

# JÜRGEN SCHRADER

## **Bildgebung des Herzens und der Gefäße: Die Maus als Modellsystem**

Seit der vollständigen Entschlüsselung des menschlichen Genoms wissen wir, dass ein komplexer Organismus wie der Mensch mit seinen vielfältigen Leistungen und Fähigkeiten durch ca. 30.000 Gene als primäre Informationsträger gesteuert wird. Dies ist eine erstaunlich geringe Zahl, bedenkt man, dass z. B. ein moderner Airbus bereits aus etwa 150.000 unterschiedlichen Einzelteilen zusammengesetzt ist. Wie das hohe Maß an biologischer Komplexität bei all unseren körperlichen und geistigen Leistungen entsteht, ist bisher kaum in Ansätzen verstanden und stellt ein zentrales Problem biomedizinischer Forschung dar.

Eine Möglichkeit, sich diesem Problem experimentell zu nähern, besteht darin, im Tier mit molekulargenetischen Methoden ein bestimmtes Gen auszuschalten bzw. überzuexprimieren und die funktionellen Konsequenzen zu untersuchen. Damit ist es möglich, Rückschlüsse auf die Genfunktion zu ziehen. Bekanntermaßen wird die in der Doppelhelix gespeicherte genetische Information in Proteine (Eiweiße) übersetzt, und diese Proteine sind die eigentlichen Träger von Funktionen. So spielen z. B. bei der Blutstillung nach einer Verletzung mehr als 100 Proteine eine Rolle und gewährleisten im Zusammenspiel, dass die Blutung normalerweise schnell zum Erliegen kommt. Ähnliche Überlegungen gelten für alle anderen komplexen Leistungen unseres Körpers: Vielfältige Regelkreise gewährleisten, dass wichtige Organfunktionen trotz Störeinflüssen aufrechterhalten werden. Die Beziehungen zwischen der Summe der in unseren Genen kodierten Informationen, dem Genotyp, und dem durch die Gene bestimmten Erscheinungsbild des Organismus, dem Phänotyp, kennzeichnen somit das Spannungsfeld, in dem moderne krankheitsorientierte Forschung stattfindet. Es besteht die berechtigte Hoffnung, mit einem systembiologischen Ansatz die Ursachen und Konsequenzen von Krankheiten besser zu verstehen.

Die Anwendung transgener Tiere in der Grundlagenforschung hat im letzten Jahrzehnt stetig zugenommen, da man davon ausgehen kann, dass die grundsätzlichen Mechanismen der Organfunktionen insbesondere der Herz- und Kreislaufkontrolle in der Maus ähnlich wie beim Menschen ablaufen. Bei der Erzeugung transgener Tiere lassen sich zwei unterschiedliche Ansätze unterscheiden. Einerseits können einzelne Gene über- oder ektopexprimiert werden; d. h., man kann die Auswirkungen einer erhöhten Proteinaktivität bzw. die Folgen einer ortsfremden Expression untersuchen. Alternativ erlaubt es die Technik der homologen Rekombination in embryonalen Stammzellen der Maus, gezielt Gene auszuschalten, so dass in den resultierenden Mausmutanten die Auswirkungen des Gendefekts untersucht werden können. Unter Verwendung gewebespezifischer Promotoren ist es auch möglich, Veränderungen der Genexpression auf bestimmte Zellen bzw. Organe zu beschränken, sogar unter genauer zeitlicher Kontrolle. Zur Erzeugung transgener Tiere ist ein hohes Maß an technischem Know-how erforderlich, es ist aber auch ein sehr zeitaufwändiger Prozess. Auf der anderen Seite hat man damit die einzigartige

Möglichkeit, selektiv und spezifisch ein Genprodukt zu verändern und die Auswirkungen auf den Gesamtorganismus zu untersuchen.

Um Veränderungen der Herz- und Gefäßfunktion an der Maus nach einer genetischen Intervention messen zu können, mussten die Analysemethoden erheblich verfeinert, insbesondere miniaturisiert werden. Eine ausgewachsene Maus wiegt nämlich typischerweise nur 25 bis 30 g, das Mäuseherz lediglich 150 bis 200 mg bei einer Herzfrequenz von 550 Schlägen in der Minute, was etwa dem achtfachen Wert des Menschen entspricht. In den vergangenen Jahren haben wir am Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie mit Hilfe der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) Methoden etabliert, die eine vollständige Charakterisierung von Herz und Gefäßen genetisch veränderter Mäuse erlauben. Inzwischen sind wir in der Lage, nahezu alle in der Klinik üblichen diagnostischen Untersuchungen auch an der Maus durchzuführen. Abbildung 1 fasst das diagnostische Spektrum der „Düsseldorfer Mäuseklinik“ zusammen. Ein besonderer Vorteil des tierexperimentellen Ansatzes ist hierbei die Analyse von Parametern, die am Menschen auf Grund ethischer Gründe nicht so einfach erhoben werden können, für das Verständnis der Krankheitsentstehung aber äußerst wichtig sind: die vollständige genetische Analyse von entnommenen Gewebe mittels Genarrays (*Genomics*) bzw. die massenspektrometrische Analyse der Proteinzusammensetzung (*Proteomics*).

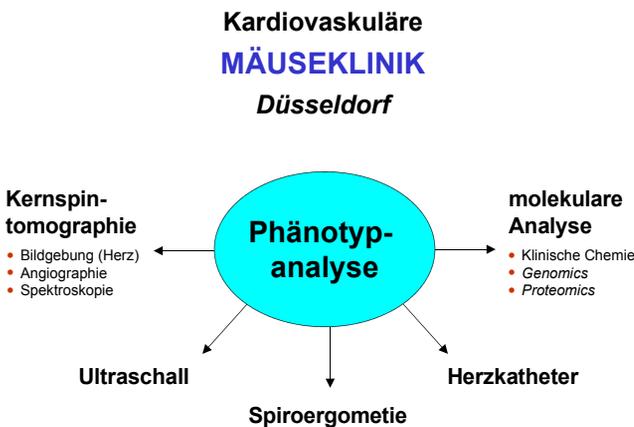


Abb. 1: Diagnostisches Spektrum der „Düsseldorfer Mäuseklinik“.

Ein besonderes Maß an Expertise haben wir in Düsseldorf inzwischen bei der Bildgebung von Herz und Gefäßen mittels Kernspintomographie, oder synonym Magnetresonanztomographie (MRT). Im Prinzip beruht die MRT auf der physikalischen Eigenschaft, dass sich Protonen des Körperwassers ( $H_2O$ ) in einem starken Magneten – ähnlich wie eine Kompassnadel – parallel zum Feld ausrichten. Eingestrahlte Radiowellen führen zu einer kurzfristigen Ausrichtung der Protonen in Gegenfeldrichtung und veranlassen sie bei der Rückkehr in den Ursprungszustand zur Energieabgabe; diese kann lokalisiert und dann zu einem Bild zusammengesetzt werden. Während ein klinisches MRT-Gerät eine Magnetfeldstärke von typischerweise 1,5 Tesla besitzt, beträgt der vergleichbare Wert des uns zur Verfügung stehenden Forschungsgerätes 9,4 Tesla. Wie Abbildung 2 belegt, können da-

mit hoch aufgelöste Bilder des Mäuseherzens mit großem Detailreichtum aufgenommen werden. Die Bestimmung von Wanddicke, Form des Herzens, ventrikulärer Volumina und Myokardmasse in dreidimensionaler Form ist damit routinemäßig möglich. Der Vergleich zwischen Systole und Diastole ergibt außerdem die Pumpleistung des Herzens als dynamische Größe.



Abb. 2: MRT-Darstellung des Herzens in einer lebendigen Maus. Bei der gegebenen Auflösung kann man sogar die Abgänge der Koronargefäße sehen. Aufnahmedauer: zwei Minuten.

In ähnlicher Weise ist es möglich, das Gefäßsystem darzustellen. Abbildung 3 zeigt eine Aufnahme der Blutversorgung des Beckengebietes und der Hinterläufe einer Maus. Besonders hervorzuheben ist, dass diese Aufnahme ohne Verwendung eines Kontrastmittels mit Hilfe eines speziellen Gradientenechoverfahrens gewonnen wurde. Damit können auch kleinste Gefäße, wie z. B. in der Hinterpfote, sehr gut dargestellt werden. Mit diesem Verfahren wird es in Zukunft möglich sein, die Progression arteriosklerotischer Gefäßveränderungen zu verfolgen, aber auch die Regression nach therapeutischen Interventionen. Hier erwarten wir neue Einsichten in die Entstehung und Therapie dieser Volkskrankheit.

Mit Hilfe von starken Magneten können nicht nur Bilder aus dem Inneren eines Organismus aufgenommen werden; dieses Verfahren eignet sich auch für bestimmte Proteine wie das Myoglobin, für kleinmolekulare Substanzen wie das Adenosintriphosphat (ATP) oder die Glukose und sogar dazu, Ionen in einem Organ wie z. B. dem Herzen nicht invasiv und ohne Strahlenbelastung zu bestimmen (Tabelle 1). Auch hier ist es der große Vorteil dieser so genannten Kernspinresonanzspektroskopie (NMR<sup>1</sup>-Spektroskopie), dass Messungen am lebenden Tier oder an Organen durchgeführt werden können, wenn notwendig sogar mehrmals. Man kann damit wichtige Fragen zum Stoffwechsel insbesondere der

---

<sup>1</sup> Nuclear Magnetic Resonance.



Abb. 3: MRT-Gefäßdarstellung des Beckengebietes und der Hinterläufe einer Maus ohne Anwendung eines Kontrastmittels. Man kann sogar die feinen Gefäßverzweigungen an der Hinterpfote darstellen. Aufnahmedauer: vier Minuten.

energiereichen Phosphatverbindungen und zur Ionenhomöostase z. B. beim Herzinfarkt oder bei einer Herzinsuffizienz bearbeiten.

Beispielhaft sollen hier unsere Untersuchungen zum Myoglobin etwas näher erläutert werden. Myoglobin ist ein seit langem bekanntes Hämprotein, das im Muskel in hoher Konzentration vorkommt und dort für dessen rote Farbe verantwortlich ist. Historisch gesehen war Myoglobin auch das erste Protein, dessen dreidimensionale Struktur aufgeklärt wurde, und zwar von John Kendrew<sup>2</sup> (Nobelpreis für Chemie 1962). Seitdem steht in jedem Lehrbuch, dass die Hauptaufgabe von Myoglobin im Muskel in der Sauerstoffspeicherung bestehe.<sup>3</sup> Um dies näher zu untersuchen, züchteten wir in unserem Institut vor einigen Jahren eine Mausmutante, die kein Myoglobin mehr besaß.<sup>4</sup> Zu unserer großen Überraschung fanden wir, dass diese transgene Maus voll lebensfähig war, sich regelgerecht vermehrte und am Herzen auch keine Funktionseinschränkungen aufwies. Wie ist dies zu erklären? Eine detaillierte Analyse in unserer Mausklunik ergab, dass als Folge des

<sup>2</sup> Vgl. Kendrew (1961).

<sup>3</sup> Vgl. Wittenberg und Wittenberg (1989).

<sup>4</sup> Vgl. Gödecke *et al.* (1999).

## Biologisch relevante Kerne

$^1\text{H}$	$\rightarrow$	$\text{H}_2\text{O}$	$\rightarrow$	<b>Bildgebung</b>
		$\rightarrow$ <b>Myoglobin</b>	$\rightarrow$	<b>Sauerstoffbelastung</b>
$^{31}\text{P}$	$\rightarrow$	<b>ATP, PCr</b>	$\rightarrow$	<b>Energiestoffwechsel</b>
$^{23}\text{Na}$	$\rightarrow$	$\text{Na}_{\text{int}}/\text{Na}_{\text{ext}}$	$\rightarrow$	<b>Ionenhomöostase</b>
$^{13}\text{C}$	$\rightarrow$	<b>Glukose</b>	$\rightarrow$	<b>Stoffwechsel- untersuchungen</b>

Tabelle 1: Zusammenstellung der Atomkerne, die mit NMR-Spektroskopie erfasst werden können, sowie entsprechender Metaboliten und deren Funktionen im Stoffwechsel.

Verlustes von Myoglobin eine ganze Reihe von Kompensationsmechanismen (Erhöhung der Kapillardichte, Änderungen der Substratutilisation usw.) aktiviert wird, die letztlich bewirken, dass ausreichend Sauerstoff an die Mitochondrien, die Kraftwerke der Zelle, transportiert wird.<sup>5</sup> Die Myoglobin-Mutante ist ein schönes Beispiel dafür, dass der Verlust eines Gens, das für ein quantitativ wichtiges Protein im Muskel kodiert, nicht notwendigerweise zu einem Funktionsdefekt führt.

Darüber hinaus konnten wir durch einen Vergleich der Myoglobin-Verlustmutante mit Kontrolltieren zwei wichtige neue Funktionen von Myoglobin im Stoffwechsel des Muskels entdecken. Es war die Fähigkeit von Myoglobin, sowohl Stickstoffmonoxid (NO) als auch freie Sauerstoffradikale sehr effektiv abzubauen.<sup>6</sup> Für den Nachweis, dass Myoglobin NO-Oxidasefunktion besitzt, war die NMR-Spektroskopie von entscheidender Bedeutung. Wie in Abbildung 4 dargestellt, kommt es als Folge einer Gabe von NO in steigender Konzentration zu einer Abnahme des Myoglobin- und einer Zunahme des Metmyoglobinsignals – ein Effekt, der rasch reversibel ist. Diese Versuche belegten, dass dem Myoglobin neben seiner Trägerfunktion für Sauerstoff eine wichtige Entgiftungsfunktion im Herzstoffwechsel zukommt.<sup>7</sup>

Der Einsatz von Magneten zur Bildgebung hat nicht nur die Diagnose von Krankheiten in der Klinik erheblich verbessert. MRT und NMR sind darüber hinaus auch in der Forschung ein wichtiges Werkzeug, um die Beziehungen zwischen Genotyp und Phänotyp im Detail zu untersuchen. Dadurch lernen wir die Funktionen bestimmter Gene in einem Krankheitsprozess besser zu verstehen, sehen aber auch, dass komplexe molekulare Regelkreise dafür verantwortlich sind, das Überleben des Gesamtorganismus zu garantieren, wenn eine Genfunktion z. B. durch eine Mutation ausfällt.

<sup>5</sup> Vgl. Gödecke *et al.* (1999).

<sup>6</sup> Vgl. Flögel *et al.* (2001) sowie Flögel *et al.* (2004).

<sup>7</sup> Vgl. Flögel *et al.* (2001), Gödecke *et al.* (2003) sowie Wunderlich *et al.* (2003).

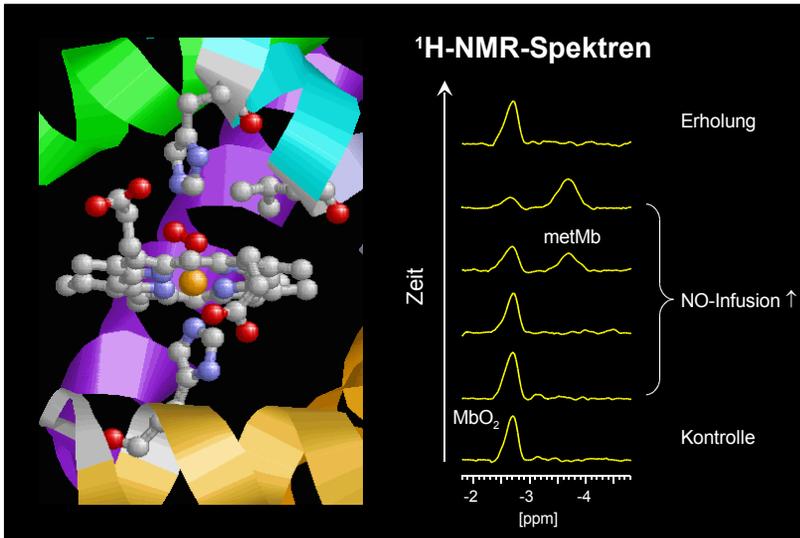


Abb. 4: Spektroskopische Messung von Myoglobin am Herzen der Maus. Der linke Teil der Abbildung zeigt die Hämstruktur des Myoglobins und die Protonen von Valin 68, die als „Antennen“ fungieren und spektroskopisch erfassbar sind. Auf der rechten Seite ist ein typisches Myoglobinspektrum abgebildet, das bei Gabe von Stickstoffmonoxid (NO) an Signalintensität abnimmt bei gleichzeitiger Zunahme des Signals für Metmyoglobin. Die Messungen wurden nicht invasiv am schlagenden Herzen der Maus durchgeführt.

**Danksagung:** Danken möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meines Institutes, die unsere Düsseldorfer Mäuseklinik so erfolgreich mit aufgebaut haben. Besonders erwähnen möchte ich Herrn Dr. Flögel – tatkräftig unterstützt durch Herrn Dr. Jacoby – der alle modernen Methoden der Bildgebung und Spektroskopie etabliert hat und dabei auf die exzellenten Arbeiten von Herrn PD Dr. Decking aus der Startphase aufbauen konnte. Unsere MRT- und NMR-Untersuchungen wurden und werden durch die DFG im Einzelverfahren und im Rahmen des Sonderforschungsbereiches 612 „Molekulare Mechanismen kardiovaskulärer Funktionen und Funktionsstörungen“ finanziell unterstützt.

## Literatur

- FLÖGEL, U., M. W. MERX, A. GÖDECKE, U. K. DECKING und J. SCHRADER. „Myoglobin: A scavenger of bioactive NO“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 98 (2001), 735-740.
- FLÖGEL, U., A. GÖDECKE, L. O. KLOTZ und J. SCHRADER. „Role of myoglobin in the antioxidant defense of the heart“, *FASEB Journal* 18 (2004), 1156-1158.
- GÖDECKE, A., U. FLÖGEL, K. ZANGER, Z. DING, J. HIRCHENHAIN, U. K. DECKING und J. SCHRADER. „Disruption of myoglobin in mice induces multiple compensatory mechanisms“, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96 (1999), 10495-10500.

- GÖDECKE, A., A. MOLOJAVYI, J. HEGER, U. FLÖGEL, Z. DING, C. JACOBY und J. SCHRADER. „Myoglobin protects the heart from inducible nitric-oxide synthase (iNOS)-mediated nitrosative stress“, *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), 21761-21766.
- KENDREW, J. C. „The three-dimensional structure of a protein molecule“, *Scientific American* 205 (1961), 96-111.
- WITTENBERG, B. A. und J. B. WITTENBERG. „Transport of oxygen in muscle“, *Annual Reviews of Physiology* 51 (1989), 857-878.
- WUNDERLICH, C., U. FLÖGEL, A. GÖDECKE, J. HEGER und J. SCHRADER. „Acute inhibition of myoglobin impairs contractility and energy state of iNOS-overexpressing hearts“, *Circulation Research* 92 (2003), 1352-1358.