

Aus der Nuklearmedizinischen Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum rechts der Isar  
Direktor: Prof. Dr. M. Schwaiger

Arbeit angefertigt unter der Leitung von  
Prof. Dr. M. Schwaiger und  
Dr. S. Egert

Vorgelegt über Prof. Dr. W. Rambeck  
Institut für Physiologie, Physiologische Chemie und Tierernährung  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig – Maximilians – Universität München

**Glukosetransporter und Hexokinase II Expression im  
normalen und chronisch-ischämischen Schweinemyokard**

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig – Maximilians - Universität München

von  
Melanie Stickel  
aus  
Böblingen

München 2005

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig – Maximilians – Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. A. Stolle  
Berichterstatter: Prof. Dr. W. Rambeck  
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. T. Göbel

Tag der Promotion: 11. Februar 2005

***Meinen Eltern***

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1.    Überblick über den myokardialen Substratmetabolismus	3
2.2.    Myokardialer Metabolismus bei Ischämie	4
2.3.    Das „hibernating“ Myokard	5
2.4.    Detektion der Gewebewitalität	7
2.4.1.  Die Positronen Emissions Tomographie (PET)	7
2.4.1.1. Der myokardiale Blutflußtracer <sup>13</sup> NH <sub>3</sub>	9
2.4.1.2. Das Glukoseanalog <sup>18</sup> FDG	10
2.5.    Expression der Glukosetransporter im Herzen	11
2.5.1.  GLUT1	12
2.5.2.  GLUT3	13
2.5.3.  GLUT4	14
2.6.    Hexokinase II	17
<b>3. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
3.1.    Material	19
3.1.1.  Chemikalien	19
3.1.2.  Verbrauchsmaterialien	21
3.1.3.  Antikörper	21
3.1.4.  Primer und Hybridisationsproben	22
3.1.5.  Geräte	23
3.1.6.  Tracer	24
3.1.7.  Puffer, Lösungen und Gele	24
3.2.    Methoden	26
3.2.1.  Nicht-ischämische Herzen	26
3.2.2.  Ischämische Herzen	26
3.2.2.1. Versuchstiere	26
3.2.2.2. Anästhesie	26
3.2.2.3. Stent	27
3.2.2.4. Postoperative Untersuchungen	28
3.2.2.5. Untersuchungen am 7. Tag	28
3.2.2.6. Untersuchungen am 28. Tag	29
3.2.2.7. Euthanasie und Probenentnahme	30
3.2.3.  Proteinanalyse	30
3.2.3.1. Allgemeines	30
3.2.3.2. Anreicherung der Zellmembranen	32
3.2.3.3. Proteinbestimmung	33
3.2.3.4. Polyacrylamidelectrophorese	34
3.2.3.5. Western-Blot	35
3.2.3.6. Detektion der Proteine	36
3.2.3.7. Auswertung	37
3.2.4.  mRNA	38
3.2.4.1. Allgemeines	38
3.2.4.2. Isolation der RNA	38
3.2.4.3. Messung der RNA Konzentration	39
3.2.4.4. Reverse Transkription (RT)	40
3.2.4.5. Polymerasenkettenreaktion (PCR)	42
3.2.5.  Datenanalyse und Statistik	46

<b>4.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>47</b>
4.1.	Ergebnisse der nicht-ischämischen Herzen	47
4.1.1.	Ergebnisse der Proteinquantifizierung	47
4.1.1.1.	GLUT1 Protein	47
4.1.1.2.	GLUT3 Protein	49
4.1.1.3.	GLUT4 Protein	50
4.1.1.4.	Hexokinase II Protein	52
4.1.2.	Ergebnisse der mRNA Quantifizierung	54
4.1.2.1.	GLUT1 mRNA	54
4.1.2.2.	GLUT3 mRNA	55
4.1.2.3.	GLUT4 mRNA	57
4.1.2.4.	Hexokinase II mRNA	58
4.1.2.5.	GLUT1/GLUT4 mRNA Verhältnis	58
4.2.	Ergebnisse der ischämischen Herzen	59
4.2.1.	Wandbewegungsstörung	59
4.2.2.	Myokardiale Durchblutung	60
4.2.3.	Ergebnisse der Proteinquantifizierung	61
4.2.3.1.	GLUT1 Protein	61
4.2.3.2.	GLUT4 Protein	62
4.2.3.3.	Hexokinase II Protein	63
4.2.4.	Ergebnisse der mRNA Quantifizierung	66
4.2.4.1.	GLUT1 mRNA	65
4.2.4.2.	GLUT3 mRNA	66
4.2.4.3.	GLUT4 mRNA	67
4.2.4.4.	GLUT1/GLUT4 mRNA Verhältnis	68
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>70</b>
5.1.	Einleitung	70
5.2.	Überlegungen zum Tiermodell	70
5.3.	Überlegungen zu den nicht-ischämischen Herzen	72
5.4.	Überlegungen zu den ischämischen Herzen	74
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>86</b>

	<b>Seite:</b>
Abbildung 1: PET – Aufnahme eines „mismatch“ Patienten	<b>8</b>
Abbildung 2: Drei-Kompartiment-Modell der Verstoffwechslung von $^{13}\text{NH}_3$	<b>9</b>
Abbildung 3: Metabolismus von Glukose und $^{18}\text{FDG}$	<b>10</b>
Abbildung 4: Modifizierter Stent mit aufgeblasenem Ballon	<b>27</b>
Abbildung 5: Ponceau – S - Färbung eines Blots	<b>36</b>
Abbildung 6: Prinzip der PCR	<b>42</b>
Abbildung 7: Aufbau des LightCyclers	<b>43</b>
Abbildung 8: Funktionsprinzip der Hybridisationsproben	<b>44</b>
Abbildung 9: Ausschnitt aus einem Blot zum Nachweis von GLUT1	<b>48</b>
Abbildung 10: GLUT1 Proteinexpression im nicht – ischämischen Herzen	<b>49</b>
Abbildung 11: Ausschnitt aus einem Blot zum Nachweis von GLUT4	<b>50</b>
Abbildung 12: GLUT4 Proteinexpression im nicht – ischämischen Herzen	<b>51</b>
Abbildung 13: Ausschnitt aus einem Blot zum Nachweis von Hexokinase II	<b>52</b>
Abbildung 14: HK II Proteinexpression im nicht – ischämischen Herzen	<b>53</b>
Abbildung 15: Expression von GLUT1 mRNA im LV nicht– ischämischer Her.	<b>55</b>
Abbildung 16: Expression von GLUT3 mRNA im nicht – ischämischen Herzen	<b>56</b>
Abbildung 17: Expression von GLUT4 mRNA im LV nicht–ischämischer Her.	<b>57</b>
Abbildung 18: Koronare Angiographie (Tag 0; Tag 7; Tag 28)	<b>59</b>
Abbildung 19: Expression des GLUT1 Proteins im ischämischen Herzen	<b>62</b>
Abbildung 20: Expression des GLUT4 Proteins im ischämischen Herzen	<b>63</b>
Abbildung 21: Expression des Hexokinase II Proteins im ischämischen Herzen	<b>64</b>
Abbildung 22: Expression der GLUT1 mRNA im ischämischen Herzen	<b>66</b>
Abbildung 23: Expression der GLUT4 mRNA im ischämischen Herzen	<b>68</b>

	<b>Seite:</b>
Tabelle 1: Sequenz der verwendeten Primer	<b>22</b>
Tabelle 2: Sequenz der verwendeten Hybridisationsproben	<b>22</b>
Tabelle 3: Verwendete Tracer für die Positronen Emissions Tomographie	<b>24</b>
Tabelle 4: Probenentnahme aus den Schlachthofherzen (nicht-ischämisch)	<b>30</b>
Tabelle 5: Verdünnungsreihe des Proteinstandards	<b>33</b>
Tabelle 6: Master Mix für die Reverse Transkription	<b>41</b>
Tabelle 7: Master Mix für die PCR mit dem LightCycler	<b>45</b>
Tabelle 8: regionale Verteilung des GLUT1 Proteins im nicht-isch. Herzen	<b>48</b>
Tabelle 9: regionale Verteilung des GLUT4 Proteins im nicht-isch. Herzen	<b>51</b>
Tabelle 10: regionale Verteilung des HK II Proteins im nicht-isch. Herzen	<b>53</b>
Tabelle 11: regionale Verteilung der GLUT1 mRNA im nicht-isch. Herzen	<b>54</b>
Tabelle 12: regionale Verteilung der GLUT3 mRNA im nicht-isch. Herzen	<b>56</b>
Tabelle 13: regionale Verteilung der GLUT4 mRNA im nicht-isch. Herzen	<b>57</b>
Tabelle 14: GLUT1/GLUT4 mRNA Verhältnis im nicht-isch. Herzen	<b>58</b>
Tabelle 15: Messung der Wandbewegungsstörung	<b>60</b>
Tabelle 16: Myokardiale Durchblutung	<b>60</b>
Tabelle 17: regionale Verteilung des GLUT1 Proteins im isch. Herzen	<b>61</b>
Tabelle 18: regionale Verteilung des GLUT4 Proteins im isch. Herzen	<b>62</b>
Tabelle 19: regionale Verteilung des HK II Proteins im isch. Herzen	<b>64</b>
Tabelle 20: regionale Verteilung der GLUT1 mRNA im isch. Herzen	<b>65</b>
Tabelle 21: regionale Verteilung der GLUT3 mRNA im isch. Herzen	<b>66</b>
Tabelle 22: regionale Verteilung der GLUT4 mRNA im isch. Herzen	<b>67</b>
Tabelle 23: GLUT1/GLUT4 mRNA Verhältnis im isch. Herzen	<b>69</b>

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP aktivierte Proteinkinase
AMV	Avian Myeloblastose Virus
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchoninic acid
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d.h.	das heißt
DNA	Deoxyribonukleinsäure/-säure
dt.	deutsch
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	et alii
<sup>18</sup> FDG	Fluor -18-Deoxyglukose
FS	Fettsäuren
g	Gramm
GLUT	Glukosetransporter
G4-/-	GLUT4 knockout
G6P	Glukose-6-Phosphat
h	Stunde
HK	Hexokinase
HWZ	physikalische Halbwertszeit
IE	internationale Einheiten
i.m.	intra musculär
IRS-1	Insulin-Rezeptor-Substrat 1
i.v.	intra venös
kD	kiloDalton
keV	Kiloelektronen Volt
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHE	koronare Herzerkrankung
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten Konstante
LAD	left anterior descending coronary artery



LCX	left circumflex coronary artery
LV	linker Ventrikel
mA	Milliampere
MBF	myokardialer Blutfluss
mCi	milli Curie, alte Einheit für Radioaktivität
mg	Milligramm
min.	minütig
mm	Millimeter
MM	Membranfraktion
mRNA	messenger Ribonukleinacid/-säure
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
n	Anzahl
N	Stickstoff
NC	Nitrocellulose
$^{13}\text{NH}_3$	Stickstoff-13-Ammoniak
Nr	Nummer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	Phosphat buffered saline (Phosphatpuffer)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PET	Positronen Emissions Tomographie
PI	Phosphatidylinositol
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PK	Proteinkinasen
p.o.	per oral
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
RV	rechter Ventrikel
s	Sekunde
s.c.	subkutan
SD	Standardabweichung
SDS	Sodiumdodecylsulfat
s.u.	siehe unten
tägl.	täglich

V	Volt
v.a.	vor allem
WP	Whatmanpapier
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

In den Industrienationen sind Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems die Todesursache Nr.1, vor dem Tod durch Unfälle und Krebs.

Nach einer Erkrankung des koronaren Gefäßsystems kann jedoch die Überlebensrate durch verbesserte medikamentöse und interventionelle Therapie deutlich erhöht werden.

Von besonderem Wert für den klinischen Fortschritt ist dabei die Erkenntnis, dass es bei Patienten mit einer koronaren Herzerkrankung (KHE) und eingeschränkter linksventrikulärer Funktion, durch eine Revaskularisierung zur Verbesserung der kardialen Funktion kommen kann. Dies zeigt, dass eine Minderperfusion des Myokards nicht unbedingt zu einer Infarzierung des Gewebes führen muß, sondern dass das Herz verschiedene Überlebensstrategien entwickelt, um sich an ischämische Phasen anzupassen. Das sogenannte „hibernating“ Myokard spiegelt eine dieser Strategien wieder (Diamond et al. 1978; Rahimtoola 1989). In Folge einer chronischen Minderdurchblutung kommt es dabei zu einer regionalen myokardialen Dysfunktion, die den Sauerstoffbedarf herabsetzt. Nach Reperfusion kann es zu einer Erholung der regionalen Funktion kommen, wobei Tage bis Monate vergehen können, bis die ursprüngliche Leistungsfähigkeit wieder hergestellt ist (Schwaiger et al. 1995).

Eine wichtige Rolle im Adaptionsmechanismus des ischämischen Myokards spielt dabei der Glukosestoffwechsel. Durch den Einsatz der Positronen-Emissions-Tomographie (PET) konnte in verschiedenen Studien eine erhöhte Aufnahme des Glukoseanaloges Fluor-18-Deoxyglukose ( $^{18}\text{FDG}$ ) in ischämisch geschädigten Myokardabschnitten festgestellt werden (Kalff et al. 1992).

Tierexperimentelle Arbeiten der letzten Jahre haben gezeigt, dass ein wichtiger Regulationsmechanismus der  $^{18}\text{FDG}$  Aufnahme im Glukosetransport durch die Zellmembran zu suchen ist. Bei einer akuten Ischämie isolierter Rattenherzen kommt es z.B. zu einer rapiden Rekrutierung der Glukosetransportmoleküle (GLUTs) auf die Plasmamembran und zu einem schnellen Anstieg der Glukoseaufnahme (Sun et al. 1994; Egert et al. 1999b). Die Mechanismen, die bei einer chronischen Ischämie zu einer Veränderung des Glukosestoffwechsels führen, sind dagegen noch weitgehend unbekannt.

Die vorliegende Arbeit ist Teil eines Großprojekts, in dem die zugrunde liegenden molekularen Veränderungen im Glukosestoffwechsel bei einer länger andauernden Myokardischämie am Tiermodell untersucht werden sollen. Genehmigt wurde der Versuch von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 211-2531-26/2001.

Das Schwein erscheint als Versuchstier in dieser Studie besonders geeignet, da sein Herz in vielen Parametern, wie z.B. dem Blutgefäßsystem und der Herzphysiologie, große Ähnlichkeit mit dem menschlichen Myokard besitzt.

Die makroskopischen und histologischen post mortem Untersuchungen der Herzen sind Gegenstand einer Dissertation von Nimz (2004), eine Arbeit mit molekularbiologischen Schwerpunkt bei einer Versuchsdauer von 7 Tagen wird von Praus vorbereitet (2005).

Zur weiteren Beantwortung der Fragestellung welche molekularen Veränderungen des Glukosestoffwechsels sich bei einer vierwöchigen myokardialen Ischämie ergeben, soll im Rahmen einer detaillierten Herzkartierung eine umfassende Analyse der Glukosetransporter Isoformen GLUT1, GLUT3, GLUT4, sowie der Hexokinase Isoform II auf dem Level der mRNA und der Proteine durchgeführt werden. Dazu werden molekularbiologische Methoden wie die Reverse Transkription-Polymerasenkettenreaktion (RT-PCR) und Western-Blotting verwendet.

Darüber hinaus gibt es in der Literatur derzeit noch keine Angaben über die statistische Verteilung der genannten Glukosetransporter oder der Hexokinase II in verschiedenen funktionellen Regionen des normal perfundierten Schweinemyokards. Eine Arbeit von Praus et al. (in Vorb.), die die Variabilität der Untersuchungsparameter GLUT1, GLUT3, GLUT4, sowie der Hexokinase II in definierten Regionen des gesunden Schweinemyokards untersucht, soll deshalb zur statistischen Absicherung der Ergebnisse noch um einige Tiere ergänzt werden.

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Überblick über den myokardialen Substratmetabolismus

Die zentrale Aufgabe des Herzens ist es, den Körper durch seine Pumpleistung mit Sauerstoff, Nährstoffen und Hormonen zu versorgen. Um diese Funktion dauerhaft und zuverlässig ausführen zu können, benötigen die Kardiomyozyten ein konstantes Nährstoffangebot zur ATP Gewinnung.

Zum besseren Verständnis des Metabolismus im ischämischen Herzen ist es zunächst wichtig, die Stoffwechselfvorgänge im normal perfundierten Myokard zu beschreiben.

Das gesunde Herz bezieht die notwendige Energie aus einer großen Anzahl oxidierbarer Substraten. Unter aeroben Bedingungen sind das vor allem freie Fettsäuren (FS) und Triglyzeride, die etwa 60 – 90% der benötigten Energie liefern (Stanley et al. 1997). Durch die oxidative Phosphorylierung in den Mitochondrien werden diese FS zu Acetyl-CoA abgebaut und weiter zur ATP Gewinnung im Zitronensäurezyklus herangezogen. In welchem Maße die FS zur Energieproduktion dienen, ist außerdem vom Grad der Herzarbeit, sowie dem Vorhandensein von Hormonen (v.a. Insulin) abhängig (Neely und Morgan 1974).

Im gesunden, adulten Herzen spielt der Stoffwechsel von Kohlenhydraten nur eine untergeordnete Rolle (10 – 40 % der Gesamtenergie).

Durch die Erhöhung des Blutglukosespiegels und dem Insulingehalts im postprandialen Zustand, aber auch nach körperlicher Anstrengung, gewinnt die Glykolyse zur Energiegewinnung an Bedeutung (Taegtmeyer 1994).

Die in die Myozyten aufgenommene Glukose wird durch das Enzym Hexokinase (HK) zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert. Im weiteren Verlauf wird G6P entweder als Glykogen gespeichert, oder zur Energiegewinnung durch die aerobe Glykolyse zu Pyruvat abgebaut, welches durch die Pyruvatdehydrogenase weiter zu Acetyl-CoA verstoffwechselt wird.

Laktat, das vor allem nach körperlicher Anstrengung produziert wird, kann alle anderen Substrate, inklusive der Glukose, im Prozeß der Energiegewinnung ersetzen (Gertz et al. 1988).

Ketonkörper, die primär in Hungersituationen, während des letzten Drittels der Schwangerschaft, aber auch in pathologischen Situationen (z.B. Diabetes) gebildet werden, werden in den Kardiomyozyten ebenfalls metabolisiert (Taegtmeyer 1983).

Das Herz hat somit die Möglichkeit, sich bezüglich der Energiegewinnung auf verschiedene Situationen (z.B. Nährstoffangebot, Hormonspiegel, koronare Durchblutung) einzustellen.

### **2.2 Myokardialer Metabolismus bei Ischämie**

Der Energiemetabolismus im Herzen bei Ischämie ist vor allem abhängig vom Grad und der Dauer der Minderdurchblutung (Liedtke et al. 1988).

Ein vollständiges Versiegen des koronaren Blutflusses führt schnell zu einem Sauerstoffmangel in den Myozyten, weshalb die zur Energiegewinnung überlebenswichtigen Oxidationsschritte nicht mehr aufrechterhalten werden können. Es kommt zur Erschöpfung der ATP- und Kreatinphosphatreserven, die Glykogenspeicher werden aufgebraucht und Laktat akkumuliert in der Zelle. Als Ergebnis der sich entwickelnden intrazellulären Azidose und der Anhäufung von anorganischen Phosphaten und Protonen, kommt es zu Störungen im Kontraktionsmechanismus der Kardiomyozyten. Schon nach kurzer Zeit entwickelt sich nekrotisches Gewebe und in Folge ein Herzinfarkt (Stanley und Chandler 2002). Eine Reduktion des Blutflusses um 40 – 60% dagegen führt zunächst zu einer Abnahme des myokardialen Sauerstoffverbrauchs (10 – 50%), zu einem Anstieg der anaeroben Glykolyse (Glykogenabbau und Laktatproduktion), sowie zu einer Reduktion der  $\beta$ -Oxidation der FS und Anpassung der Kontraktilität der Myozyten. Diese moderate Minderdurchblutung resultiert somit nicht in einer sofortigen, irreversiblen Gewebeschädigung, wenn auch die grundsätzliche Leistungsfähigkeit des Herzens nicht aufrechterhalten werden kann (Stanley und Chandler 2002).

Es wird vermutet, dass es durch die Entkopplung des Grundstoffwechsel und der kontraktilen Funktion der Myokardzellen zu einer deutlichen Herabsetzung des Energiebedarfs der Zelle kommt und damit die Toleranz der Kardiomyozyten gegenüber einer ischämischen Schädigung gesteigert wird (Schulz et al. 1993).

Die Steigerung des Glukosemetabolismus während ischämischen Phasen konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden (Liedtke 1981, Kalff et al. 1992).

Der energetische Vorteil des Glukoseabbaus bei einer Minderperfusion des Gewebes ist darin zu sehen, dass die Zellen ca. 10 – 15% Sauerstoff einsparen können, um eine zur  $\beta$ -Oxidation äquivalente Menge an ATP zu produzieren (Liedtke 1981). Der Anstieg der Glukoseaufnahme und des weiteren Stoffwechsels kann bei einer akuten, moderaten Ischämie noch etwa 24 h nach der Reperfusion festgestellt werden (Schwaiger 1989). Bei einer chronischen Ischämie sind diese metabolischen Veränderungen von persistierender Natur. Dieses Phänomen macht man sich bei Stoffwechseluntersuchungen im Positronen Emissions Tomographen (PET) mittels des radioaktiven Glukoseanaloges Fluor-18-Deoxyglukose ( $^{18}\text{FDG}$ ) zunutze. Durch die vermehrte Aufnahme des Tracers  $^{18}\text{FDG}$  in ischämischen Herzregionen, können diese noch vitalen Areale von bereits nekrotischem Gewebe differenziert werden (Marshall et al. 1989).

Über die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen der veränderten Stoffwechsellage ist noch wenig bekannt, in der kardiologischen PET Diagnostik wird dieses Phänomen jedoch als „hibernating“ Myokard (= „Winterschlaf“) bezeichnet (Fallavollita et al. 1997; Camici et al. 1997).

### **2.3. Das „hibernating“ Myokard**

Erstmals erkannten Diamond et al. (1978), dass ein minderdurchbluteter, nicht infarzierter Myokardanteil in einem Zustand der funktionellen „Hibernation“ verharren kann. Rahimtoola definierte den Begriff 1989 folgendermaßen: “Hibernating myocardium is a state of persistently impaired myocardial and left ventricular (LV) function at rest, that can be partially or completely restored to normal, if the myocardial oxygen supply/demand relationship is favourably altered, either by improving blood flow and/or by reducing demand.”

Entsprechend dieser Definition kommt es im hibernating Myokard zu einer Anpassung der kontraktile Funktion, so dass der Blutfluß und die Herzfunktion wieder im Gleichgewicht zueinander stehen. Wenn allerdings dieser Zustand der myokardialen Balance zwischen Sauerstoffangebot und –nachfrage ungünstig verändert wird, kommt es leicht zur Entwicklung nekrotischen Gewebes

(Rahimtoola 1995). Für den Kliniker ist dieser hibernierende Zustand des Myokards von großem Interesse, da es nach einer Reperfusion zu einer Erholung der regionalen Funktion kommen kann (Schwaiger et al. 1995). Der Zeitraum in dem diese Erholung stattfindet, kann allerdings zwischen wenigen Tagen und mehreren Monaten variieren (Nienaber et al. 1991).

Durch Biopsien der betroffenen Myokardabschnitte konnte eine Erklärung für die oftmals langsame Erholung der regionalen Funktion gefunden werden. Durch ultrastrukturelle Analysen des hibernierenden Myokards wurden Veränderungen festgestellt, die denen einer Zelldegeneration entsprechen (Maes et al. 1994). Diese Veränderungen schließen auch eine Erhöhung der Glykogenspeicherung und des Bindegewebsanteils, zusammen mit einer Verarmung an kontraktile Filamenten ein (Borgers et al. 1993; Vanoverschelde et al. 1993; Ausma et al. 1995a, Elsässer et al. 1997).

Es muß allerdings hierbei beachtet werden, dass es wahrscheinlich kein einheitliches morphologisches Bild des hibernating Myokards gibt, sondern dass – je nach Grad der Minderperfusion – alle Übergänge zwischen fast normaler Morphologie bis zum Fast-Infarkt möglich sind. Deshalb ist es auch nicht überraschend, dass in verschiedenen Regionen des hibernating Myokards apoptotische Veränderungen gefunden wurden. In einer Arbeit von Chen et al. (1997) konnten im Herzen von Schweinen mit einer experimentellen Stenose der LAD, keine apoptotischen Zellen in den normal durchbluteten Regionen nachgewiesen werden. Sie fanden dagegen heraus, dass der Prozentsatz der apoptotischen Zellen signifikant mit dem Ausmaß der myokardialen Dysfunktion korrelierte.

Die typischen Veränderungen der Kardiomyozyten die im länger andauernden hibernating Myokard auftreten, können auch als ein Charakteristikum des fetalen Herzens aufgefaßt werden. Dafür spricht nicht nur der Anstieg der Glykogenreserven, sondern auch die Expression verschiedenster Zellproteine, die sonst nur in fetalen Zellen gefunden werden konnten (Ausma et al. 1995a, b). Im Gegensatz zum adulten Herzen arbeitet das fetale Herz unter hypoxischen Bedingungen und gewinnt seine Energie durch den Metabolismus von Glukose (Lee et al. 2004, Joyner und Smoak 2004).



Die Vermutung liegt also nahe, dass es im hibernating Myokard zu einer Reaktivierung verschiedenster zellulärer Strategien kommt, die Ähnlichkeiten zu den in fetalen Herzen beobachteten Mechanismen aufweisen (Depre et al. 1999).

### **2.4. Detektion der Gewebevitalität**

Das Ziel moderner diagnostischer Verfahren ist es, die Reversibilität von linksventrikulären Funktionsstörungen („hibernating Myokard“) spezifisch zu erkennen. Die Bestimmung der Wandbewegung durch Methoden wie der Echokardiographie und Angiographie allein, erlaubt jedoch keine exakte Differenzierung zwischen bereits vernarbtem und noch vitalem Gewebe (Schwaiger et al. 1995). Aufgrund der Beobachtung, dass die Vitalität eines Gewebes einerseits vom Grad der Sauerstoffversorgung und andererseits durch den Metabolismus unterschiedlicher Substanzen zur Energiegewinnung bestimmt ist, kam es zur Entwicklung verschiedener radioaktiv markierter Tracern, die den myokardialen Stoffwechsel charakterisieren. Durch die Verwendung dieser Tracer in Kombination mit dem Positronen Emissions Tomographen (PET), kann die Gewebevitalität festgestellt werden (Leong-Poi und Freeman 1997).

#### **2.4.1. Die Positronen Emissions Tomographie (PET)**

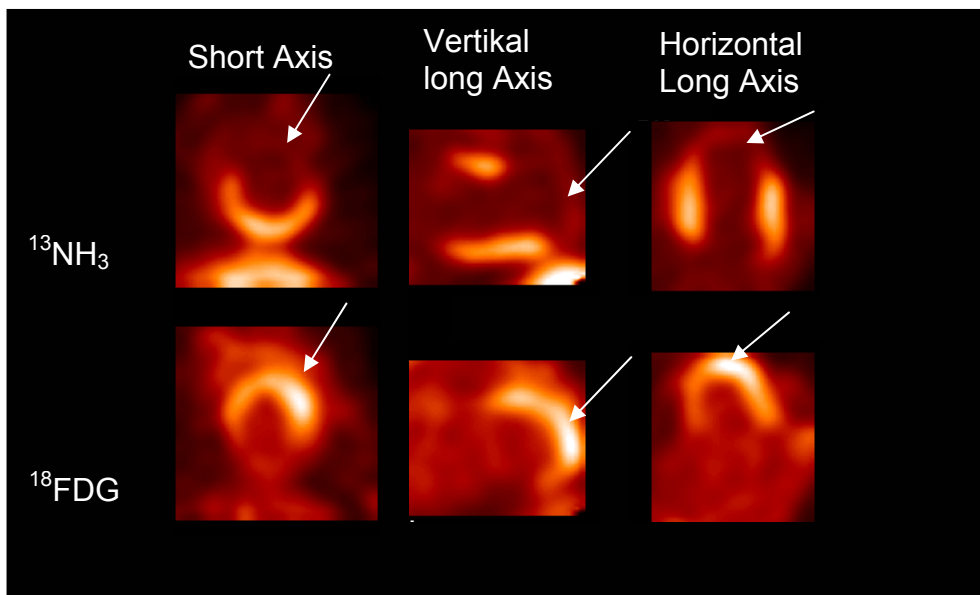
In der Nuklearmedizin werden physiologisch aktive Substanzen mit Radionukliden markiert. Nach der Inkorporation dieser sogenannten Tracer, können biologische Stoffwechselforgängen untersucht und pathologische Veränderungen erfaßt und therapiert werden.

Von besonderem Interesse sind diese Untersuchungsmethoden vor allem für die Diagnostik und Therapie koronarer Herzerkrankungen (KHE).

Wie schon erwähnt wurde, ist die Vitalität der Myozyten bei Störungen der myokardialen Durchblutung von der noch verbleibenden Möglichkeit der Energiegewinnung durch den Glukosemetabolismus abhängig. Diese Veränderungen macht man sich bei der nichtinvasiven Untersuchung mittels des PET zunutze. Für die Bestimmung der myokardialen Glukoseaufnahme wird Fluor 18-Deoxyglukose ( $^{18}\text{FDG}$ ) verwendet, der myokardiale Blutfluß wird mit Hilfe von Stickstoff-13-Ammoniak bestimmt ( $^{13}\text{NH}_3$ ). Durch die Detektion der Regionen mit

reduzierter Durchblutung, aber erhöhtem Glukoseumsatz (sogenannten „mismatch“ Regionen), kann bei einer eingeschränkten Herzfunktion das Ausmaß des noch vitalen Gewebes quantifiziert werden. Auf Basis dieser Ergebnisse können daraufhin prognostische Aussagen getroffen und therapeutische Maßnahmen, wie z.B. eine Revaskularisierung, eingeleitet werden (Schwaiger et al. 1995).

Das Grundprinzip der kardialen PET bildet die Markierung physiologisch aktiver Substrate mit Positronen emittierenden Radionukliden und die Erfassung von Querschnittsbildern der Radionuklidverteilung im Herzen nach Injektion der Marker (Wolpers und Schwaiger 1990).



**Abb. 1:** PET-Aufnahme eines „mismatch“ Patienten. Myokardiale Segmente mit reduzierter Perfusion zeigen eine gesteigerte Aufnahme von Glukose

$^{13}\text{NH}_3$ : Stickstoff-13-Ammoniak; myokardialer Perfusionstracer

$^{18}\text{FDG}$ : Fluor-18-Deoxyglukose; Marker zur Messung des myokardialen Glukosemetabolismus

### 2.4.1.1. Der myokardiale Blutflußtracer: Stickstoff-13 Ammoniak ( $^{13}\text{NH}_3$ )

Der zur Messung des myokardialen Blutflusses am häufigsten verwendete Tracer  $^{13}\text{NH}_3$ , befindet sich im Blut im Gleichgewicht mit  $^{13}\text{N}$ -Ammonium ( $\text{NH}_4$ ), wobei im physiologischen pH-Bereich etwa 95% des  $^{13}\text{N}$  in Form von  $^{13}\text{NH}_4$  vorliegt. Im Gegensatz zur Ammoniumform kann  $^{13}\text{NH}_3$  zu 100% durch die Membranen diffundieren und aus diesem Grund auch sehr schnell im extravaskulären Raum des Myokards detektiert werden.

Innerhalb der Kardiomyozyten dient  $^{13}\text{NH}_3$  über die Glutamin-Synthesereaktion, oder zu einem geringeren Teil auch über die Ketoglutarat-Glutaminsäure-Reaktion als Substrat zur Bildung von  $^{13}\text{N}$ -Glutamin, oder es diffundiert zurück in das Gefäßsystem des Herzens (Schelbert et al. 1981).

$^{13}\text{N}$ -Glutamin wird im Herzen mit einer biologischen Halbwertszeit (HWZ) von mehr als 180 min nur sehr langsam metabolisiert, was die physiologische HWZ von  $^{13}\text{NH}_3$  mit 10 min deutlich überschreitet. Die  $^{13}\text{N}$  Aktivität nimmt demnach im vaskulären Raum sehr schnell ab, während sie im myokardialen Gewebe länger nachzuweisen ist (Schelbert et al. 1981; Krivokapich et al. 1989). Aufgrund dieses unterschiedlichen Verteilungsmusters des Tracers innerhalb des Gefäßsystems und des myokardialen Gewebes, sowie der Rate der myokardialen Transformation von  $^{13}\text{NH}_3$  zu  $^{13}\text{N}$ -Glutamin kann der myokardiale Blutfluß indirekt berechnet werden.

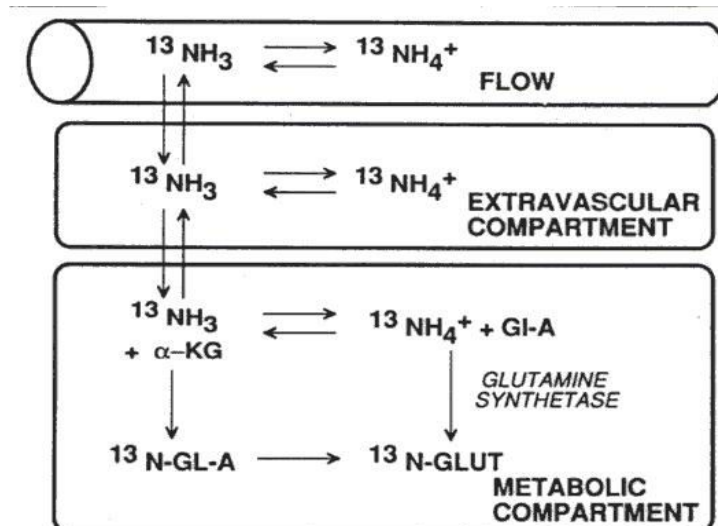


Abb. 2: Drei- Kompartimenten- Modell der Verstoffwechslung von  $^{13}\text{NH}_3$  (nach Schelbert 1981)

GI-A = Glutaminsäure, Glut = Glutamin,  $\alpha$ - KG =  $\alpha$ - Ketoglutarat, Flow = intravasal, extravasc. compartment= extravaskuläres Kompartiment, metabolic compartment = intrazelluläres Kompartiment

### 2.4.1.2. Das Glukoseanalog: Fluor 18-Deoxyglukose ( $^{18}\text{FDG}$ )

Um den myokardialen Glukosemetabolismus mit Hilfe des PETs zeigen zu können, wird das radioaktive Glukoseanalog  $^{18}\text{FDG}$  verwendet.

Das Grundprinzip dieser Untersuchung ist dabei, dass  $^{18}\text{FDG}$  wie die Glukose mit Hilfe der Glukosetransporter durch die Plasmamembran in die Zelle aufgenommen wird. Die anschließende Phosphorylierung durch das Enzym Hexokinase findet ebenfalls analog zur Glukose ab. Das  $^{18}\text{FDG}$ -6-Phosphat kann daraufhin allerdings nicht mehr weiter metabolisiert werden, da es kein Substrat mehr für die nachfolgenden Enzyme darstellt. Es bleibt im wesentlichen in den Kardiomyozyten gespeichert und wird nur sehr langsam durch die Glukose-6-Phosphatase dephosphoryliert und aus der Zelle ausgeschleust.

Das Signal, das im PET aus der Zelle empfangen wird, verhält sich demnach proportional zur Glukoseaufnahme (Huang et al. 1987; Phelps et al. 1979).

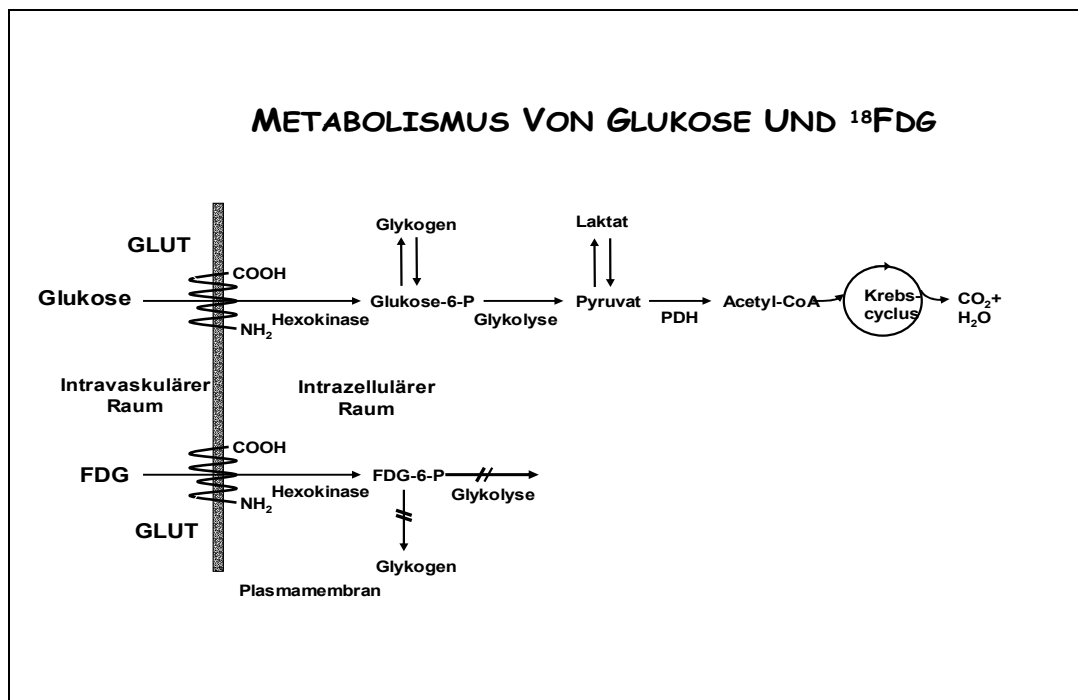


Abb. 3: Metabolismus von Glukose und dem Glukoseanalog  $^{18}\text{FDG}$  (Egert 2003)

GLUT = Glukosetransporter/ PDH = Pyruvatdehydrogenase/ P = Phosphat

Bei der kardialen PET Untersuchung mit  $^{18}\text{F}$ FDG, steht der Vitalitätsnachweis des Gewebes im Vordergrund. Diese Methode gilt momentan als „golden standard“ zum Nachweis von Narben bzw. Restvitalität (Schicha und Voth 2000).

Heutzutage werden die  $^{18}\text{F}$ FDG PET Untersuchungen überwiegend unter Insulinstimulation durchgeführt. Insulin führt zu einer Steigerung des Glukosestoffwechsels bzw. der  $^{18}\text{F}$ FDG-Anreicherung im Myokard. Während bei niedrigem Insulinspiegel bevorzugt ischämisches Myokard  $^{18}\text{F}$ FDG speichert, kommt es unter Insulinstimulation zur Darstellung des gesamten vitalen Myokards, was die Lokalisation pathologischer Befunde erleichtert (Schicha und Voth 1994).

Die genauen Mechanismen der regionalen Stoffwechseleränderung im chronisch, ischämischen Myokard sind noch nicht geklärt, doch wird dem Transport der Glukose durch die Plasmamembran mittels der Glukosetransporter eine besondere Rolle zugesprochen.

### **2.5. Expression der Glukosetransporter im Herzen**

Der Glukosetransport in die Zellen erfolgt entlang eines Konzentrationsgradienten mit Hilfe von Glukosetransportproteinen (GLUTs). Dieser passive Transport durch die Plasmamembran der Zelle ist nach heutigem Wissensstand der limitierende Schritt im Glukosemetabolismus (Kashiwaya et al. 1994; Charron et al. 1999).

Derzeit sind 13 unterschiedliche Isoformen der Glukosetransporter bekannt, die in den verschiedenen Geweben des Körpers unterschiedlich exprimiert werden (Mueckler 1994; Doege et al. 2000, 2001; Ibberson et al. 2000; Rogers et al. 2002; Macheda et al. 2003, Wood und Trayhurn 2003).

Die dominierenden Isoformen im adulten Herzen sind dabei GLUT1 und GLUT4. Es wurden aber auch noch weitere Isoformen in myokardialen Zellen nachgewiesen. Die Expression von GLUT3 konnte in 10 Wochen alten humanen, fetalen Kardiomyozyten gezeigt werden. Nach 15 Wochen nahm der Gehalt dieser Isoform jedoch ab, bis sie schließlich durch Western-Blot Experimente kaum mehr nachzuweisen war (Grover-McKay et al. 1999). Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass GLUT3 vor allem eine wichtige Rolle während der Entwicklung des Herzen spielt.

Von den erst kürzlich entdeckten GLUTs zeigt GLUT12 eine 29% Übereinstimmung mit dem wichtigsten kardialen Glukosetransporter GLUT4. Beide sind vor allem in Insulin-sensiblen Geweben wie dem Fettgewebe und der Muskulatur vorhanden (Rogers et al. 2002).

GLUT11 wird ebenfalls im Herzen, wie auch in der Skelettmuskulatur exprimiert. Dieses Transportprotein zeigt weitgehend Ähnlichkeiten zu GLUT5, einem Fruktosetransporter. Eine wichtige Erkenntnis bei der Untersuchung von GLUT11 ist, dass die Möglichkeit des Glukosetransports durch den Anstieg des Fruktosegehalts deutlich verringert ist (Doege et al. 2001). Das führt zur Annahme, dass das Protein sowohl als duales Transportsystem für Glukose, als auch für Fruktose im Herzen dient.

GLUT8 wird ebenfalls, wenn auch nur im geringen Ausmaß im Herzen exprimiert. Dieser Transporter ist zu 29,4% identisch mit der Struktur des Prototyps aller GLUTs, dem GLUT1 (Doege et al. 2000).

### 2.5.1 GLUT1

Die molekularbiologische Ära der Glukosetransportforschung begann Ende der 70er Jahre des letzten Jahrhunderts mit der Isolation von GLUT1 aus den Membranen humaner Erythrozyten. Nach und nach konnte das Transportprotein in fast allen Geweben des Körpers nachgewiesen werden und es zeigte sich, dass GLUT1 primär für die basale Aufnahme der Glukose in die Zelle zuständig ist (Mueckler 1994).

Die Analyse der Aminosäuresequenz des humanen Transporters ergibt eine 97 – 98% Übereinstimmung mit den GLUT1 von Ratte, Maus, Kaninchen und Schwein, was dafür spricht, dass das Protein im Laufe der Evolution im hohen Maße stabil geblieben ist (Mueckler 1994).

Eine Untersuchung von Kraegen (1993) zeigt, dass GLUT1, in den Kardiomyozyten im Gegensatz zur Skelettmuskulatur in relativ großem Maßstab exprimiert wird. Ein weiterer Unterschied ist die Lokalisation des Proteins in diesen beiden Geweben. Während GLUT1 in der Skelettmuskulatur außerhalb der

Myozyten nahe den Nervenfasern lokalisiert ist, ist es im Herz innerhalb der Zellen zu finden. Dort ist das Protein primär auf der Plasmamembran lokalisiert, allerdings ist ein kleiner Teil des GLUT1 auch in intrazellulären Vesikeln gespeichert. Unter dem Einfluß von Insulin, aber auch bei Ischämie wird GLUT1 aus diesen Speichern freigesetzt und auf die Zelloberfläche geschleust (Fischer et al. 1997; Young et al. 1997; Egert et al. 1999b).

Eine interessante Beobachtung ist, dass die Expression von GLUT1 in bestimmten Situationen, wie z.B. bei einer chronischen Ischämie, aber auch bei einer Hypertrophie des Herzens, gesteigert wird (Brosius et al. 1997a; Montessuit und Thorburn 1999). Wie eine Studie von Brosius am Tiermodell zeigen konnte, beschränkte sich der Anstieg des GLUT1 Gehaltes nicht nur auf die ischämischen Regionen, sondern wurde auch in den konstant durchbluteten Arealen festgestellt. In transgenen Mäusen, die eine Herz-spezifische Überexpression von GLUT1 aufweisen, konnte durch die vermehrte Aufnahme von Glukose und verstärkter Glykolyse ein Schutz vor Herzversagen nach experimentell erzeugter Hypertrophie nachgewiesen werden (Liao et al. 2002).

Eine in vitro Studie an kultivierten Kardiomyozyten zeigt, dass es durch die verstärkte Expression von GLUT1 unter hypoxischen Bedingungen zu einer Verringerung apoptotischer Zellvorgängen kommt (Malhotra et al. 2002).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass GLUT1 eine wichtige Rolle als „stress-induziertes Protein“ einnimmt und eine Überexpression als wichtige Schutzfunktion des Herzens anzusehen ist.

### **2.5.2. GLUT3**

GLUT3 ist der dominierende GLUT in den Zellen des adulten Gehirnparenchyms (Mueckler 1994). Neben dem Gehirn konnte das Protein aber auch in hoher Expression in den Hoden, sowie den Spermien gefunden werden.

Die Forschungsgruppe von Haber (1993) konnte allerdings keinen Nachweis des GLUT3 Proteins im adulten, humanen Fett-, Muskel-, und Herzgewebe erbringen. Genausowenig konnten sie den Transporter in den inneren Organen nachweisen.

Da die niedrige Michaelis-Menten Konstante ( $K_M$ ) für Glukose sehr charakteristisch für diese Isoform ist, kann davon ausgegangen werden, dass GLUT3 den Transport der Glukose bei niedrigeren Substratkonzentrationen effizienter durchführt als andere GLUTs. Im Gehirn ist GLUT3 primär in der grauen Gehirnschicht exprimiert, einer Region mit besonders hoher metabolischer Aktivität. Gould und Holman (1993) vermuteten, dass GLUT3 v.a. bei einer Hypoglykämie oder bei verstärktem Glukosestoffwechsel eine Rolle spielt. Sie zeigten auch, dass die GLUT3 mRNA in den unterschiedlichen Geweben des Körpers, im Gegensatz zum Protein, durchaus nachweisbar war.

Dieser Unterschied zwischen den Ergebnissen auf Protein und mRNA Ebene, führten zur Annahme, dass sich für diese Isoform der GLUTs eine verstärkte posttranskriptionale Regulation ergibt. Durch verbesserte Detektionsmethoden konnte GLUT3 schließlich auch in humanem Herzmuskel nachgewiesen werden. Welche Rolle der Transporter dabei im adulten Herzen einnimmt ist nach wie vor fraglich. Im fetalen Myokard dagegen scheint GLUT3 vor allem eine wichtige Rolle während der Herzentwicklung zu spielen (Grover-McKay et al. 1999).

### **2.5.3. GLUT4**

GLUT4 kommt im Körper in Fett- und Muskelzellen, den sogenannten „Insulin sensiblen“ Geweben vor.

Während GLUT1 im fetalen Herzen eine dominierende Rolle im Glukosetransport einnimmt (Heilig et al. 2003; Joyner und Smoak 2004), ist GLUT4 im postnatalen und adulten Herzen die am stärksten exprimierte Isoform (Studelska et al. 1992). Verursacht wird dieser Anstieg des GLUT4 Gehaltes vom fetalen zum neonatalen Herzen hauptsächlich durch Änderungen auf der Ebene der Gentranskription (Abel 2004).

Unter basalen Umständen ist GLUT4 primär in intrazellulären Vesikeln gespeichert (Sun et al. 1994). Von dort kann der Transporter allerdings unter dem Einfluß verschiedenster Stimuli sehr schnell auf die Plasmamembran transloziert werden.



Unter physiologischen Bedingungen ist dieses Phänomen primär bei einem Anstieg der Insulinkonzentration (Slot et al. 1991), aber auch bei einer verstärkten Kontraktion des Herzens (Douen et al. 1990) zu beobachten.

Die schnelle Rekrutierung von GLUT4 konnte ebenfalls in energetischen Stresssituationen, wie einer akuten Ischämie (Sun et al. 1994; Brosius 1997b) oder Hypoxie (Cartee et al. 1991) nachgewiesen werden.

Die molekularen Grundlagen der Translokation sind trotz intensiver Forschung noch immer nicht vollständig geklärt. Am besten untersucht ist nach wie vor der Signalmechanismus, der durch den Einfluß von Insulin aktiviert wird:

Nachdem das Insulin an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche gebunden wurde, kommt es zur Phosphorylierung der rezeptorspezifischen Tyrosinkinase. Diese wiederum führt zur Phosphorylierung verschiedenster intrazellulärer Substrate wie dem Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS-1), welches sich anschließend an die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) bindet. Die Assoziation dieser beider Enzyme führt zur Phosphorylierung von Phosphatidylinositol (PI) und seiner Derivate (Lam et al. 1994; Okada et al. 1994). PI bindet letztlich an weitere Proteinkinasen (PK) von denen die PKB und PKC die wichtigsten Enzyme für die folgende Translokation von GLUT4 darstellen (Hue et al. 2002).

Im Gegensatz zur Insulin aktivierten Signalwirkung, ist bisher nur sehr wenig über die durch Ischämie induzierte Wirkungskaskade bekannt. Egert et al. (1997) konnten in einer Studie am isolierten Rattenherzen eine Beteiligung der PI3K ausschließen. Durch die Blockade des Enzyms mit Hilfe von Wortmannin, einem mykotischen Stoffwechselprodukt, konnte die Translokation nach Insulinstimulation verhindert werden. Auf die GLUT1 und GLUT4 Translokation nach einer kurzzeitigen Ischämie hatte sie jedoch keinen Einfluß.

Ein weiteres wichtiges Regulationsenzym der GLUT4 Translokation scheint die Adenosinmonophosphat-aktivierte-Proteinkinase (AMPK) zu sein. Unter hypoxischen Umständen und nach Stimulation des Enzyms wurde GLUT4 vermehrt transloziert und die Glukoseaufnahme in die Zelle erhöht (Russell et al. 1999). Diese Beobachtungen konnten an einem transgenen Mausmodell weitgehend bestätigt werden. Die Tiere zeigten durch die Inaktivierung der AMPK eine geringere Toleranz bezüglich ischämischer Phasen, was unter anderem

wahrscheinlich auf die verringerte Translokation der GLUT4 auf die Plasmamembran zurückzuführen ist (Xing et al. 2003).

Wie die Signalkaskade zur Aktivierung der AMPK verläuft ist nach wie vor unklar. Eine Blockade der PI3K blieb ohne Ergebnis, was eine Beteiligung dieses Enzym ausschließen läßt. Abel (2004) vermutet, dass der hauptsächliche Stimulus im Anstieg des AMP/ATP Verhältnis zu suchen ist. Die Arbeitsgruppe von Li (2004) vertritt dagegen die Meinung, dass der Aktivierung des Stickstoffoxidwegs eine wichtige Rolle zuzusprechen ist.

Weitere wichtige Proteine die die Translokation der GLUT in zellulären Streßsituationen steigern können, sind die Katecholamine.

Versuche an ischämischen (no-flow) Rattenherzen zeigten, dass dabei primär die Stimulation der  $\alpha$ -Rezeptoren auf der Zelloberfläche eine Rolle spielt. Der Einsatz des  $\alpha$ -Antagonisten Phentolamin konnte einerseits die Translokation von GLUT4, aber auch GLUT1 vollständig verhindern, andererseits verringerte sich auch die Glukoseaufnahme in die Zelle. Eine Blockade der  $\beta$ -Adrenozeptoren durch den Antagonisten Propranolol konnte diese Effekte nicht bestätigen (Egert et al. 1999a).

Welcher dieser Mediatoren nun tatsächlich eine dominante Rolle im Translokationsmechanismus der GLUTs während einer ischämischen Phase einnimmt, ist noch immer fraglich.

Zum besseren Verständnis der molekularen Grundlagen der Glukoseaufnahme in die Zelle wurden spezielle GLUT4 defiziente Mäuse gezüchtet. Tian und Abel (2001) verwendeten bei ihren Untersuchungen Tiere, die eine herzspezifische Aplation des GLUT4 Gens aufwiesen (G4H<sup>-/-</sup>), während Katz et al. (1995) Mäuse generierten, die ein systemisches Fehlen von GLUT4 zeigten (G4<sup>-/-</sup>).

Neben einer Reihe pathophysiologischer Adaptionen, zeigen beide Stämme eine Hypertrophie des Herzens und Veränderungen im myokardialen Metabolismus. Der Gehalt an Kreatin und Kreatinphosphat ist in den Herzen im Vergleich zu Wildtypmäusen (WT) erhöht (Weiss 2002). In weiteren Studien an G4<sup>-/-</sup> Mäusen konnte nach Insulinapplikation eine Steigerung der Glukoseaufnahme beobachtet werden, die aber im Vergleich zu Kontrollmäusen zeitlich versetzt verlief.

Während im WT schon kurz nach der Insulinapplikation die Aufnahme des Glukoseanaloges <sup>18</sup>FDG um das 3,5-fache gesteigert war, konnte diese Erhöhung

erst nach 60-minütiger Stimulation in den knockout Mäusen beobachtet werden (Simoes et al. 2004). Durch die molekularbiologische Untersuchung dieser Herzen konnte eine besondere Beteiligung des zweiten wichtigen GLUT im Herzen, dem GLUT1, nachgewiesen werden.

Der Gehalt an GLUT1 in den Membranen der G4<sup>-/-</sup> Mäuse war im Vergleich zu den WT im basalen Zustand 1,7-fach gesteigert. Nach zweistündiger Glukose/Insulin Stimulation erhöhte sich der Wert auf der Plasmamembran, wobei das Ausmaß der Translokation vergleichbar zu der im WT beobachteten war. Diese Ergebnisse zeigen, dass GLUT1 vermutlich eine sehr wichtige, kompensatorische Funktion beim Fehlen des GLUT4 Gens übernimmt (Egert et al. 2005).

### 2.6. Hexokinase II

Der myokardiale Glukosemetabolismus wird nicht nur von dem Transport der Glukose in die Zelle bestimmt, sondern ebenfalls von den darauf folgenden enzymatischen Abbauschritten kontrolliert.

Nachdem die Glukose in die Kardiomyozyten aufgenommen wurde, wird sie durch das Enzym Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat (G6P) phosphoryliert.

Im Herzen existieren dafür zwei unterschiedliche Isoformen der Hexokinase mit einem Molekulargewicht von 100 kD:

Die Hexokinase I ist primär im fetalen und neonatalen Herzen zu finden, während die Hexokinase II die dominierende Isoform im adulten Myokard darstellt (Printz et al. 1993). Innerhalb der Zelle ist das Enzym im Zytosol lokalisiert, es kann aber auch an die äußere Membran der Mitochondrien gebunden sein. Durch die Membranbindung verringert sich die  $K_M$  für Glukose und die Aktivität der Hexokinase wird gesteigert. Durch die Anbindung kommt es außerdem zu einer Suppression der inhibitorischen Wirkung von G6P auf das Enzym (Russel et al. 1992).

Inwieweit der myokardiale Glukosestoffwechsel unter ischämischen Bedingungen von diesem ersten Schritt der Glykolyse abhängt, ist noch nicht geklärt. In Tierversuchen konnte nach repetitiver Kurzzeitschämie (10 min) eine Aktivitätssteigerung der Hexokinase nachgewiesen werden, was eine besondere Beteiligung des Enzyms im Glukosemetabolismus unter diesen Bedingungen vermuten läßt (McFalls et al. 2002). In einer anderen Studie zeigte sich, dass sich die Expression der Hexokinase nach einer 40 minütigen Ischämie, hervorgerufen durch eine 60% Perfusionsreduktion der LAD, geringfügig aber doch signifikant erhöhte. In derselben Studie konnte jedoch nach einer Reperfusionphase kein Anstieg des Enzymgehalts mehr festgestellt werden (Feldhaus und Liedtke, 1998). Welche Änderung der Enzymexpression sich auf Basis einer chronischen, mehrwöchigen myokardialen Minderperfusion ergibt, ist nach wie vor unbekannt.

### **3. Material und Methoden**

#### **3.1. Material**

##### **3.1.1. Chemikalien**

<b>Chemikalien</b>	<b>Bestellnummer</b>	<b>Firma</b>
1st Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR (AMV)	1 483188	Roche
Acrylamid: Bisacrylamid 40% (w/v) 29:1 (AccuGel)	900150	Biozym
Antifoam A	A5758	Sigma
Albumin Standardlösung (2 mg/ml)	UP 36859A	Uptima
APS (Ammonium Persulfat)	A9164	Sigma
BCA Protein Assay Reagent A & B	UP 95424A/UP 95425A	Uptima
Bromphenolblau	8122	Merck
Calciumchlorid	1.02382.0500	Merck
Chloroform	C2432	Sigma
Collagenase Type CLS II	C2-22	Biochrom
DEPC (Diethylpyrocarbonate)	D5758	Sigma
EDTA (Ethylendiamintetraessigsr.)		Sigma
EGTA (Ethylenglycoltetraessigsr.)	E0369	Sigma
Ethanol, molecular biology grand	331542	Calbiochem
Glycerol	G5516	Sigma
Glycine	G8898	Sigma
Hepes	H3375	Sigma
Hybridisations Probes		TibMolbiol
Igepal Ca-630	198596	ICN
Isopropanol	1.08544.0250	Merck

Kaliumchlorid	4936.1000	Merck
LightCycler FastStart DNA Master Hybridisations Probes	2 239272	Roche
Magermilchpulver		Altromin
$\beta$ -Mercaptoethanol	M7154	Sigma
Methanol	106018	Merck
Natriumacid	S2002	Sigma
Natriumchlorid	1.06404.1000	Merck
NaOH 0.1 N	109141.1000	Merck
PBS Dulbecco w/o	L1825	Biochrom
Ponceau S	P3504	Sigma
Primer		TibMolbiol
Rainbow coloured protein molecular weight marker	RPN 800	Amersham
RNase freies Wasser	0032 006.205	Eppendorf
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	161-0302	Biorad
Sulfosalicylsäure	S2130	Sigma
Temed (Tetramethylethyldiamin)	T7024	Sigma
TRI Reagent	T9424	Sigma
Trichloressigsäure zur Analyse	1.00807.0250	Merck
Triton X-100	17-1315-01	Pharmacia Biotech
Trizma Base (Tris)	T1503	Sigma
Tween 20 (Polyoxyethylensorbitan Monolaurate)	P1379	Sigma

**3.1.2. Verbrauchsmaterialien**

LightCycler Glass Capillaries	1 909339	Roche
Nitrocellulose Membran	439396	Schleicher& Schuell
Uvette (Cuvette) 220 – 1600 nm	0030 106.300	Eppendorf
Whatmanpapier	10426994	Schleicher& Schuell

**3.1.3. Antikörper**

<sup>125</sup> J-Donkey-Anti-Rabbit IgG (100 µCi/ml)	IM134	Amersham
Anti-GLUT1 (gegen Mensch, Maus und Ratte); Polyklonaler Antikörper gegen die terminale Carboxylgruppe gerichtet)	RaGlut1	Diagnostic International
Anti-GLUT4 (gegen Ratte); Antiserum aus Kaninchen gegen die terminale Carboxylgruppe gerichtet		Maureen Charron Albert Einstein College, NY, USA
Anti-HK-II (gegen Ratte); Polyklonaler Antikörper	AB 1629	Chemicon

3.1.4. Primer und Hybridisationsproben

Tabelle 1: Primer

	Sequenz	Länge	Genbank Nr.
GLUT1	3'Primer: ATA CTg gAA gCA CAT gCC C 5'Primer:TCC ACA AgC ATC TTC gAg AA	393 bp	X17058
GLUT3	3'Primer:TTg gAg gAT CTC CTT AgC ATT CTC 5'Primer: CCg ATT gAT TAT Tgg CCT CT	314 bp	AF054836
GLUT4	3'Primer:TTC TTC CTT CCC AgC CAC TgA 5'Primer:CTT CCA ACA gAT Agg CTC CgA A	319 bp	AF 141956

Tabelle 2: Hybridisations Proben

GLUT1	FL-Label	5'- gCC ggA gCC gAT ggT ggC ATA C X
	LC-Label	5'- LC Red640-CAg gCT gCT gCT gCA CCC CCg CCT T p
GLUT3	FL-Label	5'- ATT CCA gCT gTC CTg CAg TgT gCC X
	LC-Label	5'- LC Red640- CCC TTC CCT TTT gCC CTg AAA gTC C p
GLUT4	FL-Label	5'- ACC ACC CTC Tgg gCT CTC TCC gT X
	LC-Label	5'- LC Red640-CCA TCT TCT CTg Tgg gTg gCA TgT p



<b>3.1.5. Geräte</b>	<b>Firma</b>
BioPhotometer	Eppendorf
Elektrophorese Apparatur Protean II xi	BIO-RAD
Glas - Glas Homogenisierer	Braun-Melsungen
Kühlgerät Multi Temp II	Pharmacia
LightCycler	Roche
PET Scanner ECAT Exact	Siemens
Power Supply Model 1000/500 Power Supply Model 200/2.0	BIO-RAD
Power Supply Multidrive XL	Amersham
Phosphorimager 445 SI Phosphorscreen GP, ImageEreaser	Molecular Dynamics
Sonicator UP 200S	Dr. Hielscher
T25 Ultra-Turrax	IKA-Labortechnik
Thermomixer Comfort	Eppendorf
Trans-Blot Cell System	BIO-RAD
Ultrazentrifuge L8-70M; Rotor TI 70.1	Beckmann Instruments
Uvicon Spectrophotometer 931	Kontron Instruments
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus

**3.1.6. PET-Tracer**

**Tabelle 3: verwendete PET-Tracer**

Tracer	Halbwertszeit (HWZ)	Anwendung
<sup>13</sup> N-Ammonik	10,0 min	Myokardiale Durchblutung
<sup>18</sup> F-Deoxyglukose ( <sup>18</sup> FDG)	110,0 min	Glukosemetabolismus

**3.1.7. Puffer, Lösungen und Gele**

Aufbewahrungspuffer	238,3 mg	Hepes	
	14,6 mg	EDTA	
	19,0 mg	EGTA	
	16,3 mg	Natriumacid	
	250,0 µl	Triton X-100 (0,5%)	
ad	50,0 ml	H <sub>2</sub> O bidest	
Blocking Puffer	25,0 g	Magermilchpulver	
	25,0 ml	1,0 M Tris-HCl, pH 8,0	
	2,0 ml	Tween 20	
	1,0 ml	1,0 M CaCl <sub>2</sub>	
	100,0 µl	Antifoam A	
	ad	500,0 ml	TBS
Blotting Puffer	8,4 g	Trizma Base	
	40,3 g	Glycine	
	0,7 l	Methanol	
	ad	3,5 l	H <sub>2</sub> O bidest
DEPC - Wasser	1,0 ml	DEPC	
	1000,0 ml	H <sub>2</sub> O bidest	
Homogenisationspuffer pH: 7,5	1191,5 mg	Hepes	
	73,0 mg	EDTA	
	95,0 mg	EGTA	
	81,3 mg	Natriumacid	
	2516,4 mg	Kaliumchlorid	
	ad	250,0 ml	H <sub>2</sub> O bidest

## Material und Methoden

Laufpuffer	6,0 g	Trizma Base
	28,8 g	Glycine
	20,0 ml	10% SDS
	ad 2000,0 ml	H <sub>2</sub> O bidest
PBS, pH: 7,3	8000,0 ml	NaCl
	200,0 ml	KCl
	1150,0 ml	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	200,0 ml	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Ponceau S Färbelösung	10,0 g	Ponceau S
	150,0 g	Trichloressigsäure
	150,0 g	Sulfosalicylsäure
	ad 500,0 ml	H <sub>2</sub> O bidest
Probenpuffer	6,25 ml	2 M Tris, pH 6,8
	40,0 ml	10% SDS
	20,0 ml	100% Glycerol
	ad 100,0 ml	H <sub>2</sub> O bidest + + wenig Bromphenolblau
Sammelgel 4% (2 Gele)	9,45 ml	H <sub>2</sub> O bidest
	1,5 ml	Acrylamid 29:1
	3,75 ml	0,5 M Tris, pH: 6,8
	150 µl	SDS 10%
	150 µl	APS 10%
	15 µl	Temed
TBS („tris buffered saline“), pH: 7,5	40,0 ml	1,0 M Tris, pH: 7,5
	100,0 ml	3,0 M NaCl
	2,0 ml	Igepal CA
	ad 2,0 l	H <sub>2</sub> O bidest
Trenngel 10% (2 Gele)	43,1 ml	H <sub>2</sub> O bidest
	22,5 ml	1,5 M Tris-HCl, pH: 8,8
	22,5 ml	Acrylamid 29:1
	900 µl	SDS 10%
	90 µl	Temed
	900 µl	APS 10%

## **3.2. Methoden**

### **3.2.1. Nicht - ischämische Herzen („Normalherzen“)**

Zur Erlernung der Methodik wurden insgesamt 3 Schweineherzen aus dem Münchner Schlachthaus geholt. Die Herzen wurden nach dem Tod der Tiere sofort entnommen und anschließend mit eiskaltem PBS gewaschen und gekühlt. Sie wurden nach einem definierten Schema in ca. 1,5 cm dicke Scheiben geschnitten und vom Apex (=1) zur Basis (=6) durchnummeriert. Um sich auch weiterhin orientieren zu können, wurde jeweils die Facies auricularis der einzelnen Scheiben mit einer Kanüle markiert. Schließlich wurden die Scheiben in Petrischalen verpackt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bis zur weiteren Analyse bei -70°C.

### **3.2.2. Ischämische Herzen**

#### **3.2.2.1. Versuchstiere**

Genehmigt wurde der Versuch von der Regierung von Oberbayern unter dem Aktenzeichen 211-2531-26/2001.

Für die Entwicklung einer chronischen, myokardialen Ischämie wurden klinisch gesunde weibliche Schweine der dt. Landrasse verwendet. Die Tiere waren ca. 14 Wochen alt und wogen durchschnittlich 35 kg. Sie wurden 3 Tage vor Versuchsbeginn in die Abteilung für experimentelle Onkologie und Therapieforschung des Klinikums rechts der Isar gebracht. Von diesem Zeitpunkt an erfolgte täglich eine tierärztliche Untersuchung. Des Weiteren wurden die Tiere mit 300 mg Clopidogrel und 100 mg Acetylsalicylsäure p.o. vortheraipiert, um das Koagulationsrisiko zu minimieren und die Thrombosebildung an der Stelle des Stents zu vermeiden.

#### **3.2.2.2. Anästhesie**

Die Schweine wurden durch eine i.m. Injektion von 0,5 mg/Tier Atropinsulfat, 2 mg/kg KG Azaperon und 10 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid sediert.

Nach ausreichender Sedation konnte die Narkose durch die Injektion von Narcobarbital (10 mg/kg Körpergewicht (KG)) über einen Venenverweilkatheter an der Ohrvene eingeleitet werden. Um einen ausreichend hohen Antibiotikaspiegel zu erzielen, wurde den Tieren Cephalosporine i.v. verabreicht. Danach wurden sie intubiert und mit einem Gemisch aus Isofluran, Lachgas und Sauerstoff beatmet. Außerdem wurde zusätzlich 6-12 mg/kg KG/h Propofol i.v. durch einen Perfusor appliziert. Präoperativ wurde 0,025 mg/kg KG Fentanyl Dihydrogencitrat zur Analgesie verabreicht. Flüssigkeitsverluste während der Operation wurden durch Ringerlösung in einer Dosierung von 10 ml/kg KG/h i.v. im Dauertropf ausgeglichen.

Sauerstoffsättigung, Körpertemperatur, Pulsfrequenz und EKG wurden während des gesamten chirurgischen Eingriffs überprüft.

### 3.2.2.3. Stent

#### Präparation

Um in den Schweineherzen chronisch-ischämische Regionen zu generieren, wurde ein Modell des Institutes für Kardiologie, Großhadern verwendet (von Degenfeld et al. 2000). Die dabei verwendeten Stents sollten anders als ihrer ursprünglichen Funktion nach, zu einer Verengung des Gefäßlumens führen. Hierfür wurden kommerziell erhältliche Stents (Jostent<sup>®</sup> Coronary Stent) verwendet. Der Stent wurde auf eine 1,7 mm Kanüle gesteckt, um einen definierten inneren Durchmesser zu fixieren. Um den mittleren Anteil wurde daraufhin ein Faden doppelt gebunden und geknotet. Mit dieser Ligatur sollte eine Teilstenose im Stent erreicht werden. Anschließend wurde dieser auf einen Ballon (20 mm lang, 3,0 mm Durchmesser) aufgebracht, der mit 0,5 bar leicht geblockt war um ein Abrutschen des vorpräparierten Stents zu vermeiden. Somit wurde ein initialer Stenosegrad von 75% angestrebt.



**Abb. 4: Modifizierter Stent,  
mit aufgeblasenem Ballon**

### **Katheterisierung und Implantation**

Als Antikoagulans wurden 20.000 IE Heparin und 500 mg Acetylsalicylsäure i.v. appliziert. Daraufhin wurde eine Angiographie der Koronararterien durchgeführt, um den ursprünglichen Gefäßstatus zu überprüfen und zu dokumentieren.

Der modifizierte Stent wurde anschließend distal der ersten Verzweigung der linken Koronararterie (im Weiteren LAD genannt) positioniert und durch das vorsichtige Aufblasen des Ballons fixiert. Schließlich wurde die Lage und Ausdehnung des Stents wiederum angeographisch ermittelt und dokumentiert.

#### **3.2.2.4. Postoperative Versorgung**

Während der Aufwachphase erhielten die Tiere zur Schmerzlinderung langsam 20 bis 50 mg/kg KG Metamizol i.v. Am ersten bis zum dritten Tag 4 mg/kg KG Carprofen p.o. Die antikoagulatorische Therapie wurde mit der s.c. Applikation von 5000 IE Heparin fortgeführt. Einen Tag nach dem chirurgischen Eingriff erhielten die Tiere täglich über einen Zeitraum von 21 Tagen 75 mg Clopidogrel und 100 mg Acetylsalicylsäure oral verabreicht. Des Weiteren wurden die Tiere täglich tierärztlich untersucht.

#### **3.2.2.5. Untersuchungen am 7. Tag**

Eine Woche nach der Stentimplantation wurden die Tiere erneut narkotisiert (siehe 3.2.2.2.). Es wurden arterielle Blutproben entnommen, die auf den Gehalt an Glukose, Insulin, Laktat und den freien Fettsäuren überprüft wurden.

Zur Überprüfung der Wandbewegung und zum Nachweis der Vitalität des Myokards wurden Magnetresonanztomographische (MRT) Aufnahmen durchgeführt.

##### **A) Wandbewegung**

Es wurden fortlaufende Kurzachsenschnitte vom Apex bis zur Herzbasis angefertigt, um den linken Ventrikel lückenlos erfassen zu können.

Die Beurteilung erfolgt qualitativ visuell mit Hilfe einer 5-Punkte-Skala.

Normokinesie (1+); geringgradige (2+), schwere (3+) Hypokinesie

Akinesie (4+); Dyskinesie (5+)

### B) Vitalität

Die Myokardvitalität wurde ca. 20 min nach der i.v. Injektion eines paramagnetischen Kontrastmittels (Gadolinium-diethylen-triamine-Pentansäure) visuell beurteilt. Dabei zeigte vernarbtes Gewebe einen stärkeren Kontrast und einen stärker verzögerten „wash-out“, als nicht geschädigtes, normal durchblutetes Gewebe.

### 3.2.2.6. Untersuchungen am 28. Tag

Da die abschließenden Untersuchungen einige Zeit benötigten, wurde den Tieren unter Narkose ein Blasenkatheter gelegt, um unkontrolliertes Urinieren zu verhindern. Daraufhin wurde eine sonographische Herzuntersuchung durchgeführt, um die Hypokinesie der anterioren Wand festzustellen. Durch eine abschließende koronare Angiographie wurde das Ausmaß der LAD-Stenose und der sich entwickelten Kollateralgefäße festgestellt.

Der Hauptteil der Untersuchungen machten die dynamischen und statischen PET Untersuchungen mit  $^{13}\text{NH}_3$  und  $^{18}\text{FDG}$  aus.

Dabei wurde die myokardiale Durchblutung (MBF) mittels  $^{13}\text{NH}_3$  und der Glukosemetabolismus mittels  $^{18}\text{FDG}$  bestimmt. Mit Hilfe des PETs konnten Regionen mit erhöhter  $^{18}\text{FDG}$  Aufnahme und verringertem MBF (mismatch), sowie solche Areale festgestellt werden, bei denen beide Parameter verringert waren (match). Regionen ohne ersichtliche Veränderungen wurden als remote Zonen bezeichnet.

Nachdem die Tiere in den Ganzkörper-Scanner des Tomographen verbracht worden waren, begannen die Messungen durch:

- i.v. Injektion von 20 mCi  $^{13}\text{NH}_3$ 
  - dynamische Messungen von 12 x 10 s, 6 x 30 s und 1 x 300 s
- nach 30 min i.v. Applikation von 10 mCi  $^{18}\text{FDG}$ 
  - dynamische Messung von 12 x 10 s, 6 x 30 s, 3 x 300 s und 2 x 600 s

Nach Abschluß dieser Messungen konnte mit Hilfe eines Computerprogramms, dem sogenannten „Munich Heart“, ein dreidimensionales Modell des Herzens konstruiert werden. Anhand des Verteilungsmusters der Radionuklide konnten die so erhaltenen Ergebnisse analysiert werden.

### **3.2.2.7. Euthanasie und Probenentnahme**

Nach Abschluß der PET - Untersuchungen wurden die Tiere durch die Injektion von ca. 160 mg/kg KG Pentobarbital und 20 ml KCl-Lösung i.v. euthanasiert. Der Thorax wurde sofort eröffnet, das Herz entnommen und in eiskaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurden die einzelnen Herzen mittels einer Digitalkamera zu Dokumentationszwecken fotografiert und schließlich wie unter Punkt 3.2.1. beschrieben in sechs Scheiben geschnitten und die ermittelten match, mismatch, sowie remote Regionen markiert. Die Aufbewahrung der entnommenen Proben erfolgte bis zur weiteren Analyse bei -70°C.

### **3.2.3. Proteinanalyse**

#### **3.2.3.1. Allgemeines**

Die nicht-ischämischen Herzen (Schlachthof) wurden einerseits zur Erlernung der molekularbiologischen Untersuchungsmethoden, andererseits aber auch zur Ermittlung eines bestimmten Verteilungsmusters der einzelnen Proteine, bzw. mRNA im Herz verwendet.

**Tabelle 4: Probenentnahme (Schlachthofherzen)/ mittlere Scheibe**

1a) LV, Septum epikardial	4a) LV, Inferior epikardial
1b) LV, Septum endokardial	4b) LV, Inferior endokardial
2a) LV, Anterior epikardial	5) Apex
2b) LV, Anterior endokardial	6) RV
3a) LV, Lateral epikardial	7) linkes Atrium
3b) LV, Lateral endokardial	8) rechtes Atrium



Die Probenentnahme der ischämischen Herzen bezog sich auf die Ergebnisse der PET Untersuchungen. Prinzipiell wurden folgende Proben entnommen, wobei zu beachten ist, dass teilweise nicht alle Biopsien pro Schwein entnommen werden konnten.

### **1. Remote:**

Gewebeproben aus dem linken Ventrikel (LV) im Bereich der LCX (left circumflex coronary artery). In dieser Region konnte in der vorangegangenen PET Untersuchung weder eine Wandbewegungsstörung, noch eine reduzierte Durchblutung festgestellt werden.

### **2. „fasted“ mismatch:**

Gewebeproben aus dem linken Ventrikel (LV) im Bereich der LAD. Wandbewegungsstörungen, eine reduzierte Restdurchblutung und eine erhöhte <sup>18</sup>FDG-Aufnahme konnten im vorangegangenen PET gemessen werden. Das Tier war nüchtern („fasted“) und es erfolgte keine Glukosegabe.

### **3. „post insulin“ mismatch:**

Gewebeproben aus dem linken Ventrikel (LV) im Bereich der LAD. Wiederum konnten Wandbewegungsstörungen und eine reduzierte Restdurchblutung gemessen werden, jedoch lag die erhöhte <sup>18</sup>FDG-Aufnahme nur nach vorheriger Gabe von Glukose und Insulin vor.

### **4. match:**

Gewebeproben aus dem linken Ventrikel (LV) im Bereich der LAD mit Wandbewegungsstörungen und reduzierter Restdurchblutung. Keine gesteigerte <sup>18</sup>FDG-Aufnahme nach Glukose- und Insulingabe konnte beobachtet werden.

### **5. Kontrolle:**

Gewebeprobe aus dem rechten Ventrikel

Gewebeprobe aus den Atrien

### **3.2.3.2. Anreicherung der Zellmembranen**

Alle Arbeiten wurden soweit wie möglich im Kühllabor bzw. auf Eiswasser bei 4°C durchgeführt, um Abbauprozesse von Proteasen und anderen Enzymen zu minimieren.

Ziel der Membranpräparation war es, eine angereicherte Fraktion der Glukosetransporter zu erhalten. Es wurde darauf geachtet, dass die gefrorenen Gewebeproben ein Gewicht von 0,5 - 0,7 g hatten. Sichtbare Gefäßanteile, Binde- bzw. Fettgewebe wurden mit einem Skalpell entfernt und die Proben einzeln in PBS-Puffer gewaschen, um noch enthaltenes Blut zu entfernen.

Anschließend wurden sie in mit Kollagenase (1,1 g/ml) versetztem Homogenisationspuffer (5 ml/g) (Ryder et al. 1999) mit Hilfe einer Rasierklinge ca. 15 Minuten so stark zerkleinert, dass nur noch ein sehr homogener Gewebebrei vorhanden war. Ziel der Kollagenasenzugabe war es, das Handling der Proben, vor allem im Bezug auf die anschließende Proteinbestimmung, zu erleichtern.

Weitere Zerkleinerung wurde mit Hilfe des Ultra Turrax (2 x 20 sec, 10 000 rpm) und einem mittleren Dispergierwerkzeug erreicht. Als letzte Stufe der Homogenisation wurden die Zellen in einem Glas-Glas-Homogenisierer (Potter) durch zehnfache Anwendung aufgeschlossen. Das Volumen der Proben wurde nach diesem Schritt festgehalten.

Um die Kollagenase bei ihrem Temperaturoptimum arbeiten lassen zu können, musste das Homogenat bei 37°C, 15 Minuten inkubiert werden. Danach wurden die Proben sofort wieder auf Eis verbracht, 100 µl des Homogenats als Roh-Homogenat (Crude-/CH-Fraktion) in 200 µl Aufbewahrungspuffer verdünnt und bei -20°C aufbewahrt. Die übrige Gewebesuspension wurde im Kühlraum 10 Minuten bei 350 g zentrifugiert und dadurch die Fraktion der schweren Zellanteile – Nuklei, intakte Gewebezellen und Blutzellen – als Pellet abzentrifugiert. Die erhaltenen Überstände wurden abpipettiert, in Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und in der Ultrazentrifuge (4°C, 170000 g) eine Stunde lang zentrifugiert.

Die so gewonnene Membranfraktion (MM-Fraktion) wurde mit 200 µl Aufbewahrungspuffer versetzt und ebenfalls eingefroren. Für die anschließende Proteinbestimmung mußten die Proben wieder aufgetaut, resuspendiert und mit 500 µl Aufbewahrungspuffer weiter verdünnt werden.

### **3.2.3.3. Proteinbestimmung**

Um die Ergebnisse der Gelelektrophorese bzw. des Western Blot quantitativ auswertbar zu machen, musste von jeder Probe jeweils 50 µg Protein aufgebracht werden. Es war deshalb notwendig, die Gesamtproteinkonzentration der Proben zu ermitteln.

Dazu wurde eine Mischung des Bicinchoninic acid (BCA) haltigen Reaktionsreagenz bestehend aus BCA Protein Assay Reagent A und B (Verhältnis 50:1) verwendet.

Um die Konzentrationen der unbekanntenen Proben ermitteln zu können, war es zunächst notwendig, eine Eichkurve aus bekannten Proteinstandards (Albuminstandardlösung) herzustellen. Diese Standardkurve wurde für jeden Versuchsansatz neu erstellt und die jeweiligen Konzentrationsstandards als Doppelwerte bestimmt.

**Tabelle 5: Verdünnungsreihe des Proteinstandards**

Proteinstandardkonzentration (mg Protein/ml)	0,9 % NaCl (ml)	Albuminstandardlösung (ml)
<b>0,0</b>	1,0	0,0
<b>0,4</b>	0,8	0,2
<b>0,8</b>	0,6	0,4
<b>1,0</b>	0,5	0,5
<b>1,2</b>	0,4	0,6

Gleichzeitig wurden auch die Gewebesuspensionen der zu untersuchenden Proben mit NaCl in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt (4-fach Ansatz/Probe) und zu jedem Ansatz 2 ml des BCA-Reagenz pipettiert.

Die Proben wurden gut durchmischt, im Wasserbad unter weiterem Schütteln 30 Minuten bei 37°C inkubiert und unmittelbar danach bei 4°C abgekühlt. Dadurch wurde die Reaktion gestoppt und die Proben konnten vergleichend im Photometer gemessen werden. Die erhaltenen Konzentrationen mussten aufgrund der vorausgegangenen Verdünnung der Proben noch mit dem Faktor 10 multipliziert werden. Mit Hilfe der so ermittelten Endkonzentration konnte das Volumen bestimmt werden, das die standardisierte Menge von 50 µg Protein pro Probe enthielt.

### **3.2.3.4. Polyacrylamidelektrophorese (SDS-Page)**

Moleküle wandern in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Ladung. Der Grad der Wanderung ist dabei abhängig von der Stärke des elektrischen Feldes, der Größe, Form und Nettoladung der Moleküle, sowie der Viskosität und Temperatur des Mediums in dem sich die Moleküle bewegen. Bei der Gelelektrophorese wandern die Moleküle in einer unterstützenden Matrix (hier Polyacrylamidgel).

Das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) maskiert die Eigenladung der Moleküle, so dass sie proportional zu ihrer Länge negativ geladen sind. Die Auftrennung erfolgt somit in der Reihenfolge der molekularen Masse in Richtung der Anode.

### **Versuchsdurchführung**

Nach dem Zusammenbau der Elektrophoreseapparatur wurde zunächst das Trenngel produziert. Nach dem Gießen des Gels zwischen die Glasplatten wurde es mit H<sub>2</sub>O bidest überschichtet. Dadurch war es möglich einerseits eine gerade horizontale Kante zu erhalten, andererseits konnte so der Kontakt des Gels mit Luftsauerstoff verhindert werden. Nach etwa 10 min war das Trenngel auspolymerisiert, das H<sub>2</sub>O bidest konnte mit Hilfe von Filterpapier entfernt und das Sammelgel eingegossen werden. Zur Ausbildung der Probetaschen wurde ein Plastikamm in das Gel gesteckt.

### **SDS-Elektrophorese**

Das berechnete Volumen der Proteinproben (mit 50 µg Protein) wurde vor dem Auftragen auf die Gele im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt. Dieser enthielt außer den denaturierenden Detergenzien auch Glycerol, um das Gewicht der Proben zu erhöhen, damit sie sich gut am Grund der Taschen sammeln konnten. Bromphenolblau diente als Markierung für die Position der Lauffront.

Um die genaue Position der Proteine auf dem Gel nach der Elektrophorese bestimmen zu können, wurde außerdem in der seitlichen Tasche ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen. Dieser wird während eines Laufes in bestimmte farbige Banden mit bekanntem Molekulargewicht aufgetrennt.

Nachdem alle Proben mittels einer Hamiltonspritze in die Taschen aufgetragen worden waren, konnte der Lauf gestartet werden (100 mA, max. 400 V, ca. 3,5 h). Um entstehende Wärme abzuleiten, wurde mit einer Kühlanlage 8°C kaltes Wasser in einem geschlossenen System durch den Kühltank der Laufkammer gepumpt.

### **3.2.3.5. Western-Blot**

Beim Western-Blot werden große Moleküle auf die Oberfläche einer immobilisierenden Membran transferiert. Dadurch ist es möglich sie für weitere Reaktionen, wie z.B. Antikörperbindungen, zugänglich zu machen.

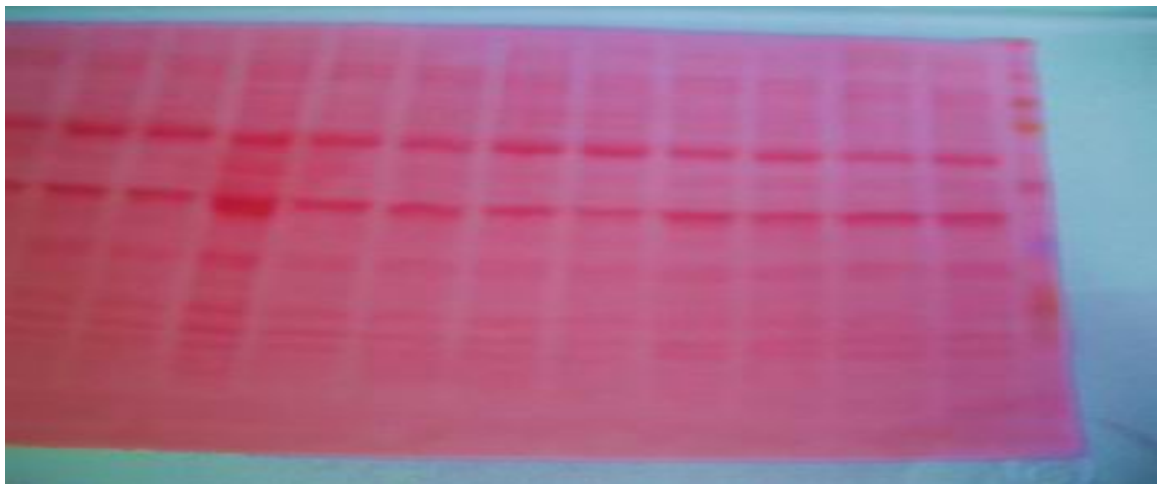
### **Blotting**

Um restliche Laufpufferanteile zu entfernen, mussten die Gele zunächst etwa 15 min in gekühltem Blottingpuffer gewaschen werden. Währenddessen wurden pro Gel jeweils eine Nitrocellulosemembran (NC) und zwei Whatmanpapiere (WP) auf Gelgröße zurechtgeschnitten. Anschließend wurde der Blottingstapel zusammengebaut (Schaumstoffauflage, WP, Gel, NC, WP, Schaumstoffauflage) und die so gebildete Blot-Kassette in die mit Puffer gefüllte Blottingkammer eingesetzt, so dass das Gel der Kathode und die NC der Anode zugewandt waren. Damit die Proteine ausreichend lange binden konnten, wurde der Transfer über Nacht im Kühlraum durchgeführt (15 V, 4°C).

### Ponceau-S-Färbung

Nach Abschluß des Blotting musste die Integrität der Proteinbindung auf der NC-Membran überprüft werden.

Dafür wurde die Membran zunächst durch waschen in TBS von Blottingpuffer gereinigt und anschließend in einer 1:10 verdünnten Ponceau-S-Lösung für 20 sec gefärbt und vorsichtig in destilliertem Wasser wieder leicht entfärbt. Die Proteinbanden, sowie jegliche Transferdefekte durch eingeschlossene Luftblasen, waren nun erkennbar. Die Färbung wurde zu Dokumentationszwecken durch fotokopieren der Membran festgehalten.



**Abb. 5: Bsp. einer Ponceau-S-Färbung, seitlich sind die Banden des Molekulargewichtsmarkers erkennbar**

### 3.2.3.6. Detektion der Proteine

Vor der Inkubation mit dem Primärantikörper mussten die Membranen zuerst durch waschen in TBS wieder vollständig entfärbt werden.

Danach folgte eine ca. 1,5-stündige Inkubation der Membranen bei 37°C in Blockingpuffer. Durch die im Puffer enthaltene Makromoleküle (hier Magermilch) wurden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der NC-Membran abgesättigt und damit ein stärkeres Hintergrundsignal verhindert.

### **Primärantikörper**

Die jeweiligen AK für GLUT1, GLUT4 und HK II wurden in mit Natriumazid versetztem Blockingpuffer verdünnt (1:800) und die NC-Membranen bei Raumtemperatur für 1,5 h bei starkem Schütteln in diesen Lösungen inkubiert. Die AK-Lösungen wurden aus Kostengründen danach wieder aufgefangen, im Kühlschrank aufbewahrt und mehrmals verwendet.

### **Sekundärantikörper**

Reste des ungebundenen Primärantikörpers wurden durch das Waschen mit TBS (6 x 5 min) entfernt. Der radioaktiv markierte Sekundärantikörper ( $^{125}\text{J}$ ) bindet sich an nicht variable Regionen des ersten AK. Er wurde ebenfalls mit Blockingpuffer verdünnt. Nach erneuter Inkubation und Waschen der NC-Membran (siehe Primärantikörper) wurde sie vorsichtig getrocknet, in Folie verpackt und auf den Phosphorscreen gelegt.

### **Phosphorimager**

Durch die Exposition des Phosphorscreens mit der  $\gamma$  - Strahlung des  $^{125}\text{J}$ -markierten AK wird äquivalent zur Lokalisation der markierten Proteinbanden Energie auf dem Screen gespeichert. Es zeichnet sich auf der Speicherfläche des Screens demnach ein Abbild des Blots ab. Dieses Bild kann nach dem Einscannen des Screens im Phosphormager sichtbar gemacht werden (Software: Image Quant 5.1.).

#### **3.2.3.7. Auswertung**

Durch die spezielle Software des Phosphorimagers war es möglich die gesuchten Proteinbanden genau zu markieren und zu quantifizieren. Um die einzelnen Ergebnisse vergleichen zu können, wurde in jedem Gel jeweils die gleiche Standardprobe aufgetragen. Es handelte sich hierbei um die Membranpräparation von insgesamt 4 Proben eines linken Ventrikels. Die Standardproben wurden aliquotiert und eingefroren. Es konnte dadurch sichergestellt werden, dass sich der Gehalt an Protein durch äußere Einflüsse nicht verändern würde. Alle anderen Proben wurden auf diesen internen Standard bezogen und relativ quantifiziert.

### 3.2.4. mRNA

#### 3.2.4.1. Allgemeines

Besondere Sorgfalt war im Umgang mit RNA geboten, da abbauende Enzyme (RNasen) überall in der Umgebung vorkommen. Es wurde deshalb darauf geachtet, immer mit Handschuhen zu arbeiten. Alle verwendeten Geräte waren, soweit möglich, sterilisiert. Außerdem kam DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat) zum Einsatz, um die Instrumente vor der RNA Extraktion noch einmal sorgfältig zu spülen. DEPC ist ein Detergenz, das alle vorhandenen RNasen zerstört. Um Interaktionen mit anderen Substanzen während der RNA-Isolation zu verhindern, wurde das Wasser 2 x autoklaviert und das DEPC somit wieder zersetzt.

#### 3.2.4.2. Isolation der RNA

Die RNA wurde nach der „single-step“ Extraktionsmethode, die von Chomczynski und Sacchi entwickelt wurde, isoliert (Chomczynski und Sacchi 1987). Hierbei wurde das TRI Reagenz der Firma Sigma verwendet. Dieses Produkt ist eine Mischung von denaturierendem Guanidinthiocyanat und Phenol in einer einphasigen Lösung. Durch Verwendung dieses Reagenzes konnte mit einer relativ geringen Gewebemenge ausgekommen werden und mehrere Proben gleichzeitig extrahiert werden. Es separiert Gewebehomogenate in 3 Phasen (RNA, DNA, Proteine), wobei die wässrige Phase die gewünschte RNA enthält.

Die Gewebeproben wurden aus den gleichen Arealen gewonnen, wie auch für die Membranpräparationen (siehe 3.2.3.)

Die gefrorenen Proben mit einem durchschnittlichen Gewicht von 100 mg wurden in 1 ml TRI-Reagent mit Hilfe des Ultra-Turrax 30 sec zerkleinert (24 000 rpm/min). Daraufhin wurde das Homogenat sofort wieder gekühlt (ca. 1 min) und schließlich mit Hilfe des Ultraschallgeräts für 15 sec bei 24 kHz weiter zerkleinert. Diese Gewebesuspension konnte nun bei -70°C maximal 1 Monate bis zur weiteren Analyse aufbewahrt, oder sofort zur RNA Extraktion verwendet werden.



Für die Anwendung der weiteren Isolationsschritte musste das Homogenat zunächst bei Raumtemperatur 10 min stehen gelassen werden. In dieser Zeit konnten sich die denaturierten Proteine von den Nukleinsäuren lösen.

Anschließend wurde pro Milliliter TRI-Reagent 0,2 ml Chloroform zugegeben und die Proben vorsichtig 15 sec geschüttelt. Das Reaktionsgemisch wurde wiederum für 5 min stehen gelassen und daraufhin zentrifugiert (12 000 rpm, 15 min, 4°C). Durch diesen Schritt wurde die Mixtur in 3 Phasen aufgetrennt: der roten organischen Phase mit den Proteinen, der Interphase mit der DNA, sowie der obersten, farblosen wässrigen RNA Schicht.

Dieser wässrige Überstand musste nun vorsichtig abpipettiert und in ein neues Tube überführt werden. Es wurden 0,8-1,0 ml Isopropanol zugegeben. Das Gemisch wurde zum Ausfällen der RNA 10 min bei Raumtemperatur stehen gelassen und abschließend erneut zentrifugiert (12 000 rpm, 15 min, 4°C). Durch diesen Schritt sammelte sich die RNA als Pellet am Boden des Tubes. Dieses Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes mit 1 ml 75% Ethanol oberflächlich gewaschen und noch einmal zentrifugiert (12 000 rpm, 10 min, 4°C).

Abschließend musste das RNA-Pellet 5-10 min an der Luft angetrocknet und danach in RNase freiem Wasser für 5 min bei 65°C auf einem Thermomixer gelöst werden.

### 3.2.4.3. Messung der RNA-Konzentration

Um die RNA Konzentration und Reinheit der Proben zu bestimmen, wurde ihre Extinktion photometrisch gemessen.

Dafür wurde zunächst eine 1:100 Verdünnung der Proben hergestellt. Die Konzentrationsmessung wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, was dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäuren entsprach.

Eine Extinktion von 1 bei 260 nm bedeutete, dass eine RNA-Konzentration von 40 µg/ml Probe enthalten war. Für die Berechnung der Konzentrationen bezog man sich also auf diesen Wert unter Beachtung des oben genannten Verdünnungsfaktors.

Zur Überprüfung der Probenreinheit wurde die Absorption zwischen einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gemessen. Der Quotient dieser beiden Werte, sollte mindestens 1,6 betragen. Werte die unterhalb lagen, ließen auf eine

Kontamination der wässrigen Phase mit der Phenolphase während des Isolierens, oder auf ein ungenügendes Wiederauflösen des finalen Pellets schließen.

Schließlich wurden die Probenlösungen bei -70 °C eingefroren.

### 3.2.4.4. Reverse Transkription (RT)

#### Allgemeines

Durch die Verwendung des 1st Strand cDNA Synthese Kit der Firma Roche konnte die RNA durch Reverse Transkription in Einzelstrang cDNA umgeschrieben werden. Die hierbei verwendete Transkriptase des Avian Myeloblastose Virus (AMV) synthetisierte den neuen cDNA - Strang in Abhängigkeit des verwendeten Primers. In diesem Versuch wurden die im Kit gelieferten Oligo-p(dT)<sub>15</sub> Primer zur Synthese am 3' Ende des poly(A)- mRNA-Schwanzes verwendet.

#### Versuchsdurchführung

Zu Beginn wurde der RNase Inhibitor und die AMV Reverse Transkriptase auf Eis aufgetaut. Alle anderen Bestandteile des Kits konnten bei Raumtemperatur aufgetaut werden. Um sicher zu gehen, dass die gesamte, meist äußerst geringe Inhaltsmenge der Tubes vorhanden war, mußte zuerst kurz zentrifugiert werden.

Da für jede cDNA Synthese Reaktion nur sehr kleine Mengen notwendig waren, wurde es empfohlen eine größere Menge des so genannten „Master Mix“ anzusetzen und diesen anschließend zu aliquotieren. Dadurch konnten Fehlerquellen wie ungleiches Pipettieren ausgeschlossen werden.

**Tabelle 6. Ansatz des Master Mix für die Reverse Transkription**

Reagenz	Volumen/Probe	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer (100mM Tris, 500mM KCl, pH 8,3)	2,0 µl	1x
25 mM MgCl <sub>2</sub>	4,0 µl	5 mM
Deoxynucleotide Mix (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	2,0 µl	1 mM
Oligo-p(dT) <sub>15</sub> Primer	2,0 µl	0.04 A <sub>260</sub> units (1,6 µg)
RNase Inhibitor	1,0 µl	50 units

Dieser Master Mix bildete die grundsätzliche Mischung, mit der die Proben versetzt wurden. Außerdem wurden zu jeder Probe noch 0,8 µl der AMV Reverse Transkriptase pipettiert. Des Weiteren wurden Negativkontrollen hergestellt, die statt des Enzyms steriles Wasser enthielten.

Für die Transkription wurde der Master Mix in sterilen Tubes aliquotiert (11,8 µl), jeweils 1 µg der RNA-Probe zugegeben und mit sterilem Wasser auf insgesamt 20 µl aufgefüllt. Das Reaktionsgemisch musste nun bei Raumtemperatur 10 min zur Primerbindung stehen gelassen und anschließend bei 42°C (Temperaturoptimum des Enzyms) für 60 min inkubiert werden. Danach wurde das Enzym durch 5-minütiges Erhitzen auf +99°C und schnellem Abkühlen auf 4°C denaturiert. Das war notwendig, um sämtliche Interferenzen der Transkriptase mit den Substanzen der folgenden Schritte ausschließen zu können.

### 3.2.4.5. Polymerasenkettenreaktion (PCR)

In der Biochemie wurde die PCR zu einer essentiellen Technik, um viele Kopien eines einzigen Gens herstellen zu können. Prinzipiell gliedert sie sich in 3 Phasen:

**1. Denaturierung:** Bei einer Temperatur von 95°C wird der DNA-Doppelstrang zu Einzelstrang-DNA aufgetrennt. Alle sonstigen Enzymreaktionen werden durch das Erhitzen gestoppt.

**2. Anbindung:** Die gewählte Temperatur in diesem Schritt ist abhängig von der Länge und Sequenz der gewählten Primer (hier 62°C). Die Primer haben nun Zeit, sich an die Einzelstrang-DNA zu binden. An diese kleinen Stücke von Doppelstrang-DNA kann sich die hitzestabile Taq-Polymerase anbinden und die Vorlage kopieren. Schon nach dem Anbau weniger Basen sind die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der Vorlage und dem Primer so fest, dass sie nicht mehr aufgebrochen werden können.

**3. Verlängerung:** Die Polymerase arbeitet bei einem Temperaturoptimum von 72°C. Primer die nicht optimal an die DNA gebunden sind, d.h. nicht exakt komplementär sind, werden durch das Erwärmen wieder abgelöst. Es werden also nur die gesuchten DNA-Abschnitte kopiert. Durch das Wiederholen dieser Schritte (hier 50-fach) wird die DNA exponentiell vervielfältigt.

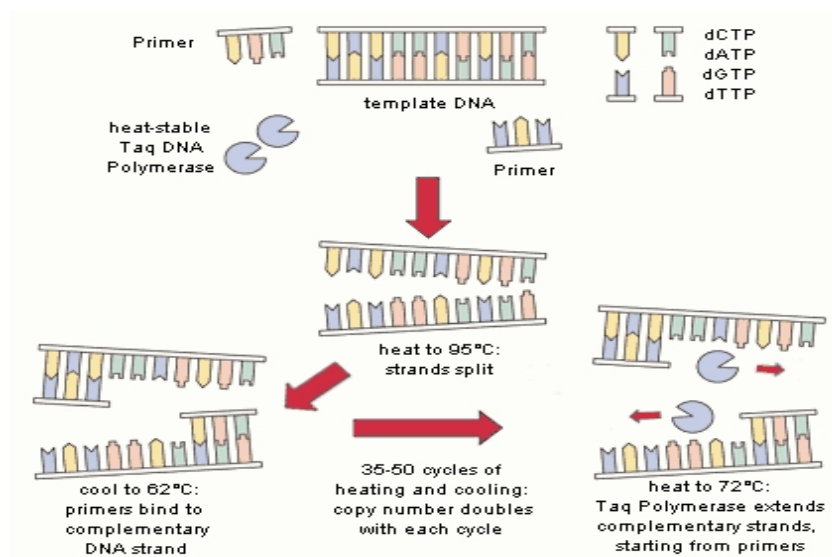


Abb. 6: PCR-Prinzip (siehe auch: [www.roche-applied-science.com/pcr/principles](http://www.roche-applied-science.com/pcr/principles))

## LightCycler und real-time (RT) PCR

Das LightCycler System hat gegenüber der konventionellen PCR den Vorteil, dass die Amplifikation des PCR-Produkts schon während eines Laufes (real-time) überprüft werden kann. Ein weiterer Vorteil bildet die sehr schnelle Erwärmung durch Luft (bis zu 20°C/sec). Durch den Einsatz von Glaskapillaren können die Temperaturänderungen sehr schnell durchgeführt werden. Der ausschlaggebende Punkt zur Verwendung dieses Verfahrens war allerdings, dass mit Hilfe des LightCyclers nicht nur ein qualitativer, sondern auch ein quantitativer Nachweis der DNA möglich ist. Bei der konventionellen Methode sind dafür noch immer weitere Schritte notwendig. Im LightCycler war es möglich die DNA-Menge aufgrund von Fluoreszenzmessungen zu bestimmen. Dafür war es notwendig die zu untersuchenden Proben mit sogenannten Hybridisationsproben zu versehen. Die optische Steuereinrichtung des Geräts konnte daraufhin während des PCR-Laufs die Fluoreszenz von den Spitzen der die Proben enthaltenen Glaskapillaren detektieren.

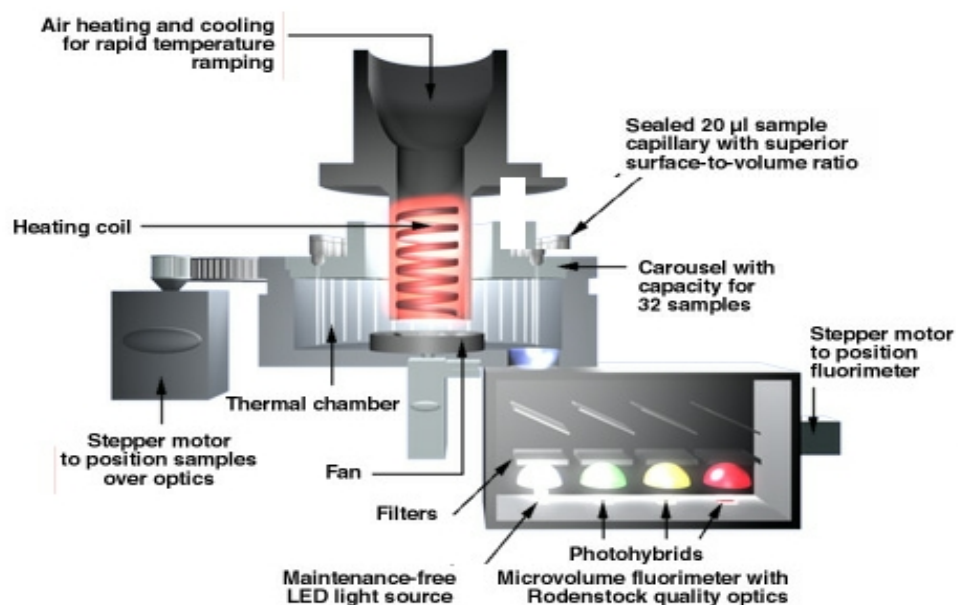


Abb. 7: Aufbau des LightCyclers (siehe auch: [www.biochem.roche.com/lightcycler](http://www.biochem.roche.com/lightcycler))

### Hybridisationsproben

Um DNA mit maximaler Produktspezifität detektieren und quantifizieren zu können, wurde das sogenannte Hybridisationsprobenverfahren entwickelt. Für dieses Verfahren wurden zwei speziell synthetisierte, sequenzspezifische Oligonucleotidproben verwendet, die mit verschiedenen Fluoreszenzmarkern versehen waren (Oligo 1: Fluorescein am 3'Ende/Donor, Oligo 2: LightCycler-Red 640 am 5'Ende/Akzeptor).

Die Sequenzen der beiden Proben wurden so gewählt, dass sie auf dem gesuchten DNA-Fragmente in einer Art „Kopf zu Schwanz“ Position hybridisiert wurden. Dadurch wurden die zwei Fluoreszenzmarker dicht aneinander gebracht. Fluorescein wurde durch das Licht des LightCyclers angeregt und emittierte grünes Fluoreszenzlicht. Dieses stimulierte nun das LC Red 640, rotes Fluoreszenzlicht abzugeben.

Fluoreszenz konnte nur gemessen werden, wenn der Abstand höchstens 5 Nukleotide betrug. Die Stärke des Signals war direkt proportional zur Menge der Zielsequenz, die während des PCR-Laufs produziert wurde.

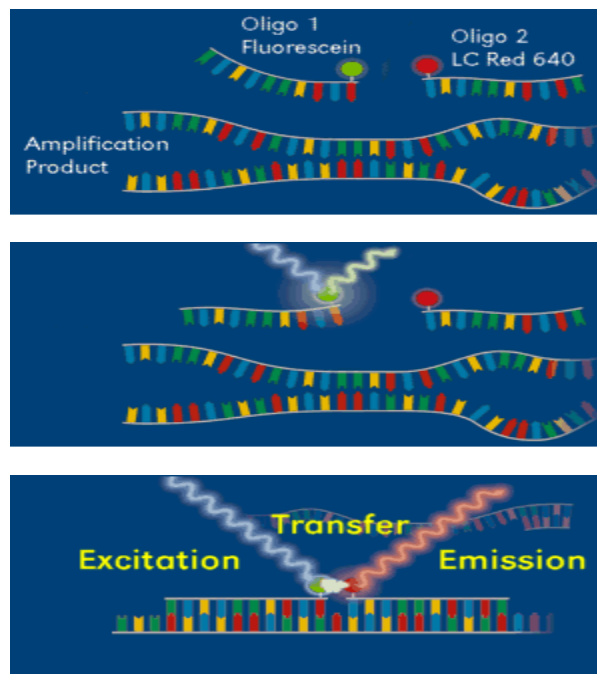


Abb. 8: Funktionsprinzip der Hybridisationsproben

**LightCycler FastStart DNA Master Hybridisations Probes**

Die in diesem „Hot Start“ Reaktions-Mix enthaltene Polymerase ist eine modifizierte Form der thermostabilen Taq DNA Polymerase. Bei Raumtemperatur ist das Enzym aufgrund verschiedener hitzelabiler Blockierungsgruppen inaktiv. Durch Erhitzen werden diese Gruppen entfernt und das Enzym somit „aktiviert“. Durch Verwendung dieser „Hot Start“ Polymerase konnte die Spezifität und Sensitivität der PCR signifikant gesteigert werden, da es nicht zu einer Verlängerung von nichtspezifischen Primer – DNA - Hybriden bei niedrigen Temperaturen kam.

Zuerst mußten die einzelnen Reagenzien zu einem Master Mix vermischt werden.

**Tabelle 7: Master Mix für die PCR mit dem LightCycler**

Reagenz	Volumen (µl)	Endkonzentration
Steriles H <sub>2</sub> O (PCR grade)	6,8	
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	3,2	5 mM
3'Primer (10 µM)	1,0	0,5 µM
5'Primer (10 µM)	1,0	0,5 µM
FL-HybProbes (2 µM)	2,0	0,2 µM
LC-HybProbes (2 µM)	2,0	0,2 µM
LightCycler-FastStart Master (TaqPolymerase, Reaktionspuffer,dNTP)	2,0	

Nach dem vorsichtigen Durchmischen der Reagenzien, wurden jeweils 18 µl des Master Mix in die vorgekühlten Glaskapillaren pipettiert. Vervollständigt wurde der Versuchsansatz durch die Zugabe von 2 µl der cDNA Proben (Positivkontrolle), bzw. der Negativkontrolle (ohne AMV). Zusätzlich wurde in jedem PCR-Lauf mindestens noch eine absolut „negative“ Probe mit sterilem PCR-Wasser eingesetzt. Um die Werte anschließend quantitativ auswerten zu können, wurden sogenannte Standardproben verwendet. Dieser Standard wurde durch das Klonen der jeweilig gesuchten Sequenzen im Pasmid pCR 2.1 produziert (GenExpress,

Berlin). Durch das Erstellen einer externen Standardkurve und dem Einsatz einer genau definierten Menge der Standardprobe ( $10^7$  Kopien des Gens) pro PCR-Lauf konnten die gemessenen Konzentrationen der Proben berechnet werden.

Jede PCR begann mit einer Vorinkubation der Proben für 10 min bei 95°C. Dadurch wurden die Blockierungsgruppen der Polymerase abgespalten und das Enzym aktiviert. Daraufhin folgte wie unter 3.2.4.5. beschrieben die Fortführung der PCR. Nach insgesamt 50 Zyklen wurden die Proben 30 sec lang auf 40 °C abgekühlt und im Kühlschrank aufbewahrt.

### **3.2.5. Datenanalyse und Statistik**

Die Signifikanzberechnung zwischen den Vergleichsgruppen wurden mit dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Test für verbundene Stichproben im Statistikprogramm SPSS® Version 11,0 durchgeführt. Statistische Signifikanz wurde für  $p < 0,05$  angenommen. Es werden die Mittelwerte (MW), sowie die Standardabweichung (SD) gezeigt.



## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Ergebnisse der nicht-ischämischen Herzen**

Die nicht-ischämischen Herzen stammen, wie unter 3.2.1. beschrieben, aus dem Münchner Schlachthaus. Von insgesamt 3 Schweineherzen, wurde Herz Nr.1 zur Erlernung der Methodik benötigt, die Daten werden deshalb nicht gezeigt.

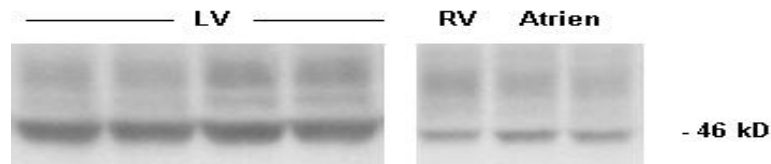
Die Herzen Nr. 2 und Nr. 3 wurden zur Ergänzung und statistischen Absicherung der Ergebnisse einer Veröffentlichung von Praus et al. (in Vorb.) verwendet, um ein detailliertes Verteilungsschema der Glukosetransporter Isoformen GLUT1, GLUT3, GLUT4 (Protein/mRNA) und der Hexokinase II (Protein) im nicht-ischämischen Schweineherzen zu erstellen.

#### **4.1.1. Ergebnisse der Proteinquantifizierung**

Wie unter 3.2.3.1. beschrieben, wurden aus jedem Herzen 12 Proben zur Analyse gewonnen. Wie weiter unter 3.2.3.7. aufgeführt, beziehen sich die nach der Proteinauswertung erhaltenen Daten auf eine Standardprobe, die einen Vergleich der einzelnen Proben möglich macht. Jede Probe wurde vierfach bestimmt, um Falschmessungen zu minimieren.

##### **4.1.1.1. GLUT1 Protein**

In Abb. 9 ist deutlich die spezifische Bande von GLUT1 bei einem Molekulargewicht von ca. 46 kD zu erkennen. Aus dem repräsentativen Western-Blot ist ersichtlich, dass der verwendete Primärantikörper, der ursprünglich gegen Human- bzw. Mäuse- Rattengewebe gerichtet war, eine ausreichend hohe Affinität zum GLUT1 des Schweins aufweist.



**Abb. 9: Ausschnitt aus einem Western-Blot zum Nachweis von GLUT1 Membranpräparationen aus Regionen des linken/rechten Ventrikles (LV/RV) sowie der Atrien**

Tabelle 8 stellt die relative GLUT1 Proteinexpression in den 12 Regionen der untersuchten Herzen dar. Die Proben des linken Ventrikles (LV) wurden in epi- bzw. endokardial unterschieden, um intermurale Differenzen feststellen zu können. Es zeigt sich, dass trotz der individuellen Unterschiede der Herzen, eine homogene Proteinverteilung im linken Ventrikel (LV), wie auch im Apex erkennbar ist. Im rechten Ventrikel (RV) scheint der Proteingehalt geringgradig reduziert zu sein. In den Atrien dagegen ist der Gehalt im Vergleich zum LV, um mehr als 70% verringert. Die zusammengefaßten Ergebnisse der Werte des LV, Apex, RV und der Atrien der beiden Herzen sind in Abb. 10 graphisch dargestellt.

**Tabelle 8: regionale Verteilung des GLUT1 Proteins im nicht-ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 2	Herz 3	Mittelwert beider Herzen
Septum epikardial	1,93 ± 0,19	2,07 ± 0,20	2,00 ± 0,10
Septum endokardial	1,51 ± 0,05	1,77 ± 0,16	1,64 ± 0,18
Anterior epikardial	1,56 ± 0,06	1,63 ± 0,22	1,60 ± 0,05
Anterior endokardial	1,67 ± 0,05	1,73 ± 0,12	1,70 ± 0,04
Lateral epikardial	1,49 ± 0,08	1,92 ± 0,47	1,71 ± 0,30
Lateral endokardial	1,32 ± 0,02	1,86 ± 0,37	1,59 ± 0,38
Inferior epikardial	1,18 ± 0,02	1,86 ± 0,18	1,52 ± 0,48
Inferior endokardial	1,17 ± 0,03	1,75 ± 0,09	1,46 ± 0,41
Rechter Ventrikel	1,32 ± 0,04	1,34 ± 0,09	1,33 ± 0,01
Apex	1,37 ± 0,09	1,63 ± 0,17	1,50 ± 0,18
linkes Atrium	0,42 ± 0,01	0,49 ± 0,09	0,46 ± 0,05
rechtes Atrium	0,46 ± 0,03	0,54 ± 0,05	0,50 ± 0,06

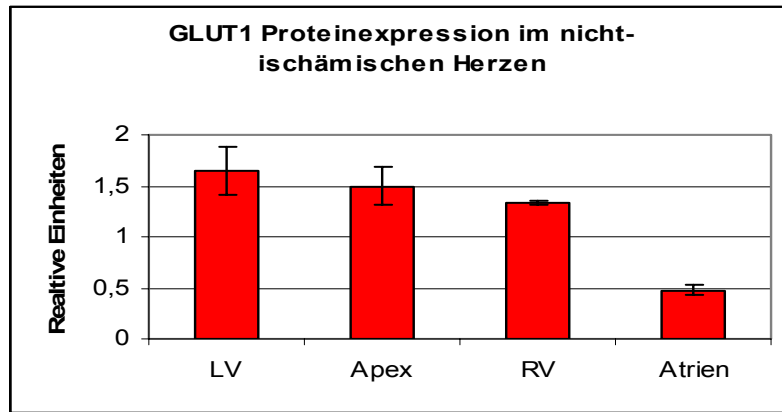


Abb. 10: GLUT1 Proteinexpression im nicht-ischämischen Herzen (n=2)  
LV = linker Ventrikel / RV = rechter Ventrikel

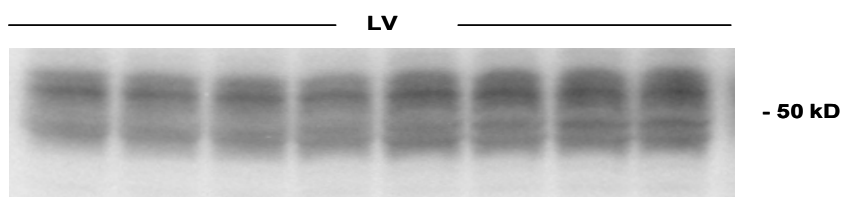
In Übereinstimmung mit den Daten von Praus (Daten nicht gezeigt), ergab sich bei der Auswertung aller Herzen (n=6) eine statistisch signifikante Reduktion des GLUT1 Proteins im RV, sowie der Atrien ( $p < 0,05$ ), gegenüber dem LV. Diese Signifikanz wurde ebenfalls beim Vergleich des RV bzw. Apex vs. der Atrien beobachtet ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.1.2. GLUT 3 Protein

Die Bestimmung des GLUT3 Proteingehalt der Myokardproben konnte nicht durchgeführt werden, da die kommerziell erhältlichen Antikörper entweder gegen Human-, oder gegen Ratten- bzw. Mäusegewebe gerichtet waren. Gegenüber Schweinegewebe zeigten sie entweder gar keine Bindung, oder eine Bindung mit so geringer Affinität, dass sie mit dem gewählten Quantifizierungsverfahren nicht auswertbar waren.

#### 4.1.1.3. GLUT4 Protein

Abb. 11 stellt einen repräsentativen Western-Blot zum Nachweis von GLUT4 im Schweinegewebe dar. Der gegen Rattengewebe gerichtete Primärantikörper zeigt eine ausreichend hohe Affinität zum GLUT4 des Schweins. Die Darstellung mehrerer deutlicher Banden wurde ebenfalls im Rattenherzen nachgewiesen. Da der Transporter in unterschiedlichen Stufen der Glykolysierung auftritt, können diese Banden als spezifisch für GLUT4 angesehen und in der Gesamtheit quantifiziert werden.



**Abb. 11: Ausschnitt aus einem Western-Blot zum Nachweis von GLUT4, Membranfraktionen aus verschiedenen Regionen des linken Ventrikels (LV)**

Tabelle 9 zeigt die relative GLUT4 Proteinexpression in den 12 Regionen der untersuchten Herzen. Wie auch bei GLUT1 sind zwischen den Herzen individuelle Unterschiede zu erkennen, was die Höhe der einzelnen Meßwerte betrifft. Das Verteilungsmuster ist dennoch in beiden Herzen ähnlich. In den acht Regionen des LV ist das Protein homogen verteilt. Der Proteingehalt im RV ist vergleichbar zum LV, im Apex und den Atrien ist die Expression geringgradig erhöht. Die zusammengefaßten Werte des LV, Apex, RV und den Atrien sind in Abb. 12 graphisch dargestellt.

Tabelle 9: regionale Verteilung des GLUT4 Proteins im nicht-ischämischen Herzen

Regionen:	Herz 2	Herz 3	Mittelwerte beider Herzen
Septum epikardial	1,74 ± 0,10	1,97 ± 0,20	1,86 ± 0,16
Septum endokardial	2,09 ± 0,15	1,93 ± 0,35	2,01 ± 0,11
Anterior epikardial	2,10 ± 0,44	1,91 ± 0,52	2,01 ± 0,13
Anterior endokardial	1,77 ± 0,01	1,99 ± 0,30	1,88 ± 0,16
Lateral epikardial	2,01 ± 0,08	2,44 ± 0,56	2,23 ± 0,30
Lateral endokardial	1,94 ± 0,11	2,33 ± 0,47	2,14 ± 0,28
Inferior epikardial	2,17 ± 0,08	1,98 ± 0,16	2,08 ± 0,13
Inferior endokardial	2,05 ± 0,28	1,99 ± 0,08	2,02 ± 0,04
Rechter Ventrikel	1,92 ± 0,03	2,06 ± 0,31	1,99 ± 0,10
Apex	2,54 ± 0,06	2,34 ± 0,28	2,44 ± 0,14
linkes Atrium	2,71 ± 0,14	1,92 ± 0,18	2,32 ± 0,56
rechtes Atrium	2,63 ± 0,06	1,74 ± 0,17	2,19 ± 0,63

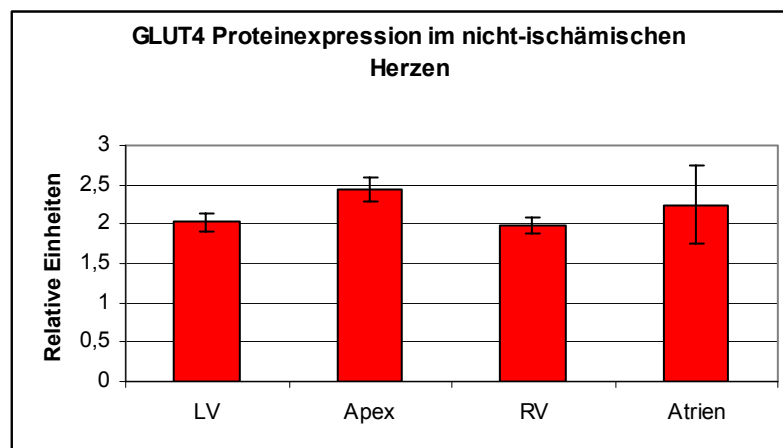
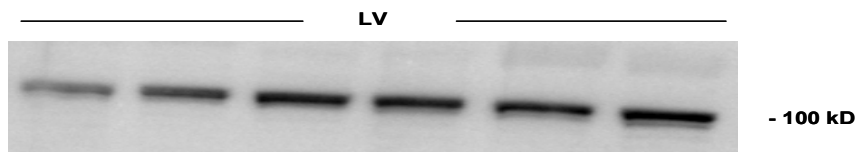


Abb. 12: GLUT4 Proteinexpression im nicht-ischämischen Herzen (n = 2)  
 LV = linker Ventrikel / RV = rechter Ventrikel

In Übereinstimmung mit den Daten von Praus (Daten nicht gezeigt), ergaben sich bei der Auswertung aller Herzen (n=6) keine statistisch signifikanten Unterschiede im regionalen Verteilungsmuster des GLUT4 Proteins.

#### 4.1.1.4. Hexokinase II Protein

Abb. 13 stellt einen repräsentativen Western-Blot zum Nachweis der Hexokinase II im Schweinemyokard dar. Der Primärantikörper (Anti-Ratte) bindet in ausreichendem Maße an Schweinegewebe. Die deutlich abgesetzte Bande bei 100 kD entspricht dem Molekulargewicht der Hexokinase II und wurde im weiteren quantifiziert.



**Abb. 13: Ausschnitt aus einem Western-Blot zum Nachweis der Hexokinase II, Roh-Homogenat-Fractionen aus verschiedenen Regionen des linken Ventrikels (LV)**

Tabelle 10 zeigt die relative Hexokinase II Proteinexpression in den 12 Regionen der untersuchten Herzen. Die Meßwerte der einzelnen Herzen weisen kein homogenes Verteilungsschema des Proteins in den unterschiedlichen Regionen auf, auch weichen die Werte zwischen den untersuchten Herzen untereinander stark ab. In Abb. 14 werden deshalb statt der Mittel-, die Einzelwerte der untersuchten Herzen aus dem LV, Apex, RV und Atrien graphisch dargestellt. In dieser Darstellung zeigt sich, dass trotz der individuellen Unterschiede der Herzen, die Meßwerte in den Atrien erhöht sind.

Tabelle 10: regionale Verteilung der Hexokinase II im nicht-ischämischen Herzen

Regionen:	Herz 2	Herz 3	Mittelwert beider Herzen
Septum epikardial	0,70 ± 0,05	0,68 ± 0,03	0,69 ± 0,01
Septum endokardial	0,69 ± 0,02	0,74 ± 0,01	0,72 ± 0,03
Anterior epikardial	1,08 ± 0,05	0,63 ± 0,02	0,86 ± 0,22
Anterior endokardial	0,88 ± 0,15	0,98 ± 0,11	0,93 ± 0,05
Lateral epikardial	1,21 ± 0,04	0,96 ± 0,23	1,09 ± 0,12
Lateral endokardial	1,22 ± 0,12	1,09 ± 0,16	1,16 ± 0,07
Inferior epikardial	1,20 ± 0,10	0,53 ± 0,01	0,87 ± 0,34
Inferior endokardial	1,03 ± 0,06	0,50 ± 0,07	0,77 ± 0,26
Rechter Ventrikel	1,22 ± 0,03	0,60 ± 0,01	0,91 ± 0,31
Apex	0,91 ± 0,01	0,80 ± 0,13	0,86 ± 0,06
linkes Atrium	0,95 ± 0,02	1,40 ± 0,02	1,18 ± 0,22
rechtes Atrium	1,67 ± 0,01	1,19 ± 0,05	1,43 ± 0,24

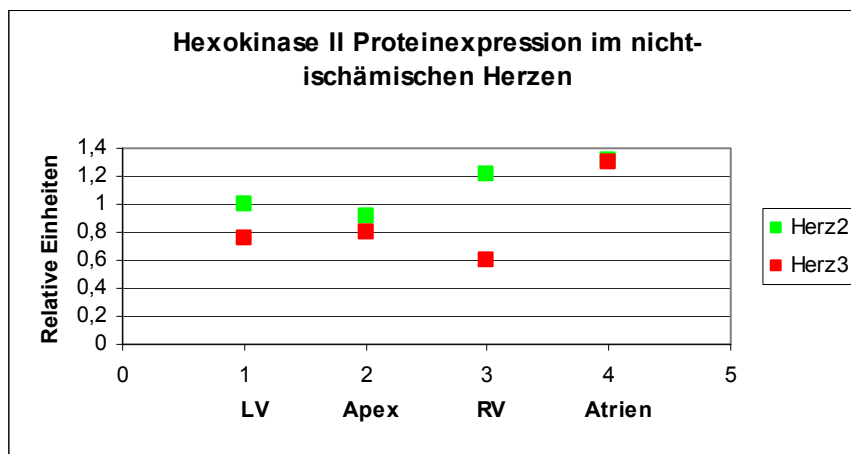


Abb. 14: HK II Proteinexpression im nicht-ischämischen Herzen  
 LV = linker Ventrikel / RV = rechter Ventrikel

Im Zusammenhang mit den Daten von Praus (Daten nicht gezeigt), ergab sich bei der Auswertung aller Herzen (n=6) die Tendenz zur signifikanten Erhöhung des Hexokinase II Proteins in den Atrien (p=0,06).

#### 4.1.2. Ergebnisse der mRNA Quantifizierung

Die Probenentnahme zur Analyse der mRNA wurde wie unter 3.2.3.1. beschrieben aus 12 Regionen, unter Beachtung der besonderen Sorgfaltspflicht beim Umgang mit RNA, gewonnen. Jede Probe wurde im LightCycler in 3 verschiedenen Durchgängen, jeweils im Doppelansatz gemessen.

##### 4.1.2.1. GLUT1 mRNA

Tabelle 11 stellt die absolute GLUT1 mRNA Expression (pro  $\mu\text{g}$  der Gesamt-mRNA) in den 12 Regionen der untersuchten Herzen dar. Die Meßwerte zeigen, dass zwischen den beiden Herzen eine Differenz der Expression besteht. Jedoch zeigt sich, dass die regionale Verteilung in beiden Herzen Ähnlichkeiten aufweist. Im LV sind weder zwischen den endo- noch epikardialen Arealen signifikante Expressionsunterschiede zu erkennen. Während die Werte des LV denen des RV ähneln, scheint die Expression im Apex verringert zu sein. Die Daten der Atrien weisen darauf hin, dass die GLUT1 mRNA hier am geringsten ausgeprägt ist.

Abb. 15 zeigt den individuellen Unterschied der Herzen im Bereich des LV. Bei beiden Herzen schwankt die Expression in den einzelnen Regionen des LV ca.  $\pm 200$  Kopien vom Mittelwert des gesamten LV.

**Tabelle 11: regionale Verteilung der GLUT1 mRNA im nicht-ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 2	Herz 3	Mittelwert beider Herzen
Septum epikardial	701,38 $\pm$ 11,5	1606,20 $\pm$ 76,4	1153,79
Septum endokardial	763,80 $\pm$ 118,1	1488,30 $\pm$ 131,9	1126,05
Anterior epikardial	573,40 $\pm$ 42,5	1467,50 $\pm$ 458,5	1020,45
Anterior endokardial	465,25 $\pm$ 43,5	1278,85 $\pm$ 412,8	872,05
Lateral epikardial	301,88 $\pm$ 37,8	1634,75 $\pm$ 383,5	968,32
Lateral endokardial	441,12 $\pm$ 85,0	1254,88 $\pm$ 324,3	848,00
Inferior epikardial	405,15 $\pm$ 44,9	1208,10 $\pm$ 215,5	806,63
Inferior endokardial	327,37 $\pm$ 73,6	1066,78 $\pm$ 400,9	697,08
Rechter Ventrikel	523,95 $\pm$ 47,7	1327,20 $\pm$ 425,6	925,58
Apex	503,05 $\pm$ 57,6	436,30 $\pm$ 58,5	469,68
linkes Atrium	769,10 $\pm$ 41,6	307,45 $\pm$ 37,1	538,28
rechtes Atrium	248,04 $\pm$ 35,0	373,67 $\pm$ 71,3	310,86



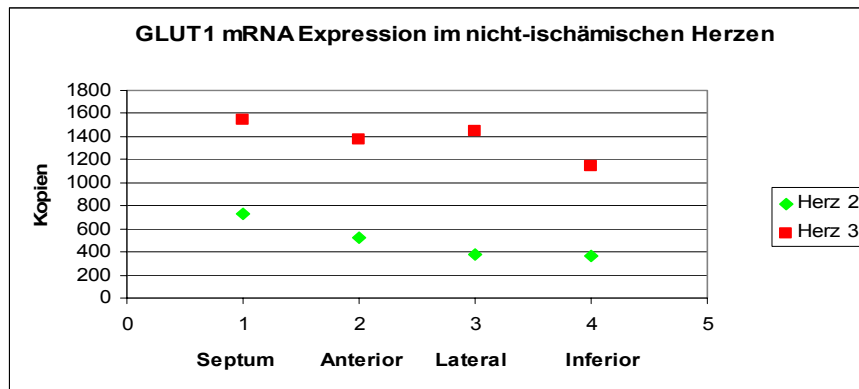


Abb. 15: Expression von GLUT1 mRNA im linken Ventrikel nicht-ischämischer Herzen

In Übereinstimmung mit den Daten von Praus (Daten nicht gezeigt), ergab sich bei der Auswertung aller Herzen (n=6) ein signifikanter Unterschied zwischen den Werten des LV vs. Apex, sowie LV vs. Atrien ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2.2. GLUT3 mRNA

Tabelle 12 zeigt die absolute GLUT3 mRNA Expression (pro  $\mu\text{g}$  der Gesamt-mRNA) in den 12 Regionen der untersuchten Herzen. GLUT3 mRNA ist in beiden Herzen in relativ niedriger Kopienanzahl nachweisbar. Individuellen Unterschiede bezüglich der Ausprägung sind erkennbar (Herz 3 > Herz 2).

Tendenziell ist die mRNA im Bereich des RV und aber auch im rechten Atrium am stärksten ausgeprägt (Abb. 16).

Tabelle 12: regionale Verteilung der GLUT3 mRNA im nicht-ischämischen Herzen

Regionen:	Herz 2	Herz 3	Mittelwert beider Herzen
Septum epikardial	113,54 ± 13,98	119,73 ± 27,26	116,64
Septum endokardial	94,52 ± 16,74	190,67 ± 83,20	142,60
Anterior epikardial	128,48 ± 24,87	119,00 ± 6,10	123,74
Anterior endokardial	60,75 ± 7,69	255,40 ± 77,36	158,08
Lateral epikardial	26,71 ± 5,35	64,00 ± 19,56	45,36
Lateral endokardial	57,69 ± 16,80	49,41 ± 16,0	53,55
Inferior epikardial	27,79 ± 1,80	218,38 ± 75,10	123,09
Inferior endokardial	13,74 ± 8,10	145,96 ± 60,74	79,85
Rechter Ventrikel	323,50 ± 26,98	647,87 ± 296,60	485,69
Apex	77,34 ± 13,85	250,80 ± 15,60	164,07
linkes Atrium	81,66 ± 9,96	230,00 ± 55,70	155,83
rechtes Atrium	380,12 ± 25,97	528,50 ± 70,10	454,31

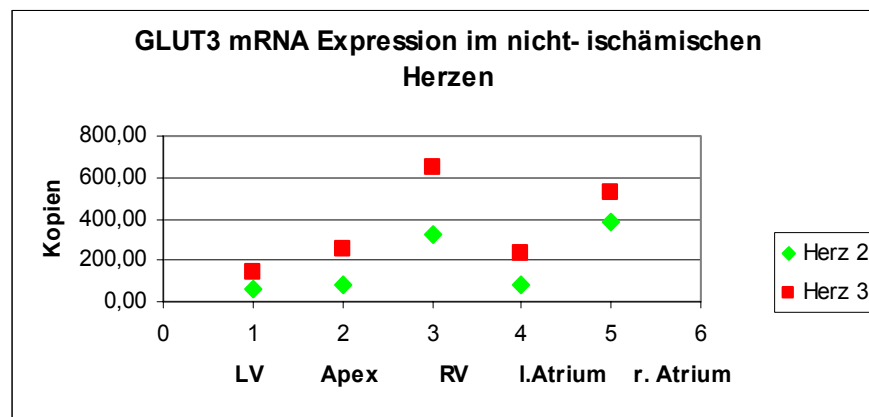


Abb. 16: Expression der GLUT3 mRNA in nicht-ischämischen Herzen  
 LV = linker Ventrikel / RV = rechter Ventrikel  
 l. = linkes / r. = rechtes Atrium

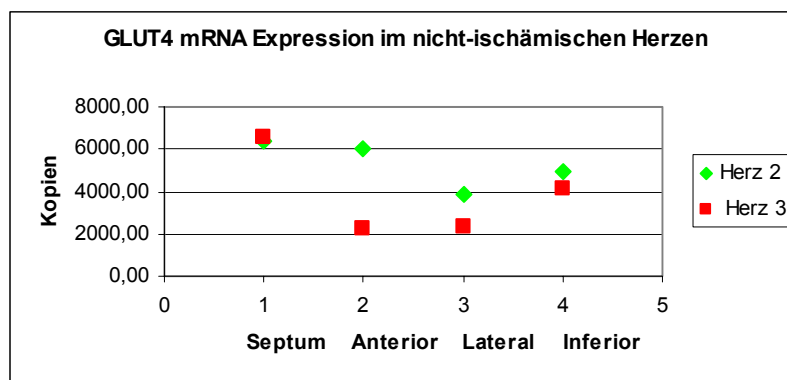
Im Zusammenhang mit den Daten von Praus (Daten nicht gezeigt), ergaben sich bei der Auswertung aller Herzen (n=6) keine statistisch signifikanten Unterschiede im Verteilungsmuster der GLUT3 mRNA im Schweinemyokard.

#### 4.1.2.3. GLUT4 mRNA

Tabelle 13 stellt die absolute GLUT4 mRNA Expression (pro  $\mu\text{g}$  der Gesamt-mRNA) in den 12 Regionen der untersuchten Herzen dar. Von den gemessenen Isoformen zeigt GLUT4 die stärkste Expression. Das Herz Nr. 2 weist höhere Meßwerte auf, als Herz Nr. 3. Trotzdem kann ein ähnliches Verteilungsmuster festgestellt werden. Im Bereich des LV ist die GLUT4 mRNA v.a. im lateralen Bereich reduziert (Abb.17). Die Expression innerhalb des RV, ähnelt der des LV.

**Tabelle 13: regionale Verteilung der GLUT4 mRNA im nicht-ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 2	Herz 3	Mittelwert
Septum epikardial	6774,25 $\pm$ 657,9	8866,75 $\pm$ 2559,1	7820,50
Septum endokardial	6068,00 $\pm$ 467,9	4274,75 $\pm$ 1184,9	5171,38
Anterior epikardial	6025,25 $\pm$ 508,8	2696,50 $\pm$ 248,74	4360,88
Anterior endokardial	5953,00 $\pm$ 541,0	1878,50 $\pm$ 189,4	3915,75
Lateral epikardial	3386,67 $\pm$ 1131,2	2458,25 $\pm$ 223,1	2922,46
Lateral endokardial	4413,00 $\pm$ 826,9	2157,00 $\pm$ 194,4	3285,00
Inferior epikardial	5412,50 $\pm$ 1190,3	3620,00 $\pm$ 1148,9	4516,25
Inferior endokardial	4523,75 $\pm$ 957,5	4647,00 $\pm$ 657,1	4585,38
Rechter Ventrikel	4160,00 $\pm$ 573,6	3933,40 $\pm$ 935,6	4046,70
Apex	7796,00 $\pm$ 927,2	3001,40 $\pm$ 556,9	5398,70
linkes Atrium	7423,80 $\pm$ 1716,9	3024,00 $\pm$ 391,6	5223,90
rechtes Atrium	8952,50 $\pm$ 1505,3	1409,67 $\pm$ 295,9	5181,09



**Abb. 17: Expression von GLUT4 mRNA im linken Ventrikel nicht-ischämischer Herzen**

Im Zusammenhang mit den Daten von Praus (Daten nicht gezeigt), ergab sich bei der Auswertung aller Herzen (n=6) kein statistisch unterschiedliches Verteilungsmuster der GLUT4 mRNA in den untersuchten Herzregionen.

#### 4.1.2.4. Hexokinase II mRNA

Zum Zeitpunkt der experimentellen Studie war die Nukleotidsequenz der Hexokinase Typ II vom Schwein nicht bekannt. Dadurch wurde in dieser Arbeit nur der Proteingehalt des Enzyms in den verschiedenen Herzregionen quantifiziert.

#### 4.1.2.5. GLUT1/GLUT4 Verhältnis

Tabelle 14 zeigt das Verhältnis zwischen der absolute GLUT1 mRNA und GLUT4 mRNA Expression (pro  $\mu\text{g}$  der Gesamt-mRNA) in den 12 Regionen der untersuchten Herzen. Alle Mittelwerte sind deutlich kleiner 1, was die Dominanz der GLUT4 Expression verdeutlicht (LV: 0,27; RV: 0,24; Apex: 0,11; Atrien: 0,13).

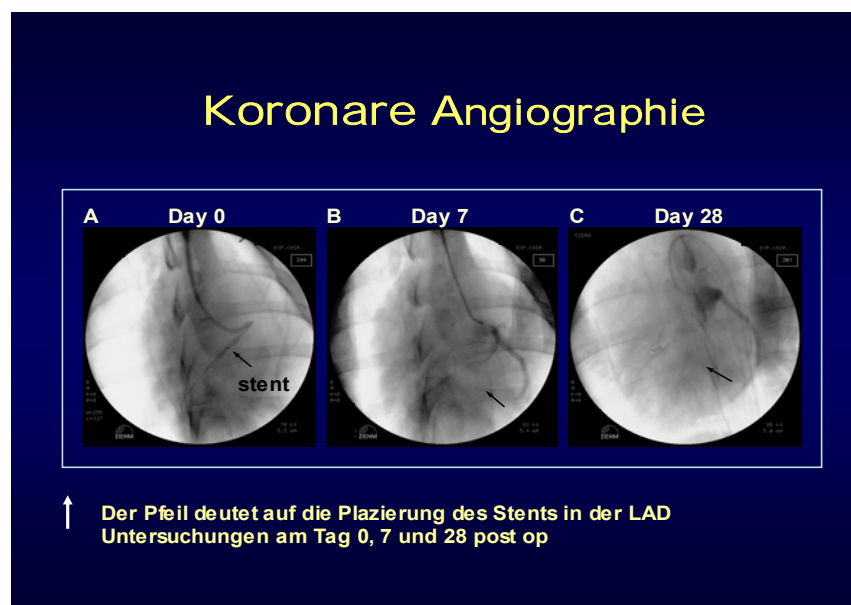
**Tabelle 14: GLUT1/GLUT4 mRNA Verhältnis im nicht-ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 2	Herz 3	Mittelwert
Septum epikardial	0,10	0,18	0,14
Septum endokardial	0,13	0,35	0,24
Anterior epikardial	0,10	0,54	0,32
Anterior endokardial	0,08	0,68	0,38
Lateral epikardial	0,09	0,67	0,38
Lateral endokardial	0,10	0,58	0,34
Inferior epikardial	0,07	0,33	0,20
Inferior endokardial	0,07	0,23	0,15
Rechter Ventrikel	0,13	0,34	0,24
Apex	0,06	0,15	0,11
linkes Atrium	0,10	0,10	0,10
rechtes Atrium	0,03	0,27	0,15

## 4.2. Ergebnisse der ischämischen Herzen

Von den insgesamt 11 Versuchstieren überlebten 6 Schweine (54,5 %) die Spanne bis zum Versucheende von 28 Tagen und die Herzen konnten zur molekularbiologischen Analyse verwendet werden.

Bei allen Tieren war bei der angiographischen Untersuchung am Tag 28 der Studie ein 90 – 100%er Verschluß der LAD zu ermitteln. Abb. 18 zeigt den Verlauf der Stenosezunahme am Beispiel des Schweins Nr. 1 am Tag 0 (Stentimplantation), Tag 7 (1. Kontrolle) und Tag 28 (Abschlußkontrolle).



**Abb. 18:** Angiographisch ermittelte Stenosezunahme der LAD in einem Zeitraum von 28 Tagen (Schwein 1)

### 4.2.1. Wandbewegungsstörung

Die Veränderungen der Wandbewegung konnten im PET anhand der Signalintensität des Tracers ( $^{13}\text{NH}_3$ ), während der Systole und Diastole gemessen werden. Eine Störung der Wandbewegung liegt vor, wenn ein „Count increase“ von weniger als 20 % gemessen wird. Dies war im Bereich der LAD bei jedem

Tier, außer bei Nr. 2, festzustellen. Innerhalb des Versorgungsgebiets der LCX (Kontrolle) zeigt sich dagegen keine Störung der Wandbewegung (MW: 31 %, LAD vs. LCX  $p < 0,05$ ).

**Tabelle 15: Messung der Wandbewegungsstörung, eine Störung liegt bei einem count increase von < 20 % vor**

	Count increase LAD in %	Count increase LCX in %
Herz 1	13,3	31,4
Herz 2	21,9	32,1
Herz 3	14,4	34,2
Herz 4	2,8	26,4
Herz 5	-1,2	31,4
Herz 6	-1,5	31,1

#### 4.2.2. Myokardiale Durchblutung

Die Messung der myokardialen Durchblutung ergab einen durchschnittlichen Blutfluss im Bereich der Kontrollregion der LCX von  $0,885 \pm 0,278$  ml pro Gramm des Herzgewebes in der Minute. Im Bereich der LAD Region konnte ein Mittelwert von  $0,535 \pm 0,242$  ml/g/min gemessen werden. Die durchschnittliche Reduktion des Blutfluss betrug 45 %. Die Einzelwerte für jedes Tier sind in Tabelle 16 dargestellt (LAD vs. REMOTE  $p < 0,05$ ).

**Tabelle 16: Myokardiale Durchblutung im Bereich der Kontroll- (Remote/LCX), sowie LAD- Region**

	Blutfluss: Remote (ml/g/min)	Blutfluss: LAD (ml/g/min)	Fluss - Reduktion in %
Herz 1	0,63	0,35	45
Herz 2	1,39	1,00	28
Herz 3	0,85	0,59	31
Herz 4	0,85	0,40	53
Herz 5	0,64	0,46	58
Herz 6	0,95	0,41	56

### 4.2.3. Ergebnisse der Proteinquantifizierung

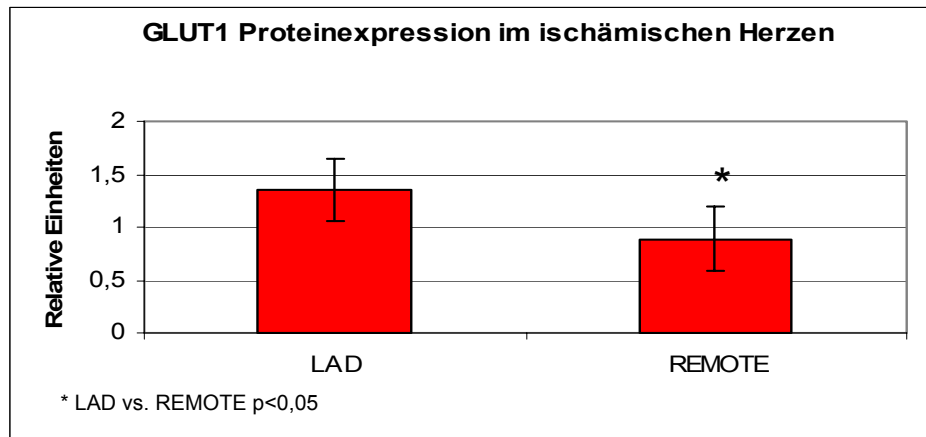
#### 4.2.3.1. GLUT1 Protein

Tabelle 17 stellt die relative GLUT1 Protein Expression in den unterschiedlichen Regionen der untersuchten Herzen dar. Hervorzuheben ist ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zwischen den „REMOTE“ Regionen (Kontrollregion im LV) und den zusammengefaßten Regionen im Bereich der LAD (d.h. „fasted“ und „post insulin“ mismatch, sowie match). Durchschnittlich ist das GLUT1 Protein im Versorgungsgebiet der LAD um 50% erhöht. In Abb. 19 werden die Ergebnisse der Messungen zwischen den LAD ( $MW = 1,34 \pm 0,29$ ) und REMOTE Regionen ( $MW = 0,89 \pm 0,30$ ) graphisch dargestellt.

**Tabelle 17: Regionale Verteilung des GLUT1 Proteins im ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 1	Herz 2	Herz 3	Herz 4	Herz 5	Herz 6
Remote epi (LV)	0,70±0,13	0,43±0,08	1,36±0,28	0,72±0,14	1,13±0,13	0,75±0,05
Remote endo (LV)	0,75±0,04	0,59±0,21	1,26±0,10	0,84±0,26	1,26±0,33	0,93±0,11
fasted mismatch epi (LAD)	1,38±0,01	-----	1,48±0,14	-----	2,33±0,02	1,37±0,27
fasted mismatch endo (LAD)	1,18±0,13	-----	1,41±0,2	-----	1,52±0,11	1,34±0,01
p. insulin mismatch epi (LAD)	1,15±0,02	-----	-----	1,46±0,15	1,6±0,14	-----
p. insulin mismatch endo (LAD)	1,24±0,09	-----	-----	1,39±0,25	1,31±0,06	-----
match epi (LAD)	-----	0,61±0,16	-----	-----	1,3±0,02	1,27±0,05
match endo (LAD)	-----	0,86±0,19	-----	-----	1,18±0,32	1,42±0,06
Rechter Ventrikel (Kontrolle)	0,67±0,05	0,41±0,07	1,02±0,21	0,77±0,15	1,13±0,05	-----
linkes Atrium (Kontrolle)	0,45±0,01	0,15±0,01	0,31±0,04	-----	0,7±0,11	-----
rechtes Atrium (Kontrolle)	0,48±0,02	0,45±0,10	0,39±0,03	-----	0,55±0,01	-----

----- nicht bestimmt / epi = epikardial, endo = endokardial / LV = linker Ventrikel  
 LAD = left anterior descending artery / p.= post



**Abb. 19: Expression des GLUT1 Proteins im ischämischen Herzen**  
**LAD = Bereich des Versorgungsgebiets der linken Koronararterie**  
**(Anzahl der untersuchten Proben: n = 20)**  
**REMOTE = Kontrollregion im linken Ventrikel (n =12)**

#### 4.2.3.2. GLUT4 Protein

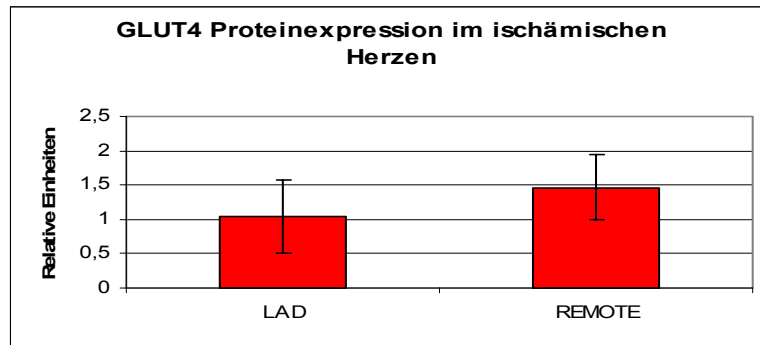
Tabelle 18 stellt die relative GLUT4 Protein Expression in den unterschiedlichen Regionen der untersuchten Herzen dar. Die Meßwerte von Herz 1 sind im Vergleich zu allen anderen Herzen deutlich reduziert. In Abb. 20 wird ersichtlich, dass es im Bereich der LAD (MW=1,04±0,52) im Vergleich zur REMOTE Region (MW=1,46±0,48) zu einer Reduktion des Proteins kommt, diese ist allerdings statistisch nicht signifikant.

**Tabelle 18: Regionale Verteilung des GLUT4 Proteins im ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 1	Herz 2	Herz 3	Herz 4	Herz 5	Herz 6
Remote epi (LV)	0,59±0,11	2,17±0,21	1,69±0,33	1,21±0,13	1,90±0,1	1,23±0,12
Remote endo (LV)	0,56±0,05	1,59±0,01	1,93±0,38	1,48±0,06	1,48±0,2	1,66±0,23
fasted mismatch epi (LAD)	0,48±0,02	-----	1,90±0,36	-----	1,41±0,07	1,41±0,11
fasted mismatch endo (LAD)	0,42±0,02	-----	1,64±0,31	-----	0,4±0,19	1,11±0,07
p. insulin mismatch epi (LAD)	0,71±0,05	-----	-----	0,86±0,16	0,55±0,22	-----
p. insulin mismatch endo(LAD)	0,76±0,05	-----	-----	0,91±0,18	0,60±0,24	-----
match epi (LAD)	-----	1,85±0,3	-----	-----	0,51±0,22	1,53±0,09
match endo (LAD)	-----	2,09±0,2	-----	-----	0,51±0,19	1,24±0,08
Rechter Ventrikel (Kontrolle)	0,65±0,05	1,74±0,14	1,93±0,21	1,41±0,38	1,18±0,17	-----
linkes Atrium (Kontrolle)	0,55±0,04	2,13±0,13	0,85±0,07	-----	0,94±0,07	-----
rechtes Atrium (Kontrolle)	0,66±0,03	1,63±0,21	0,93±0,12	-----	0,55±0,04	-----

----- nicht bestimmt / epi = epikardial, endo = endokardial / LV = linker Ventrikel  
 LAD = left anterior descending artery/ p.= post





**Abb. 20: Expression des GLUT4 Proteins im ischämischen Herzen**  
LAD = Bereich des Versorgungsgebiets der linken Koronararterie  
(Anzahl der untersuchten Proben: n = 20)  
REMOTE = Kontrollregion im linken Ventrikel (n =12)

#### 4.2.3.3.Hexokinase II Protein

Tabelle 19 stellt die relative Hexokinase II Protein Expression in den unterschiedlichen Regionen der untersuchten Herzen dar. Die statistische Untersuchung aller Meßwerte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Regionen der Herzen. Die Herzen 1-4 zeigen einen durchschnittlichen Meßwert aller Regionen von  $0,74 \pm 0,16$ . In den Herzen 5 und 6 kann im Bereich der LAD ein Anstieg der Hexokinase II im Vergleich zur REMOTE Region beobachtet werden. Abb. 21 zeigt die regionale Unterschiede der Verteilung der HK II im Bereich der LAD ( $MW=1,18 \pm 0,5$ ) und der REMOTE ( $MW=0,679 \pm 0,14$ ) Region nach Auswertung aller Herzen.

Tabelle 19: Regionale Verteilung des Hexokinase II Proteins im ischämischen Herzen

Regionen:	Herz 1	Herz 2	Herz 3	Herz 4	Herz 5	Herz 6
Remote epi (LV)	0,69±0,03	0,64±0,09	0,93±0,01	0,45±0,02	0,62±0,07	0,69±0,15
Remote endo (LV)	0,58±0,05	0,55±0,01	0,93±0,09	0,68±0,09	0,58±0,06	0,84±0,11
fasted mismatch epi (LAD)	0,85±0,02	-----	0,87±0,11	-----	1,25±0,76	1,16±0,27
fasted mismatch endo (LAD)	0,63±0,08	-----	0,89±0,08	-----	1,32±0,36	2,24±0,07
p. insulin mismatch epi (LAD)	0,50±0,03	-----	-----	1,18±0,27	2,95±0,5	-----
p. insulin mismatch endo (LAD)	0,63±0,07	-----	-----	0,78±0,08	1,03±0,13	-----
match epi (LAD)	-----	0,58±0,14	-----	-----	1,31±0,28	1,2±0,29
match endo (LAD)	-----	0,65±0,13	-----	-----	1,44±0,03	1,15±0,06
Rechter Ventrikel (Kontrolle)	0,77±0,07	0,61±0,11	0,78±0,01	0,78±0,19	1,15±0,04	-----
linkes Atrium (Kontrolle)	0,95±0,13	0,71±0,02	0,46±0,08	-----	1,37±0,25	-----
rechtes Atrium (Kontrolle)	1,03±0,14	0,76±0,06	0,77±0,05	-----	2,19±0,47	-----

----- nicht bestimmt / epi = epikardial, endo = endokardial / LV = linker Ventrikel  
 LAD = left anterior descending artery/ p.= post

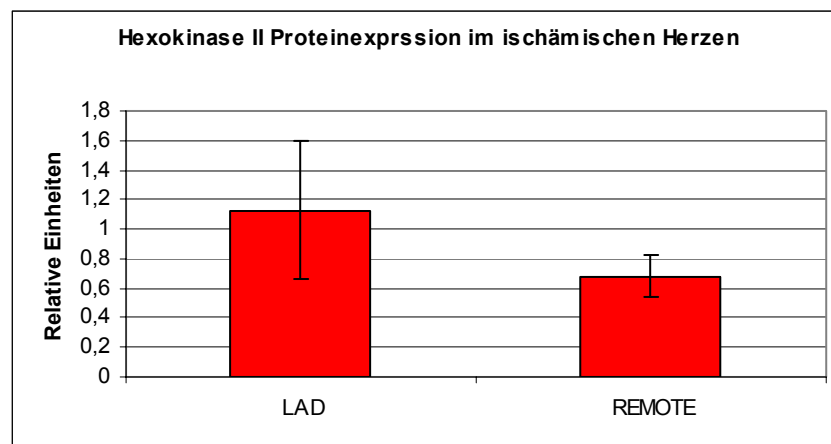


Abb. 21: Expression des Hexokinase II Proteins im ischämischen Herzen  
 LAD = Bereich des Versorgungsgebiets der linken Koronararterie  
 (Anzahl der untersuchten Proben: n = 20)  
 REMOTE = Kontrollregion im linken Ventrikel (n =12)

#### 4.2.4. Ergebnisse der mRNA Quantifizierung

##### 4.2.4.1. GLUT1 mRNA

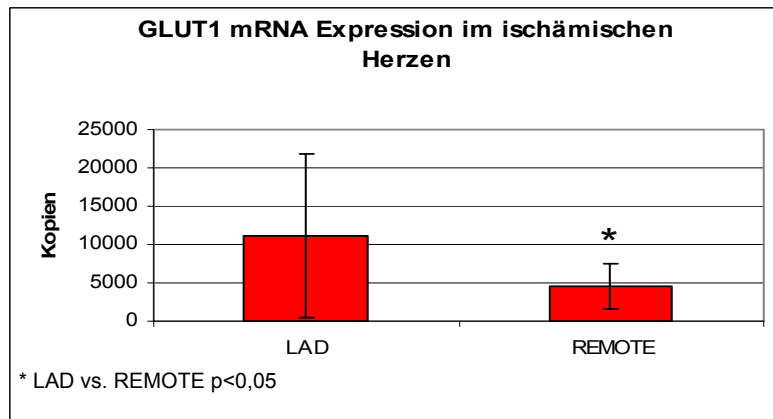
Die Tabelle 20 zeigt die absolute GLUT1 mRNA Expression (pro  $\mu\text{g}$  der Gesamt-mRNA) in den unterschiedlichen Regionen der ischämischen Herzen. Es ist erkennbar, dass sich zwischen den REMOTE Regionen und den zusammengefaßten Regionen im Bereich der LAD (d.h. „fasted“ und „post insulin“ mismatch, sowie match), ein signifikanter Unterschied in der Expression der mRNA ergibt ( $p < 0,05$ ). Dieser Unterschied konnte ebenfalls auf dem Level des GLUT1 Proteins festgestellt werden. Der MW der REMOTE Regionen aller Tiere beträgt 4468 Kopien GLUT1 mRNA, der MW der LAD 11100 Kopien, was einem 2,5-fachen Anstieg der Expression entspricht. In Abb. 22 sind die MW aus LAD und REMOTE Region graphisch dargestellt. Die hohe Standardabweichung im Bereich der LAD ist auf die relativ niedrigen Werte der Herzen 4 – 6 zurückzuführen. Die Steigerung der GLUT1 mRNA Expression im Bereich der LAD im Vergleich zur REMOTE Region, ist aber auch in diesen Herzen zu beobachten. Die MW Werte der weiter untersuchten Kontrollregionen (RV, Atrien) entsprechen denen der REMOTE Region.

**Tabelle 20: Regionale Verteilung der GLUT1 mRNA im ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 1	Herz 2	Herz 3	Herz 4	Herz 5	Herz 6
Remote epi (LV)	3,3±0,43	9,6±2,5	9,7±1,6	2,57±0,56	1,46±0,93	2,35±0,55
Remote endo (LV)	12,12±1,28	3,4±1,1	4,39±0,62	1,97±0,31	1,21±0,22	1,47±0,34
fasted mismatch epi (LAD)	40,14±5,07	-----	12,66±2,26	-----	1,98±0,32	0,52±0,07
fasted mismatch endo (LAD)	29,78±5,9	-----	20,69±4,65	-----	3,32±0,42	1,95±0,20
p. insulin mismatch epi (LAD)	6,8±0,63	-----	-----	6,12±1,23	4,18±0,53	-----
p.insulin mismatch endo (LAD)	6,1±1,0	-----	-----	6,21±0,39	3,44±0,72	-----
match epi (LAD)	-----	24,8±7,7	-----	-----	10,03±0,84	1,65±0,31
match endo (LAD)	-----	20,1±12,9	-----	-----	14,27±3,86	7,26±0,51
Rechter Ventrikel (Kontrolle)	2,3±0,35	3,51±1,05	8,06±2,17	1,16±0,37	3,96±0,42	-----
linkes Atrium (Kontrolle)	4,2±0,85	1,49±0,26	4,28±0,70	-----	3,07±0,46	-----
rechtes Atrium (Kontrolle)	2,23±0,31	4,04±0,97	6,26±3,28	-----	6,6±1,31	-----

----- nicht bestimmt / epi = epikardial, endo = endokardial / LV = linker Ventrikel  
LAD = left anterior descending artery/ p.= post

Alle Meßwerte  $\cdot 10^3$



**Abb. 22: Expression der GLUT1 mRNA im ischämischen Herzen**  
**LAD = Bereich des Versorgungsgebiets der linken Koronararterie**  
**(Anzahl der untersuchten Proben: n = 20)**  
**REMOTE = Kontrollregion im linken Ventrikel (n =12)**

#### 4.2.4.2. GLUT3 mRNA

Die Tabelle 21 zeigt die absolute GLUT3 mRNA Expression (pro µg der Gesamt-mRNA) in den unterschiedlichen Regionen der ischämischen Herzen. Die Herzen 5 und 6 weisen geringere Werte, als die ersten vier auf. Statistisch konnten keine regionalen Unterschiede in der Expression der GLUT3 mRNA in den verschiedenen Regionen festgestellt werden.

**Tabelle 21: Regionale Verteilung der GLUT3 mRNA im ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 1	Herz 2	Herz 3	Herz 4	Herz 5	Herz 6
Remote epi (LV)	1,18±0,24	3,30±0,58	2,16±0,63	4,12±1,10	0,18±0,07	0,5±0,21
Remote endo (LV)	2,13±0,48	0,82±0,16	1,01±0,25	1,44±0,14	0,08±0,02	0,2±0,06
fasted mismatch epi (LAD)	3,96±0,89	-----	3,62±1,07	-----	0,15±0,04	0,18±0,05
fasted mismatch endo (LAD)	4,56±0,63	-----	3,88±0,90	-----	0,20±0,04	0,24±0,09
p. insulin mismatch epi (LAD)	0,92±0,19	-----	-----	0,88±0,23	0,15±0,05	-----
p.insulin mismatch endo (LAD)	0,96±0,015	-----	-----	0,69±0,03	0,13±0,05	-----
match epi (LAD)	-----	7,28±1,68	-----	-----	0,59±0,18	0,23±0,02
match endo (LAD)	-----	4,46±0,88	-----	-----	0,92±0,22	0,68±0,04
Rechter Ventrikel (Kontrolle)	0,56±0,11	0,98±0,21	1,98±0,56	0,93±0,15	0,48±0,06	-----
linkes Atrium (Kontrolle)	0,98±0,19	0,79±0,29	1,16±0,48	-----	0,98±0,2	-----
rechtes Atrium (Kontrolle)	0,63±0,25	0,61±0,23	1,38±0,53	-----	1,49±0,29	-----

----- nicht bestimmt / epi = epikardial, endo = endokardial / LV = linker Ventrikel  
 LAD = left anterior descending artery/ p. = post **Alle Meßwerte \*10<sup>3</sup>**

#### 4.2.4.3. GLUT4 mRNA

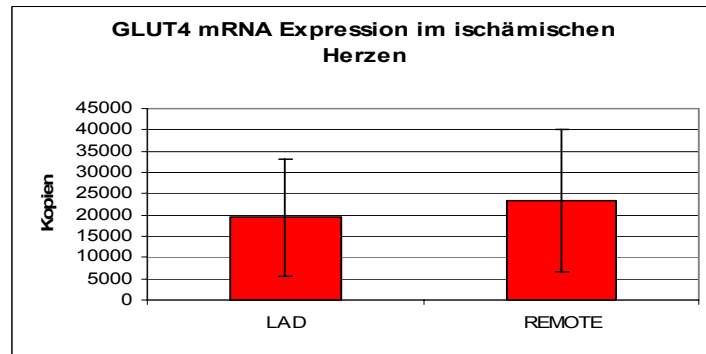
Die Tabelle 22 zeigt die absolute GLUT4 mRNA Expression (pro µg der Gesamt-mRNA) in den unterschiedlichen Regionen der ischämischen Herzen. Die Herzen 4 – 6 weisen, wie auch schon bei der GLUT1 mRNA, geringere Werte auf. Statistisch konnten zwischen den einzelnen Regionen kein Unterschied festgestellt werden. Der MW der REMOTE Regionen aller Herzen beträgt 23291,23 Kopien, die der LAD Regionen 19437,45 Kopien. Die Werte der Kontrollregionen RV (MW: 23628,30) und Atrien (MW: 25514,49) gleichen, wie auch in den nicht – ischämischen Herzen, denen des LV.

**Tabelle 22: Regionale Verteilung der GLUT4 mRNA im ischämischen Herzen**

Regionen:	Herz 1	Herz 2	Herz 3	Herz 4	Herz 5	Herz 6
Remote epi (LV)	25,49±4,2	79,65±20,17	31,32±5,55	6,89±0,54	8,13±0,24	24,64±4,54
Remote endo (LV)	42,03±7,9	20,09±7,26	17,74±3,56	5,12±0,98	6,01±0,3	14,28±3,21
fasted mismatch epi (LAD)	45,76±9,38	-----	40,52±8,7	-----	6,7±0,27	9,92±1,65
fasted mismatch endo (LAD)	32,69±4,45	-----	47,96±10,45	-----	4,96±0,32	11,52±2,92
p. insulin mismatch epi (LAD)	25,84±6,32	-----	-----	6,12±0,69	5,74±0,15	-----
p.insulin mismatch endo (LAD)	23,15±6,88	-----	-----	4,58±0,28	6,84±0,61	-----
match epi (LAD)	-----	276,9±137,1	-----	-----	18,35±3,67	17,74±5,78
match endo (LAD)	-----	150,7±90,42	-----	-----	16,47±2,09	17,24±5,24
Rechter Ventrikel (Kontrolle)	15,42±3,18	33,25±11,23	29,58±3,62	2,92±0,28	36,97±3,30	-----
linkes Atrium (Kontrolle)	23,83±7,25	17,28±4,69	34,23±3,96	-----	20,47±3,74	-----
rechtes Atrium (Kontrolle)	18,97±7,23	17,19±4,33	22,24±3,07	-----	49,91±11,20	-----

----- nicht bestimmt / epi = epikardial, endo = endokardial / LV = linker Ventrikel  
LAD = left anterior descending artery/ p.= post

Alle Meßwerte \*10<sup>3</sup>



**Abb. 23: Expression der GLUT4 mRNA im ischämischen Herzen**  
**LAD = Bereich des Versorgungsgebiets der linken Koronararterie**  
**(Anzahl der untersuchten Proben: n = 20)**  
**REMOTE = Kontrollregion im linken Ventrikel (n =12)**

#### 4.2.4.4. GLUT1/GLUT4 Verhältnis

Tabelle 23 zeigt das GLUT1/ GLUT4 Verhältnis der mRNA Expression (pro  $\mu\text{g}$  der Gesamt - mRNA) in den unterschiedlichen Regionen der ischämischen Herzen. Die dominante Ausprägung der GLUT4 mRNA ist in jedem Herz zu sehen (Werte < 1). Im Gegensatz zu den nicht – ischämischen Herzen, bei denen der MW des LV 0,27 beträgt, kann bei den ischämischen Tieren im Bereich der LAD ein MW von 0,64 gemessen werden. In der REMOTE Region beträgt der MW 0,22, im RV 0,21 und in den Atrien 0,16. Diese Daten zeigen erneut die signifikante Expressionssteigerung der GLUT1 mRNA im Versorgungsgebiet der LAD ( $p < 0,05$ )

Tabelle 23: GLUT1/GLUT4 mRNA Verhältnis im ischämischen Herzen

Regionen:	Herz 1	Herz 2	Herz 3	Herz 4	Herz 5	Herz 6
Remote epi (LV)	0,13	0,12	0,31	0,37	0,18	0,01
Remote endo (LV)	0,29	0,17	0,25	0,38	0,20	0,10
fasted mismatch epi (LAD)	0,88	-----	0,31	-----	0,30	0,05
fasted mismatch endo (LAD)	0,91	-----	0,43	-----	0,67	0,17
p. insulin mismatch epi (LAD)	0,26	-----	-----	1,0	0,73	-----
p.insulin mismatch endo (LAD)	0,26	-----	-----	1,36	0,50	-----
match epi (LAD)	-----	0,09	-----	-----	0,55	0,09
match endo (LAD)	-----	0,13	-----	-----	0,87	0,42
Rechter Ventrikel (Kontrolle)	0,15	0,11	0,27	0,40	0,11	-----
linkes Atrium (Kontrolle)	0,18	0,09	0,13	-----	0,15	-----
rechtes Atrium (Kontrolle)	0,12	0,24	0,28	-----	0,10	-----

----- nicht bestimmt / epi = epikardial, endo = endokardial / LV = linker Ventrikel

LAD = left anterior descending artery/ p.= pos

## 5. Diskussion

### 5.1. Einleitung

Eine wichtige Überlebensstrategie des Herzens in ischämischen Situationen, ist das Phänomen des „hibernating“ Myokards. Welche pathophysiologischen Vorgänge in solchen chronisch dysfunktionalen Herzen stattfinden, ist jedoch bislang nicht zufriedenstellend geklärt. In PET Untersuchungen wurde in den minderdurchbluteten Arealen eine Steigerung des Glukosemetabolismus festgestellt, was auf noch vitales Gewebe schließen läßt (Marshall et al. 1989, Kalff et al. 1992). Diese Beobachtungen gaben den Anlaß, in Schweineherzen modellhaft chronische Ischämie zu simulieren und in dem unterperfundierten, sowie umliegenden Gewebe nach einem Zusammenhang zwischen der gesteigerten Glukoseaufnahme der Zellen und einer möglicherweise veränderten Expression der Glukosetransporter Isoformen GLUT1, GLUT3, GLUT4 oder der Hexokinase II zu suchen.

### 5.2. Überlegungen zum Tiermodell

Die hauptsächliche Problematik bei der Erforschung eines derart komplexen klinischen Syndroms wie dem hibernating Myokard ist darin zu sehen, diese Situation in einem Tiermodell überzeugend simulieren zu können.

Das Schwein wird als Versuchstier zur Erforschung von Herzerkrankungen, aufgrund der zum Menschen ähnlichen koronaren Gefäßanatomie und Herzphysiologie, von vielen Gruppen bevorzugt (Chen et al. 1997; Fallavollita et al. 1997, 2003; St. Louis et al. 2000; McFalls et al. 2002, 2003).

Im Gegensatz zu anderen Spezies, existiert bei Schweinen eine nur schwache Veranlagung zur Ausbildung von Kollateralgefäßen im Bereich des koronaren Gefäßsystems. Ein experimenteller Verschuß der LAD führt demnach, je nach Grad der Stenose, zu einer Ischämie bzw. Infarkt in den unterperfundierten Myokardabschnitten. Auch kommt es nach einer länger andauernden Ischämie kaum zur Ausbildung neuer Gefäßstrukturen, die zur Versorgung der hypoxisch geschädigten Areale führen könnten (Schaper 1995). Selbst bei den in der vorliegenden Studie eingesetzten juvenilen, sich im Wachstum befindenden



Tieren, konnte angiographisch lediglich eine geringgradige Kollateralgefäßbildung beobachtet werden. Schaper und Mitarbeiter (1967) beschreiben jedoch, dass sich bei Schweinen und Menschen, kleine endomurale und subendokardiale Kollateralgefäße ausbilden können, die angiographisch nicht darstellbar sind. Im Rahmen der histologischen Untersuchung der Herzen der vorliegenden Studie, konnte in einigen Schnitten ein erhöhter Gehalt an Myofibroblasten festgestellt werde, was unter anderem für eine vermehrte Gefäßneubildung spricht (Nimz 2004). Diese Ergebnisse zeigen auch, dass es zwischen den einzelnen Versuchstieren interindividuelle Unterschiede gab, die vermutlich einerseits durch den unterschiedlichen Grad der Stenose innerhalb der LAD, andererseits aber auch durch die individuelle Anatomie des koronaren Gefäßsystems zu erklären sind. Zwar wurde mit dem eingesetzten Stent ein initialer Stenosegrad von etwa 75% bei allen Tieren erreicht, doch konnte der Zeitraum bis zu einem vollständigen Verschluss des Gefäßes, der zwischen 7 und 28 Tagen oder höher lag, nicht genau gesteuert werden. In der vorliegenden Studie wurde im Rahmen der pathologisch-anatomischen Untersuchungen bei zwei der frühzeitig verstorbenen Tiere ein massiver Infarkt im Bereich der LAD als Todesursache diagnostiziert (Nimz 2004).

Ein alternatives Tiermodell zur Erforschung einer chronischen myokardialen Ischämie wäre das sogenannte „Ameroid-Konstriktor-Modell“. Durch die Absorption von Wasser und dem daraus folgenden Aufquellen des Konstriktors, kommt es innerhalb von 14 bis 30 Tagen zu einem vollständigen Verschluss des Gefäßes. Eine Limitation dieses Modells ist jedoch auch hier darin zu sehen, dass einerseits der Grad der Stenose nicht kontrolliert werden kann und zudem eine vermehrte epikardiale Kollateralbildung zu beobachten ist. Letztere verhindert wiederum die Entwicklung eines „Perfusions-Metabolismus-Mismatch“, wie es im humanen hibernating Myokard gefunden werden kann (St. Louise et al. 2000). Andere Gruppen verwenden hydraulische Okkluder, mit deren Hilfe es möglich ist, den Verschluss des Gefäß extern zu steuern (St. Louise et al. 2000; McFalls et al. 2002). Obwohl dadurch der Grad der koronaren Stenose gut kontrolliert und auch über einen längeren Zeitraum aufrecht gehalten werden kann, spricht der massive chirurgische Eingriff (Thorakotomie) und die damit verbundenen Schmerzen, aus tierschutzrechtlichen Gründen gegen den längerfristigen Einsatz dieser Technik.

### 5.3. Überlegungen zu den nicht-ischämischen Herzen

Bei der Untersuchung und Beurteilung myokardialer Biopsien, die im Rahmen chirurgischer Eingriffe gewonnen werden, wird oftmals vorausgesetzt, dass diese Proben repräsentativ für das gesamte Herz anzusehen sind. Es stellt sich jedoch unweigerlich die Frage, ob innerhalb der verschiedenen strukturellen und funktionellen Regionen des Herzens nicht doch auch eine variable Expression der Untersuchungsparameter vorliegt.

In einer Studie von Kuribayashi und Mitarbeiter (1986) konnte festgestellt werden, dass es unter dem Einfluß von Schilddrüsenhormonen zu einer Hypertrophie der Kardiomyozyten im Rattenherzen kommt, die verstärkt im rechten Ventrikel zu beobachten ist. Innerhalb des linken Ventrikels vergrößern sich dagegen primär die epimyokardialen Zellen. Eine andere Arbeit, die die regionale Verteilung verschiedener Proteine im humanen Myokard untersuchte, führte zu dem Erkenntnis, dass trotz einer enormen individuellen Expressionsvariabilität der Untersuchungsparameter, zwischen den verschiedenen anatomischen Strukturen dennoch ein bestimmtes Verteilungsmuster identifizierbar ist (Sharma et al. 2003).

Um die Veränderungen der GLUT bzw. Hexokinase Expression innerhalb verschiedener Areale im chronisch-ischämischen Schweineherzen besser beurteilen zu können, war es deshalb notwendig, die natürliche Variabilität der Untersuchungsparameter im normal perfundierten Herzen zu untersuchen. Dazu wurden, der Ischämie-Studie entsprechend, Schweine (n=6) der dt. Landrasse verwendet.

Tatsächlich konnten zwischen den verschiedenen anatomischen Strukturen des normalperfundierten Myokards signifikante Unterschiede der Protein bzw. mRNA Expression gefunden werden.

Im Rahmen der relativen Proteinquantifizierung wurde in den untersuchten Proben mehr GLUT1 Protein im linken, als im rechten Ventrikel festgestellt. Insgesamt waren die Meßdaten beider Ventrikel, im Vergleich zu den Atrien erhöht. Eine erhöhte Expression der GLUT1 mRNA konnte dagegen nur im linken Ventrikel, gegenüber den Atrien beobachtet werden. Signifikante Unterschiede innerhalb des

linken Ventrikels, wurden weder für das GLUT1 Protein, noch für die mRNA gemessen.

Brosius et al. (1997a) konnten in ihrer Studie, bei der der Einfluß einer 6 stündigen Ischämie auf die Expression der GLUT untersucht wurde, ebenfalls keine regionalen Expressionsunterschiede von GLUT1 (Protein, mRNA), innerhalb des linken Ventrikels der normal perfundierten Kontrollherzen feststellen. Auch Sharma et al. (2003) fanden in ihren Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen der GLUT1 mRNA Expression innerhalb des linken Ventrikels humaner, bzw. Rattenherzen. Im Gegensatz zu der genannten Studie von Brosius untersuchten sie aber noch weitere myokardiale Strukturen. Innerhalb des rechten Ventrikels der humanen Herzen war die Expression der GLUT1 mRNA in ihrer Studie gesteigert. Dieses Ergebnis bestätigte sich allerdings nicht bei der regionalen Untersuchung der Rattenherzen. Eine mögliche Erklärung ist darin zu sehen, dass die humanen Herzen aus einem Patientenpool (n=7) stammten, der anamnetisch zu 57% an einer Hypertension litt, zwei der Patienten starben in direkter Folge eines Herzinfarkt. Intrazelluläre Veränderungen der Myozyten des rechten Ventrikels, die zu einer Erhöhung der GLUT1 mRNA in dieser Region führten, können deshalb nicht ausgeschlossen werden. Innerhalb der Atrien war das GLUT1 Transkript beider untersuchten Spezies (Mensch, Ratte), signifikant reduziert. Dieses Ergebnis stimmt mit dem der vorliegenden Studie überein. Schon bei der Membranpräparation im Rahmen der Proteinanalyse konnte ein struktureller Unterschied zwischen diesen beiden unterschiedlichen Regionen beobachtet werden. Mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die atrialen Myozyten im Vergleich zu den ventrikulären einerseits kürzer, andererseits aber auch im Durchmesser verringert sind. Außerdem weisen sie weniger T-Tubuli und Mitochondrien auf (Olsen 1980). Die Arbeitsgruppe von Sharma (2003) vermutet, dass die verringerte Expression von GLUT1 (mRNA) in den Atrien entweder darauf zurückzuführen ist, dass in dieser Region generell der Gehalt an Muskelfasern pro Gramm Gewebe reduziert ist, oder aber die Veränderung auf der Ebene der Transkriptionsrate zu suchen ist.

Die weiter untersuchten Parameter der vorliegenden Studie: GLUT3 (mRNA), GLUT4 (Protein, mRNA), Hexokinase II (Protein) lassen kein unterschiedliches regionales Verteilungsmuster innerhalb der Schweineherzen erkennen.

In der schon erwähnten Studie von Brosius (1997a) wurde ebenfalls die regionale Verteilung von GLUT4 (Protein/mRNA) in den normalperfundierten Herzen untersucht. Wie auch schon für GLUT1, konnten innerhalb des linken Ventrikels keine signifikanten Expressionsunterschiede festgestellt werden.

GLUT3 ist die dominierende Isoform der GLUT in den Zellen des adulten Gehirnparenchyms (Mueckler 1994). Über die Expression des Transporters im Myokard ist in der Literatur bislang noch wenig beschrieben (Grover-McKay et al. 1999). Deshalb ist der Nachweis des GLUT3 Transkripts im Schweineherzen ein interessantes Ergebnis dieser Studie. Es bleibt jedoch die Frage, ob und in welcher Ausprägung das GLUT3 Protein im Schweinemyokard tatsächlich existiert. Ursächlich für den mangelhaften Nachweis des Proteins in dieser Studie, könnte zum einen eine unzureichende Bindung des spezifischen Antikörpers, oder aber auch ein tatsächliches Fehlen der Proteinexpression im Herzen sein.

Schlussfolgerung:

Die Untersuchungen am nicht-ischämischen Herzen demonstrieren, dass Gewebeproben, die in bestimmten Regionen des Herzens gewonnen wurden, nicht immer repräsentativ für das gesamte Myokard anzusehen sind. Bei der Beurteilung dieser Proben sollte deshalb immer die genaue Lokalisation der Entnahmestelle beschrieben und nach Möglichkeit mehrere Vergleichsproben genommen werden.

### **5.4. Überlegungen zu den ischämischen Herzen**

Wie schon unter 5.2. erwähnt wurde, gestaltete es sich als äußerst schwierig, eine chronische Ischämie im vergleichbaren Maßstab in den einzelnen Versuchstieren zu reproduzieren. Aufgrund der interindividuell auftretenden Unterschiede primär im Bereich des Koronargefäßsystem, war der Grad der LAD Stenose variabel (90 - 100%). In der darauffolgenden PET Untersuchung konnte ebenfalls kein einheitliches Bild eines hibernating Myokards mit dem Auftreten einer „mismatch“ oder „match“ Region bei jedem Tier festgestellt werden. Die Ergebnisse

fokussieren deshalb die Veränderungen, die im gesamten Versorgungsgebiet der LAD stattgefunden haben.

Die zugrunde liegende Frage der Studie war, ob die im PET gemessene erhöhte Aufnahme des Glukoseanaloges  $^{18}\text{F}$ FDG in ischämische Herzregionen durch Veränderungen auf der Ebene des Glukosetransports oder des weiteren intrazellulären Metabolismus zu erklären ist.

Die Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, dass:

- dem im Herzen zweitwichtigsten Glukosetransporter **GLUT1** eine dominierende Rolle im Transport der Glukose unter diesen Bedingungen zuzusprechen ist. Im Versorgungsgebiet der LAD konnte eine signifikante Erhöhung des GLUT1 Protein, sowie der mRNA, im Vergleich zur REMOTE Region festgestellt werden. In den anderen untersuchten Kontrollregionen (rechter Ventrikel, Atrien) wurden dagegen keine Veränderungen beobachtet.
- der wichtigste myokardiale Glukosetransporter **GLUT4** unter diesen Versuchsbedingungen eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Im Bereich der LAD war der Proteingehalt geringgradig, aber nicht signifikant verringert. Jedoch konnte diese Reduktion auf der Ebene der mRNA nicht gemessen werden.

In welchem Maße sich **GLUT3** an dem erhöhten Glukosetransport beteiligt, bleibt nach wie vor fraglich. Auf der Ebene der mRNA konnten keine regionalen Expressionsunterschiede gemessen werden. Auch ist noch nicht geklärt, ob das Protein im Schweinemyokard tatsächlich existiert.

Die vermehrte  $^{18}\text{F}$ FDG Aufnahme scheint ebenfalls nicht durch eine Änderung der **Hexokinase II** Protein Expression begründet zu sein.

Welche Schlussfolgerung können aus diesen Ergebnissen gezogen werden?

Schon in den ersten Untersuchungen von Patienten, bei denen ein „hibernating“ Myokard diagnostiziert wurde, konnte eine Erhöhung des GLUT1 Transkripts in den ischämisch beeinträchtigten Herzregionen nachgewiesen werden (Schwaiger et al. 1994). Die histologische Untersuchung ähnlicher Myokardabschnitte hat gezeigt, dass die Zellen strukturell verändert sind und einen erhöhten Gehalt an

Glykogen aufweisen (Borgers et al. 1993; Vanoverschelde et al. 1993; Ausma et al. 1996, Elsässer et al. 1997). Auch in der vorliegenden Studie konnte durch die histologischen Untersuchung der Biopsien der LAD Regionen eine erhöhte Speicherung von Glykogen nachgewiesen werden (Nimz 2004). Die Vermutung liegt also nahe, dass GLUT1 für die gesteigerte Glukoseutilisation und Glykogenspeicherung in chronisch ischämischen Myokardregionen verantwortlich sein könnte. Immunhistologische Untersuchungen humaner Herzbiopsien aus hibernating Regionen, deuten auf einen Anstieg des GLUT1 Protein in humanen Herzbiopsien hin (Brosius et al. 1997b). Die Ergebnisse vieler anderer Studien unterstützen die Hypothese, dass GLUT1 eine spezielle Funktion als „stress-induziertes Protein“ einnimmt. In der mehrfach zitierten Arbeit von Brosius et al. (1997a) konnte ein Anstieg des GLUT1 Transkripts im gesamten Myokard beobachtet werden. Die Erhöhung war nicht, wie in der vorliegenden Studie auf die ischämisch beeinträchtigte Region beschränkt. Jedoch ist der direkte Vergleich der Ergebnisse schwierig, da erstens ein anderes Tiermodell gewählt wurde (Hund statt Schein) und zweitens die Zeitspanne der Ischämie nur 6 Stunden (statt 28 Tage) betrug. Dennoch vertritt auch Brosius die Meinung, dass die Erhöhung der GLUT1 mRNA nicht nur durch den chirurgische Eingriff, oder die Anästhesie allein zu erklären ist, sondern der Einfluß der Ischämie eine wichtige Rolle zu spielen scheint. Möglicherweise kommt es durch die langsamere Entwicklung der Ischämie in unserer Studie zu einer regional begrenzten Erhöhung von GLUT1. Eine ähnliche Untersuchung an ischämischen Schweineherzen wurde von Feldhaus und Liedtke (1998) durchgeführt. Auch sie fanden gesteigerte Meßwerte für GLUT1 mRNA in den unterperfundierten Herzregionen. Problematisch an dieser Studie ist jedoch, dass die unterschiedlichen Versuchsbedingungen (zwischen 40 min. bis 4 Tage Ischämie/±Reperfusion) immer nur an einem exemplarischen Tier getestet wurden, eine statistische Auswertung deshalb nicht möglich war.

Die Hypothese, dass dem GLUT1 eine wichtige Schutzfunktion im Herzen zuzusprechen ist, konnte durch eine Studie an transgenen Mäusen allerdings erneut bestätigt werden. Durch eine Überexpression von GLUT1 in den Kardiomyozyten dieser Tiere, kommt es zu einer vermehrten Aufnahme von Glukose und zur verstärkten Glykolyse. Nach experimenteller Induktion einer kardialen Hypertrophie, konnte in diesen Tieren im Vergleich zu den

Wildtypmäusen, eine bessere linksventrikuläre Funktion, ein höheres Phosphokreatin/ATP Verhältnis und eine signifikant geringere Mortalität beobachtet werden (Liao et al. 2002).

In einer Untersuchung von Malhotra und Kollegen (2002) wurde der Einfluß von Hypoxie auf kultivierte Rattenkardiomyozyten überprüft. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Expression des Transkriptionsfaktors: Hypoxie-induzierter-Faktor 1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) nach achtstündiger Hypoxie rapide gesteigert wurde. Nach Zugabe von Glukose zum Zellkulturmedium verringerte sich der Gehalt an HIF-1 $\alpha$  um fast 50 %. Durch die adenovirale Infektion der Kulturen mit GLUT1 und nachfolgender 24-stündiger Hypoxie, konnte die Proteinexpression des HIF-1 $\alpha$  ebenfalls signifikant reduziert werden. Die GLUT1 überexprimierenden Zellkulturen wiesen außerdem eine geringere Anzahl apoptotischer Zellen auf. Wie schon in früheren Studien festgestellt wurde, wird die durch Hypoxie verursachte Apoptose der Zellen unter anderem durch eine vermehrte Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induziert (Malhotra und Brosius 1999; Moissac et al 2000). Ohne den Zusatz von Glukose im Medium, konnten die GLUT1 überexprimierenden Zellen die Freisetzung von Cytochrom c nicht länger verhindern. Dieses Ergebnis bestätigt erneut die Vermutung, dass die protektive Rolle des GLUT1 in der gesteigerten Aufnahme der Glukose und deren weiteren Metabolismus zu suchen ist. Im Gegensatz zur obigen genannten Studie machten Morissette und seine Kollegen (2003) in ihren Versuchen an neonatalen Kardiomyozyten eine interessante Beobachtung. Zwar konnten sie ebenfalls einen Anstieg von GLUT1 unter dem Einfluß hypertropher Substanzen beobachten, doch stellten sie fest, dass der protektive Effekt der GLUT1 Überexpression unabhängig vom extrazellulären Glukosespiegel war. Sie folgerten daraus, dass GLUT1 neben der Rolle als Glukosetransporter, additive Funktionen im Adaptionsmechanismus der Kardiomyozyten zu erfüllen hat. Sie vermuteten weiter, dass GLUT1 mit Signalmolekülen interagiert, die zu einer Phosphorylierung der „Serine-Threonin-Kinase Akt“ führen. Durch die Aktivierung der Akt kommt es zu einer Erhöhung der kardialen Glykogenspeicher, zur Reduktion des Zelltods und zur Induktion einer kardialen Hypertrophie (Cook et al. 2002; Matsui et al. 2002). Auch wenn der direkte Zusammenhang zwischen der erhöhten GLUT1 Expression und der Aktivierung der Akt derzeit noch spekulativ ist, könnten dadurch doch zelluläre Signalwege erklärt werden, bei denen es durch die

Aufnahme von Glukose und deren Metabolismus zu einer verstärkten Akt Aktivierung und damit zur Protektion der Zellen kommt (Gottlob et al. 2001).

Die signifikant gesteigerte Expression der GLUT1 mRNA in den ischämischen Arealen der Schweineherzen konnte durch die Bildung des GLUT1/GLUT4 Verhältnisses bestätigt werden. Zwar lagen die Werte durchweg in allen Regionen unter 1, was die Dominanz des GLUT4 Transkripts im adulten Herzen bestätigt, doch konnte in den ischämischen LAD Regionen ein fast 2,5 facher Anstieg des Verhältnisses im Vergleich zur REMOTE Region festgestellt werden. In den nicht-ischämischen Herzen lag das GLUT1/GLUT4 Verhältnis innerhalb des linken Ventrikels dagegen durchweg im Bereich der Werte der REMOTE Region.

Im Gegensatz zu den GLUT1 Ergebnissen, konnten auf der Ebene von GLUT4 keine signifikanten Veränderungen zwischen den untersuchten Herzregionen beobachtet werden. Schon McFalls et al. (2002) fanden in ihrer Studie keine veränderten GLUT4 Protein Meßwerte nach repetitiver 10 minütiger Ischämie im Schweineherzen (2x tägl., 4 Tage lang). Durch immunohistochemische Untersuchungen der Proben konnte ebenfalls keine verstärkte Translokation des GLUT4 Transporters auf die Plasmamembranen der Kardiomyozyten beobachtet werden. Es wurde deshalb vermutet, dass es trotz eines „normalen“ Gehalts an GLUT4 innerhalb der Zelle, durch die Reduktion von Thiolgruppen zu einer Aktivitätserhöhung des Transportes und nachfolgender verstärkter Glukoseaufnahme in die Zelle kommen kann. Interessanterweise hatte die Gruppe jedoch Probleme, den GLUT1 Proteingehalt der Proben zu bestimmen. Deshalb wurde der Aspekt, dass eine gesteigerte GLUT1 Expression ursächlich für die erhöhte Glukoseaufnahme sein könnte, in ihre Überlegungen nicht mit einbezogen. Generell ist es doch schwierig die Ergebnisse dieser Studie mit der vorliegenden direkt zu vergleichen, da die Dauer und Ausprägung der Ischämie unterschiedlich waren. In der schon zitierten Untersuchung von Feldhaus und Liedtke (1998) wurden ebenfalls keine Veränderungen des GLUT4 mRNA Gehalts in den ischämischen Regionen nach 40 min. Ischämie, bei einer Blutflußreduktion von 60% beobachtet. Bei ihrem 4 täg. „hibernating Myokard“ Modell konnte eine leichte Reduktion der GLUT4 Transkript Daten festgestellt werden, welche jedoch nicht signifikant war. Dennoch erscheint es schwierig die Ergebnisse der Studie



mit denen der vorliegenden zu vergleichen, da einerseits Grad und Dauer der Ischämie verschieden waren und die Versuchsansätze jeweils nur an einem Tier getestet wurden. Eine Studie von Rosenblatt-Velin et al. (2001) untersuchte welchen Einfluß die Ligation der LAD auf die Expression der GLUT im Rattenherzen hat. Sie wiesen nach, dass GLUT4 (Protein/mRNA) nach 24 h in den unterperfundierten Arealen verringert war. Nach 8 Wochen konnte diese Reduktion jedoch nicht mehr beobachtet werden. Obwohl das Tiermodell verschieden ist, ist das Resultat für die vorliegende Studie interessant. Möglicherweise werden bei einer länger andauernden Ischämie kompensatorische Mechanismen innerhalb der Zelle aktiviert, die zu einer Erholung der GLUT4 Expression führen, die zuerst auf der mRNA und im weiteren Verlauf auch auf der Protein-Ebene festzustellen ist.

Wie bekannt ist, arbeitet das fetale Herz unter hypoxischen Bedingungen und gewinnt seine Energie durch den Metabolismus von Glukose (Lee et al. 2004, Joyner und Smoak 2004). Wie weiterhin bekannt ist, ist GLUT1 im fetalen Herzen der dominierende Glukosetransporter (Heilig et al. 2003; Joyner und Smoak 2004). Eine Erhöhung von GLUT1 während ischämischen Phasen könnte deshalb möglicherweise dadurch erklärt werden, dass zelluläre Strategien reaktiviert werden, die auch im fetalen Myokard beobachtet werden können (Depre et al. 1999). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Proben auf ihren Gehalt an GLUT3 mRNA kontrolliert. GLUT3 ist der dominierende GLUT in den Zellen des adulten Gehirnparenchyms (Mueckler 1994). Der Transporter kann aber auch im Myokard nachgewiesen werden, wobei er hier vor allem eine wichtige Aufgabe während der fetalen Entwicklung des Herzens zu erfüllen scheint (Glover-McKay et al. 1999). In der vorliegenden Untersuchung wurden jedoch regional keine Veränderungen der Expression der GLUT3 mRNA festgestellt, eine Reaktivierung der fetalen Mechanismen ist demnach eher unwahrscheinlich. Auch bleibt die Frage unbeantwortet, ob und wenn ja in welchem Maße das GLUT3 Protein tatsächlich im Schweinemyokard existiert. Schon Feldhaus und Liedtke (1998) schrieben, dass Ereignisse die auf der Ebene der Transkription zu beobachten sind, nicht notwendigerweise auch auf dem Level der Gen-Translation stattfinden müssen.

Als weitere Ursache für die Erhöhung des Glukosemetabolismus in chronisch-ischämischen Herzregionen, wurde eine vermehrte Expression der Hexokinase, dem Schlüsselenzym der Glykolyse diskutiert. Durch die Hexokinase wird die in die Zelle aufgenommene Glukose zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt, ein Produkt das entweder als Glykogen gespeichert, oder im Rahmen der Energiegewinnung weiter metabolisiert wird.

In der vorliegenden Studie konnte innerhalb der verschiedenen Areale der ischämischen Herzen keine Veränderung der Proteinexpression des Enzyms festgestellt werden. Welche Veränderungen sich auf der Ebene der Transkription ergeben haben, konnte nicht untersucht werden, da zum Zeitpunkt der Studie die Nukleotidsequenz der Hexokinase II vom Schweine nicht bekannt war.

Bisher ist in der Literatur wenig über die Expression der Hexokinase II während ischämischen Phasen beschrieben. McFalls und seine Kollegen (2002) konnten in ihrer Untersuchung nach repetitiver Ischämie einen Anstieg der Enzymaktivität messen. Eine andere Gruppe wies nach experimenteller Induktion einer Hypertrophie in einen Zeitraum von 30-45 Tagen eine Steigerung der Hexokinaseaktivität um 26 % nach (Do et al. 1997). Diese Untersuchungen beschreiben jedoch jeweils die Aktivität des Enzyms, nicht seine Expression.

In der schon mehrfach erwähnten Arbeit von Feldhaus und Liedtke (1998) zeigt sich, dass das Transkript der Hexokinase nach einer 40 minütigen Ischämie, hervorgerufen durch eine 60% Perfusionsreduktion der LAD, geringfügig aber doch signifikant erhöht war. In derselben Studie konnte jedoch nach einer Reperfusionphase kein Anstieg des Enzymgehalts mehr festgestellt werden.

Eine andere Forschungsgruppe verwendete in ihren Versuchen ein Mäusemodell, das GLUT1 und Hexokinase II in der Skelettmuskulatur überexprimierte. Sie fanden heraus, dass die alleinige Überexpression der Hexokinase im isolierten Muskel keinen Effekt auf den Glukosetransport bzw. den weiteren Metabolismus auszuüben scheint (Hansen et al. 2000).

Die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchungen lassen vermuten, dass die beobachtete verstärkte Glukoseaufnahme der chronisch ischämischen Regionen primär durch eine Überexpression von GLUT1 reguliert wird. Nichtsdestotrotz muß jedoch in diesem Zusammenhang beachtet werden, dass gerade in ischämischen

Phasen, multiple und komplexe Prozesse innerhalb der Kardiomyozyten ablaufen. Es ist daher unwahrscheinlich, dass diese Vorgänge alleine durch eine einzige spezifische Veränderung erklärt werden können. Trotzdem kann postuliert werden, dass in der Überexpression von GLUT1 ein wichtiger Ansatzpunkt für die zukünftigen Erforschung und Therapie des chronisch dysfunktionalen Myokards zu sehen ist.

## 6. Zusammenfassung

**Hintergrund:** In ischämisch geschädigten Regionen des Herzens, konnte mit Hilfe der Positronen Emissions Tomographie (PET) eine erhöhte Aufnahme des Glukoseanaloges Fluor-18-Deoxyglukose ( $^{18}\text{F}$ FDG) bei gleichzeitig verminderter Durchblutung festgestellt werden. Diese Beobachtung weist auf noch vitales Gewebe mit verändertem Glukosemetabolismus hin und ist Ausdruck einer Stoffwechseladaption an diese besondere Situation. Ziel der Studie war es festzustellen, inwieweit eine erhöhte Expression der Glukosetransporter GLUT1, 3, 4, bzw. der Hexokinase (HK) ursächlicher (Teil-) Mechanismus für die beobachtete Steigerung der Glukoseaufnahme in die Herzmuskelzelle sein kann.

**Methoden:** Zur Überprüfung der Existenz einer natürlichen regionalen Variabilität der Untersuchungsparameter, wurde eine molekularbiologische Analyse zuerst am nicht-ischämischen Schweinemyokard durchgeführt. Die Herzen von geschlachteten Tieren (n=6) wurden in definierte epi- und endokardiale Regionen des linken und rechten Ventrikels, sowie den Atrien unterteilt. Der zweite Teil der Studie untersuchte die Veränderungen in chronisch ischämischen Herzen (n=6). Im tierexperimentellen Versuchsaufbau wurde dafür bei jungen Schweinen ein modifizierter Stent in die linke Koronararterie (LAD) implantiert, der zu einer initialen Stenose von 75% führte. Ziel war ein langsamer Fortschritt des Verschlusses mit kompletter Stenose nach Ende des Versuchszeitraums von 28 Tagen. Anschließend wurden klinische Untersuchungen mit Hilfe des PETs durchgeführt, die Tiere euthanasiert und die Herzen entnommen. Myokardiale Biopsien wurden aus Regionen gewonnen, in denen im PET eine erhöhte Glukoseaufnahme bei gleichzeitig reduzierter Perfusion festgestellt worden war („mismatch“), aus Arealen mit reduzierter Perfusion und normalem bzw. vermindertem Glukosestoffwechsel („match“), sowie aus Regionen ohne jegliche Veränderung (REMOTE). Die Gewebeproben wurden auf ihren Protein- und mRNA-Gehalt an GLUT1, 3, 4, sowie der Hexokinase II untersucht. Die Quantifizierung der Proteine erfolgte nach Anreicherung der Membranfraktionen, durch Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern und wurde bezogen auf einen intern mitgeführten Standard ausgewertet. mRNA wurde aus dem Gewebe extrahiert und die Kopienanzahl nach RT-PCR mit Hilfe der LightCycler Technik und spezifischen, fluoreszierenden Hybridisationsproben bestimmt.

**Ergebnisse:** Die Ergebnisse der nicht-ischämischen Herzen zeigen, dass innerhalb des linken Ventrikels keine regionalen Unterschiede der untersuchten Parameter nachzuweisen waren. Interessanterweise konnte dagegen im Bereich der Atrien eine deutliche Reduktion der GLUT1 Expression festgestellt werden.

In den ischämischen Herzen wurde innerhalb des Versorgungsgebietes der linken Koronararterie (LAD) eine signifikante Steigerung ( $p < 0,05$ ) des GLUT1 Protein ( $1,34 \pm 0,29$ ) im Gegensatz zur REMOTE Region beobachtet ( $0,89 \pm 0,3$ ). Durchschnittlich war die GLUT1 mRNA Kopienanzahl in der LAD Region 2,5-fach gegenüber der unveränderten REMOTE Region gesteigert ( $p < 0,05$ ). Das GLUT4 Protein war in den ischämischen Arealen geringgradig, jedoch nicht signifikant reduziert (LAD:  $1,04 \pm 0,52$  vs. REMOTE:  $1,46 \pm 0,48$ ). Die weiter untersuchten Parameter (GLUT3, HK) ließen, weder auf der Protein-, noch auf der mRNA Ebene, ein regional verändertes Verteilungsmuster innerhalb der ischämischen Herzen erkennen.

**Schlussfolgerung:** Die beobachtete Expressionssteigerung von GLUT1 läßt vermuten, dass diese Isoform der Glukosetransporter eine wichtige Funktion im gesteigerten Glukosemetabolismus und damit im Protektionsmechanismus der Kardiomyozyten in chronisch ischämischen Situationen zu erfüllen hat.

## 7. Summary

Melanie Stichel

### **Glucose transporter and hexokinase type II expression in normal and chronic ischemic myocardium of the pig**

**Background:** The use of Positronen Emissions Tomography in metabolic imaging studies has shown ischemically damaged but still viable myocardium to be characterized by an increase in glucose metabolism with a concomitant decrease in perfusion. Therefore, the purpose of this study was to determine if observed increases in glucose uptake in cardiomyocytes under the previously mentioned conditions can be at least part explained by changes in the expression of glucose transporter isoforms (GLUT1, 3, 4) or the enzyme hexokinase type II (HK).

**Methods:** In order to clarify whether a regional heterogeneity exists in the distribution pattern of the examined parameters, molecular analyses were done in normal pig myocardium (n=6). Therefore porcine hearts received from slaughterhouse were divided into defined epi- and endocardial regions of the left and right ventricle and the atria. The second part of the study examined the expressional changes in ischemically injured hearts (n=6). In order to produce chronic, regional ischemia experimentally in young pigs, a modified stent graft was implanted into the proximal left anterior descending artery (LAD), producing an initial stenosis of 75%. The stent graft was supposed to occlude slowly within 28 days. At the end of the study, clinical PET examinations were done. Thereafter the pigs were euthanized and the hearts immediately removed. Tissue samples were taken based on PET results in regions with increased glucose uptake and decreased blood flow ("mismatch"), in regions where glucose uptake was defined as normal, but perfusion was clearly reduced ("match") and in those no changes could be measured ("REMOTE"). Protein content (GLUT1, 4, HK) was quantified after producing membrane-enriched fractions followed by immunoblotting with specific antibodies related to an internal standard. Samples were subjected to mRNA extraction (GLUT1, 3, 4), followed by determination of copy numbers after RT-PCR using the LightCycler technique and specific fluorescent hybridisation probes.

**Results:** No regional differences could be observed in the expression of the examined parameters within the left ventricle of non-ischemic hearts. However, expression of GLUT1 was significantly reduced within the atria.

In regions supplied by LAD in ischemic hearts, a significant increase ( $p < 0,05$ ) of GLUT1 protein could be measured ( $1,34 \pm 0,29$ ) compared to REMOTE regions ( $0,89 \pm 0,3$ ). On average, GLUT1 mRNA copy numbers were increased 2.5-times in ischemic regions, compared to REMOTE regions ( $p < 0,05$ ). GLUT4 protein was slightly but not significantly decreased in ischemic affected parts of the hearts (LAD:  $1,04 \pm 0,52$  vs. REMOTE:  $1,46 \pm 0,48$ ). No regionally significant changes in mRNA or protein expression could be measured for GLUT3 or HK type II, respectively.

**Conclusion:** These findings support the hypothesis that GLUT1 plays an important role in glucose uptake and protection mechanism of myocytes in chronically ischemic injured myocardium.

## 8. Literaturverzeichnis

**Abel ED:** Glucose transport in the heart  
Frontiers in Bioscience 2004; 9:201-215

**Ausma J, Schaart G, Thone F:** Chronic ischemic viable myocardium in man: aspects of dedifferentiation  
Cardiovasc. Pathol. 1995a; 4:29-37

**Ausma J, Furst D, Thone F:** Molecular changes of titin in left ventricular dysfunction as a result of chronic hibernation  
J Mol. Cell. Cardiol. 1995b; 27:1203-1212

**Borgers M, Thone F, Wouters L, Ausma J, Shivalkar B, Flameng W:** Structural correlates of regional myocardial dysfunction in patients with critical coronary artery stenosis: chronic hibernation?  
Cardiovasc. Pathol. 1993; 2:237-245

**Brosius FC, Liu Y, Nguyen N, Sun D, Bartlett J, Schwaiger M:** Persistent myocardial ischemia increases GLUT1 glucose transporter expression in both ischemic and non-ischemic heart regions  
J Mol. Cell. Cardiol. 1997a; 29:1675-1685

**Brosius FC, Nguyen N, Egert S, Lin Z, Deeb M, Haas F, Schwaiger M, Sun DG:** Increased sarcolemmal glucose transporter abundance in myocardial ischemia  
Am. J Cardiol. 1997b; 80:77A-84A

**Camici PG, Wijns W, Borgers M, de Silva R, Ferrari R, Knuuti J, Lammertsma A, Liedtke J :** Pathophysiological mechanisms of chronic reversible left ventricular dysfunction due to coronary artery disease (hibernating myocardium)  
Circulation 1997; 96:3205-3214

**Cartee G, Douen A, Ramlal T:** Stimulation of glucose transporter in skeletal muscle by hypoxia  
J Appl. Physiol. 1991; 70:1593-1600

**Charron MJ, Katz EB, Olson AL:** GLUT4 gene regulation and manipulation  
J Biol. Chem. 1999; 274:3253-3256

**Chen C, Lijie MA, Linfert DR:** Myocardial cell death and apoptosis in hibernating myocardium  
J Am. Coll. Cardiol. 1997; 30:1407-1412

**Chomczynski P, Sacchi N:** Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction  
Anal. Biochem. 1987; 162:156-159



**Cook SA, Matsui T, Li L:** Transcriptional effects of chronic Akt activation in the heart  
J Biol. Chem. 2002; 277:22528-22533

**de Moissac D, Gurevich RM, Zheng H, Singal PK, Kirshenbaum LA:** Caspase activation and mitochondrial cytochrome c release during hypoxia-mediated apoptosis of adult ventricular myocytes  
J Mol. Cell Cardiol. 2000; 32:53-63

**Depre C, Vanoverschelde JL, Taegtmeyer H:** Glucose for the heart  
Circulation 1999; 99:578-588

**Diamond GA, Forrester JS, de Luz PL, Wyatt HL, Swan HJC:** Post-extrasystolic potentiation of ischemic myocardium by atrial stimulation  
J Am. Heart 1978; 95:204-209

**Do E, Baudet S, Verdys M:** Energy metabolism in normal and hypertrophied right ventricle of the ferret heart  
J Mol. Cell. Cardiol. 1997; 29:1903-1913

**Doege H, Bocianski A, Joost HJ:** Activity and genomic organization of human glucose transporter 9 (GLUT9), a novel member of the family of sugar-transport facilitators predominantly expressed in brain und leukocytes  
Biochem. J 2000; 350:771-776

**Doege H, Bocianski A, Scheppers A, Axer H, Eckel J:** Characterization of human glucose transporter (GLUT) 11 (encoded by SLC2A11), a novel sugar-transport facilitator specifically expressed in heart and skeletal muscle  
Biochem. J 2001; 359:443-449

**Doege H, Schurmann A, Bahrenberg A, Brauers A, Joost HG:** GLUT8, a novel member of the sugar transport facilitator family with glucose transport activity  
J Biol. Chem. 2000; 275:16275-16280

**Douen A, Ramlal T, Rastogi S:** Exercise induces recruitment of the "insulin-responsive glucose transporter"  
J Biol. Chem. 1990; 265:13427-13430

**Egert S, Nguyen N, Brosius FC, Schwaiger M:** Effects of wortmannin on insulin- and ischemia induced stimulation of GLUT4 translocation and FDG uptake in perfused rat hearts  
Cardiovasc. Res. 1997; 35:283-293

**Egert S, Nguyen N, Schwaiger M:** Contribution of  $\alpha$ -adrenergic and  $\beta$ -adrenergic stimulation to ischemia-induced glucose transporter (GLUT) 4 and 1 translocation in the isolated perfused rat heart  
Circ. Res. 1999a; 84:1407-1415

**Egert S, Nguyen N, Schwaiger M:** Myocardial glucose transporter GLUT1: Translocation induced by insulin and ischemia  
J Mol. Cell. Cardiol. 1999b; 31:1337-1344

**Egert S, Simoes MV, Reder S, Charron MJ, Schwaiger M:** Insulin-induced protein expression and translocation of myocardial glucose transporter in GLUT4 deficient mice, 2005 (in Vorb.)

**Elsässer A, Schlepper M, Klovekorn WP, Cai W, Zimmermann R, Müller KD, Strasser R, Kostin S, Gagel C, Schaper J:** Hibernating myocardium: an incomplete adaptation to ischemia  
Circulation 1997; 96:2920-2931

**Fallavollita JA, Perry BJ, Canty JM:** <sup>18</sup>F-2-Deoxyglucose deposition and regional flow in pigs with chronically dysfunctional myocardium: Evidence for transmural variations in chronic hibernating myocardium  
Circulation 1997; 95:1900-1909

**Fallavollita JA, Malm BJ, Canty JM:** Hibernating myocardium retains metabolic and contractile reserve despite regional reductions in flow, function, and oxygen consumption at rest  
Circ. Res. 2003; 92:48-64

**Feldhaus LM, Liedtke AJ:** mRNA expression of glycolytic enzymes and glucose transporter proteins in ischemic myocardium with and without reperfusion  
J Mol. Cell. Cardiol. 1998; 30:2475-2485

**Fischer Y, Thomas J, Sevilla L, Munoz P, Becker C, Holman G, Kozka IJ, Palacin M, Testar X, Zorzano A:** Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat cardiac myocytes  
J Biol. Chem. 1997; 272:7085-7092

**Gertz EW, Wisneski JA, Stanley WC, Neese RA:** Myocardial substrate utilization during exercise in human  
J Clin. Invest. 1988; 82:2017-2025

**Gottlob K, Majewski N, Kennedy S, Kandel E, Robey RB, Hay N:** Inhibition of early apoptotic events by Akt/PKB is dependent on the first committed step of glycolysis and hexokinase  
Gene Dev. 2001; 15:1406-1418

**Gould GW, Holman GD:** The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression  
Biochem. J 1993; 295:329-341

**Grover-McKay M, Walsh SH, Thompson SA:** Glucose transporter 3 (GLUT3) protein in human myocardium  
Biochem. Biophys. Acta 1999; 1416:145-154

**Haber RS, Weinstein SP, O'Boyle E, Mogello S:** Tissue distribution of the human GLUT3 glucose transporter  
Endocrinology 1993; 123:2538-2543

**Hansen PA, Marshall BA, Chen M, Holloszy JO, Mueckler M:** Transgenic overexpression of hexokinase II in skeletal muscle does not increase glucose disposal in wild-type or GLUT1-overexpressing mice  
J Biol. Chem. 2000; 29:22381-22386

**Heilig CW, Saunders T, Brosius FC, Moley K, Heilig K, Baggs R, Guo L, Conner D:** Glucose transporter-1-deficient mice exhibit impaired development and deformities that are similar to diabetic embryopathy  
Dev. Biology 2003; 26:15613-15618

**Huang S, Williams B, Barrio J:** Measurement of glucose and 2-deoxy-2-(F-18) fluoro-D-glucose transport and phosphorylation rates in myocardium using dual tracer kinetic experiments  
Febs. Lett. 1987; 216:128-132

**Hue L, Beuloye C, Marsin AS, Bertrand L:** Insulin and ischemia stimulate glycolysis by acting on the same targets through different and opposing signalling pathways  
J Mol. Cell. Cardiol. 2002; 34:1091-1097

**Ibberson M, Uldry M, Thorens B:** GLUTX1, a novel mammalian glucose transporter expressed in the central nervous system and insulin-sensitive tissues  
J Biol. Chem. 2000; 275:4607-4612

**Joyner NT, Smoak IW:** In vivo hyperglycemia and its effect on GLUT-Expression in the embryonic heart  
Birth Defects Res. Pat A Clin. Mol. Teratol. 2004; 70:438-448

**Kalff V, Schwaiger M, Nguyen N:** The relationship between myocardial blood flow and glucose uptake in ischemic canine myocardium determined with F-18 Deoxyglucose  
J Nucl. Med. 1992; 33:1346-1353

**Kashiwaya Y, Sato K, Tsuchiya N:** Control of glucose utilization in working perfused rat heart  
J Biol. Chem. 1994; 269: 25502-25514

**Katz EB, Stenbit AE, Hatton K, Dephino R, Charron MJ:** Cardiac and adipose tissue abnormalities but not diabetes in mice deficient in GLUT4  
Nature 1995; 377:151-155

**Kraegen EW, Sowden JA, Halstead MB, Clark PW, Rodnick KJ, Chisholm DJ, James DJ:** Glucose transporters and in vivo glucose uptake in skeletal and cardiac muscle: fasting, insulin-stimulation and immunoisolation studies of GLUT1 and GLUT4  
Biochem. J 1993; 295:287-293

**Krivokapich J, Smith G, Huang S et al:** <sup>13</sup>N-Ammonia myocardial imaging at rest and with exercise in normal volunteers. Quantification of absolute myocardial perfusion with dynamic positron emission tomography  
Circulation 1989; 80:1328-1337

**Kuribayashi T, Furkawa K, Katsume H, Ijichi H, Iyata Y:** Regional differences of myocyte hypertrophy and three-dimensional deformation of the heart  
Am J Cardiol 1986; 250:H378-388

**Laemmli UK:** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4  
Nature 1970; 227:680-685

**Lam K, Carpenter CL, Ruderman NB:** The phosphatidylinositol 3-kinase serine kinase phosphorylates IRS-1  
J Biol. Chem. 1994; 269:20648-20652

**Lee L, Horowitz J, Frenneaux M:** Metabolic manipulation in ischemic heart disease, a novel approach to treatment  
Europ. Heart J 2004; 25:634-641

**Leong-Poi H and Freeman M:** Viable but dysfunctional myocardium: Pathophysiology, detection and treatment  
Cardiology Rounds 1997; 11

**Li J, Hu X, Selvakumar P, Russel III RR:** Role of the nitric oxid pathway in AMPK mediated glucose uptake and GLUT translocation in heart muscle  
Am. J Physiol. Endocrinol. Metab. 2004;

**Liao R, Jain M, Cui L, D'Agostino J, Aiello F, Luptak I, Ngoy S, Tian R:** Cardiac-specific overexpression of GLUT1 prevents the development of heart failure attributable to pressure overload mice  
Circulation 2002; 106:2125-2131

**Liedtke AJ:** Alterations of carbohydrate and lipid metabolism in the acutely ischemic heart  
Prog. Cardiovasc. Dis 1981; 23:321-336

**Liedtke AJ, DeMaison L, Eggleston AM:** Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium  
Circ. Res. 1988; 62:535-542

**Macheda ML, Kelly DJ, Best JD, Rogers S:** Expression during rat fetal development of GLUT12- a member of the class III hexose transporter family  
Anat. Embryol. 2003; 206:335

**Maes A, Flameng W, Muyts J, Borgers M et al.:** Histological alterations in chronic hypoperfused myocardium: Correlation with PET findings  
Circulation 1994; 90:735-745

**Malhotra R, Brosius FC:** Glucose uptake and glycolysis reduce hypoxia-induced apoptosis in cultured neonatal rat cardiac myocytes  
J Biol. Chem. 1999; 274:12567-12575

**Malhotra R, Tyson D, Kumagi A, Brosius FC:** Glucose uptake and adenoviral mediated GLUT1 infection HIF-1 $\alpha$  levels and decreases hypoxia induced apoptosis in cardiac myocytes  
J Mol. Cell. Cardiol. 2002; 34:1063-1073

**Marshall RC, Tillisch JH, Phelps ME:** Identification and differentiation of resting myocardial ischemia and infarction in man with positron computed tomography <sup>18</sup>F-labeled fluorodeoxyglucose and N-13 Ammonia  
Circulation 1989; 67:766-778

**Matsui T, Li L, Wu JC, et al.:** Phenotypic spectrum caused by transgenic overexpression of activated Akt in the heart  
J Biol. Chem. 2002; 277:22896-22901

**McFalls EO, Murad B, Liow JS, Gannon MC, Haspel HC, Lange A, Marx D:** Glucose uptake and glycogen levels are increased in pig heart after repetitive ischemia  
Am. J Physiol. Heart Circ. Physiol. 2002; 282:H205-211

**McFalls EO, Murad B, Haspel HC, Marx D, Sikora J, Ward BW:** Myocardial glucose uptake after dobutamine stress in chronic hibernating swine myocardium  
J Nuc. Cardiol. 2003; 4:385-394

**Montessuit C, Thorburn A:** Transcriptional activation of the glucose transporter GLUT1 in ventricular cardiac myocytes by hypertrophic agonists  
J Biol. Chem. 1999; 274:9006-9012

**Morissette MR, Howes AL, Zhang T, Brown JH:** Upregulation of GLUT1 expression is necessary for hypertrophy and survival in neonatal rat cardiomyocytes  
J Mol. Cell. Cardiol. 2003; 35:1217-1227

**Mueckler M:** Facilitative glucose transporters  
Europ. J Biochem. 1994; 219:713-725

**Neely JR, Morgan HE:** Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle  
Annu. Rev. Physiol. 1974; 36:413-459

**Nienaber C, Brunken R, Sherman C, Yeatman L, Gambhir S:** Metabolic and functional recovery of ischemic human myocardium after coronary angioplasty  
J Am. Coll. Card. 1991; 18:966-978

**Nimz C:** Pathologisch-anatomische und immunhistologische Untersuchungen des ischämischen Schweinemyokards  
Diss. am Lehrstuhl für All. Pathologie und Neuropathologie, LMU München 2004

**Okada T, Kawano Y, Sakakibara T:** Essential role of phosphatidylinositol 3-kinase in insulin-induced glucose transport and antilipolyses in rat adipocytes  
J Biol. Chem. 1994; 269:3568-3573

**Olsen E:** Ultrastructure of the myocardium  
The Pathology of the heart, 2 ed. London  
Macmillan Press, 1980, page 30

**Phelps M, Huang S, Hoffman E, Selin C, Sokoloff L:** Tomographic measurement of local glucose metabolic rate in humans with (F-18) 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose: Validation of method  
Ann. Neurol. 1979; 6:371-388

**Praus A, Stickel M, Egert S, Gleiter E, Reder S, Schwaiger M:** Glucose transporter and hexokinase distribution in the normal pig heart  
(in Vorb., 2005)

**Praus A:** Characterization of glucose metabolism in pig hearts during regional chronic ischemia in comparison to normal hearts.  
Diss. am Lehrstuhl für Nuklearmedizin der TU München (in Vorb., 2005)

**Printz RL, Koch S, Potter LR, O'Doherty RM, Tiesin JJ, Moritz S, Granner DK:** Hexokinase II mRNA and gene structure, regulation by insulin, and evolution  
J Biol. Chem. 1993; 268:5209-5219

**Rahimtoola SH:** The hibernating myocardium  
J Am. Heart 1989; 117:211-221

**Rahimtoola SH:** The hibernating myocardium: a brief article  
Basic Res. Cardiol. 1995; 90:38-40

**Rogers S, Macheda ML, Docherty SE, Carty MD, Henderson MA, Best JD:** Identification of a novel glucose transporter like protein – GLUT12  
Am. J Physiol. Endocrinol Metab. 2002; 282:E733-738

**Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Papageorgiou I, Terrand J, Lerch R:** Postinfarction heart failure in rats is associated with upregulation of GLUT1 and downregulation of genes of fatty acid metabolism  
Cardiovasc. Res. 2001; 52:407-416

**Russel RR, Mrus JM, Mommessin JI, Taegtmeyer H:** Compartmentation of hexokinase in rat heart: a critical factor for tracer kinetic analysis of myocardial glucose metabolism  
J Clin. Invest. 1992; 90:1972-1977

**Russell RR, Bergeron R, Shulman GI, Young L:** Translocation of myocardial GLUT4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR  
Am. J Physiol. 1999; 277:H643-649

**Ryder JW, Kawano Y, Chibali AV, Rincon J, Tsao TS, Stenbit AE, Zierath JR:** In vitro analysis of the glucose transport system in GLUT4-null skeletal muscle  
Biochem J. 1999; 342:321-328

**Schaper W, Jageneau A, Xhonneux R:** The development of collateral circulation in the pig and dog heart  
Cardiologia 1967; 51:321-335

**Schaper W:** Control of coronary angiogenesis  
Europ. Heart J 1995; 66-68

**Schelbert HR, Phelps ME, Huang S, Mac Donald NS, Hansen H, Selin C:** N-13 ammonia as an indicator of myocardial blood flow  
Circulation 1981, 63:1259-1272

**Schicha H, Voth E:** Qualitätsicherung in der Kardiologie: Nuklearmedizin  
Z Kardiol. 1994; 83:27-36

**Schicha H, Voth E:** Nuklearmedizinische Untersuchungsmethoden  
In: Erdmann E. (Hrsg.): Krankheiten des Herzens, des Kreislaufs und der herznahen Gefäße, 5. Auflage  
Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2000: 181-196

**Schwaiger M, Neese RA, Araujo L, Wyns W, Wisneski JA, Swank S, Kulbert D, Selin C, Phelps M:** Sustained non-oxidative glucose utilization and depletion of glycogen in reperfused canine myocardium  
J Am. Coll. Cardiol. 1989; 13:745-754

**Schwaiger M, Sun D, Deeb M, Nguyen N, Haas F, Sebening F, Brosius F:** Expression of myocardial glucose transporter (GLUT) mRNA in patients with advanced coronary artery disease (CAD)  
Circulation 1994; 90: I 113 (abstract)

**Schwaiger M, Egert S, Brosius F:** Szintigraphische Beurteilung ischämisch geschädigten Myokards bei Patienten mit eingeschränkter linksventrikulären Funktion  
Z Kardiol. 1995; 84:115-122

**Schulz R, Rose J, Martin C, Brodde OE, Heusch G:** Development of short term myocardial hibernating: Its limitation by the severity of ischemia and inotropic stimulation  
Circulation 1993; 88:684-695

**Sharma S, Razeghi P, Shakir A, Keneson BJ, Clubb F, Taegtmeyer H:** Regional heterogeneity in gene expression profiles: A transcript analysis in human and rat heart  
Cardiology 2003; 100:73-79

**Simoës MV, Egert S, Ziegler S, Miyagawa M, Reder S, Lehnert T, Charron MJ, Schwaiger M:** Delayed response of insulin-stimulated fluorine-18 deoxyglucose uptake in glucose transporter-4-null mice in hearts  
J Am. Coll. Cardiol. 2004; 43:1690-1697

**Slot JW, Geuze HJ, Gigengack S, Lienhard GE, James DE:** Translocation of the glucose transporter GLUT4 in cardiac myocytes of the rat  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991; 88:7815-7819

**Stanley WC, Lopaschuk GD, Hall JL:** Regulation of myocardial carbohydrate metabolism under normal and ischemic conditions. Potential for pharmacological interventions  
Cardiovasc. Res. 1997; 332:243-257

**Stanley WC, Chandler MP:** Energy metabolism in the normal and failing heart: Potential for therapeutic interventions  
Heart Failure Rev. 2002; 7:115-130

**St. Louis JD, Hughes GC, Kypson AP, Degrado TR, Donovan CL, Coleman RE, Lowe JE:** An experimental model of chronic myocardial hibernation  
Ann. of Thoracic Surgery 2000; 69:1351-1357

**Studelska DR, Campbell C, Pang S, Rodnick KJ, James DE:** Developmental expression of insulin-regulatable glucose transporter GLUT4  
Am. J Physiol. 1992; 263:E102-106

**Sun DQ, Nguyen N, DeGrado TR, Schwaiger M, Brosius FC:** Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter GLUT4 to the plasma membrane of cardiac myocytes  
Circulation 1994; 89:793-798

**Taegtmeyer H:** On the inability of keton bodies to serve as the only energy providing substrate for rat heart at physiological work load  
Basic Res. Cardiol. 1983; 78:435-450

**Taegtmeyer H:** Energy metabolism in the heart: from basic concepts to clinical applications  
Curr. Prob. Cardiol. 1994; 19:57-116

**Tian R, Abel ED:** Responses of GLUT4 deficient hearts to ischemia underscore the importance of glycolysis  
Circulation 2001; 103:2961

**Vanoverschelde JL, Wijns W, Depre C:** Mechanism of chronic regional postischemic dysfunction in humans. New insights from the study of noninfarcted collateral-dependent myocardium  
Circulation 1993; 87:1513-1523

**Van Rossum AC:** Magnetic resonance angiography of the coronary arteries: diagnostic perspectives  
Z Kardiol. 1997; 86:141-147 (Suppl II)

**von Degenfeld G, Lebherz C, Raake P:** Functionally relevant therapeutic angiogenesis by selective pressure regulated retroinfusion of basic fibroblast growth factor into coronary veins in chronic myocardial ischemia in pigs  
Circulation 2000; 102 (suppl):1518



**Weiss RG, Chatham JC, Georgakopolous D, Charron MJ, Wallimann T, Kay L, Walzel B, Chako VP:** An increase in the myocardial PCr/ATP ratio in GLUT4 null mice

Faseb. J 2002; 16:613-615

**Wolpers HG, Schwaiger M:** Analyse des Myokardstoffwechsels bei koronarer Herzkrankheit durch Positronen-Emissions-Tomographie

In: Heusch, G. (Hrsg.): Pathophysiologie und rationale Pharmakotherapie der Myokardischämie

Steinkopff Verlag, Darmstadt 1990: 63-84

**Wood IS, Trayhurn P:** Glucose transporters (GLUT and SGLT): expand families of sugar transport proteins

Br. J. Nutr. 2003; 89:3-9

**Xing Y, Musi N, Fujii N, Zou L, Luptak I, Hirshman MF, Goodyear J, Tian R:** Glucose metabolism and energy homeostasis in mouse hearts overexpressing dominant negative alpha 2 subunit of AMP activated protein kinase

J Biol. Chem. 2003; 278:28372-28377

**Young LH, Renfu Y, Russell R, Hu X, Caplan M, Ren J, Shulman GI, Sinusas AJ:** Low-flow ischemia leads to translocation of canine GLUT4 and GLUT1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo

Circulation 1997; 95:415-42

