 min wurde dem Reagenz 200 µl Folin Ciocalteus Phenolreagenz (verdünnt auf 1:2) hinzugefügt. Nach weiteren 10 Minuten Einwirkungszeit wurde die UV-Absorption der Proben bei 578 nm bestimmt. Unter Verwendung einer Eichgerade wurde der Proteingehalt jeder Probe bestimmt.

Enzymatische Bestimmung von Glutamat und Lactat

Zur zusätzlichen Validierung der NMR-spektroskopischen Bestimmung des Glutamat- und Lactat-Gehaltes wurden die Metabolitenkonzentrationen biochemisch bestimmt. Die Konzentrationen von Glutamat und Lactat wurden in Raumtemperatur, mittels gekoppelter enzymatischer Farb-Tests, modifiziert nach Bergmeyer und Noll bestimmt (72). Die Messproben wurden in einem UV/VIS Spektrometer Lamda 20 von Perkin Elmer gemessen.

Bestimmung der Glutamat-Konzentration

Testprinzip: $\text{L-Glutamat} + \text{NAD}^+ + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{2-Oxoglutarat} + \text{NADH} + \text{NH}_4^+$ (GIDH)

$\text{NADH} + \text{INT} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{NAD} + \text{Formazan}$ (Diaphorase)

Aufbereitung der Proben-Reagenzien:

Aus jeder Probe wurden 200 μl entnommen und in Küvetten mit 1,00 cm Schichtdicke pipettiert. In jede Küvette wurde 600 μl Kaliumphosphat/Triethanolamin-Puffer (pH 6,8), 200 μl 14 % ige Diaphorase-Lösung, 200 μl 30 % ige Jodnitrotetrazoliumchlorid-Lösung (INT) und 1800 μl bidestilliertes H_2O hinzugefügt. Zusätzlich wurde eine Küvette für die Messung des Leerwertes vorbereitet. Nach 2-minütiger Inkubationszeit wurde eine Kontrollextinktion (E_1) bei 492 nm gemessen und anschliessend 30 μl Glutamat-Dehydrogenase-Lösung (GIDH) (1080 U) hinzugefügt. Nach weiteren 15 Minuten Inkubationszeit wurden die Extinktionen (E_2) der Proben und des Leerwertes nacheinander in 2-minütigem Abstand bestimmt. Anhand der Extinktionsdifferenz von Probe und Leerwerte wurde die Konzentration von Glutamat in jeder Probe ermittelt.

Bestimmung der Lactat-Konzentration

Testprinzip: $\text{L-Lactat} + \text{NAD}^+ \rightleftharpoons \text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+$ (LDH)

$\text{Pyruvat} + \text{L-Glutamat} \rightleftharpoons \text{L-Alanin} + \alpha\text{-Ketoglutarat}$ (GPT)

Aufbereitung der Proben-Reagenzien:

Aus jeder Probe wurden 2500 μl entnommen und in die Küvetten pipettiert. Hinzugefügt wurden 50 μl einer Suspension mit Lactatdehydrogenase (LDH) und Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT). Der Ansatz für den Leerwert wurde aus 5000 μl NAD-Puffer-Lösung und 50 μl 3,2 M Ammonium-Lösung hergestellt. Die Extinktion jedes Reagenz wurde nach 10-15 Minuten Inkubationszeit photometrisch bei

einer Wellenlänge von 365 nm gemessen und anhand des Leewertes die Extinktionsdifferenz bestimmt, aus dem anschliessend die Lactat-Konzentration jeder Probe errechnet wurde.

Verwendete Chemikalien und Materialien

Chemikalie	Firma
1,6- ¹³ C ₂ -Glucose	Cambridge Isotope Laboratories, Wesel
Bovines Albumin (essentiell fettsäurefrei)	Sigma, München
Bovines Albumin (Nitrogengehalt 15,2%)	Sigma, München
D ⁺ -Glucose	Merck, Darmstadt
Dobutamin	Solvay-Arzneimittel, Hannover
EDTA (Ethyldiaminotetraessigsäure)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L-Glutaminsäure-Farb-Test	Boeringer, Mannheim
Insulin Actrapid HM	Novo Nordisk, Mainz
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Riedel-de Haen, Seelze
Kalziumchlorid	Merck, Darmstadt
Lactat-Farb-Test-Kit	Boeringer, Mannheim
Liquemin (Heparin-Natrium)	Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen
Magnesiumsulfat-heptahydrat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogencarbonat	Merck, Darmstadt
Palmitinsäure	Merck, Darmstadt
Pyruvat (Brenztraubensäure Natriumsalz)	Fluka Chemika AG, Buchs
Qualex Gold Agarose	Hybaid AGS, Heidelberg
U- ¹³ C ₁₆ -Palmitinsäure	Cambridge Isotope Laboratories, Wesel
Urethan	Riedel-de Haen, Seelze

Tabelle 7: Verwendete Chemikalien und der jeweilige Hersteller.

Präparation der Mäuseherzen:

Für die Präparation wurden eine Mikro-Federschere, Nagelschere, Nagelhautschere und Mikro-Pinzette von Aesculap, Tuttlingen benutzt. Die Kaltlichtlampe KL 1500 LCD, sowie das Mikroskop Leica GZ6 wurden von Leica, Wetzlar bezogen.

Perfusion der Mäuseherzen:

Die Molekularporen-Membran (Spectrapore[®]) für die Herstellung des Albumin-Puffers wurde von *The spectrum companies*, Gardena bezogen. Für die Perfusion der Mäuseherzen wurden folgende Schläuche verwendet: Diverse Tygon-Schläuche von Saint Gobain, Beaverton, Silikonschläuche verschiedener Durchmesser von Reichelt,

Heidelberg. Die zusätzlichen Einzelteile und Glasmaterialien wurden in der Werkstatt und Glasbläserei der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf hergestellt. Folgende peristaltische Pumpen wurden für die Perfusionsapparatur benutzt: Perpex Jubile, MiniPlus 3 von ABIMED, Gilson und Easyload Masterflex L/S von Cole Parmer, Eindhoven. Für die Dobutamin-Infusion wurde ein Perfusor der Firma Precidor infors, Basel genutzt. Für die Messung der funktionellen Parameter wurden folgende Materialien benutzt: Die Sauerstoffelektrode wurde von Radiometer, Copenhagen bezogen, der HSE-Stimulator von Hugo Sachs, Mach-Hugstetten. Die Druckstationen für die Messung diverser Drücke stammt von Isotec, Ohio. Sämtliche schockgefrorene Herzen wurden mit der Lyovac GT2 lyophilisiert. Die computertechnische Datenerfassung der Parameter wurde mit der Software Chart von ADInstruments, Spechbach erfasst.

NMR-Messungen:

Die NMR-Probenröhrchen (5 mm Ø) wurden von Wilmad, Remshalden hergestellt. Die NMR-Spektren wurden mit der Software XWIN-NMR Version 5.1 von Bruker, Rheinstetten ausgewertet. Alle NMR-Spektren wurden mittels eines DRX 400 MHz NMR-Spektrometer der Firma Bruker akquiriert.

Spektrometrie:

Küvetten für photometrische Untersuchungen wurden von Sarsted bezogen. Die Messungen wurden in einem UV/VIS Spektrometer Lamda 20 von Perkin Elmer durchgeführt.

7 Literaturverzeichnis

- (1) Knoop F. Beitr Chem Physiol 1905; **6**:150-162.
- (2) Meyerhof O. Energy conversions in muscle. 1923.
Ref Type: Report
- (3) Krebs H. Citric acid in intermediate metabolism in animal tissues.
Enzymologia 1937.
- (4) Lynen F, Reichert E. Angewandte Chemie 1951; **63**:47.
- (5) Mitchell M. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemiosmotic type of mechanism. Nature 1961; **191**:144-148.
- (6) Neely J, Rovetto M, Oram J. Myocardial Utilization of Carbohydrate and Lipids. Progress in Cardiovascular Diseases 1972; **15**(3):298-329.
- (7) Opie L. The Heart-Physiology from Cell to Circulation. 3 ed. Lippincott-Raven, 1997.
- (8) Randle P, Garland P, Hales C, Newsholme E. The glucose fatty-acid cycle. Its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. Lancet 1963; **1**:785-789.
- (9) Russell R, Yin R, Xiaoyue H. Insulin stimulates translocation of both GLUT 4 and GLUT 1 in the heart. Circulation 1996; **94**:1-308.
- (10) Abrumad N, Perkins R, Park J. Mechanisms of long chain fatty acid permeation in the isolated adipocyte. J Biol Chem 1981; **256**:9183-9191.
- (11) Pohl J, Ring A, Eehalt R, Herrmann T, Stremmel W. New concepts of cellular fatty acid uptake: role of fatty acid transport proteins and of caveolae. Proc Nutr Soc 2004; **63**(2):259-262.
- (12) van der Vusse G, van Bilsen M, Glatz J. Cardiac fatty acid uptake and transport in health and disease. Cardiovasc Res 2000; **45**:279-293.
- (13) Hinkle P, Kumar M, Resetar A, Harris D. Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation. Biochemistry 1991; **30**(14):3576-3582.
- (14) Theorell H, Ehrenberg A. Magnetic properties of some compounds of myoglobin, peroxidase and catalase. Arch Biochem Biophys 1952; **41**(2):442-461.
- (15) Wittenberg B, Wittenberg J. Transport of Oxygen in Muscle. ANNU Rev Physiol 1989; **51**:857-879.
- (16) Millikan G. Muscle Hemoglobin. Physiol Rev 1937; **19**:503-523.

- (17) Wittenberg B, Wittenberg J, Caldwell P. Role of myoglobin in the oxygen supply to red skeletal muscle. *J Biol Chem* 1975; **250**(23):9038-9043.
- (18) Wittenberg B, Wittenberg J. Myoglobin-mediated oxygen delivery to mitochondria of isolated cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; **84**(21):7503-7507.
- (19) Wittenberg J. Myoglobin-facilitated diffusion of oxygen. *J Gen Physiol* 1965; **49**(1):Suppl-74.
- (20) Gödecke A, Flogel U, Zanger K, Ding Z, Hirchenhain J, Decking UK et al. Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**(18):10495-10500.
- (21) Merx M, Flogel U, Stumpe T, Godecke A, Decking UaSJ. Myoglobin facilitates oxygen diffusion. *FASEB J* 2001; **15**:1077-1079.
- (22) Perutz M. Myoglobin and haemoglobin: role of distal residues in reactions with haem ligands. *Trends Biochem Sci* 1989; **14**(2):42-44.
- (23) Wittenberg J. Myoglobin-facilitated oxygen diffusion: role of myoglobin in oxygen entry into muscle. *Physiol Rev* 1970; **50**(4):559-636.
- (24) Wittenberg J, Wittenberg BA. Mechanisms of cytoplasmic hemoglobin and myoglobin function. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* 1990; **19**:217-241.
- (25) Garry D, Meeson A, Yan Z, Williams R. Life without myoglobin. *Cell Mol Life Sci* 2000; **57**(6):896-898.
- (26) Meeson A, Radford N, Shelton J, Mammen P, DiMaio J, Hutcheson K et al. Adaptive mechanisms that preserve cardiac function in mice without myoglobin. *Circ Res* 2001; **88**(7):713-720.
- (27) Ibdah J, Hyacinth P, Zhao Y, Binford S, Salleng K, et al. Lack of mitochondrial trifunctional protein in mice causes neonatal hypoglycemia and sudden death. *J Clin Invest* 2001; **107**(11):1403-1409.
- (28) Uchida Y, Izai K, Orii T, Hashimoto T. Novel fatty acid beta-oxidation enzymes in rat liver mitochondria. II. Purification and properties of enoyl-coenzyme A (CoA) hydratase/3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/3-ketoacyl-CoA thiolase trifunctional protein. *J Biol Chem* 1992; **15**(267):1034-1041.
- (29) Stryer L. *Biochemistry*. 4. ed. ed. New York: Freeman, 1995.
- (30) Bloch F, Hansen WW, Packard ME. Nuclear induction. *Phys Rev* 2004; **69**:127.
- (31) Purcell E, Torrey H, Pound R. Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys Rev* 1946; **69**:37-38.
- (32) Arnold J, Dharmati S, Packard M. Chemical effects on nuclear induction signals from organic compounds. *J Chem Phys* 1951; **19**:507.

- (33) Knight W. Nuclear magnetic resonance shift in metals. *Phys Rev* 2004; **76**:1259-1260.
- (34) Ernst R, Anderson W. Application of fourier transform spectroscopy to magnetic resonance. *Rev Sci Instrum* 2004; **37**:93-102.
- (35) Hull W, Wehrli F. Ultra-high-field NMR: technology and applications. *Carbon 13NMR Spectrosc* 1984; **4**:1-36.
- (36) Lowe J, Norberg R. Free-induction decays in solids. *Phys Rev* 2004; **107**:46-61.
- (37) Lauterbur P. Image formation by induced local interactions: examples employing nuclear magnetic resonance. *Nature* 1973; **242**:190-191.
- (38) Garry D, Ordway G, Lorenz J, Radford N, Chin E, Grange R et al. Mice without myoglobin. *Nature* 1998; **395**(6705):905-908.
- (39) Krebs H, Henseleit K. Untersuchungen über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe Seyler's Z. Physiol Chemie* **210**, 33-66. 1932.
Ref Type: Magazine Article
- (40) Langendorff O. Untersuchungen am überlebenden Säugetierherzen. *Arch. Ges. Physiol.* **61**, 291-332. 1895.
Ref Type: Magazine Article
- (41) Clarke L. Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography. *J. Appl. Physio.* **6**, 189-193. 1953.
Ref Type: Magazine Article
- (42) Barr R, Lopaschuk G. The fatty acid perfused isolated working heart. CRC Press, Inc., 1997.
- (43) Flögel U, Decking U, Gödecke A, Schrader J. Contribution of NO to Ischemia-Reperfusion Injury in the Saline-Perfused Heart: a Study in Endothelial NO Synthase Knockout Mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 1999; **31**(4):827-836.
- (44) Malloy C, Thompson J, Jeffrey F, Sherry A. Contribution of exogenous substrates to acetyl coenzyme A: measurement by ¹³C NMR under non-steady-state conditions. *Biochemistry* 1990; **29**(29):6756-6761.
- (45) Lopaschuk G, Belke D, Gamble J, Itoi T, Schonekess B. Regulation of fatty acid oxidation in the mammalian heart in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1994; **1213**:263-276.
- (46) Bass A, Brdiczka D, Eyer P, Hofer S, Pette D. Metabolic differentiation of distinct muscle types at the level of enzymatic organization. *Eur J Biochem* 1969; **10**(2):198-206.
- (47) Neuffer P, Benjamin I. Differential expression of B-crystallin and Hsp27 in skeletal muscle during continuous contractile activity. Relationship to myogenic regulatory factors. *J Biol Chem* 1996; **271**:24089-24095.

- (48) Laussmann T, Janosi R, Fingas C, Schlieper G, Schlack W, Schrader J et al. Myocardial proteome analysis reveals reduced NOS inhibition and enhanced glycolytic capacity in areas of low local blood flow. *FASEB J* 2002; **16**(6):628-630.
- (49) O'Brien P, Gwathmey J. Myocardial Ca²⁺ - and ATP-cycling imbalances in end-stage dilated and ischemic cardiomyopathies. *Cardiovascular Research* 1995; **30**:394-404.
- (50) Weekes J., Wheeler C, Yan J, Weil J, Eschenhagen T, Scholtysik G et al. Bovine dilated cardiomyopathy: Proteomic analysis of an animal model of human dilated cardiomyopathy. *Electrophoresis* 1999; **20**:898-906.
- (51) Weil J, Eschenhagen T, Magnussen O, Mittmann C, Orthey E, Scholz H et al. Reduction of myocardial myoglobin in bovine dilated cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol* 1997; **29**(2):743-751.
- (52) Hochachka P, McClelland G. Cellular metabolic homeostasis during large-scale change in ATP turnover rates in muscles. *J Exp Biol* 1997; **200**:381-386.
- (53) Grynberg A, Demaison L. Fatty acid oxidation in the heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; **28** Suppl 1:S11-S17.
- (54) Suga H. Ventricular energetics. *Physiol Rev* 1990; **70**(2):247-277.
- (55) Korvald C, Elvenes O, Ytrebo L, Sorlie D, Myrnes T. Oxygen-wasting effect of inotropy in the "virtual work model". *Am J Physiol* 1999; **276**(4 Pt 2):H1339-H1345.
- (56) Gloster J, Harris P. Fatty acid binding to cytoplasmic proteins of myocardium and red and white skeletal muscle in the rat. A possible new role for myoglobin. *Biochem Biophys Res Commun* 1977; **74**:506-513.
- (57) Götz F, Hertel M, Grötschel-Steward U. Fatty Acid Binding of Myoglobin Depends on Its Oxygenation. *J Biol Chem* 1994; **375**:387-392.
- (58) Moore K, Cameron P, Ekeren P, Smith. Fatty acid binding protein in bovine longissimus dorsi muscle. *Biochem Physiol* 1993; **104B**:259-266.
- (59) Flogel U, Merx MW, Godecke A, Decking UK, Schrader J. Myoglobin: A scavenger of bioactive NO. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**(2):735-740.
- (60) Cocks T, Angus J, Campbell J, Campbell G. Release and properties of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from endothelial cells in culture. *J Cell Physiol* 1985; **123**:310-320.
- (61) Schulz R, Smith J, Lewis M, Moncada S. Nitric oxide synthase in cultured endocardial cells of the pig. *Br J Pharmacol* 1991; **104**:21-24.
- (62) Schulz R, Nava E, Moncada S. Induction and potential biological relevance of a Ca²⁺-independent nitric oxide synthase in the myocardium. *Br J Pharmacol* 1992; **105**:575-580.

- (63) Balligand J, Kobzik L, Han X, Kaye D, Belhassen L, O'Hara D et al. Nitric oxide-dependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1995; **270**:14582-14586.
- (64) Brady A, Warren J, Poole W, Williams T, Harding S. Nitric oxide attenuates cardiac myocyte contraction. *Am J Physiol* 1993; **265**:H176-H182.
- (65) Moncada S, Palmer R, Higgs E. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; **43**:109-142.
- (66) Tada H, Thompson C, Recchia F, Loke K, Ochoa M, Smith C et al. Myocardial glucose uptake is regulated by nitric oxide via endothelial nitric oxide synthase in Langendorff mouse heart. *Circ Res* 2000; **82**(270):274.
- (67) Depré C, Gaussin V, Ponchaut S, Fischer Y, Vanoverschelde J, Hue L. Inhibition of myocardial glucose uptake by cGMP. *Am J Physiol* 1998; **274**:H1443-H1449.
- (68) Suto N, Mikuniya A, Okubo T, Hanada H, Shinozaki N, Okumura K. Nitric oxide modulates cardiac contractility and oxygen consumption without changing contractile efficiency. *Am J Physiol* 1998; **275**:H41-H49.
- (69) Liang Z, Nocek J, Huang K, Hayes R, Kurnikov I, Beratan D et al. Dynamic docking and electron transfer between Zn-myoglobin and cytochrome b(5). *J Am Chem Soc* 2002; **124**:6849-6859.
- (70) Wakasugi K, Nakano T, Morishima I. Oxidized human neuroglobin acts as a heterotrimeric G α -protein guanine nucleotide dissociation inhibitor. *J Biol Chem* 2003; **278**:36505-36512.
- (71) Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall R. Protein measurement with the folin reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275. 1951.
Ref Type: Magazine Article
- (72) Noll F, Bergmeyer H. *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim, 1974: 1521.

8 Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, insbesondere bei Herrn **Prof. Dr. med. J. Schrader** für die Themenstellung und die stetige Unterstützung in der Planung und Durchführung der Arbeit.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer **Dr. Ulrich Flögel**, der mit großer Mühe und Geduld am Gelingen der Arbeit beigetragen hat. Durch die vielen Hilfestellungen und seine große Diskussionsbereitschaft hat er mich maßgeblich an der Planung, Durchführung und Auswertung der Experimente und der Erstellung des Manuskriptes, sowie an der Vorbereitung von Fachvorträgen unterstützt.

Ich möchte mich bei Herrn **Prof. Dr. Axel Gödecke** für die Bereitstellung der myo^{-/-}-Mäuse und die stetige Unterstützung und Geduld bei vielen Fragen, insbesondere bei der Vorbereitung von Fachvorträgen bedanken.

Herrn **Dr. Christoph Jacoby** möchte ich für seine Diskussionsbereitschaft bei vielen Fragen und die unerschöpfliche Geduld bei vielen Fragestellungen danken. Frau **Daniela Haubs** danke ich für die wertvolle labortechnische Einarbeitung und Hilfestellungen bei der Herstellung der Perfusionslösungen. Frau **Brandt** danke ich für die Anfertigung zahlreicher Fotografien während der Experimente.

Meinen Eltern, **Fabian** und **Teresita Abanador** und meinen Geschwistern, **Edwin** und **Michelle Abanador** danke ich für ihre Liebe und Fürsorge, die mir viel Durchhaltevermögen für mein Studium gegeben hat.

Lars Kamper danke ich nicht nur für die zahlreichen Korrekturen des Manuskriptes... Ich danke Dir für Deine liebevolle Unterstützung während meiner gesamten Promotions- und Studienzeit.

9 Lebenslauf

Name: Nadine Abanador
Geburtsdatum: 01.06.1979 in Wuppertal
Eltern: Teresita Abanador, geb. Lingad und Fabian Abanador
Geschwister: Edwin und Michelle Abanador

Schulbildung:

1986-1990: Städt. Grundschule Thornerstrasse, Wuppertal
1990-1998: Carl-Duisberg-Gymnasium, Wuppertal
1998: Abitur

Hochschulbildung:

1998-2004: Studium der Humanmedizin an der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (HHU)
2000: Ärztliche Vorprüfung
2001: 1. Staatsexamen
2003: 2. Staatsexamen
2004: 3. Staatsexamen
2003-2004: Praktisches Jahr:
Queen's medical centre, University of Nottingham
Universitätsklinikum HHU
2001-2004: Promotion am Institut für Herz-Kreislauf-Physiologie, Düsseldorf

Preise und Stipendien:

Mai 1997 Reisestipendium der Carl-Duisberg-Gesellschaft ins Deutsche
Museum, München (DMM)
Mai 1998 Auszeichnung vom DMM für die verfasste Arbeit: Theorie der
Sternentstehung
Dezember 2004 Young Investigator Cardiovascular Award Forschungspreis im
Rahmen der Posterpräsentation in der Nordrhein-Westfälischen
Akademie der Wissenschaften, Cardiovision 2004

Düsseldorf, im Dezember 2004

10 Abstract

Die kardiale Substratselektion bei Myoglobin-Defizienz wurde durch Perfusion isolierter Mäuseherzen, sowohl an Wildtyp (WT) als auch an Myoglobin-defizienten Tieren ($myo^{-/-}$) untersucht. Unter der Verwendung von ^{13}C -NMR-Spektroskopie (Kernresonanz-Spektroskopie) (Isotopomerenanalyse von $4\text{-}^{13}\text{C}$ - und $3,4\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glutamat bzw. von $4,5\text{-}^{13}\text{C}_2$ - und $3,4,5\text{-}^{13}\text{C}_3$ -Glutamat) konnte der relative Substratfluss von $1,6\text{-}^{13}\text{C}_2$ -Glucose und $\text{U-}^{13}\text{C}_{16}$ -Palmitat, einer langkettigen Fettsäure (FS) zwischen beiden Gruppen analysiert werden. Funktionelle und energetische Parameter wurden zusätzlich durch ^{31}P -NMR-Spektroskopie an isoliert perfundierten Herzen beider Gruppen erfasst. Außerdem wurde die Perfusion alleiniger FS in beiden Gruppen, unter der Analyse funktioneller und energetischer Parameter, untersucht und zusätzlich der Einfluss kurz- und langkettiger FS auf die Herzen beobachtet. Folgende Ergebnisse wurden dabei erzielt:

Die spektroskopischen Stoffwechsel-Analysen zeigten bei parallelem Substratangebot eine Bevorzugung der Glucose gegenüber FS in $myo^{-/-}$ -Herzen im Vergleich zu den WT. Die Funktionsparameter-Analysen zeigten allerdings keine Beeinträchtigung der funktionellen und energetischen Parameter in den Myoglobin-defizienten Mäusen bei kurzfristiger, alleiniger Perfusion mit FS. Erst bei gleichzeitiger maximaler Arbeitsbelastung zeigten $myo^{-/-}$ -Herzen Anzeichen einer stärkeren energetischen Beanspruchung als WT-Herzen.

Da die vollständige Oxidation von Glucose weniger Sauerstoff (O_2) verbraucht als die FS-Verbrennung, kann der metabolische „Substratshift“ als ein weiterer Kompensationsmechanismus bei Myoglobin-Defizienz gewertet werden.