

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Direktor (kommissarisch): Prof. Dr. med. Ralf Stahlmann

Charakterisierung des kardialen Phänotyps SERCA2a-transgener Ratten

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von Wolfgang Weiß
aus Berlin

Referent: Priv.-Doz. Dr. R. Vetter

Korreferent: Prof. Dr. M. Bader

Gedruckt mit Genehmigung der Charité - Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 22.09.2006

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	IX
1. Einleitung	1
1.1. Die Ca ²⁺ -ATPase SERCA2a des sarkoplasmatischen Retikulums	2
1.1.1. SERCA-Isoformen und molekulare Struktur	2
1.1.2. Ca ²⁺ -Transportmechanismus	4
1.1.3. Regulation der Ca ²⁺ -Transportaktivität durch Phospholamban	5
1.2. SERCA2a und Ca ²⁺ -Regulation im intakten Herz	6
1.3. SERCA2a und Ca ²⁺ -Regulation bei Herzhypertrophie/-insuffizienz	9
1.4. Pharmakologische Verbesserung des SERCA2a-vermittelten Ca ²⁺ -Transports	11
1.5. Gentechnische Beeinflussungen des retikulären Ca ²⁺ -Transports	13
1.6. Zielstellung der Arbeit	15
2. Material und Methoden	16
2.1. Tierhaltung	16
2.2. Tötung und Organentnahme	16
2.3. <i>In vitro</i> Methoden zur Genotypisierung	16
2.3.1. Schwanzspitzen-Biopsie	17
2.3.2. Genomische DNA-Isolierung	17
2.3.3. Bestimmung der DNA-Konzentration	18
2.3.4. ApaI-Restriktionsverdau genomischer DNA	18
2.3.5. DNA-Elektrophorese	19
2.3.6. Southern Blot	19
2.3.7. PCR	21
2.4. <i>In vitro</i> Methoden zur kardialen Phänotypisierung	23
2.4.1. RNA-Isolierung	23
2.4.2. Northern Blot	24
2.4.3. Dot Blot für RNA	27
2.4.4. Dot Blot für DNA	28
2.4.5. Isolation von Kardiomyozyten	28
2.4.6. Herzhomogenate	29
2.4.7. Myofibrillen-freie Membranpräparate	30
2.4.8. Messung membranärer Ca ²⁺ -Transportaktivitäten	31
2.4.8.1. Oxalat-stimulierter Ca ²⁺ -Transport	31
2.4.8.2. Na ⁺ -Gradient getriebener ⁴⁵ Ca ²⁺ -Transport	33
2.4.9. Proteinbestimmung	34
2.4.10. Western Blot	35
2.4.11. Phospholamban-ELISA	37
2.5. <i>In vivo</i> Methoden zur kardialen Phänotypcharakterisierung	38
2.5.1. Isoliertes, retrograd perfundiertes Herz	38

2.5.1.2.	Perfusionsanlage	38
2.5.1.3.	Perfusionslösung	38
2.5.1.4.	Herzisolierung und Präparation	40
2.5.1.5.	β -adrenerge Stimulation	41
2.5.1.6.	Datenaufzeichnung und -verarbeitung	42
2.5.1.7.	Geräte und sonstige Materialien	43
2.5.1.8.	Chemikalien	43
2.6.	Statistik	44
3.	Ergebnisse	45
3.1.	Genotypisierung und Zucht SERCA2-transgener Ratten	45
3.1.1.	Genotypisierung mit Southern Blot-Technik	45
3.1.2.	Genotypisierung mit PCR	45
3.1.3.	Kopienanzahl des SERCA2-Transgens	45
3.1.4.	Genotypverteilung und Wurfgröße	48
3.2.	Allgemeiner Phänotyp SERCA2-transgener Ratten	49
3.3.	Kardialer Phänotyp SERCA2-transgener Ratten	51
3.3.1.	Herzfeuchtgewichte	51
3.3.2.	SERCA2-mRNA im Herzen und anderen Geweben	51
3.3.2.1.	Kardiale SERCA2a-mRNA bei männlichen und weiblichen Tieren	52
3.3.2.2.	SERCA2a-mRNA-Signal im Dot Blot	53
3.3.2.3.	mRNA-Spiegel von Transkripten anderer Ca^{2+} -regulierender Gene	54
3.3.2.4.	Atriale SERCA2a-mRNA-Spiegel	57
3.3.3.	Kardiales SERCA2- und Phospholamban-Protein	58
3.3.4.	SERCA2a-katalysierter Ca^{2+} -Transports <i>in vitro</i>	59
3.3.4.1.	Ca^{2+} -Abhängigkeit	59
3.3.4.2.	Stimulierung durch Proteinkinase A	60
3.3.4.3.	Hemmung durch Thapsigargin	62
3.3.4.4.	Einfluss von Ruthenium-Rot	62
3.3.5.	Sarkolemmale Na^+ - Ca^{2+} -Austauscheraktivität	63
3.3.6.	Isoliert perfundierte Herzen	64
3.3.6.1.	Linksventrikuläre Kontraktilität und Relaxation	64
3.3.6.2.	Chronotrope Isoproterenol-Wirkung	66
3.3.6.3.	Inotrope Isoproterenol-Wirkung	66
3.3.6.4.	Lusitrope Isoproterenol-Wirkung	68
3.3.7.	Linksventrikuläre Funktion <i>in situ</i>	71
4.	Diskussion	72
4.1.	Transgene Ratten als Tiermodell	72
4.2.	Zucht SERCA2-transgener Ratten	73
4.3.	Konstitutive SERCA2a-Überexpression in Herzen transgener Ratten	74
4.4.	Kardiale Expression anderer Proteine des SR	76
4.5.	SERCA2-Überexpression und Ca^{2+}-Transportaktivität	76
4.6.	Sarkolemmaler Na^+-Ca^{2+}-Austauscher bei SERCA2-Überexpression	79

4.7.	Kardiale SERCA2-Überexpression und kontraktile Funktion <i>in vivo</i>	80
4.8.	Transgene SERCA2-Überexpression und Funktion isolierter Herzen	80
4.9.	Ausblick	82
5.	Zusammenfassung	83
6.	Schriftenverzeichnis	85
7.	Anhang	98
7.1.	Danksagung	98
7.2.	Curriculum Vitae	99
7.3.	Veröffentlichungen	100
8.	Appendix	103
8.1.	Reaktionsbedingungen	103
8.2.	Stabilität auf Eis gelagerter Herzhomogenate	103
8.3.	Temperaturabhängigkeit	103
8.4.	Proteinabhängigkeit	104
8.5.	Zeitabhängigkeit	105

Abkürzungsverzeichnis

ANF	Antinatriuretisches Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
Ca ²⁺	Calciumionen
[Ca ²⁺]	Calciumionenkonzentration
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
+dP/dt _{max}	maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit der Systole
-dP/dt _{max}	maximale Druckabfallgeschwindigkeit der Diastole
dsDNA	Doppelstrang DNA
ssDNA	Einzelstrang DNA
ECC	elektromechanische Kopplung
EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
L x B x H	Länge x Breite x Höhe
LV	linker Ventrikel
LV + S	linker Ventrikel mit Septum
LVP	linksventrikulärer systolischer Druck
LVDP	maximal entwickelter linksventrikulärer Druck
LVEDP	linksventrikulärer enddiastolischer Druck
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
NCX	sarkolemmaler Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NTG	transgen-negative Ratten
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PMCA	sarkolemmale Ca ²⁺ -ATPase
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodinrezeptor
RV	rechter Ventrikel
SSC	Natriumchlorid-/Natriumcitratpuffer
SD	Sprague Dawley
SERCA	Ca ²⁺ -ATPase des sarko(endo)plasmatischen Retikulums
SERCA2a	kardiale SERCA-Isoform
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
TG	transgene SERCA2a-Ratten

U	Einheiten
v/v	prozentualer Anteil eines Substanzvolumens am Gesamtvolumen
w/v	Masse einer Substanz in g pro 100 ml Lösungsvolumen

Abbildungsverzeichnis

1.1	Zweidimensionales Modell der kardialen Ca^{2+} -ATPase SERCA2a des sarkoplasmatischen Retikulums	3
1.2	Konformationszustände der Ca^{2+} -ATPase	4
1.3	Schematischer Überblick über transmembranäre Ca^{2+} -Bewegungen und beteiligte Proteine bei der Regulation der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in der Herzmuskelzelle	7
1.4	Schematischer Überblick über gestörte Ca^{2+} -Fluxe und beteiligte Ca^{2+} -Transportproteine bei myozytärer Ca^{2+} -Dysregulation pathologisch hypertrophierter und insuffizienter Herzen	10
1.5	Potenzielle Interventionen zur Verbesserung des Phospholamban-regulierten SERCA2a-katalysierten Transports von Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum	11
2.1	Teilsequenz des humanen CMV-Immediate-Early Enhancer zwischen den Basenpaaren 119 und 422	22
2.2	Prinzip der Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme	32
2.3	Prinzip der Millipore-Filtrationstechnik	33
2.4	Schematische Darstellung der Versuchsanlage für die Untersuchung der linksventrikulären Funktion isolierter, retrograd perfundierter Rattenherzen mittels Ballonkatheter	39
3.1	Southern Blot genomischer DNA von Nachkommen der SERCA2-transgenen Ratten der Linie L 1167	46
3.2	Ethidiumbromid gefärbtes 1,5%-iges Agarosegel mit PCR-Produkten der Teilsequenz des Transgen-spezifischen humanen CMV-Immediate-Early-Enhancer von Nachkommen SERCA2-transgener Ratten der Linie L1167	47
3.3	Abhängigkeit des SERCA2-spezifischen cDNA-Sonden-Signals von im Dot Blot aufgetragener linksventrikulärer DNA	47
3.4	Anzahl der transgenen und nicht-transgenen Nachkommen heterozygoter SERCA2a-transgener Ratten der Linie 1167	48
3.5	Stammbaumauszug der SERCA2a-transgenen Rattenlinie 1167	48
3.6	Wurfgrößenverteilung der SERCA2a-transgenen Rattenlinie 1167	49
3.7	Körpergewichtsentwicklung von Nachkommen SERCA2-transgener Ratten der Linie 1167	50
3.8	SERCA2-mRNA in unterschiedlichen Geweben nicht-transgener und SERCA2-transgener Ratten der Linie 1167	52

3.9	Northern Blot Analyse von linksventrikulärer SERCA2- und GAPDH-mRNA von weiblichen SERCA2-transgenen Ratten der Linie 1167	53
3.10	Abhängigkeit des SERCA2-mRNA-Signals von der aufgetragenen Menge an kardialer Gesamt-RNA	54
3.11	Quantitative Dot Blot Analyse linksventrikulärer RNA-Spiegel für männliche nicht-transgene und SERCA2-transgene Ratten der Linie 1167	55
3.12	Quantitative Dot Blot Analyse linksventrikulärer RNA-Spiegel für weibliche nicht-transgene und SERCA2-transgene Ratten der Linie 1167	56
3.13	Quantitative Dot Blot Analyse atrialer RNA-Spiegel für männliche nicht-transgene und SERCA2-transgene Ratten der Linie 1167	57
3.14	Western Blot-Analyse von SERCA2a-Proteinspiegeln in adulten isolierten Kardiomyozyten von nicht-transgenen und SERCA2-transgenen Ratten	58
3.15	Linksventrikuläre immunreaktive Phospholambanspiegel in Membranpräparaten von nicht-transgenen und SERCA2-transgenen Ratten	59
3.16	Oxalat-stimulierte SERCA2a-katalysierte Ca^{2+} -Aufnahme in linksventrikulären Homogenaten SERCA2-transgener und nicht-transgener Ratten bei unterschiedlichen freien Ca^{2+} -Konzentrationen	59
3.17	Oxalat-stimulierter Ca^{2+} -Transport in Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums linksventrikulärer Homogenate von nicht-transgenen und SERCA2-transgenen Ratten in Gegenwart von 2 μM katalytischer Untereinheit der Proteinkinase A oder 10 μM Inhibitorpeptid von PKA	61
3.18	Konzentrationsabhängige Hemmwirkungen von Thapsigargin auf den Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transport in linksventrikulären Homogenaten von nicht-transgenen und SERCA2-transgenen Ratten	62
3.19	Wirkung von Ruthenium-Rot auf die Oxalat-stimulierte Ca^{2+} -Transportrate des sarkoplasmatischen Retikulums von nicht-transgenen und SERCA2-transgenen Ratten	63
3.20	Na^+ -abhängiger Ca^{2+} -Transport in Herzmembranpräparaten männlicher nicht-transgener und SERCA2-transgener Ratten	64
3.21	Registrierte linksventrikuläre Druckkurven und darunter deren 1. Ableitung je eines isovolumentrisch kontrahierenden isolierten Herzens einer nicht-transgenen und einer SERCA2-transgenen männlichen Ratte	64
3.22	Repräsentative linksventrikuläre Druckkurven und dazugehörige 1. Ableitung β -adrenerg stimulierter isolierter Herzen einer nicht-transgenen und einer SERCA2-transgenen männlichen Ratte	66

3.23	Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die spontane Herzfrequenz isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen und nicht-transgenen männlichen Ratten	67
3.24	Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf den maximal entwickelten linksventrikulären Druck (dLVP) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen und nicht-transgenen männlichen Ratten	67
3.25	Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($+dP/dt_{\max}$) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen und nicht-transgenen männlichen Ratten	68
3.26	Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die maximale Druckabfallgeschwindigkeit ($-dP/dt_{\max}$) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen und nicht-transgenen männlichen Ratten	69
3.27	Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die halbmaximale Relaxationszeit (RT_{50}) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen und nicht-transgenen männlichen Ratten	70
3.28	Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (τ) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen und nicht-ransgenen männlichen Ratten	70
7.1	SR Ca^{2+} -Aufnahme in Abhängigkeit von der Lagerungszeit linksventrikulärer Homogenate auf Eis	103
7.2	Temperaturabhängigkeit des Oxalat-stimulierten SERCA2a-katalysierten Ca^{2+} -Transports	104
7.3	Proteinabhängigkeit des Oxalat-stimulierten SERCA2a-katalysierten Ca^{2+} -Transports in linksventrikulären Homogenaten	104
7.4	Zeitabhängigkeit der Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme in linksventrikulären Homogenaten	105

Tabellenverzeichnis

2.1	PCR-Ansatz zur Amplifikation transgen-spezifischer CMV-Sequenzen	22
2.2	Auflistung verwendeter cDNA-Sonden	26
2.3	Zusammensetzung glucosefreier Krebs-Henseleit-Perfusionslösung	40
3.1	Vergleich der Herz- und Körpergewichte von männlichen 9 Monate alten nicht-transgenen und heterozygot SERCA2-transgenen Ratten der Linie 1167	51
3.2	Kalkulierte kinetische Parameter des SERCA2a-katalysierten Ca^{2+} -Transports in linksventrikulären Homogenaten weiblicher und männlicher nicht-transgener und SERCA2-transgener Ratten	60
3.3	Funktionelle Charakteristik isovolumentrisch kontrahierender, nach Langendorff perfundierter Herzen SERCA2-transgener und nicht-transgener Ratten	65
3.4	Linksventrikuläre Funktionsparameter narkotisierter nicht-transgener und heterozygot SERCA2-transgener Ratten der Linie L1167	71