

Aus der Klinik für Innere Medizin II
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Einfluss von Adenin-Nukleotid-Translokase-1-Überexpression
auf das System der Kreatinkinase

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nikias Ioannis Sifarikas

aus Krefeld am Niederrhein

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. H. P. Schultheiss
 2. Prof. Dr. med. M. Bader
 3. Prof. Dr. rer. nat. B. Munz

Datum der Promotion: 16.05.2010

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	4
I. 1. Die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT)	4
I. 2. Die Kreatinkinase (CK)	5
I. 3. Interaktion von ANT1 und CK	7
I. 4. ANT1 und CK bei Herzerkrankungen	10
I. 5. ANT1 als Bestandteil eines kardioprotektiven Programms	11
I. 6. Renin-transgene Tiere (REN-Tiere)	12
I. 7. Ziel der Arbeit	13
II. Material und Methoden	14
II. 1. Untersuchungsmaterial und Behandlung	14
II. 2. Gewebeaufschluss	14
II. 3. Proteinkonzentrationsbestimmung	16
II. 4. Enzymaktivitätsbestimmung der mitochondrialen und zytosolischen CK	15
II. 5. Bestimmung der CK-Isoformanteile	17
II. 6. Statistik	19
III. Ergebnisse	20
III. 1. Aktivität der mitochondrialen Kreatinkinase	20
III. 2. Aktivität der zytosolischen Kreatinkinase	21
III. 3. Isoformverteilung der zytosolischen Kreatinkinase	22
III. 4. Zusammenfassung	23
IV. Diskussion	24
V. Zusammenfassung	29
VI. Literatur	30
VII. Danksagung	37
VIII. Lebenslauf und Publikationsliste	38

I. Einleitung

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die weltweit häufigsten Todesursachen. Verschiedene Herzkrankheiten wie die hypertensive Herzkrankheit, die als Folge eines chronisch erhöhten Blutdrucks auftreten kann, sind begleitet von einer Beeinträchtigung des mitochondrial-zytosolischen Energietransfers. Dies kann zu einer verminderten ATP-Versorgung des Kardiomyozyten führen (1, 2).

Durch die Unterversorgung mit energiereichen Phosphaten werden die die Zelle schädigenden Vorgänge Apoptose und Nekrose eingeleitet. Oxidativer Stress führt zu mitochondrialen Schäden, und die Funktion des Herzens wird beeinträchtigt (3).

Für den zytosolisch-mitochondrialen Energietransfer spielen das Transportprotein Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT) und die Kreatin-Kinase (CK) eine zentrale Rolle.

I. 1. Die Adenin-Nukleotid-Translokase (ANT)

Die ANT ist im Mitochondrion das Protein mit der höchsten Expressionsdichte (4, 5). Sie wird beim Menschen von vier (ANT1-4), bei Nagetieren von drei (ANT1, 2 und 4) unabhängigen Genen kodiert (4), die in gewebespezifischen Mustern exprimiert werden (6, 7, 8). ANT1 ist die vorherrschende Isoform in Herz, Skelettmuskel und Gehirn, wird aber in geringerem Umfang auch in anderen Organen exprimiert (6, 7).

Die ANT spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus eukaryontischer Zellen. Sie ist ein dimeres integrales Membranprotein der inneren Mitochondrienmembran und tauscht zytosolisches ADP^{3-} gegen mitochondriales ATP^{4+} aus. Damit ist sie ein entscheidendes Bindeglied zwischen im Mitochondrion lokalisierten energieliefernden und im Zytosol lokalisierten energieverbrauchenden Prozessen. Daneben ist die ANT ein Bestandteil der *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP), womit sie eine zentrale Rolle in der Regulation des Apoptoseprozesses spielt (5). Die Öffnung dieser Pore führt zur Destabilisierung der inneren Mitochondrienmembran, zu Störungen der oxidativen Phosphorylierung und zur Freisetzung mitochondrialer proapoptotischer Faktoren. Proteine, wie das pro- bzw. antiapoptotische Bax und Bcl-2, sind Interaktionspartner der ANT, beeinflussen ihre Aktivität (9) und regulieren den Öffnungszustand der MPTP. Auch Proteine der Signaltransduktion wie z. B. BART (Binder of Arl Two), ein lösliches 19 kDa Protein (10), und Transkriptionsregulatoren wie I-kappa-b-alpha (11) binden an die ANT.

Durch Bindung viraler Proteine an die ANT können Apoptosevorgänge eingeleitet oder blockiert werden (12).

Zusammengefasst ist die ANT ein multifunktionales Protein, das durch ihre zentrale Rolle in Energiestoffwechsel, intrazellulärer Kommunikation und Apoptose einerseits an der Zellerhaltung, andererseits am Zelluntergang beteiligt ist.

I. 2. Die Kreatinkinase (CK)

Von der CK sind vier Isoenzyme bekannt (13): Die mitochondriale Isoform der CK (CK_{mit}), die in ihrem aktiven Zustand Oktamere bildet (14), katalysiert die Übertragung einer Phosphatgruppe von ATP auf Kreatin (Hinreaktion). Das vom ANT in den mitochondrialen Intermembranraum transportierte ATP wird von der mitochondrialen Kreatinkinase (CK_{mit}) zur Phosphorylierung von Kreatin verwendet (Abbildung 2).

Drei weitere Isoenzyme liegen als dimeres zytosolisches Enzym (CK_{cyt}) vor, das aus zwei Untereinheiten (M- und B-Untereinheit) gebildet wird, woraus sich die möglichen Formen CK-MM, -BB, -MB ergeben. Die zytosolischen Formen übertragen eine Phosphatgruppe von Kreatinphosphat (PCr) auf ADP, wodurch ATP gebildet wird (Rückreaktion).

Durch die reversible Übertragung energiereicher Phosphatgruppen zwischen Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) und Kreatin unter Bildung von Adenosin-Di-Phosphat (ADP) und Kreatin-Phosphat stellt das Enzym bei plötzlichen Erhöhungen des Energiebedarfs der Zelle kurzfristig energiereiches Phosphat zur Verfügung und puffert damit eine mögliche Unterversorgung mit energiereichen Phosphatgruppen ab.

Die Isoenzyme sind charakteristisch verteilt. Die CK-MM überwiegt in der Muskulatur. Sie ist im M-Band lokalisiert und an dessen Bildung beteiligt (13). Die CK-BB wird hauptsächlich in Gehirnzellen exprimiert, während die CK-MB neben der CK-MM in Kardiomyozyten lokalisiert ist.

Die mitochondriale Form ist an der Außenfläche der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert (13). In Form kuboider Oktamere verknüpft sie die innere mit der äußeren Mitochondrienmembran, wodurch parallele Membranabschnitte gebildet werden (Abbildungen 2 und 3) (15).

Durch Bindung der oktameren, aktiven CK_{mit} an die ANT wird die Bildung der *Mitochondrial Permeability Transition Pore* unterbunden und die Einleitung der Apoptose behindert (15).

Durch die charakteristische Verteilung der Isoformen in Mitochondrion und Zytosol kommt es zur Verbindung energiebereitstellender (mitochondrialer) und energieverbrauchender (zytosolischer) Prozesse. Diese funktionelle und räumliche Verbindung wird auch als „Kreatinphosphat-Shuttle“ (Abbildung 1) bezeichnet: PCr wirkt hier als Träger („Shuttle“) (13) für energiereiche Phosphate zwischen dem Mitochondrion als Energieproduzent und dem Zytosol als –konsument. So wird vor allem der kurzfristige Energiebedarf z. B. für den Kontraktionsvorgang abgedeckt, ohne dass dafür Substrat oxidiert werden muss. Der Phosphataustausch zwischen PCr und ADP erfolgt schneller als die ATP-Synthese über die oxidative Phosphorylierung oder die Neusynthese (16).

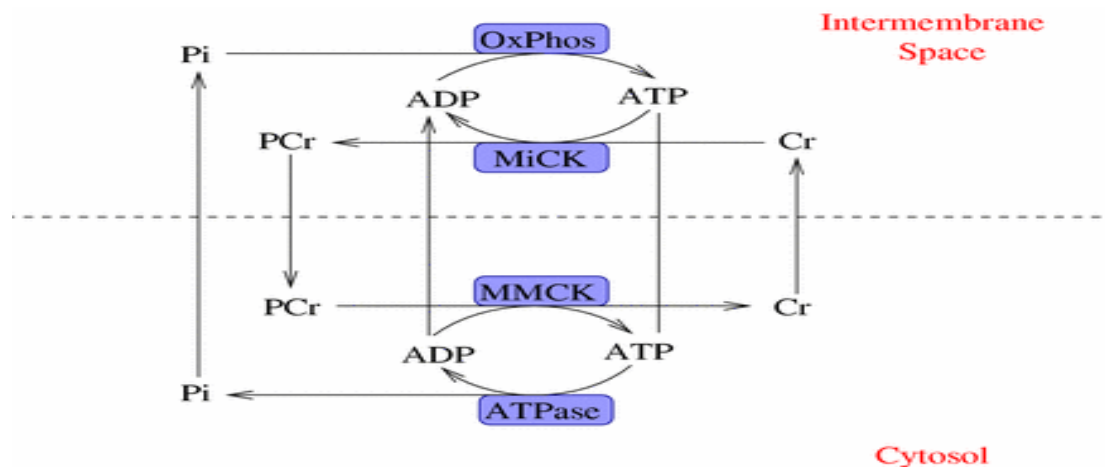


Abbildung 1: Die mitochondriale Isoform der CK katalysiert die Übertragung eines Phosphatrestes von ATP auf Kreatin, wodurch Kreatinphosphat entsteht. Die zytosolische Isoform katalysiert die Rückreaktion, wodurch im Zytosol kurzfristig ATP bereitgestellt wird („Kreatinphosphat-Shuttle“, modifiziert nach Dolder. OxPhos=oxidative Phosphorylierung, Pi=Phosphatrest, Cr=Kreatin, MMCK=zytosolische CK-MM).

I. 3. Interaktion zwischen ANT1 und CK

Die Versorgung jeder Herzmuskelzelle mit chemisch gebundener Energie ist Voraussetzung für eine regelgerechte Pumpfunktion des Herzens, durch welche der Körperperipherie ein dem Sauerstoffbedarf entsprechendes Blutvolumen angeboten wird. Wichtige Energieträger sind die Phosphatverbindungen Adenosin-Tri-Phosphat (ATP) und Kreatin-Phosphat (PCr). ATP und ADP sind Substrate der ANT1 und der mitochondrialen und zytosolischen Kreatinkinase. Transportproteine und Enzyme für Kreatinphosphat und energiereiche Adenylphosphate sind somit Bindeglieder zwischen mitochondrialem ATP-Aufbau und zytosolischem ATP-Abbau (17).

In diesem Rahmen bilden die ANT1 und das System der mitochondrialen und zytosolischen Kreatinkinase ein eng miteinander verbundenes funktionelles Netzwerk von Transport und Übertragung energiereicher Phosphate.

Die ANT1 ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und transportiert mitochondriales ATP im Austausch gegen zytosolisches ADP in den mitochondrialen Intermembranspalt und beliefert die mitochondriale Isoform der CK mit ATP. Diese katalysiert die Übertragung eines Phosphatrestes von ATP auf Kreatin, wodurch Kreatinphosphat (PCr) entsteht, das der Zelle als Energie-Puffer (14) für eine kurzfristige Energieversorgung bei abrupten Änderungen des Energiebedarfs neben dem ATP zur Verfügung steht. Das Kreatinphosphat diffundiert über die äußere Mitochondrienmembran ins Zytosol („Kreatinphosphat-Shuttle“). Die zytosolische Isoform katalysiert die Rückreaktion, wodurch im Zytosol kurzfristig ATP bereitgestellt wird.

Außerdem interagieren CK_{mit} und ANT1 im Rahmen der Apoptose miteinander, die Verbindung der beiden Proteine scheint die Einleitung der Apoptose zu behindern und hat damit einen protektiven Effekt auf die Zelle (15).

Wie die Interaktion zwischen ANT1 und CK_{mit} auf molekularer Ebene aussieht, ist bisher noch unklar (17).

In mitochondrialen Kontaktpunkten konnten beide Moleküle nachgewiesen werden (18). Kontaktpunkte sind aus Proteolipidkomplexen bestehende Bereiche, die die innere mit der äußeren Mitochondrienmembran verbinden (18).

In peripheren Proteolipidkomplexen kommen ANT1 und CK_{mit} sich räumlich sehr nahe. Sie bilden hier Mikrokompimente, die den Austausch und den Transport von Substraten und Produkten aufrechterhalten (18). Auch die MPTP, an der ANT1 und

CK_{mit} zusammen mit dem VDAC im Rahmen der Apoptose beteiligt sind, ist ein solcher Kontaktpunkt, ANT1 und CK_{mit} lassen sich gemeinsam isolieren (19).

Die Bildung dieser Strukturen ist abhängig vom Energiebedarf der Zelle und wird besonders durch erhöhte Konzentrationen von ADP stimuliert (18).

Für eine strukturelle Verbindung von ANT1 und CK_{mit} gibt es Hinweise. An isolierten ANT1-Molekülen konnten jeweils 6 bis 8 eng aneinander liegende Cardiolipin-Moleküle nachgewiesen werden (20, 21, 22). Eine hierdurch vermittelte Bindung an CK_{mit}-Moleküle ist möglich (Abbildung 2).

Zur Analyse einer funktionellen Beziehung wurde ein thermodynamisches Modell entwickelt, in dem der direkte und der dynamische Transfer von Substraten zwischen ANT1 und CK_{mit} berechnet wurden. Die Ergebnisse sprechen für eine Mischform, d. h. für direkten und dynamischen, diffusionsabhängigen Transfer energiereicher Substrate zwischen beiden Molekülen (17).

Eine Verbindung, sei sie funktionell oder strukturell, scheint auch über die Atmungskette zu bestehen. Es wird diskutiert, dass die Atmungskette hierdurch reguliert und stabilisiert wird, womit auch in diesem Rahmen beide Moleküle zusammen zu einer Aufrechterhaltung des Energiestoffwechsels der Herzzelle beitragen (17).

Insgesamt gibt es starke Hinweise dafür, dass die Interaktion zwischen CK_{mit} und ANT1 sowohl im Rahmen des Energiestoffwechsels als auch im Rahmen der Apoptose für das Überleben der Zelle von zentraler Bedeutung ist.

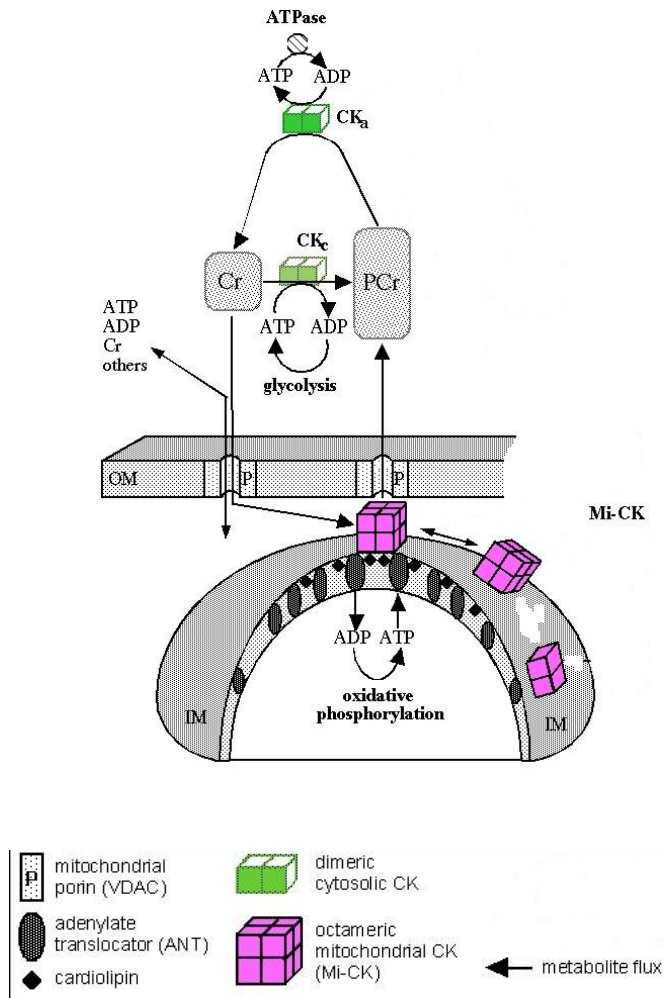


Abbildung 2: Interaktion der ANT mit der CK. Die ANT ist an der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert und transportiert mitochondriales ATP im Austausch gegen zytosolisches ADP in das Zytosol. Die mitochondriale Isoform der CK katalysiert die Übertragung eines Phosphatrestes von ATP auf Kreatin, wodurch Kreatinphosphat entsteht. Die zytosolische Isoform katalysiert die Rückreaktion, wodurch im Zytosol kurzfristig ATP bereitgestellt wird. Das Kreatinphosphat diffundiert über die äußere Mitochondrienmembran ins Zytosol. Dieser Energietransfer wird auch als „Kreatinphosphat-Shuttle“ bezeichnet (Abb. modifiziert nach Th. Wallimann, Zürich).

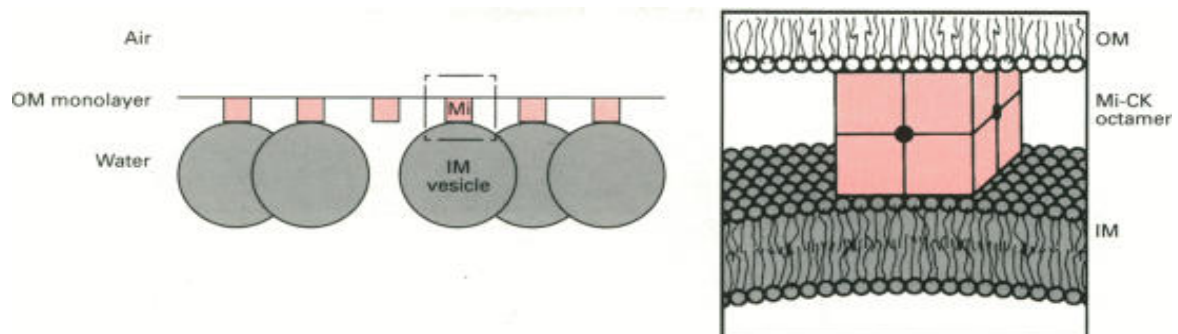


Abbildung 3: Die mitochondriale CK in sog. „Contact-sites“ zwischen innerer und äußerer Mitochondrienmembran. Das Enzym ist als Oktamer dargestellt, im Gegensatz zu den zytosolischen Isoformen, die nur als Dimere bekannt sind (Abb. modifiziert nach Th. Wallimann, Zürich).

I. 4. ANT1 und CK bei Herzerkrankungen

Änderungen der ANT1-Expression oder Mutationen im ANT1-Gen und die damit verbundene ANT1-Funktionsstörung beeinflussen den Stoffwechsel und damit die Leistungsfähigkeit des Herzens.

Eine verminderte ANT1-Funktion wirkt sich ungünstig auf beides aus. Die oxidative Phosphorylierung wird beeinträchtigt, und es kommt zu Schädigungen der mitochondrialen DNA (23) mit folgendem Funktionsverlust und Untergang der Zelle. Dies wird bei verschiedenen, zum Teil schweren Erkrankungen beobachtet, z. B. dem Sengers-Syndrom (24) oder der autosomal-dominanten, progressiven, externen Ophthalmoplegie (adPEO) (25, 26). Beide können mit einer hypertrophen Kardiomyopathie assoziiert sein. Hiermit im Einklang konnte im Tiermodell gezeigt werden, dass ANT1-Knockout-Mäuse biochemische und physiologische Charakteristika einer hypertrophen Kardiomyopathie zeigen (27). Es fielen Veränderungen der mitochondrialen Proliferation und Störungen der oxidativen Phosphorylierung (27) auf.

Außerdem kommt es zu erhöhtem oxidativen Stress. Daraus folgt eine vermehrte mitochondriale Freisetzung reaktiver Sauerstoffmoleküle (ROS) und einer gesteigerten Expression an der ROS-Entgiftung beteiligter Enzyme, wie Superoxiddismutase und Glutathion-Peroxidase (28). Als weitere Folge erhöhten oxidativen Stresses kann eine erhöhte Mutationsrate der mitochondrialen DNA beobachtet werden (29).

Eine reduzierte kardiale ANT1-Transportkapazität, die mit einer Verschiebung des ANT-Isoformmusters einhergeht und eine Funktionsänderung des ANT-Gesamtproteins bedingt, konnte bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie und Myokarditis gezeigt werden (30). Zudem sind die myokardialen Mitochondrien der DCM-Patienten deformiert (31) und Aktivitäten von Atmungskettenkomplexen deutlich reduziert (31, 32). Der Nachweis ANT-spezifischer Autoantikörper im Serum von Patienten mit Myokarditis (MC) und dilatativer Kardiomyopathie (DCM) wies zusätzlich auf die Bedeutung der ANT innerhalb dieser Krankheitsbilder hin (33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40).

Im Vergleich zu Personen, die nicht an einer kardialen Erkrankung litten, zeigten beide Patientengruppen einen Isoformshift, der durch einen erhöhten ANT1-, einen erniedrigten ANT2- und einen unveränderten ANT3-Anteil gekennzeichnet war (41). Mit Hilfe von ANT-Rekonstitutionsanalysen konnte weiter gezeigt werden, dass die

veränderte ANT-Isoformzusammensetzung zu einer Änderung der funktionellen Eigenschaften des ANT-Gesamtproteins und zu einer erniedrigten Austauschkapazität bei DCM-Patienten führen kann (42).

In tierischen Krankheitsmodellen der ischämischen und hypertrophen Kardiomyopathie lassen sich schwerwiegende mitochondriale Defekte, reduzierte Aktivitäten der Atmungskettenenzyme und auch eine erniedrigte ANT1-Expression beobachten (43), jedoch keine Verschiebung des ANT-Isoenzymmusters.

Darüber hinaus konnte zum Beispiel bei transgenen Mäusen, die Wachstumshormon überexprimieren und eine kardiale Hypertrophie entwickeln, ein verringerter Gehalt von ANT1 mit herabgesetztem Energiestoffwechsel beobachtet werden (44).

I. 5. ANT1 als Bestandteil eines kardioprotektiven Programms

Während eine unzureichende ANT1-Funktion wahrscheinlich zur kardialen Schädigung beiträgt, wird eine erhöhte ANT1-Expression derzeit als Teil eines Kardiomyozyten-protektiven Programms diskutiert, das in der Herzmuskelzelle unter Stress wirksam wird.

Im „Preconditioning“ wird das Herz wiederholt kurzzeitig Stress in Form von Ischämie oder Hypothermie (45) ausgesetzt. Die Ausdehnung von Infarkt-, Nekrose- und Fibroseareal kann so nach Reperfusion verringert werden, es kommt zu einer schnelleren Normalisierung der kontraktile Funktion (45). Durch gezielte Stimulation der Prozesse, die bei verschiedenen Erkrankungen eintreten und an sich schädlich sind, kann das Myokard geschützt werden.

Im Rahmen des Preconditionings konnte auf zellulärer Ebene eine Zunahme von Faktoren beobachtet werden, die den Energiestoffwechsel günstig beeinflussen und die Einleitung der Apoptose behindern und damit insgesamt kardioprotektiv wirken.

Es kommt hierbei zur Expressionzunahme von Genen, die Komplexe der oxidativen Phosphorylierung kodieren, wie zum Beispiel die Cytochrom-Oxidase, Cytochrom C sowie ANT1 (32, 46). Überexpression von Proteinen wie Bcl-2 und PKC_{epsilon}, die direkt mit der ANT1 oder der MPTP interagieren (9, 47), verstärkt zusätzlich diesen nach Preconditioning einsetzenden protektiven Effekt (48, 49). Bcl-2 gehört in die Gruppe antiapoptotischer Faktoren und beeinflusst die Funktion der ANT1 positiv. Eine stabilisierte ANT1- und ATPase-Aktivität sowie eine verbesserte Kopplung zwischen ANT1 und mitochondrialer Kreatinkinase tragen zur Stabilisierung des zytosolischen Energiegehaltes bei (50, 51).

Andere Arbeiten (43) zeigten zudem, dass eine kardiale Überexpression von ANT1 zu einer deutlichen Verbesserung des Zustandes hypertropher Herzen reninüberexprimierender, an arterieller Hypertonie leidender Ratten (s. I. 6.) führt.

Auch der Transfer von ANT1 durch virale Vektoren in ANT1-defiziente Skelettmuskelzellen führt durch Erhöhung des mitochondrialen Exports von ATP zur Rückbildung der histopathologischen Veränderungen, die mit einer mitochondrialen Myopathie verbunden sind (52).

Durch die aufgezeigten Effekte könnte die ANT1 zu einem Zielprotein bei der Entwicklung neuer Therapieansätze werden, die über eine Wirkung an ihr die Apoptose modulieren.

I. 6. Renin-transgene Tiere

Diese Tiere überexprimieren Renin durch Expression des murinen REN2-Gens. Renin, als Teil des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Blutdrucks. Es katalysiert die Bildung von Angiotensin-II aus Angiotensinogen. Dauernde Überexpression führt zu einem erhöhten Angiotensin-II-Spiegel und damit zu erhöhtem Blutdruck. Als Folge der stetig erhöhten Druckbelastung entwickeln die Tiere eine konzentrische kardiale Hypertrophie mit eingeschränkter kardialer Pumpfunktion.

Da es sich bei der arteriellen Hypertonie um einen systemisch wirksamen Faktor handelt, sind außer dem Herzen auch andere Organe betroffen. Neben der hypertensiven Kardiopathie kommt es zu Schäden besonders an Gefäßen des Gehirns und der Nieren (43).

Es konnte gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Überexpression von ANT1 (43) auf die REN-Tiere einen günstigen Einfluß ausübt. Die Herzstruktur und -funktion sowie die Überlebensrate der doppelt-transgenen Tiere sind gegenüber Kontrolltieren signifikant stabiler bzw. länger (43).

I. 7. Ziel der Arbeit

Die ANT1 und das System der mitochondrialen und zytosolischen Kreatinkinase bilden ein eng miteinander verbundenes Netzwerk von Transport und Übertragung energiereichen Phosphats. Im Mitochondrion synthetisiertes ATP wird durch die ANT1 zu der in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten mitochondrialen Kreatinkinase (CK_{mit}) transportiert, die Phosphat von ATP auf Kreatin überträgt. ADP wird über die ANT1 wieder in das Mitochondrion zurücktransportiert. Die zytosolische Kreatinkinase (CK_{cyt}) katalysiert die Rückreaktion und überträgt den Phosphatrest unter Bildung von ATP von Kreatin auf ADP. Damit schließt sich der Kreislauf energiebereitstellender mitochondrialer und energieverbrauchender zytosolischer Reaktionen.

Aufgrund der engen Beziehung zwischen ANT1 und CK soll der Einfluss einer kardialen ANT1-Überexpression auf das Kreatinkinasesystem unter physiologischen und pathologischen Bedingungen analysiert werden.

Dazu werden ANT1-, Renin- und für beides transgene Ratten sowie Wildtyp-Tiere verwendet. Die ANT1-transgenen Tiere überexprimieren die ANT1 unter Kontrolle des Myosinschwerketten-Promotors herzspezifisch. Die Renin-transgenen Tiere überexprimieren Renin und entwickeln als Folge einer arteriellen Hypertonie eine hypertensive Kardiopathie mit Zeichen der Herzinsuffizienz.

Die untersuchten Parameter sind die Aktivitäten und Isoformmuster der mitochondrialen und zytosolischen Kreatinkinase

Der Einfluss der ANT1-Überexpression auf diese Parameter soll unter physiologischen Bedingungen an den ANT1-transgenen Tieren und unter pathologischen Bedingungen an den doppelt-transgenen ANT1-REN-Tieren bestimmt werden. Als Referenz für physiologische beziehungsweise pathologische Verhältnisse dienen Wildtyp- und Renin-transgene Tiere.

II. Material und Methoden

II. 1. Untersuchungsmaterial und Behandlung

Bei den untersuchten Ratten der Linie 3267 handelt es sich um jeweils acht männliche acht Monate alte Wildtyp-Ratten (WT) vom Stamm Sprague-Dawley, ANT1-transgene MHCANT1-Ratten (ANT), Renin-transgene (REN) und ANT1-Renin-transgene (ANT/REN) Tiere.

Die Tiere wurden unter konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit bei einem Hell-Dunkel-Zyklus von 12 h gehalten.

Die Haltung und Tötung der Tiere erfolgte unter Einhaltung der behördlichen Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (Tötungsanzeige T 0041/06). Die Entnahme der Herzen erfolgte nach CO₂-Intoxikation. Das Gewebe wurde schockgefroren und bei -80°C gelagert.

II. 2. Gewebeaufschluss und Proteinlösung

Zur Aufbereitung werden die Myokardproben nach Zwischenlagerung in flüssigem Stickstoff im Mörser zerkleinert und anschließend mit einem sauberen und sterilen Einwegskalpell zurechtgeschnitten.

Die gewogenen Gewebestücke wurden nun in einem Phosphatpuffer mit 1:100 verdünntem Proteaseinhibitor (*Protease-Inhibitor-cocktail P-8340, Sigma Aldrich, St. Louis, USA*) mit Hilfe eines Glas-Potters homogenisiert.

Das Homogenisat wurde bei 10 000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert.

Es erfolgte eine erneute Zentrifugation des Überstandes bei 10 000 rpm für 30 Minuten bei 4°C.

Das Pellet (mitochondriale Fraktion) wurde in 50 µl Extraktionspuffer mit Proteaseinhibitor gegeben. Vom Überstand (zytosolische Fraktion) und der Mitochondrienlösung wurde mithilfe des BCA-Essays (*BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, USA*) die Proteinkonzentration bestimmt.

Herstellung des Phosphatpuffers:

Stammlösung A: 0,1 M

1,3799 g Di-Natrium-Hydrogenphosphat in 100 ml Aqua dest.

Stammlösung B: 1,0 M

1,3799 g Di-Natrium-Hydrogenphosphat in 10 ml Aqua dest.

Von Lösung A 10 ml mit 90 ml Aqua dest., von Lösung B 1 ml mit 99 ml Aqua dest. mischen, dann 50 ml des ersten Gemisches mit soviel des zweiten titrieren, bis ein pH-Wert von 7,5 erreicht ist.

II. 3. Proteinkonzentrationsbestimmung

Messprinzip: Mithilfe einer Albuminstandardlösung bekannter Konzentration wird eine Eichkurve erstellt (*BCA Protein Assay, Pierce, Rockford, USA*). Mit den ermittelten Extinktionswerten des Standards werden diejenigen der Proben verglichen, und über die Regressionsgerade wird die Proteinkonzentration berechnet.

Für die Verdünnungsreihe des Proteinstandards wird eine Albuminlösung auf 50, 100, 150, 250, 750 µg/ml verdünnt. Von der Verdünnung werden je 25 µl in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert.

Es erfolgt eine Doppelbestimmung. Für die Bestimmung des Leerwertes werden 25 µl Aqua dest. eingesetzt.

Von den zytosolischen und mitochondrialen Proteinlösungen werden je 12,5 µl zusammen mit 12,5 µl Aqua dest. in zwei Eppendorfgefäße pipettiert.

Der Standard und die Proben werden mit 500 µl BCA-Reagenzlösung gemischt. Die BCA-Reagenzlösung wird aus Lösung A+B im Verhältnis 50:1 entsprechend den Herstellerangaben hergestellt.

Die Proben werden 30 Minuten lang im Wasserbad bei 37°C inkubiert.

Nach der Inkubationszeit werden die Lösungen in 1,5 ml Halbmikro-Küvetten (*UV-Halbmikroküvetten, Plastibrand, Wertheim, Deutschland*) überführt und ihre Proteinkonzentrationen im Spektralphotometer (*Spectrophotometer DU 640, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA*) bei 562 nm bestimmt.

II. 4. Enzymaktivitätsbestimmung der mitochondrialen und zytosolischen CK

Messprinzip: Die Aktivitätsbestimmung erfolgt mittels eines optischen Tests, basierend auf der folgenden Reaktionsfolge.

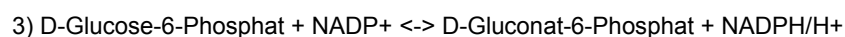
CK



Hexokinase



Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase



Zur Bestimmung der CK-Aktivität wird der CK-Kit (*CK-Kit, Boehringer, Ingelheim, Deutschland*) verwendet.

20 µl einer 100 ng/µl konzentrierten Proteinprobe der zytosolischen bzw. 200 ng/µl der mitochondrialen Fraktion werden mit 500 µl Substratlösung in eine 1,5 ml Küvette pipettiert.

Die Substratlösung wird entsprechend dem Hersteller zusammengemischt und für 10 Minuten auf Raumtemperatur gebracht.

Nach einer Vorinkubationszeit von 2 Minuten wird die Extinktionsänderung 4 Minuten lang im Intervall von 30 Sekunden bei 340 nm Wellenlänge gemessen. Die ermittelten Werte werden mit dem Faktor 4127 multipliziert.

Die Extinktionsänderung basiert auf der Zunahme des Reduktionsäquivalentes NADPH/H⁺, dessen Absorptionsmaximum bei 340 nm liegt. Die Aktivität wird in µmol/mgxmin angegeben.

Wellenlänge	340 nm
Inkubationszeit	2 min
Meßzeit	4 min
Intervall	30 s
Faktor	4127

II. 5. Bestimmung der CK-Isoformanteile

Wie oben beschrieben, liegt die CK in verschiedenen Isoformen vor, die elektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können. Die Auftrennung in Isoenzyme erfolgt auf einem gepufferten Agarose-Gel (*Isoenzym-Kit Paragon, Beckman Coulter Inc., Fullerton, USA*). In den Isoenzymbanden bildet sich ein Farbstoff, der im UV-Licht sichtbar ist.

Nach Entnahme aus der Verpackung wird das Gel vorsichtig abgeblottet, wobei Luftblasen vermieden werden. In die Auftragstaschen des Gels werden 5 µl der auf 600 ng/µl verdünnten zytosolischen Proteinfraction pipettiert. Nach einer Diffusionszeit von 5 Minuten wird überschüssige Lösung mit einem Blotter entfernt. Das Gel wird jetzt in einen Rahmen gespannt und in die Elektrophoresezelle gehängt.

In der Elektrophoresezelle befinden sich jeweils 45 ml Substratpuffer, der hergestellt wird durch Lösen einer Flasche CK-Puffer in 1000 ml destilliertem Wasser.

Nach einer Trennzeit von 20 Minuten bei einer Spannung von 100 Volt wird das Gel aus der Zelle genommen und in eine lichtdichte Inkubationsbox gelegt. Auf das Gel wird vor Schließen der Box ein mit Substrat getränkter Gelblotter gelegt. Die Inkubationszeit beträgt 30 Minuten bei 45°C.

Nach der Inkubation werden die Gele in einen Rahmen gespannt und 1 Minute lang in 5%ige Essigsäure getaucht, dann für 3 Minuten unter einen Gel- und zwei Trockenblotter gelegt, um zuletzt noch einmal 1 Minute lang in die Essiglösung getaucht zu werden. Zum Trocknen wird das Gel in einen Trockner mit *laminar airflow* gelegt.

Die getrocknete Folie wird unter UV-Licht photographiert (Abbildung 4) und anschließend densitometrisch ausgewertet.

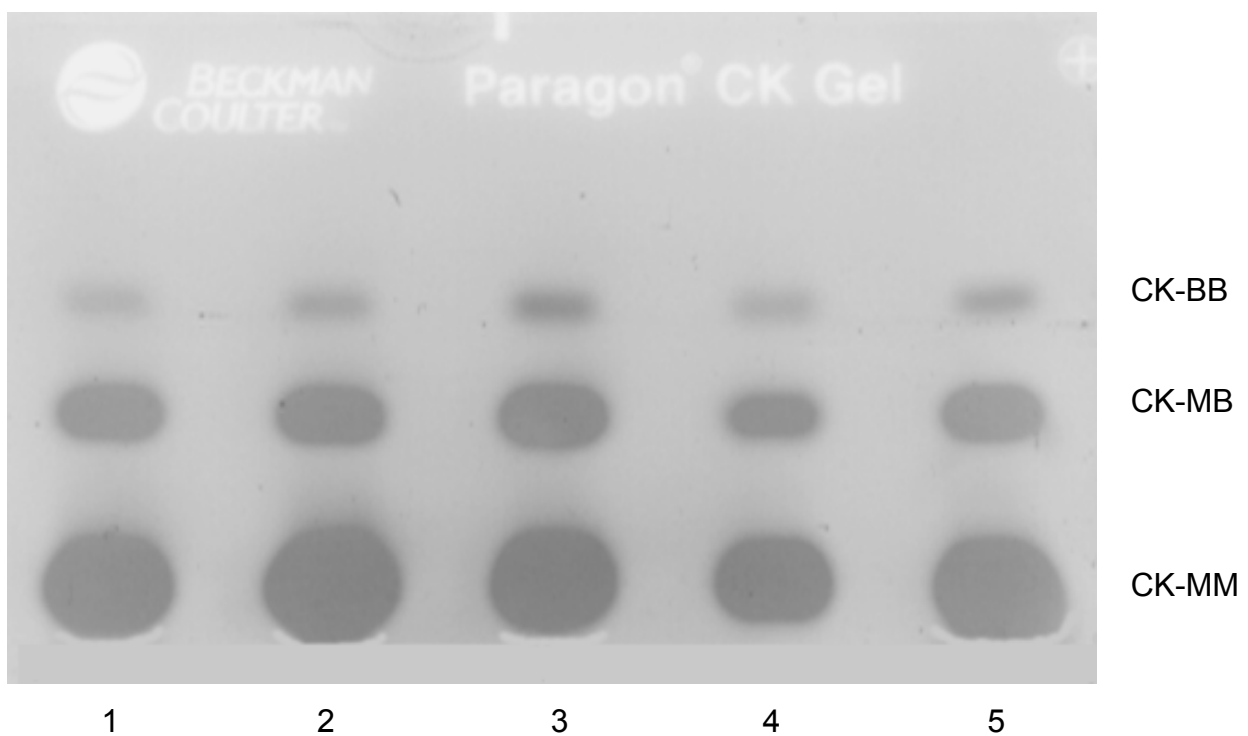


Abbildung 4: Beispiel einer elektrophoretischen Auftrennung der CK-Isoenzyme

II.6. Statistik

Alle Daten sind als Mittelwerte +/- Standardfehler angegeben. Für die Analysen wurden parametrische und nicht-parametrische Tests verwendet. Bei normalverteilten Standardfehlern wurde nach dem t-Test, bei nicht normalverteilten nach dem Man-Whitney-U-Test gerechnet. Ein p-Wert von $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet, die Angabe der p-Werte erfolgte entsprechend $*=<0,05$, $**=<0,01$, $***=<0,001$.

III. Ergebnisse

Es soll untersucht werden, welchen Einfluss die ANT1-Überexpression auf die myokardialen CK-Aktivitäten und ihre Isoformverteilung in der Herzmuskelzelle unter physiologischen und pathologischen Bedingungen ausübt. Hierzu wurden die genannten Parameter an den ANT1-, REN- und doppelt-transgenen sowie an Wildtyp-Tieren als Kontrollgruppe gemessen und analysiert.

III. 1. Aktivität der mitochondrialen Kreatinkinase

Aufgrund der engen Kopplung zwischen ANT1 und CK_{mit} sollte analysiert werden, inwieweit eine veränderte ANT1-Expression die Aktivität der CK_{mit} beeinflusst.

Bei Vergleich der ANT1-transgenen Tiere mit der Kontrollgruppe (WT) zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der mitochondrialen Kreatinkinase, wie Abbildung 5 zeigt.

Bei Vergleich der REN-Tiere mit der Kontrollgruppe konnte dagegen eine signifikant erniedrigte Aktivität der mitochondrialen CK gemessen werden.

Die Überexpression von ANT1 in Renin-transgenen Tieren (ANT/REN) führt wiederum zu einer Normalisierung der mitochondrialen CK-Aktivität, so dass kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp mehr festgestellt werden konnte.

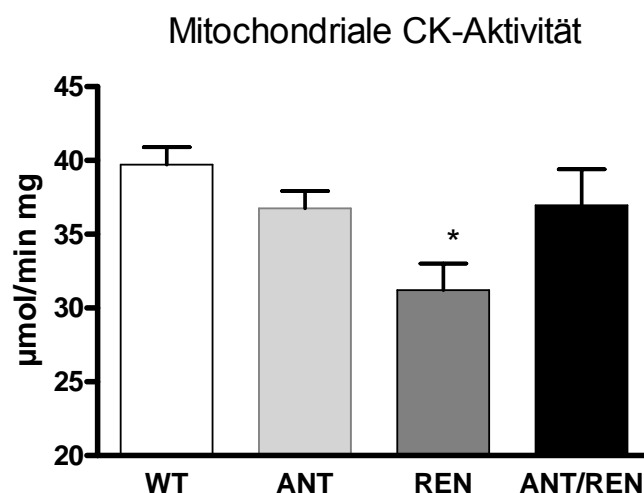


Abbildung 5: Vergleich der mitochondrialen CK-Aktivitäten der Gruppen untereinander. Die CK-Aktivität der REN-Gruppe ist signifikant erniedrigt. WT=Wildtyp, ANT=ANT1-transgene Tiere, REN=Renin-transgene Tiere, ANT/REN=doppelt-transgene Tiere.

III. 2. Aktivität der zytosolischen Kreatinkinase

Bei Vergleich der ANT1-transgenen Tiere mit der Kontrollgruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Aktivität der zytosolischen Kreatinkinase. Bei Vergleich der REN-Tiere mit der Kontrollgruppe konnte dagegen eine signifikant erniedrigte Aktivität des Enzyms gemessen werden.

Bei Vergleich der REN-Tiere mit den doppelt-transgenen Tieren (ANT/REN) fällt jedoch auf, dass die doppelt-transgenen Tiere wieder eine normalisierte CK-Aktivität zeigen. Zwischen ANT/REN- und WT-Tieren war wiederum kein signifikanter Unterschied zu beobachten, wie Abbildung 6 zeigt.

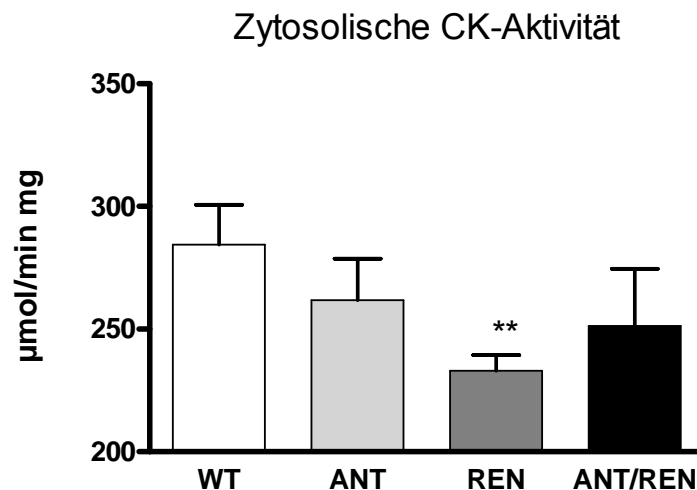


Abbildung 6: Vergleich der zytosolischen CK-Aktivitäten der Gruppen untereinander. Die CK-Aktivität der REN-Gruppe ist signifikant erniedrigt.

III. 3. Isoformverteilung

Untersucht wurde, ob es zu den veränderten Enzymaktivitäten korrespondierende Änderungen in der Verteilung der Isoformen gibt (Abbildung 7).

Bei Vergleich der Anteile der CK_{cyt}-Isoform fällt ein hochsignifikanter Unterschied zwischen REN- und WT-Tieren auf. Bei den REN-Tieren ist der Anteil der CK-BB signifikant erhöht, während der der CK-MM deutlich erniedrigt ist.

Bei gleichzeitiger Überexpression von ANT1- und Renin sind die Anteile der Isoformen dagegen normalisiert. Die ANT-Tiere haben eine Tendenz zu erniedrigter Expression der B-Untereinheit der CK, die statistisch signifikant ist.

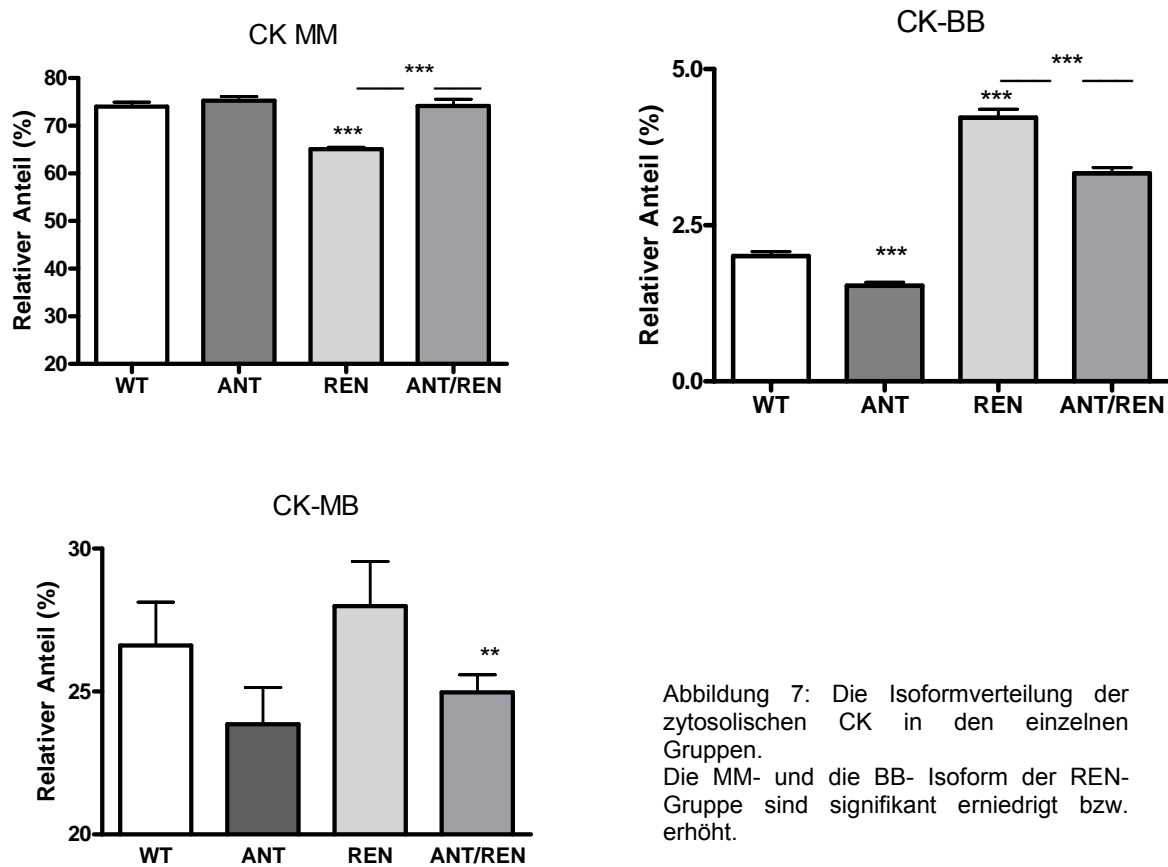


Abbildung 7: Die Isoformverteilung der zytosolischen CK in den einzelnen Gruppen. Die MM- und die BB- Isoform der REN-Gruppe sind signifikant erniedrigt bzw. erhöht.

III. 4. Zusammenfassung

In der REN-Gruppe, als Referenzgruppe für kardial erkrankte Tiere, finden sich signifikant erniedrigte CK-Aktivitäten und ein signifikant erhöhter Anteil der CK-BB- bzw. erniedrigter Anteil der CK-MM-Isoform im Vergleich zum WT.

Die ANT1-Überexpression führt unter physiologischen Bedingungen zu keiner signifikanten Veränderung der mitochondrialen und zytosolischen Kreatinkinaseaktivität, jedoch zu einer erniedrigten CK-BB-Expression. Unter gleichzeitiger REN-Überexpression wirkt die ANT1-Überexpression den bei den REN-Tieren beobachteten Veränderungen im Kreatin Kinasesystem entgegen.

IV. Diskussion

Die ANT1 ist ein zentrales Protein im Energiestoffwechsel der eukaryontischen Zelle. Störungen ihrer Funktion können die Grundlage für eine eingeschränkte Herzleistung sein, wie an Knockout-Mäusen, welche die ANT1 nicht exprimieren, gezeigt wurde (27). Als multifunktionales Protein ist sie auch an der Apoptose beteiligt (53) und ein Bindungspartner für Proteine, wie das pro- bzw. antiapoptotische Bcl-2 und Bax, die ihre Aktivität beeinflussen (9). Zudem binden Proteine der Signaltransduktion wie z. B. BART (10) und Transkriptionsregulatoren wie I-kappa b-alpha (11) an die ANT1. Auch virale Proteine binden an sie, um Apoptosevorgänge zu initiieren oder zu blockieren (12). Sie ist mit ihren verschiedenen Funktionen von entscheidender Bedeutung in Energiestoffwechsel, Apoptose und intrazellulärer Kommunikation.

Wie in der Einleitung besprochen, interagieren CK_{mit}, neben der CK_{cyt} Teil des CK-Systems, und die ANT1 funktionell und räumlich miteinander. In dieser Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss die ANT1-Überexpression auf die Aktivität des CK-Systems gesunder Wildtyp-Tiere und REN-transgener Tiere, die wegen einer Renin-Überexpression an einer hypertensiven Kardiopathie litten, ausübt.

Denkbar wäre, dass eine Überexpression der ANT1 im Wildtyp die Aktivität der beiden CK beeinflusst, etwa durch eine schnellere Substratbereitstellung das CK-System beschleunigt und die Aktivität gesteigert wird. Auf der anderen Seite könnte das CK-System ab einer bestimmten Substratmenge gesättigt sein, so dass der effektive Substratumsatz unverändert bleibt im Sinne einer Sättigungskurve. Letzteres ist mit den Ergebnissen dieser Arbeit vereinbar, denn zwischen den CK-Aktivitäten der ANT1-transgenen und der Wildtyp-Tiere besteht kein signifikanter Unterschied. Die isolierte ANT1-Überexpression führt also unter physiologischen Bedingungen beim Wildtyp trotz engem räumlichen und funktionalen Zusammenhang von ANT1 und CK_{mit} nicht zu einer veränderten Aktivität des CK-Systems.

Dagegen konnte beobachtet werden, dass eine erniedrigte ANT1-Aktivität einen ungünstigen Einfluss auf die Aktivität des CK-Systems ausübt. Das wurde an Menschen und Mäusen beobachtet im Rahmen einer enteroviral bedingten Myokarditis, möglicherweise geschieht dies im Zusammenhang mit der MPTP, an deren Bildung ANT1 und CK_{mit} beteiligt sind (17, 33, 54, 55, 56).

In den REN-Tieren hingegen konnte in dieser Arbeit erstmals beobachtet werden, dass deren mitochondriale und zytosolische CK-Aktivität deutlich vermindert sind. Das ist vereinbar mit einem gestörten Energiestoffwechsel (43) im Rahmen der

hypertensiven Kardiopathie, zu der die Renin-Überexpression führt. Störungen des Energiestoffwechsels wiederum führen zu oxidativem Stress.

Tatsächlich ist das CK-System besonders anfällig für oxidativen Stress. Ein möglicher molekularer Mechanismus sind Modifikationen des aktiven Zentrums der Kreatinkinase (CK). Die mitochondriale CK konnte als Ziel reaktiver Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen identifiziert werden (57). Stickstoffmonoxid (NO) scheint die Aktivität der CK_{mit} und CK_{cyt} durch Bindung an deren Sulphydryl-Gruppen zu vermindern. NO wird freigesetzt im Rahmen erhöhten oxidativen Stresses, z. B. bei Entzündung durch Zytokine wie TNF α (58) oder im Rahmen der beobachteten Hypertrophie.

Bei linksventrikulärer Hypertrophie wurden auch Änderungen der CK-Aktivitäten beobachtet (59). Wegen der Eigenschaft, Mangel an ATP kurzfristig durch Bereitstellung von Kreatinphosphat (PCr) abzupuffern, wirkt sich eine verminderte CK-Aktivität nachvollziehbar ungünstig auf die Herzfunktion aus. Weiter wurde gezeigt, dass eine Verringerung von PCr die Kontraktilität beeinträchtigt und die Überlebensrate etwa nach einem Herzinfarkt herabsetzt (59). CK-Knockout reduziert die kontraktile Reserve (60), und Knockout beider CK-Isoenzyme verringert die myokardiale Regeneration nach ischämischem Stress. Allerdings scheint es auf subzellulärer Ebene zu einer Reorganisation anderer ATP-puffernder Systeme zu kommen (61), wie z. B. der Adenyl-Kinase, die in Teilen den Ausfall des CK-Systems kompensieren. Eine Verringerung von PCr scheint darüber hinaus direkt das Aktinomyosin-System zu beeinflussen, auch wenn die ATP-Menge unbeeinträchtigt ist (62).

Jedenfalls ist eine verringerte Aktivität des CK-Systems bei den REN-transgenen Tieren mit einer herabgesetzten Herzleistung vereinbar, wie sie bei konzentrischer Hypertrophie und folgendem oxidativem Stress beobachtet wird.

Bei den doppelt-transgenen Tieren kann nun beobachtet werden, welchen Einfluss die Überexpression der ANT1 auf die CK-Aktivitäten in einem modellhaft kranken Tier ausübt. Vor dem Hintergrund der Ergebnisse ist z. B. denkbar, dass die ANT1-Überexpression wie bei den einfach ANT1-transgenen Tieren keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität des CK-Systems ausübt und eine Abnahme der CK-Aktivitäten wie bei den REN-Tieren beobachtet wird. Interessanterweise zeigen die Ergebnisse aber, dass eine parallele Überexpression von ANT1 im REN-transgenen Tier die Aktivitäten der mitochondrialen und zytosolischen CK soweit verändert, dass kein signifikanter Unterschied mehr zum Wildtyp gemessen wurde, es also zu einer

Normalisierung kam. Denkbar ist, dass in den REN-transgenen Tieren durch die ANT1-Überexpression ausreichend Substrat in Form von ATP bereitgestellt und damit einer verminderten CK-Aktivität entgegengewirkt wird.

Von besonderer Bedeutung ist möglicherweise der Einfluss der ANT1-Überexpression auf die Komplexe der Atmungskette. Die Komplexe II, III und IV zeigen hierunter eine gesteigerte Aktivität (43). Bei REN-transgenen Ratten konnte eine verminderte Aktivität des Komplex III gefunden werden, die bei doppelt-transgenen ANT1/REN-Tieren nicht zu beobachten war. Möglicherweise stabilisiert die Überexpression der ANT1 die Atmungskette. Über eine Stabilisierung der Atmungskette kann die Freisetzung oxidativer Reagenzien verringert werden, die wiederum, wie oben angeführt, die Funktion der CK über Änderungen am aktiven Zentrum beeinflussen und stören können.

Vor diesem Hintergrund kann eine normalisierte CK-Aktivität bei doppelt-transgenen Tieren als sekundäre Folge des Einflusses der ANT1-Überexpression auf die Atmungskette gedeutet werden. Hiermit vereinbar ist auch, dass die CK-Aktivität bei einfach transgenen ANT1-überexprimierenden Tieren unbeeinträchtigt ist.

So ist möglicherweise nicht die direkte Interaktion von ANT1 und CK Ursache der normalisierten CK-Aktivität der doppelt-transgenen Tiere, sondern eher der stabilisierende Einfluss der ANT1 auf die Enzyme der Atmungskette, der sich dann wiederum günstig auf die Aktivität der CK auswirkt (43).

Neben der Normalisierung der CK-Aktivität in den doppelt-transgenen Tieren, die so betrachtet kein direkter protektiver Mechanismus der Zelle, sondern eher Folge komplexer Änderungen der Atmungskette ist, sind andere, die Zelle schützende Mechanismen als Folge der ANT1-Überexpression denkbar. Im Zusammenhang der ANT1-Überexpression mit einer Stabilisierung der Atmungskette wurde in anderen Arbeiten (43) weiter beschrieben, dass trotz gesteigerter Aktivitäten der Atmungskettenenzyme II-IV keine Zunahme von energiereichen Phosphaten wie ADP, ATP und PCr gemessen werden konnte, so dass von einem beschleunigten, aber nicht vermehrten Energieumsatz ausgegangen werden kann. In diesem Rahmen scheint die ANT1 indirekt über die Atmungskette Einfluss auf die Aktivität der CK_{mit} zu nehmen, ohne deren Aktivität zu steigern; nur in dem Modell, in dem die ANT1 überexprimiert wird, sind die Enzymaktivitäten der Atmungskette und der CK_{mit} im Bereich der Aktivitäten der Kontrollgruppe (43). Die Stabilisierung der Atmungskette durch die ANT1-Überexpression ist für die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der Zelle entscheidend. Dafür spricht einerseits die

normalisierte CK-Aktivität, andererseits die Unterbindung der mitochondrialen Apoptose.

Schließlich ist die ANT1 ein multifunktionales Protein, das auch im Rahmen der Apoptose eine wichtige Rolle spielt. Es konnte in den REN-Tieren beobachtet werden, dass Störungen der oxidativen Phosphorylierung eine Öffnung der mitochondrialen Pore und damit die Einleitung der Apoptose begünstigen (53, 63). Im geöffneten Zustand kommt es zu osmotischem Flüssigkeitseinstrom in das Mitochondrion und zur Freisetzung Caspase aktivierender Faktoren wie Cytochrom C, was zur Schädigung der DNA und letztlich der ganzen Zelle führt (64). Die ANT1 ist ein konstitutiver Bestandteil dieser Pore, der deren Öffnungszustand entscheidend zu regulieren scheint (53). Die bei ANT1-Überexpression beobachtete Stabilisierung der Atmungskette und die CK_{mit} können durch Inhibition der Porenöffnung die mitochondrienvermittelte Apoptoseinduktion behindern (63).

In den doppelt-transgenen ANT/REN-Tieren konnte nun ein stabilisierender Einfluss der ANT1-Überexpression auf die Atmungskette beobachtet werden, so dass Cytochrom C nicht freigesetzt wird, die Caspaseaktivität nicht erhöht ist und die Öffnung der Pore nicht begünstigt wird (63). Die Struktur der Mitochondrien bleibt stabil und die Anzahl apoptotischer Komplexe ist geringer (53). Außerdem erhöht die ANT1-Überexpression die Dichte der inneren mitochondrialen Membran und erniedrigt damit die Durchlässigkeit für Ionen; hierfür spricht eine Zunahme der „respiratory control ratio“ als Parameter für die mitochondriale Membranpermeabilität und Effektivität der Energiekopplung (43).

Interessanterweise gibt es Hinweise darauf, dass die Anwesenheit von CK_{mit} die Stabilität des Porenkomplexes, an dessen Bildung die ANT1 beteiligt ist, stabilisiert bzw. die Funktion der MPTP reguliert (20) und damit der Einleitung der Apoptose entgegenwirkt.

Proteolipidkomplexe, die CK und ANT1 enthalten, haben einen stabilisierenden Einfluß auf die *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP) (18) und damit einen protektiven Einfluss auf die Zelle.

Ob die ANT1 und die CK auch außerhalb der Pore neben einer funktionellen auch eine strukturelle Bindung eingehen, ist unklar. An der ANT1 nachgewiesenes Cardiolipin könnte aber eine Verbindung beider Moleküle vermitteln (20, 21, 22).

Vereinbar sind die Ergebnisse mit dem aktuell diskutierten kardioprotektiven Programm (43). Es wurde beobachtet, dass die Expression von Genen, die Komplexe der oxidativen Phosphorylierung wie Cytochrom C, Cytochrom Oxidase

und ANT1 codieren, nach ischämischem oder hyperthermischem "Preconditioning" gesteigert wird (32, 46, 65). Präconditionierte Mitochondrien zeigten eine Stabilisierung der oxidativen Phosphorylierung nach kurzen derartigen Stressimpulsen.

Der kardioprotektive Prozess bewirkt eine Verringerung der Nekroserate, eine schnellere Rückgewinnung der kontraktilen Funktion und ein verzögertes Auftreten fibrotischer Umbildungen. In diesem Rahmen führt der Transfer von ANT1 durch virale Vektoren in ANT1-defiziente Skelettmuskelzellen zur Erhöhung des mitochondrialen Exports von ATP und zur Rückbildung nekrotischer und fibrotischer Änderungen.

Überexpression bestimmter Proteine, wie dem antiapoptotischen Bcl-2 und PKC_{epsilon}, die direkt mit der ANT1 oder der *Mitochondrial Permeability Transition Pore* (MPTP) interagieren, verstärkt diesen nach Preconditioning einsetzenden protektiven Effekt (48). Bcl-2 steigert die ADP/ATP-Transport-Aktivität der ANT1 (9). Eine erhöhte ANT1-Aktivität wird also auch hier im Rahmen kardioprotektiver Prozesse beobachtet. Eine stabilisierte ANT1- und ATPase-Aktivität sowie eine verbesserte Kopplung zwischen ANT1 und mitochondrialer Kreatinkinase tragen dabei zur Stabilisierung des zytosolischen Energiegehaltes bei (50, 51).

Neben den Aktivitäten waren auch die Expressionsmuster der Isoformen des CK-Systems verändert. Es konnte gezeigt werden, dass es bei den REN-Tieren zu einem Shift kommt; die langsamere B-Untereinheit ist erhöht, die schneller katalysierende M-Form erniedrigt. Die höhere Expression der langsameren Isoform ist mit der generell gestörten Herzfunktion der REN-Tiere vereinbar.

Die ANT1-Tiere zeigen dagegen eine Tendenz zu einer gegenüber dem Wildtyp erhöhten Expression der M-Anteile. Dieser Umstand kann als Folge der ANT1-Überexpression gedeutet werden, in deren Rahmen es zu einer höheren ANT1-Aktivität und einer beschleunigten Substratbereitstellung an das CK-System kommt. Möglicherweise wird die Expression der CK-Isoformen so der Expression bzw. Aktivität der ANT1 angeglichen. Allerdings sind die Änderungen der Expression im CK-System gering und gegenüber den Änderungen der Aktivität vermutlich nicht wesentlich relevant.

Insgesamt scheint die ANT1-Überexpression eine Angleichung von Energiebereitstellung und – transport an physiologische Verhältnisse zu begünstigen.

V. Zusammenfassung

Einleitung: Die ANT1 spielt eine wichtige Rolle im Metabolismus eukaryontischer Zellen einerseits als Bindeglied von mitochondrialem Energieaufbau und zytosolischem –abbau, andererseits als konstitutiver Bestandteil einer die Apoptose modulierenden mitochondrialen Membranpore. In beiden Funktionen besteht eine enge Verbindung zum Enzymsystem der Kreatinkinase, das aus einer zytosolischen und einer mitochondrialen Form besteht. Die ANT1 beliefert das Kreatinkinasesystem mit den gemeinsamen Substraten Adenosin-Di- und –Tri-Phosphat (ADP und ATP). Aufgrund der engen Beziehung zwischen ANT1 und CK soll der Einfluss einer kardialen ANT1-Überexpression auf das Kreatinkinasesystem unter physiologischen und pathologischen Bedingungen analysiert werden.

Methoden: Um den Einfluss der ANT1-Überexpression auf die myokardialen CK-Aktivitäten und ihre Isoformverteilung in der Herzmuskelzelle unter physiologischen und pathologischen Bedingungen zu bestimmen, wurden die genannten Parameter an ANT1-, REN- und doppelt-transgenen, d. h. ANT1 und Renin parallel überexprimierenden Tieren (ANT/REN) sowie an Wildtyp-Tieren gemessen und analysiert. Die Enzymaktivitäten wurden photometrisch, die Expressionsmuster elektrophoretisch bestimmt und densitometrisch ausgewertet. Für die Analysen wurden parametrische und nicht-parametrische Tests verwendet. Bei normalverteilten Standardfehlern wurde nach dem t-Test, bei nicht normalverteilten nach dem Mann-Whitney-U-Test gerechnet.

Ergebnisse: Bei Vergleich der ANT1-transgenen Tiere mit der Kontrollgruppe zeigt sich kein signifikanter Unterschied in der Aktivität des Kreatinkinasesystems, die Enzymaktivitäten der REN-Tiere sind dagegen signifikant erniedrigt. Die doppelt-transgenen Tiere zeigen dagegen dem Wildtyp angeglichen CK-Aktivitäten, ein signifikanter Unterschied besteht nicht.

Schlussfolgerung: Eine erhöhte Expression der ANT1, die in Energiestoffwechsel und Apoptose eine zentrale Rolle spielt, beeinflusst die Aktivität des CK-Systems unter pathologischen Bedingungen günstig. Erniedrigte CK-Aktivitäten an einfach transgenen REN-Tieren konnten durch gleichzeitige Überexpression der ANT1 in doppelt-transgenen ANT/REN-Tieren soweit ausgeglichen werden, dass kein signifikanter Unterschied in der CK-Aktivität gegenüber dem Wildtyp beobachtet werden konnte. Diese Ergebnisse sprechen für eine kardioprotektive Wirkung der ANT1-Überexpression.

VI. Literatur

1. Ingwall JS, Weiss RG. Is the failing heart energy starved? On using chemical energy to support cardiac function. *Circ Res* 2004; 95:135-145.
2. Van Bilsen M, Smeets PJ, Gilde AJ, et al. Metabolic remodelling of the failing heart: the cardiac burn-out syndrome? *Cardiovasc Res* 2004; 61:218-226.
3. Scarabelli TM, Gottlieb RA. Functional and clinical repercussions of myocyte apoptosis in the multifaceted damage by ischemia/reperfusion injury: old and new concepts after 10 years of contributions. *Cell Death and Differ* 2004; 2:144-52.
4. Li K, Warner CK, Hodge JA, et al. A human muscle adenine nucleotide translocator gene has four exons, is located on chromosome 4, and is differentially expressed. *The Journal of Biological chemistry* 1989; 24:13998-14004.
5. Klingenberg M. Dialectics in carrier research: the ADP/ATP carrier and the uncoupling protein. *J Bioenerg Biomembr* 1993; 25:447-457.
6. Doerner A, Pauschinger M, Badorff A, et al. Tissue-specific transcription pattern of the adenine nucleotide translocase isoforms in humans. *FEBS Lett* 1997; 414:258-262.
7. Doerner A, Olesch M, Giessen S, et al. Transcription of the adenine nucleotide translocase isoforms in various types of tissues in the rat. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1417:16-24.
8. Rodic N, Oka M, Hamazaki T, et al. DNA methylation is required for silencing of ANT4, an adenine nucleotide translocase selectively expressed in mouse embryonic stem cells and germ cells. *Stem Cells* 2005; 23:1314-1323.
9. Belzacq AS, Vieira HL, Verrier F, et al. Bcl-2 and Bax modulate adenine nucleotide translocase activity. *Cancer Res* 2003; 63:541-546.
10. Sharer JD, Shern JF, Van VH, et al. ARL2 and BART enter mitochondria and bind the adenine nucleotide transporter. *Mol Biol Cell* 2002; 13:71-83.

11. Bottero V, Rossi F, Samson M, et al. I κ B, the NF- κ B inhibitory subunit, interacts with ANT, the mitochondrial ATP/ADP translocator. *J Biol Chem* 2001; 276:21317-21324.
12. Boya P, Roumier T, Andreau K, et al. Mitochondrion-targeted apoptosis regulators of viral origin. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 304:575-81.
13. Spindler M, Niebler R, Remkes H, et al. Mitochondrial creatine kinase is critically necessary for normal myocardial high-energy phosphate metabolism. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002; 283:680-687.
14. Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the 'phosphocreatine circuit' for cellular energy homeostasis. *Biochem J* 1992; 281:21-40.
15. Wallimann T, Dolder M, Schlattner U, et al. Some new aspects of creatine kinase (CK): compartmentation, structure, function and regulation for cellular and mitochondrial bioenergetics and physiology. *Biofactors* 1998; 8:229-34.
16. Zimmer HG, Trendelenburg C, Kammermeier H, et al. De novo synthesis of myocardial adenine in the rat. Acceleration during recovery from oxygen deficiency. *Circ Res* 1973; 32:635-42.
17. Vendelin M, Lemba M, Saks VA. Analysis of functional coupling: Mitochondrial creatine kinase and adenine nucleotide translocase. *Biophysical Journal* 2004; 87:696-713.
18. Schlattner U, Tokarska-Schlattner M, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in human health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta* 2006; 1762:164-180.
19. Vyssokikh MY, Katz A, Rueck A, et al. Adenine nucleotide translocator isoforms 1 and 2 are differently distributed in the mitochondrial inner membrane and have distinct affinities to cyclophilin D. *Biochem J* 2001; 358:349-58.
20. Dolder M, Wendt S, Wallimann T. Mitochondrial creatine kinase in contact sites: Interaction with porin and adenine nucleotide translocase, role in permeability transition and sensitivity to oxidative damage. *Biol Signals Recept* 2001; 10:93-111.

21. Hackenberg H, Klingenberg M. Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine-5-diphosphate adenosine-5-triphosphate carrier in Triton X-100. *Biochemistry* 1980; 19:548–555.
22. Beyer K, Klingenberg M. ADP/ATP carrier protein from beef heart mitochondria has high amounts of tightly bound cardiolipin, as revealed by ³¹P nuclear magnetic resonance. *Biochemistry* 1985; 24:3821–3826.
23. Fontanesi F, Calmieri L, Scarcia P, et al. Mutations in AAC2, equivalent to human adPEO-associated ANT1 mutations, lead to defective oxidative phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* and affect mitochondrial DNA stability. *Hum Mol Genet* 2004; 3:923-934.
24. Jordens EZ, Palmieri L, Huizing M, et al. Adenine nucleotide translocator 1 deficiency associated with Sengers syndrome. *Ann Neurol* 2002; 52:95-99.
25. Chen XJ. Induction of an unregulated channel by mutations in adenine nucleotide translocase suggests an explanation for human ophthalmoplegia, *Hum Mol Genet* 2002; 11:1835-1843.
26. Siciliano G, Tessa A, Petrini S, et al. Autosomal dominant external ophthalmoplegia and bipolar affective disorder associated with a mutation in the ANT1 gene. *Neuromuscul Disord* 2003; 13:162-165.
27. Graham BH, Waymire KG, Cottrell B, et al. A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 1997; 16:226-234.
28. Esposito LA, Melov S, Panov A, et al. Mitochondrial disease in mouse results in increased oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:4820-4825.
29. Kang D, Hamasaki N. Mitochondrial oxidative stress and mitochondrial DNA. *Clin Chem Lab Med* 2003; 41:1281-1288.
30. Doerner A, Pauschinger M, Schwimmbeck PL, et al. The shift in the myocardial adenine nucleotide translocator isoform expression pattern is associated with an enteroviral infection in the absence of an active T-cell dependent immune response in human inflammatory heart disease. *Journal of the American College of Cardiology* 2000; 35:1778-84.

31. Bosman C, Boldrini R, Fusilli S. Dilated cardiomyopathy in infancy. Ultrastructural image analysis for diagnostic purpose. *Pathol Res Pract* 1989; 185:807-817.
32. McLeod CJ, Jeyabalan AP, Minners JO, et al. Delayed ischemic preconditioning activates nuclear-encoded electron-transfer-chain gene expression in parallel with enhanced postanoxic mitochondrial respiratory recovery. *Circulation* 2004; 110:534-539.
33. Schultheiss HP, Schulze K, Doerner A. Significance of the adenine nucleotide translocator in the pathogenesis of viral heart disease. *Mol Cell Biochem* 2004; 164:319-27.
34. Doerner A, Kallwellis-Opara A, Pauschinger M, et al. Cardiac autoantibodies in viral myocarditis. *Heart Fail Clin Oct* 2005; 1:333-43.
35. Fairweather D, Frisancho-Kiss S, Rose NR. Viruses as adjuvants for autoimmunity: evidence from Coxsackievirus-induced myocarditis. *Reviews in Medical Virology* 2005; 15:17-27.
36. Fairweather D, Kaya Z, Shellam GR, et al. From infection to autoimmunity. *Journal of Autoimmunity* 2001; 16:175-186.
37. Doerner A, Schulze K, Rauch U, et al. Adenine nucleotide translocator in dilated cardiomyopathy: pathophysiological alterations in expression and function. *Mol Cell Biochem* 1997; 174:261-9.
38. Rose NR. The role of infection in the pathogenesis of autoimmune disease. *Seminars in Immunology* 1998; 10:5-13.
39. Rose NR, Hill SL. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1996; 80:92-99.
40. Rose NR, Hill SL. Autoimmune myocarditis. *International Journal of Cardiology* 1996; 54:171-175.
41. Doerner A, Schultheiss HP. The myocardial expression of the adenine nucleotide translocator isoforms is specifically altered in dilated cardiomyopathy. *Herz* 2000; 25:176-80.

42. Doerner A, Giessen S, Gaub R, et al. An isoform shift in the cardiac adenine nucleotide translocase expression alters the kinetic properties of the carrier in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail* 2006; 8:81-89.
43. Walter T, Tschoepe C, Sterner-Kock A, et al. Accelerated mitochondrial adenosine diphosphate/adenosine triphosphate transport improves hypertension-induced heart disease. *Circulation* 2007; 115:333-344.
44. Bogazzi F, Raggi F, Ultimieri F, et al. Cardiac expression of adenine nucleotid translocase-1 in transgenic mice overexpressing bovine GH. *J Endocrinol* 2007; 194:521-7.
45. Khaliulin I, Clarke SJ, Lin H, et al. Temperature preconditioning of isolated rat hearts - A potent cardioprotective mechanism involving a reduction in oxidative stress and inhibition of the mitochondrial permeability transition pore. *J Physiol* 2007; 581:1147-1161.
46. Ning XH, Xu CS, Song YC, et al. Hypothermia preserves function and signaling for mitochondrial biogenesis during subsequent ischemia. *Am J Physiol* 1998; 274:786-793.
47. Baines CP, Song CX, Zheng YT, et al. Protein kinase Cepsilon interacts with and inhibits the permeability transition pore in cardiac mitochondria. *Circ Res* 2003; 92:873-880.
48. Imahashi K, Schneider MD, Steenbergen C, et al. Transgenic expression of Bcl-2 modulates energy metabolism, prevents cytosolic acidification during ischemia, and reduces ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2004; 95:734-741.
49. McCarthy J, McLeod CJ, Minners J, et al. PKCepsilon activation augments cardiac mitochondrial respiratory post-anoxic reserve - A putative mechanism in PKCepsilon cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 38:697-700.
50. Kobara M, Tatsumi T, Matoba S, et al. Effect of ischemic preconditioning on mitochondrial oxidative phosphorylation and high energy phosphates in rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:417-428.
51. Laclau MN, Boudina S, Thambo JB, et al. Cardioprotection by ischemic preconditioning preserves mitochondrial function and functional coupling between

adenine nucleotide translocase and creatine kinase. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:947-956.

52. Flierl A, Chen Y, Coskun PE, et al. Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* 2005; 12:570-578.

53. Vyssokikh MY, Brdiczka D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta biochimica polonica* 2003; 50:389-404.

54. Vyssokikh M, Brdiczka. VDAC and peripheral channelling complexes in health and disease. *Mol Cell Biochem* 2004; 257:117-126.

55. Schulze K, Schultheiss HP. The role of the ADP/ATP carrier in the pathogenesis of viral heart disease. *Eur Heart J* 1995; 16:64-67.

56. Schulze K, Witzenbichler B, Christmann C, et al. Disturbance of myocardial energy metabolism in experimental virus myocarditis by antibodies against the adenine nucleotide translocator. *Cardiovasc Res* 1999; 44:91-100.

57. Gross WL, Bak MI, Ingwall JS, et al. Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:5604-5609.

58. Zhang C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. *Basic Res Cardiol* 2008; 103:398-406.

59. Horn M, Remkes H, Stromer H, et al. Chronic phosphocreatine depletion by the creatine analogue betaguanidinopropionate is associated with increased mortality and loss of ATP in rats after myocardial infarction. *Circulation* 2001; 104:1844-1849.

60. Crozatier B, Badoul T, Boehm E, et al. Role of creatine kinase in cardiac excitation-contraction coupling: studies in creatine kinase-deficient mice. *FASEB J* 2002; 16:653-660.

61. Dzeja PP, Terzic A. Phosphotransfer networks and cellular energetics. *J Exp Biol* 2003; 206:2039-2047.

62. Ogut O, Brozovich FV. Creatine phosphate consumption and the actomyosin crossbridge cycle in cardiac muscles. *Circ Res* 2003; 93:54-60.
63. Ly JD, Grubb DR, Lawen A. The mitochondrial membrane potential in apoptosis. *Apoptosis* 2003; 8:115-128.
64. Halestrap A. A pore way to die. *Nature* 2005; 434:578-579.
65. Das DK, Maulik N. Preconditioning potentiates redox signaling and converts death signal into survival signal. *Arch Biochem Biophys* 2003; 420:305-311.

VII. Danksagung

Ich danke meinen Eltern dafür, dass sie mir durch Erziehung und wirtschaftliche Unterstützung mein Studium und die Promotion grundsätzlich ermöglicht haben und immer da waren. Meiner Betreuerin Frau Dr. Andrea Dörner danke ich für die beständige kritische Unterstützung und die Anleitung zu wissenschaftlichem Fragen, Denken und Arbeiten. Bei meinem Doktorvater Herrn Professor Schultheiss bedanke ich mich für die gestellten Rahmenbedingungen. Nicht zuletzt gilt manchen meiner Lehrer am Arndt-Gymnasium in Krefeld ganz besonderer Dank und natürlich meinen Brüdern und Freunden.

VIII. Lebenslauf

Der Lebenslauf des Autors wird aus datenschutzrechtlichen Gründen an dieser Stelle nicht veröffentlicht.

Erklärung

„Ich, Nikias Ioannis Sifarikas, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: ‚Einfluss von Adenin-Nukleotid-Translokase-1-Überexpression auf das System der Kreatinkinase‘ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

25.03.2010

Unterschrift