

## 1. Einleitung

Weltweit können kardiovaskuläre Erkrankungen wie Bluthochdruck, Myokardinfarkt, Herz- und Niereninsuffizienz sowie Schlaganfall als Hauptursachen der menschlichen Morbidität und Mortalität angesehen werden. Dabei gewinnt das Krankheitsbild der Herzinsuffizienz bei einer zunehmend älter werdenden Bevölkerung und abnehmender Akutmortalität bei Herzinfarkt und Hypertonie immer mehr an Bedeutung (12;60;68). Pro Jahr wird die Inzidenz der Herzinsuffizienz mit 0,1 bis 0,5% angegeben, verdoppelt sich mit jeder Altersdekade und überschreitet bei den über 75-jährigen sogar 3% pro Jahr. Trotz intensiver Forschung und klinischem Fortschritt nahm sie in den letzten beiden Jahrzehnten nicht ab (54;117). Die Prävalenz der Herzinsuffizienz wird in der Gesamtbevölkerung auf 0,3-2,4% geschätzt, wobei bei den über 65-jährigen ein Anstieg auf 3,0 bis 13,0% zu verzeichnen ist (24;89;91). Mit ca. 14 Mio. Erkrankten in Europa ist das Syndrom der Herzinsuffizienz damit einer der häufigsten Gründe für Krankenhausaufenthalte. Damit verbunden ist ein enormer Anstieg der Krankenhauskosten für Herzinsuffizienzpatienten (+155%) in den vergangenen 20 Jahren (117). Daten aus den Framingham-Studien zeigen, dass 5 Jahre nach Diagnosestellung der Herzinsuffizienz nur 25% der Männer und 38% der Frauen noch am Leben waren. Mit einer medianen Überlebenszeit von 1,7 Jahren für Männer und 3,2 Jahren für Frauen ist die Prognose der Herzinsuffizienz schlechter als die der meisten Malignome (130). Obwohl Morbidität und Mortalität durch den Einsatz von Angiotensin-Converting-Enzyme-Hemmern und  $\beta$ -Blockern nachweislich gesenkt werden können (20;107;123;131), ist es bisher nicht möglich, die Progredienz der Erkrankung zu verhindern (2;30). Hauptursachen der Herzinsuffizienz sind koronare Herzerkrankung, arterielle Hypertonie, Kardiomyopathien und Diabetes mellitus.

Unabhängig von der initialen Ursache kommt es bei längerem Fortbestehen der zugrunde liegenden Störung zur Manifestation der Herzinsuffizienz (14;35) und Ausprägung eines charakteristischen kardialen Phänotyps (14;35). Zu den typischen Phänotypveränderungen der hypertrophierten und insuffizienten Herzmuskelzelle gehören Störungen der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation (11;47;95;148). Dazu tragen insbesondere kritische Veränderungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxen über die Membranen des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) von Herzmuskelzellen bei. So ist sowohl tierexperimentell als auch für das terminal insuffiziente humane Herz gut belegt, dass die SERCA-Expression auf mRNA- und Proteinebene (48) und der SERCA2a-katalysierte Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR (69;110;118;147) vermindert ist. Allerdings wurde über veränderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivitäten des SR und verminderte SERCA2a-Expression (3;34;93) in hypertrophierten/insuffizienten Kardiomyozyten kontrovers berichtet (34;121).

Um die Beziehung zwischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des SR und der SERCA-Expression unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen genauer zu untersuchen, sind Tiermodelle

mit spezifisch verminderter bzw. erhöhter Ausstattung der SR-Membranen mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpmolekülen gut geeignet. Das trifft insbesondere für gentechnisch generierte transgene Tiermodelle mit kardialer SERCA-Überexpression zu. Aus diesem Grunde wird in dieser Arbeit der kardiale Phänotyp eines transgenen Rattenmodells mit SERCA2-Überexpression ausführlich untersucht. Im Folgenden soll der aktuelle Kenntnisstand der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation unter besonderer Berücksichtigung von Expression und Funktion der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a kurz beschrieben werden.

## **1.1. Die $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a des sarkoplasmatischen Retikulums**

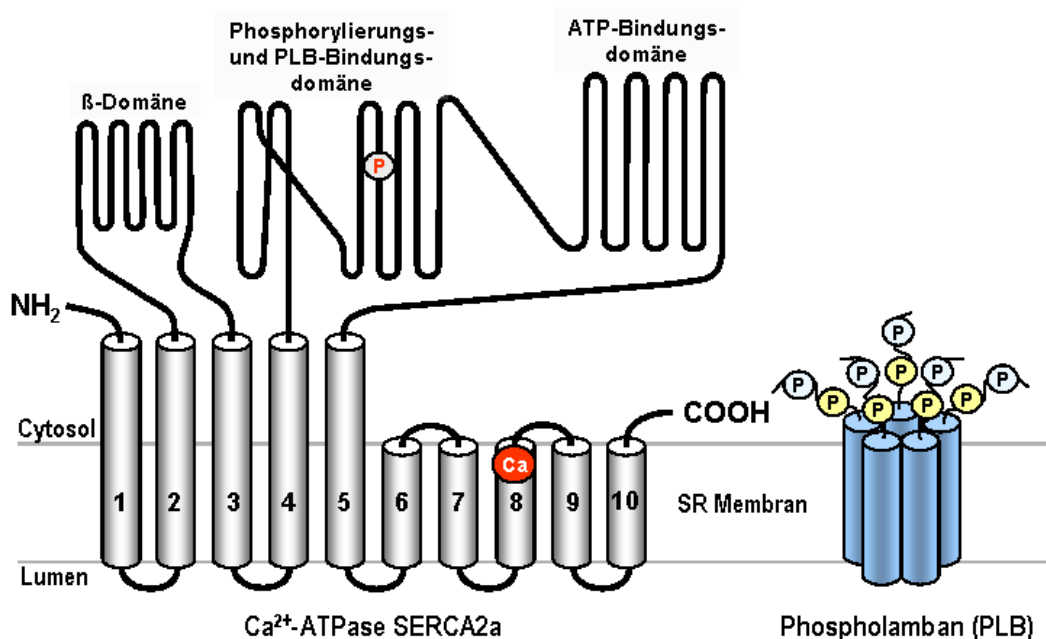
Das sarkoplasmatische Retikulum (SR) ist analog dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ein in Muskelzellen vorkommendes tubuläres Membransystem. Zu den wichtigsten Funktionen des SR zählt die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Zytosol und dessen Wiederaufnahme und Speicherung im Lumen des SR. Bei der elektromechanischen Kopplung (ECC) ist diese zentrale  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher- und Freisetzungsganglion der Herzmuskelzelle für den Kontraktions-Relaxations-Zyklus maßgebend. Der für die Wiederaufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Lumen des SR notwendige aktive Transport wird dabei von der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2a) vermittelt.

### **1.1.1. SERCA-Isoformen und molekulare Struktur**

Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des sarko(endo)plasmatischen Retikulums wurden insgesamt drei Gene gefunden (4;138). Jedes SERCA-Gen kodiert für unterschiedliche Isoformen, die gewebespezifisch exprimiert werden. Bei der im Herzmuskel exprimierten SERCA-Isoform 2a handelt es sich um eine Spleißvariante der ubiquitär vorkommenden Isoform 2b. Sie geht aus der ersten von insgesamt vier mRNA-Spleißvarianten hervor, die durch das SERCA2-Gen kodiert werden können. Die SERCA2a wird primär im fötalen, neonatalen und adulten Myokard sowie im roten Skelettmuskel exprimiert. Transient kann diese Isoform aber auch bei beginnender Differenzierung des weißen Skelettmuskels nachgewiesen werden. Die anderen drei mRNA-Spleißvarianten kodieren auf Proteinebene alle für die SERCA2b-Isoform, da sich diese gespleißten mRNA-Varianten ausschließlich in nicht translatierten Sequenzen unterscheiden. Bis auf vier Aminosäuren am C-terminalen Ende der Isoform SERCA2a, die bei SERCA2b durch eine 49-er Aminosäuresequenz ersetzt sind, besteht zwischen den beiden Isoformen jedoch Homologie (72). Das SERCA1-Gen kodiert ebenfalls für zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase mRNA-Isoformen. Die Isoform SERCA1a wird im adulten weißen Skelettmuskel konstitutiv und SERCA1b in diesem Muskel in der neonatalen Entwicklungsphase transient expri-

miert (72;75;149). Das SERCA3-Gen kodiert nur für eine Isoform, die in Endothelzellen, Epithelzellen und Thrombozyten exprimiert wird.

Im Herzmuskel wird ausschließlich die Isoform SERCA2a exprimiert. Ausgehend von der aus cDNA abgeleiteten Aminosäuresequenz besteht das native Protein der kardialen Isoform SERCA2a aus 997 Aminosäureresten. Das Molekulargewicht beträgt 110 kDa. Die Aminosäuresequenz der SERCA2a von Mensch, Ratte und Kaninchen unterscheidet sich lediglich in 6 funktionell unbedeutenden Aminosäuren. Etwa 40% des Gesamtproteins des kardialen SR wird von der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase repräsentiert (42;128). Strukturell besteht das membranäre Protein aus 10 transmembranären  $\alpha$ -Helices und zwei zytoplasmatischen Schleifen (**Abb. 1.1**) (13;79).



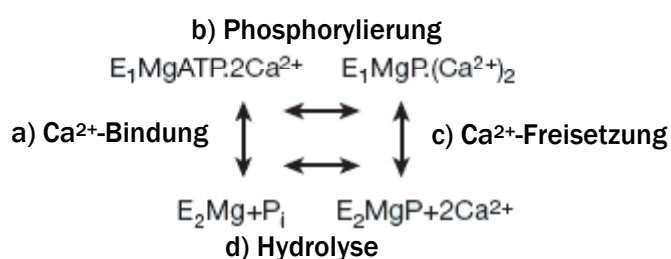
**Abbildung 1.1** Zweidimensionales Modell der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a des sarkoplasmatischen Retikulums. Die achte transmembranäre  $\alpha$ -Helix enthält hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen. Das Diagramm zeigt zusätzlich das Regulatorprotein Phospholamban als Homopentamer, das pro Monomer je eine Phosphorylierungsstelle (P) für Protein kinase A (Ser16) und  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM-Kinase (Thr17) enthält. Modifiziertes Schema nach MacLennan (78) und Lompré (72) mit freundlicher Genehmigung von R. Vetter (Vetter, 2003).

Die transmembranären  $\alpha$ -Helices bilden eine kanalähnliche Struktur mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungs- und Translokationseigenschaften. Die extramembranären Sequenzen der beiden zytoplasmatischen Schleifen enthalten wesentlich mehr Aminosäuren als die extramembranären Sequenzen der luminalen Membranseite, so dass eine transmembranäre Asymmetrie vorliegt. Die kleinere zytoplasmatische Schleife ( $\beta$ -Domäne) ist von Bedeutung für Konformationsänderungen des Enzyms bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Translokation sowie für die Kopplung von ATP-Hydrolyse und  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport. Die größere zytoplasmatische Schleife enthält die o. g. Phosphorylierungsdomäne am Aspartatrest 351 und eine Bindungsdomäne für

Phospholamban. Sie weist auch eine ATP- oder Nukleotidbindungsregion und eine Region für die Regulation der hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen auf (72;78).

### 1.1.2. $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmechanismus

Eine adäquate Füllung des linken Ventrikels bei niedrigem diastolischen Druck sowie eine ausreichende koronare Perfusion setzen eine schnelle Inaktivierung der systolischen Kraftentwicklung des Myokards voraus, d. h., die durch Anstieg des zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels in der Systole induzierte Wechselwirkung zwischen den kontraktilen Proteinen Aktin und Myosin über Myosin-Querbrücken muss durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Senkung auf diastolische Basalwerte inaktiviert werden. Für die schnelle initiale Phase des Abfalls der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist vor allem die Rückbindung von  $\text{Ca}^{2+}$  in das Lumen des SR verantwortlich. Dieser Transport wird von der membranständigen,  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen  $\text{Mg}^{2+}$ -ATPase SERCA2a katalysiert. Die erforderliche Energie liefert dabei die Hydrolyse von ATP. Im Verlauf eines  $\text{Ca}^{2+}$  Transportzyklus (Abb. 1.2) werden pro Mol hydrolysiertem ATP 2 Mol  $\text{Ca}^{2+}$  bewegt. Dabei bildet sich durch Phosphorylierung am Aspartatrest 351 des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteins zuerst eine energiereiche, phosphorylierte, intermediäre Phosphorverbindung  $\text{E}_1\text{MgP}(\text{Ca}^{2+})_2$ , die während der transmembranären Translokation von  $\text{Ca}^{2+}$  von der zytosolischen auf die luminalen Seite der SR-Membran in einen energieärmeren Konformationszustand  $\text{E}_2\text{MgP}$  übergeht. Verglichen mit dem  $\text{E}_1$ -Enzym und dem  $\text{E}_1\text{P}$ -Intermediat, zeichnet sich  $\text{E}_2\text{P}$  durch eine ca. 1000-fach geringere  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität aus. Dadurch dissoziieren die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen auf der luminalen Seite der SR-Membran, diffundieren ins Lumen und werden dort teilweise vom  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsprotein Calsequestrin komplexiert (Abb. 1.3) (51;78). Letzter Schritt des  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportzyklus ist die Hydrolyse des intermediären Phosphoenzyms mit dem Übergang der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in die Ausgangskonformation  $\text{E}_1$  (128)(80).



**Abbildung 1.2. Konformationszustände der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.** Während des ATP-abhängigen Transportzyklus werden vier phosphorylierte Konformationszustände durchlaufen, wobei jeder Zustand in den anderen übergehen kann. a, bei zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg wird durch Sättigung der beiden hochaffinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen die  $\text{E}_1\text{MgATP}\cdot 2\text{Ca}^{2+}$ -Form ausgebildet. b, dadurch erfolgt die Bildung einer energiereichen, phosphorylierten, intermediären Phosphorverbindung  $\text{E}_1\text{MgP}\cdot(\text{Ca}^{2+})_2$ . c, bei der Bildung von  $\text{E}_2\text{MgP}$  verliert das Phosphoenzyme sowohl die Fähigkeit ADP zu rephosphorylieren als auch seine hohe Affinität für  $\text{Ca}^{2+}$ , wodurch  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zytosol abgegeben wird. Durch Wasserkontakt hydrolysiert die katalytische Untereinheit den phosphorylierten Aspartatrest, um die ATPase zu regenerieren ( $\text{E}_2$ ). Nach MacLennan (80).

### 1.1.3. Regulation der $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität durch Phospholamban

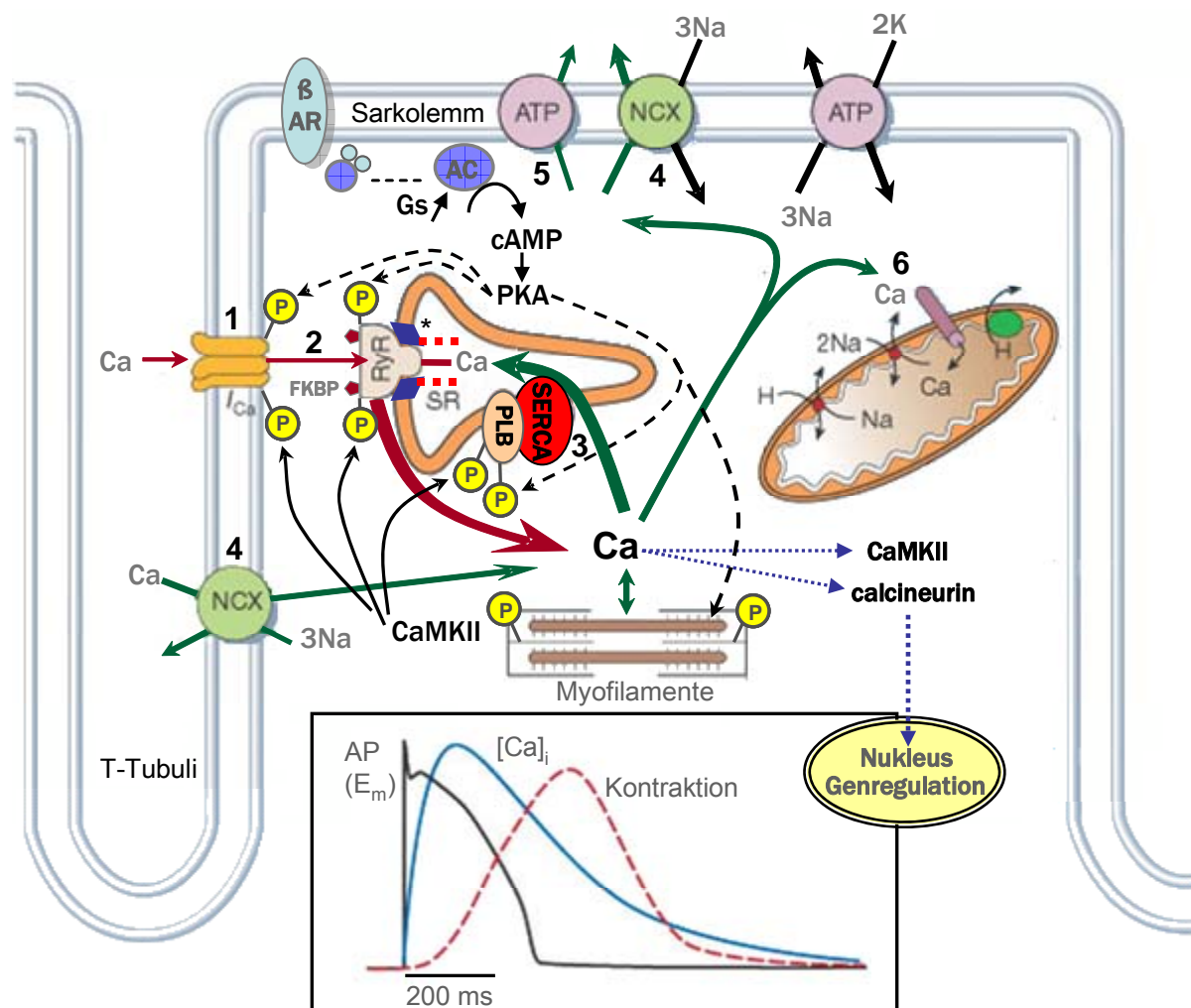
Die Regulation der elektrischen, metabolischen und kontraktilen Funktion der Herzmuskelzelle wird maßgeblich durch Katecholamine und der damit verbundenen Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Signalwege gesteuert. Bei Stimulation kardialer  $\beta$ -Rezeptoren wird über die Adenylcyclase vermehrt cAMP gebildet, was zur Aktivierung von Proteinkinase A (PKA) und damit zur Phosphorylierung von mehreren funktionellen Proteinen in der Herzmuskelzelle führt. Die PKA-katalysierte Phosphorylierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -regulierenden Proteinen trägt dabei wesentlich zur Regulation der elektromechanischen Kopplung in der Herzmuskelzelle bei (**Abb. 1.3**) (23;63;129). Für die Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität der  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums ist in diesem Zusammenhang das reversibel phosphorylierbare Modulatorprotein Phospholamban von besonderer Bedeutung. Dabei handelt es sich um ein transmembranäres Homopentamer. Das relative Molekulargewicht des aus 52 Aminosäuren bestehenden Monomers beträgt 6,08 kDa (**Abb. 1.1**) (37;81). Im unphosphorylierten Zustand bindet Phospholamban an die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase und hemmt deren Aktivität durch Verringerung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität (65;73). Dabei spielen sehr wahrscheinlich Konformationsänderungen infolge elektrostatischer Wechselwirkungen zwischen positiv geladenen Aminosäureresten der zytosolischen, hydrophilen Domäne des Phospholambanmoleküls und negativ geladenen Aminosäureresten der SERCA2a eine entscheidende Rolle. Durch Phosphorylierung von Phospholamban wird dessen inhibitorischer Einfluss auf die SERCA2a aufgehoben. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität der ATPase wird erhöht, so dass eine gesteigerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Rückbindung in das Lumen des SR resultiert. Phospholamban kann durch die cAMP-abhängiger Proteinkinase A am Serinrest 16 und am Threoninrest 17 durch die  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-ahhängige Proteinkinase II (128;141;142) phosphoryliert werden. Proteinkinase C (100) und cGMP-abhängige Proteine (6;64) sind ebenfalls an der PLB-Phosphorylierung beteiligt. Von physiologischer Bedeutung scheinen jedoch nur die Phosphorylierungen durch  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin- und cAMP-abhängige Proteinkinasen zu sein (**Abb. 1.3**). Die Stöchiometrie PLB:SERCA2a liegt nach Brittsan et al. (15) zwischen 0,4 und 1,0, so dass davon auszugehen ist, dass in der Membran des SR eine Population von  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen vorliegt, die nicht der Phospholambanregulation unterliegen. In der Herzmuskelzelle wird phosphoryliertes Phospholamban hauptsächlich durch Proteinphosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung kann aber auch durch die Proteinphosphatasen 2A (Calcineurin bzw. PP2A) und 2C (max. 30%) erfolgen (77). Bei verstärkter  $\beta$ -adrenerger Stimulierung des Herzens ist neben der positiven Chronotropie und Inotropie zusätzlich eine erhebliche Beschleunigung der Relaxation zu beobachten. Dieser lusitrope Effekt beruht hauptsächlich auf einer gesteigerten Rückbindung von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR und wird indirekt über cAMP-abhängige Phosphorylierung von Phospholamban vermittelt (70). Eine Erhöhung der Aktivität der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase scheint auch

durch direkte  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Phosphorylierung dieses Enzyms möglich zu sein (146). Allerdings konnte dieser *in vitro*-Befund von anderen Gruppen nicht bestätigt werden (105;114). Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die metabolische, cAMP-vermittelte Modulation des SERCA-katalysierten Transports von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR ein zentraler Mechanismus für die Anpassung der kardialen Pumpfunktion an unterschiedliche periphere Erfordernisse ist.

## 1.2. SERCA2a und $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation im intakten Herz

Die kontraktile Funktion des Herzmuskels wird durch zeitlich und räumlich koordinierte, rhythmische Schwankungen der zytosolischen Calciumionenkonzentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) in den einzelnen Herzmuskelzellen gesteuert. Für eine normale Herzfunktion sind deshalb intakte zelluläre und molekulare Prozesse der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation notwendig. Neben der funktionellen Bedeutung von  $\text{Ca}^{2+}$  für mehrere zelluläre Prozesse sind  $\text{Ca}^{2+}$  in der depolarisierten Herzmuskelzelle Vermittler zwischen komplexen elektrischen Vorgängen am Sarkolemm und der Aktivierung des kontraktilen Apparates (8). Die an der sog. elektromechanischen Kopplung (ECC) wesentlich beteiligten zellulären Komponenten sind in **Abb. 1.1** dargestellt. Dabei strömen geringe  $\text{Ca}^{2+}$ -Mengen über spezifische spannungsabhängige L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle des depolarisierten Sarkolemm ins Zellinnere und tragen zur Plateauphase des Aktionspotenzials bei (**Abb. 1.3**, Insert). Diese in der Systole in das Zellinnere einströmenden  $\text{Ca}^{2+}$  triggern dort die Freisetzung von Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Voraussetzung für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ist eine  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung und Öffnung spezieller  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanäle im terminalen Teil des SR, die auch als Ryanodinrezeptoren (RyR) bezeichnet werden (**Abb. 1.1**) (32). Im Herzmuskel wird die Isoform RyR2 exprimiert. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Durchlässigkeit von RyR2 in der Diastole wird in starkem Maße durch eine Interaktion mit dem Modulatorprotein FKBP12.6 reguliert, das auch als Calstabin bezeichnet wird (87). Für die  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung scheint die enge subsarkolemmale Kopplung zwischen L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen der T-Tubuli und den klusterartig angeordneten RyR2 des terminalen SR (10 bis 300 RyR2 pro L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal) funktionell bedeutungsvoll zu sein (36). Innerhalb von ca. 100 ms führt die synchronisierte,  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung (CR) aus dem terminalen SR zum Anstieg der freien  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  im Zytosol. Während in der Diastole die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei  $\sim 0,1 \mu\text{Mol/l}$  liegt, werden in der Systole  $1-5 \mu\text{Mol/l}$  erreicht. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Anstieg aktiviert die Aktin-Myosin-Interaktion in den Myofibrillen und löst so die Herzmuskelkontraktion aus. Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Sensor der Myofibrillen sind hochaffine  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen des myofibrillären Modulatorproteins Troponin C. Die Synopsis von Veränderungen des Membranpotenzials, der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -

Konzentration und der Kraftentwicklung eines Kardiomyozyten im Verlauf eines Herzzyklus ist schematisch in **Abb. 1.3** gezeigt.



**Abbildung 1.3 Schematischer Überblick über transmembranäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Bewegungen und beteiligte Proteine bei der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Herzmuskelzelle**

Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Systole durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom über spannungsabhängige L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle bei elektrischer Erregung des Sarkolemm (1) und durch  $\text{Ca}^{2+}$ -getriggerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) über Ryanodin-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (2). Wiederherstellung niedriger diastolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel durch SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-katalysierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport in das SR (3) und durch Auswärtstransport von  $\text{Ca}^{2+}$  über den sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (4) und die Plasmamembran- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (5). Ein geringer Anteil wird über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter (6) in die Mitochondrien aufgenommen. Das Insert zeigt exemplarisch die Zeitabhängigkeit von zugehörigem Aktionspotenzial,  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten und Kontraktion eines ventrikulären Kaninchenmyozyten bei  $37^\circ\text{C}$ . Modifiziert nach Bers (8).

$\beta$ -AR -  $\beta$ -Adrenozeptor, AC - Adenylcyclase, Gs - stimulierendes G-Protein, PKA - cAMP-abhängige Proteinkinase, CaMKII -  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, SR - sarkoplasmatisches Retikulum, PLB - Phospholamban, P - phosphoryliertes Protein, NCX - sarkolemmaler  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, RYR -  $\text{Ca}^{2+}$ - Freisetzungskanal des SR, FKBP - RYR -stabilisierendes Protein (Calstabin), \* - Komplex aus Juncin/Triadin und Calsequestrin

Für die Erschlaffung des Myokards muss eine schnelle und effiziente Inaktivierung der Aktin-Myosin-Wechselwirkung erfolgen. Dazu ist die Löschung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Signals erforderlich. Neben Inaktivierung von L-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen sowie  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanälen des SR ist hierfür insbesondere der Rücktransport von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR wesentlich. Der Relaxationsvor-

gang beginnt, wenn der systolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel durch aktiven membranären Transport von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  in andere intra- und extrazelluläre Kompartimente gesenkt wird, so dass  $\text{Ca}^{2+}$  vom  $\text{Ca}^{2+}$ /Troponin-C Komplex dissoziiert. Dazu werden spezieabhängig bei jedem Herzzyklus etwa 90% des systolischen, intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  aktiv durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) wieder in das SR aufgenommen und weitere 10-30% durch den sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ -Austauscher (NCX) in den extrazellulären Raum transportiert. Jeweils 1% des während der Systole intrazellulär akkumulierten  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch die sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA) ausgeschleust bzw. über den mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter in die Mitochondrien transportiert (8). Neben den erwähnten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsystemen des Sarkolemm und des SR sind verschiedene  $\text{Ca}^{2+}$ -bindende Proteine (116) ebenfalls an der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von Herzmuskelzellen beteiligt (99;143). So ist für die Speicherung von  $\text{Ca}^{2+}$  im SR das ausschließlich im Lumen des terminalen SR lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsprotein Calsequestrin von besonderer Bedeutung (**Abb. 1.3**). Es besitzt eine hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungskapazität von 800-900 nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein (ca. 40 mol  $\text{Ca}^{2+}$ /mol Calsequestrin). Der  $K_d$ -Wert beträgt 0,4-1 mM (97). Kardiales Calsequestrin besteht aus 109 Aminosäureresten, von denen 69 negativ geladene eine extrem hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungskapazität bewirken (122). Neben seiner Funktion als  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsprotein, scheint Calsequestrin an der Regulation des  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungprozesses beteiligt zu sein (56;57;62). So ist nachgewiesen worden, dass dieses nichtmembranäre Protein über die Proteine Triadin (43) und Junctin (150) indirekt an das  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanalprotein gekoppelt ist (**Abb. 1.3**). Letztendlich kann durch die beteiligten  $\text{Ca}^{2+}$ -transportierenden und  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteine in der Diastole eine submikromolare  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gegen einen 5000- bis 10 000-fachen, einwärts gerichteten, transsarkolemmalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsgradienten aufrecht erhalten werden. Der Zeitbedarf für die Absenkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels auf diastolische Werte ist schlagfrequenzabhängig und beträgt für das Säugerherz in der Regel 100-200 ms. Unter Gleichgewichtsbedingungen gilt, dass die bei der Membrandepolarisation in den Kardiomyozyten einströmende  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge gleich der Menge an  $\text{Ca}^{2+}$  ist, die vor jedem neuen Kontraktions-Relaxations-Zyklus aus der Zelle befördert wird. Verschiebungen dieses Gleichgewichtes, z. B. durch Schlagfrequenzveränderung oder kardiotope Pharmaka, machen sich funktionell als positive oder negative inotrope und lusitrope Effekte bemerkbar. Folglich ist  $\text{Ca}^{2+}$  nicht nur Auslöser der Herzmuskelkontraktion, sondern durch eine Variation von Frequenz, Amplitude und zeitlichen Verlauf der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsveränderungen ( $\text{Ca}^{2+}$ -Transient) werden das Ausmaß und die Geschwindigkeit von Kraftentwicklung und Verkürzung reguliert. Entscheidend hierfür ist die am kontraktilem Apparat angeflutete Menge an Aktivator-

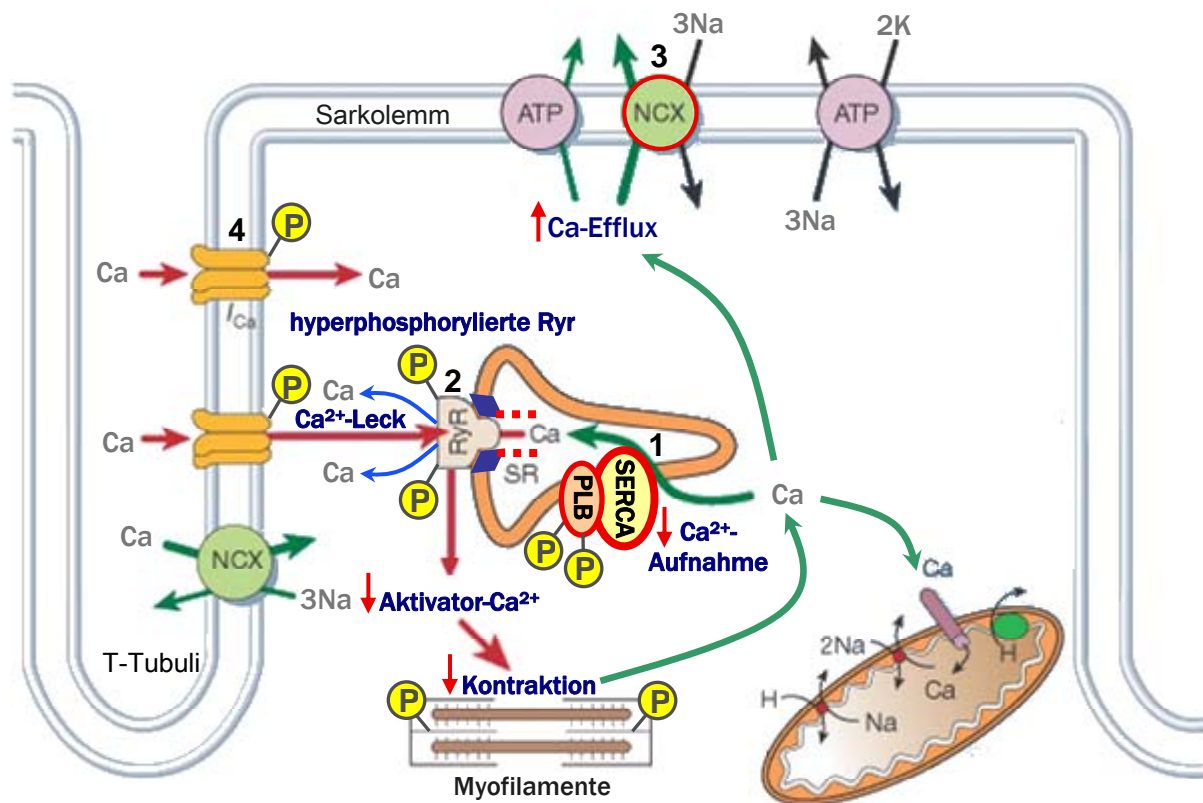


$\text{Ca}^{2+}$  und die Kinetik der Besetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen am myofibrillären  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsprotein Troponin C.

### 1.3. SERCA2a und $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation bei Herzhypertrophie/-insuffizienz

Auf zellulärer Ebene können mehrere Faktoren für die bei Herzinsuffizienz auftretenden Kontraktilitätsstörungen verantwortlich sein. Dazu zählen Apoptoseprozesse, Störungen im Energiehaushalt, veränderte Proteinexpressionsmuster und Störungen der zytoskeletären bzw. mikrotubulären Architektur (26;83). Eine myozytäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Dysregulation wird dabei als Hauptursache von sowohl ventrikulärer Dysfunktion als auch von Arrhythmien (113) angesehen. So konnten sowohl bei experimenteller Überlasthypertrophie und Insuffizienz als auch bei terminaler humaner Herzinsuffizienz erhöhte diastolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel, verlängerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, verminderte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalamplituden (10) und abgeflachte Kraft-Frequenz-Beziehungen gefunden werden (44;46;109). Obwohl grundsätzlich verschiedene Komponenten der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation betroffen sein können (**Abb. 1.2**), scheinen insbesondere die Verfügbarkeit von Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$  am kontraktilem Apparat und die Konfiguration des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten maßgebend zu sein. Während der Einstrom von Trigger- $\text{Ca}^{2+}$  über spannungsabhängige L-Tp- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle kaum verändert ist (94), scheinen daher Funktionsstörungen von  $\text{Ca}^{2+}$ -Bewegungen über die Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR), der zentralen Organelle für die myozytäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation, von besonderer Bedeutung zu sein (47) (**Abb. 1.4**). So konnte mehrfach gezeigt werden, dass sowohl bei terminaler humaner Herzinsuffizienz als auch in verschiedenen tierexperimentellen Modellen die im SR gespeicherte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge vermindert ist (11;48;52;71;113). Dadurch ist sowohl die Amplitude als auch die Dauer des  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungsprozesses verkürzt und die resultierende Kontraktionskraft geringer (147). Die Ursache des verminderten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalts scheint dabei auf einer verminderten Aktivität der maßgeblich an der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung beteiligten ATPase (SERCA2a) zu beruhen (45;69;110;147). Dafür spricht eine verminderte bzw. nicht adäquat angepasste Expression der SERCA (48;118). Zugleich findet sich eine erhöhte Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^+$ -Austauschers, wodurch vermehrt  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle transportiert wird (9;112;115). Als wahrscheinlicher Kompensationsmechanismus dazu zeigt sich eine verstärkte Aktivität der Ryanodinrezeptoren (RyR) (147), um aus dem SR größere Mengen an  $\text{Ca}^{2+}$  freizusetzen. Dies kann bei verminderter Aktivität der SERCA zu kurzfristigen Erhöhungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR führen. Längerfristig resultiert daraus eine verminderte Beladung des SR mit  $\text{Ca}^{2+}$ , so dass weniger Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR freigesetzt werden kann. Die kardiale Inotropie wird zusätzlich durch eine abnehmende funktionelle Kopplung zwischen RyR und den räumlich benachbarten L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen verschlechtert (42). Hierdurch ist die durch dieses

System geleistete Signalamplifizierung des über die L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle einströmenden Trigger- $\text{Ca}^{2+}$  eingeschränkt, wodurch abgeschwächte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten entstehen und eine Kontraktionsabnahme resultiert. Eine kompensatorische Aktivierung  $\beta$ -adrenerger Signalwege führt außerdem zur Hyperphosphorylierung verschiedener Zellkomponenten, wobei die kardiale Funktion dadurch nicht verbessert wird. Durch eine Hyperphosphorylierung der RyR2 mit einhergehender Dissoziation des Modulatorproteins FKBP12.6 kommt es zu Veränderungen der Öffnungswahrscheinlichkeiten dieser Kanäle, was zu einem vorwiegend diastolischen Ausstrom von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR führt (84). Die RyR2-Hyperphosphorylierung wird daher für das Entstehen von verzögerten Nachdepolarisationen, ventrikulären Arrhythmien und akutem Herzversagen verantwortlich gemacht (85;86). Dazu trägt auch die vermehrte Aktivität des elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher bei, wodurch ebenfalls verzögerte Nachdepolarisationen und Arrhythmien auftreten können (113).



**Abbildung 1.4** Schematischer Überblick über gestörte  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxe und beteiligte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteine bei myozytärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Dysregulation pathologisch hypertrophierter und insuffizienter Herzen. Folgende subzelluläre bzw. molekulare Veränderungen sind nachgewiesen: (1) verminderter SERCA2-katalysierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransport in das SR, (2) erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Durchlässigkeit von SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanälen („diastolisches  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck“) durch Hyperphosphorylierung (P) von RyR2, (3) kompensatorisch erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux über den sarkolemmalen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Austauscher bei gleichzeitig (4) kompensatorisch gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx über L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle. Für die Störung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxen zwischen SR und kontraktilen Apparatur ist (1) von zentraler Bedeutung, weil die dadurch bedingte negative Lusitropie von einer verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR begleitet ist. Modifiziert nach Bers (8).

## 1.4. Pharmakologische Verbesserung des SERCA2a-vermittelten $\text{Ca}^{2+}$ -Transports

Da  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxe zwischen Zytosol und SR bei der myozytären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation quantitativ dominieren und der Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR durch das SERCA2a-PLB-System determiniert wird, sind sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase als auch das reversibel phosphorylierbare Modulatorprotein PLB potenzielle Angriffspunkte therapeutischer Interventionen zur Verbesserung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransportes in das SR. Eine Steigerung des retikulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes kann prinzipiell durch Ausschaltung inhibitorischer PLB-Einflüsse auf die SERCA2 oder durch direkte Aktivierung bzw. erhöhte Expression von  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen erreicht werden (Abb. 1.5).

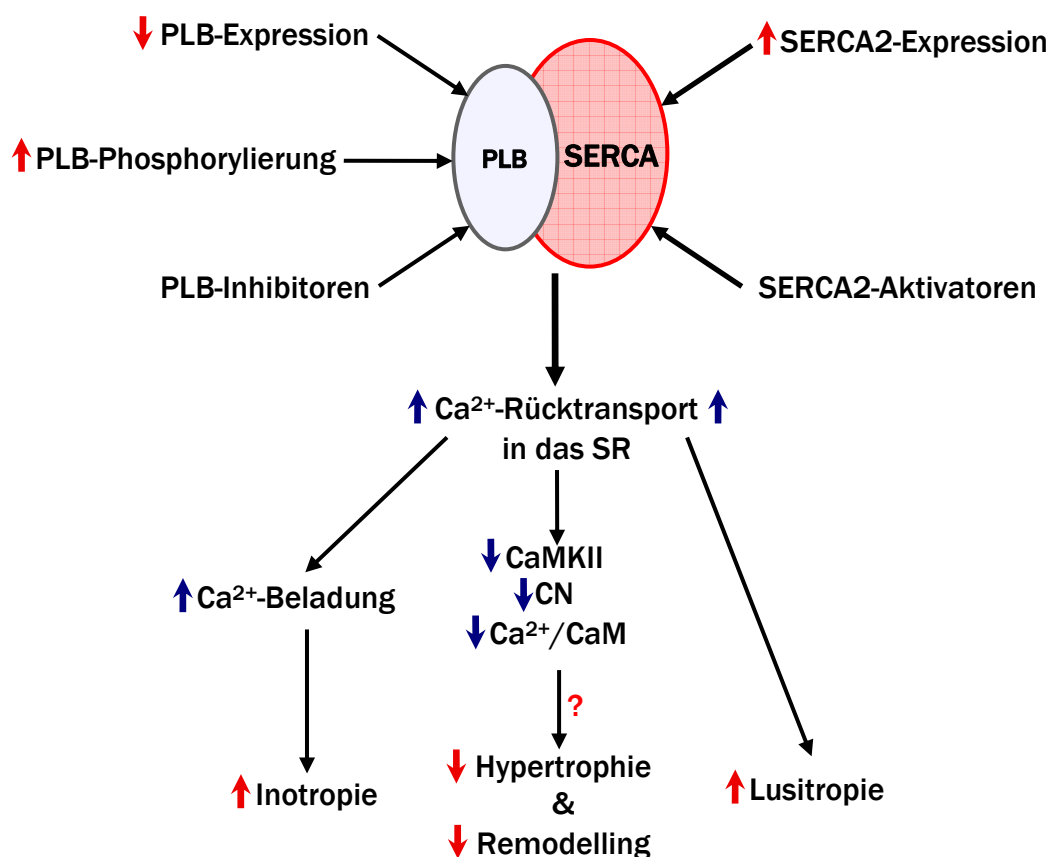


Abbildung 1.5. Potenzielle Interventionen zur Verbesserung des Phospholamban-regulierten SERCA2a-katalysierten Transports von  $\text{Ca}^{2+}$  in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) der Herzmuskelzelle. CaMKII -  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Proteinkinase II, CN - Calcineurin,  $\text{Ca}^{2+}$ /CaM -  $\text{Ca}^{2+}$ /Calmodulin-abhängige Signaltransduktionswege.

Dabei gilt, dass durch die Verminderung inhibitorischer PLB-Einflüsse bzw. durch direkte Aktivierung vorhandener  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen bestenfalls eine maximale  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität vorhandener  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen erzielt werden kann. Im Gegensatz dazu kann durch Steigerung der SERCA2-Genexpression und der damit verbundenen Zunahme der Anzahl von SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen eine Ver-

besserung der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität bei gleichbleibenden PLB-Einflüssen erzielt werden. Im letzteren Fall ist mit einer verbesserten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportkapazität und -Reserve des SR zu rechnen, die im hypertrophierten und insuffizienten Herzmuskel wegen verminderter bzw. dem pathologischen Prozess nicht adäquat angepasster Expression des SERCA2-Gens normalerweise vermindert sind. Im Folgenden soll ein kurzer Überblick über bisher erfolgreich im Experiment durchgeführte pharmakologische und gentechnische Interventionen am SERCA-PLB-System gegeben werden, durch die eine Steigerung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Rücktransportes erreicht werden konnte. Eine direkte pharmakologische Stimulation vorhandener SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen durch spezifische Wirkstoffe bzw. eine spezifische kardiale Expressionssteigerung des SERCA2-Gens wäre besonders aus klinischer Sicht von großem Interesse. Obwohl seit Mitte der 90er Jahre über einzelne Substanzen berichtet wurde, durch die die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Aktivität *in vitro* gesteigert werden kann, ist wenig bzw. nichts über deren Wirkmechanismus, Spezifität und Wirkung unter *in vivo*-Bedingungen bekannt. Zu diesen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Stimulatoren gehören Ingwer-Analoga wie [6]-Gingerol und [8]-Gingerol (1;106) und Plakortide. Bei letzteren handelt es sich um zyklische Peroxide aus Ethylazetatextrakten des Schwammes *Plakortis halichondrioides*. (108). Die potenzielle therapeutische Wertigkeit dieser Substanzen ist mit großer Sicherheit als sehr gering einzustufen.

Bezüglich der pharmakologischen Steigerung der Anzahl von  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen des SR liegen positive Daten für die Substanz Etomoxir vor, die im intakten und hypertrophierten/insuffizienten Rattenherzen erhoben wurden (118;135). Bei diesem Fettsäureanalogon handelt es sich um einen irreversiblen Carnitin-Palmitoyl-Transferase1-Hemmstoff und Liganden des Transkriptionsfaktors PPAR $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ ). Der zugrunde liegende Mechanismus, der zur Zunahme von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität und Anzahl von SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen führt, ist bisher nicht geklärt, könnte aber über das Peroxisome-Proliferator-Responsive Element (PPRE) im Promoter des SERCA2-Gens vermittelt werden (119).

Bekanntermaßen wird die inhibitorische Wirkung von PLB auf die SERCA sowohl durch cAMP-erhöhende Pharmaka wie z. B.  $\beta$ -adrenerge Agonisten und bestimmte Phosphodiesterase-Hemmstoffe vermindert (81). Allerdings ist dieses Wirkprinzip bei chronischer Herzinsuffizienz nicht nutzbar und nur dem akuten Einsatz vorbehalten. *In vitro* Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass durch inhibitorische PLB-Antikörper die Transportaktivität des SR gesteigert werden kann (17;90). Ebenso wurden Substanzen zur Verminderung der inhibitorischen Wirkung des Regulatorproteins Phospholamban gefunden. Dazu gehören kurze Peptide mit Aminosäuresequenzen mit Teilabschnitten des Phospholambans (120). Eine stimulatorische Wirkung auf die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Aktivität wurde auch für die pflanzlichen Phenole Quercetin und Tannin sowie pflanzliche Ellagsäurederivate beschrieben (18;21;22;90). Da für alle diese Substanzen bei höheren Konzen-

trationen inhibitorische Wirkungen auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport beobachtet wurden, scheinen weiterführende Untersuchungen unter *in vivo* Untersuchungen nicht sinnvoll.

### 1.5. Gentechnische Beeinflussungen des retikulären $\text{Ca}^{2+}$ -Transports

Durch die Entwicklung und Verfügbarkeit neuer gentechnischer Methoden sind in den letzten 10 Jahren vielfältige Anstrengungen zur Verbesserung des SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes gemacht worden, die entweder auf die PLB- oder SERCA2-Expression gerichtet waren. Zum Erkenntniszuwachs bezüglich der PLB-Expression haben insbesondere die Arbeiten der Gruppen um MacLennan und Kranias an isolierten Zellsystemen bzw. genetisch manipulierten transgenen Mausmodellen beigetragen (81). So konnten durch partiellen bzw. kompletten PLB-Knock-Out in heterozygoten und homozygoten Mäusen entsprechend graduierte Steigerungen der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität erreicht werden. Damit verbunden waren gendosisabhängige ino- und lusitrope Wirkungen an enzymatisch isolierten Kardiomyozyten, isoliert perfundierten Herzen sowie *in vivo* (73;74;144). Durch den Einsatz von PLB-Antisense-mRNA-Techniken in neonatalen Kardiomyozyten (31;50) und ebenso durch Expression dominant negativer PLB-Mutanten in Mausmodellen (96), konnte die Expression des Modulatorproteins PLB gesenkt bzw. seine native Wirkung ausgeschaltet werden. Als Ausdruck einer verbesserten SR-Funktion verursachten diese Interventionen in der Systole deutliche Steigerungen der Amplitude von myozytären  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten bei gleichzeitig beschleunigter Senkung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Diastole. Durch die Expression der dominant-negativen PLB-Mutante in Mäusen mit genetisch bedingter dilatativer Kardiomyopathie konnte die Entwicklung einer Herzinsuffizienz vermindert werden (96). Von einigen Gruppen wird gegenwärtig auch die relativ neue Technik der posttranskriptionellen Geninhibierung mittels siRNA genutzt (40). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des SR konnte dabei durch die Expression adenoviral-basierter PLB-siRNA gesteigert werden (139).

Eine Steigerung der SERCA2-Expression durch gentechnische Interventionen an isolierten Herzzellen bzw. Maus- und Rattenmodellen unter physiologischen und z. T. pathophysiologischen Bedingungen konnte ebenfalls von verschiedenen Arbeitsgruppen erreicht werden. Bei transgener SERCA2-Überexpression fand sich in Herzzellen in der Regel ein beschleunigter Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR, eine verstärkte  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR sowie eine erhöhte Freisetzung von Aktivator- $\text{Ca}^{2+}$ , was mit verkürzten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten sowie verbesserten diastolischen und systolischen Funktionsparametern von Herzen bzw. Herzzellen verbunden war. Das erste transgene Mausmodell mit kardialer Überexpression von SERCA2a wurde 1997 von der Arbeitsgruppe W.H. Dillmann entwickelt. Die Expression des SERCA2a-Transgens stand dabei unter der Kontrolle eines konstitutiv

aktiven humanen Zytomegalovirus (CMV)-Enhancer/Hühnchen  $\beta$ -Aktin-Promotors (49). In transgenen Mäusen mit kardialer SERCA2-Überexpression unter der Kontrolle eines alpha-myosin heavy chain (MHC) Promotors fanden Baker et al. um ca. 30% erhöhte SERCA2a-Proteinspiegel, SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität und dadurch positiv ino- und lusitrope Wirkungen am isolierten Working-Heart-Modell (5). Aufgrund der Tatsache, dass der alpha-myosin heavy chain (MHC) Promotor bei pathologischer Herzhypertrophie und -insuffizienz abgeschaltet wird, ist dieses Modell im Gegensatz zu dem von He et al. nicht dazu geeignet, die Auswirkungen einer SERCA2-Überexpression unter pathologischen Bedingungen wie z. B. chronischer Drucküberbelastung nach Aortenstenose zu untersuchen. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass chronisch drucküberbelastete Herzen SERCA2-transgener Mäuse weniger dekompensierten als Kontrollherzen, bei denen die SERCA2-Expression ausschließlich über das endogene SERCA2-Gen kodiert wurde (59). Ein verbesserter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport, der mit positiv ino- und lusitropen Effekten verbunden war, konnte auch an einem transgenen Mausmodell mit Überexpression einer nicht unter PLB-Kontrolle stehenden SERCA2a-Mutante (K397/400E) gezeigt werden (103). Außerdem gelang kürzlich die Entwicklung eines transgenen Mausmodells, bei dem die kardiale SERCA2-Überexpression durch ein tetON-System mittels Tetrazyklinapplikation induzierbar ist. (127). In Herzen dieser transgenen Tiere konnten nach Tetrazyklinbehandlung 2,3-fach bzw. 1,5-fach gesteigerte SERCA2-mRNA bzw. -Proteinspiegel nachgewiesen werden. Das war mit typisch verbesserter SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität und entsprechenden ino- und lusitropen Effekten assoziiert.

Durch adenoviralen Gentransfer von SERCA-Konstrukten war es möglich, die kardiale SERCA2-Expression in isolierten Myozyten bzw. *in vivo* von intakten bzw. pathologisch hypertrophierten Herzen transient zu steigern. Durch diese somatische Gentherapie konnte z. B. die Überlebensrate von Ratten mit schwerer Insuffizienz infolge chronischer Drucküberlast gesenkt werden (28;98). Das war verbunden mit einer transienten Steigerung der bei Herzinsuffizienz verminderten SERCA2-Expression auf mRNA- und Proteinebene. Durch Nutzung dieser Methode wurde eine altersbedingte Abnahme der SERCA2-Expression im Rattenherzen und damit verbundene diastolische und systolische Dysfunktion zeitlich begrenzt therapierbar. Eine vergleichbar erfolgreiche gentherapeutische Intervention zur Steigerung der SERCA2-Überexpression, Verbesserung der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation und kontraktile Eigenschaften wurde mit einem adenoviralen CMV-SERCA2-Konstrukt an humanen Kardiomyozyten gezeigt, die aus explantierten Herzen schwerst herzinsuffizienter Patienten isoliert wurden (27).

Außer den häufig untersuchten SERCA2-transgenen Mausmodellen wurden außerdem zwei transgene Rattenmodelle mit kardialer SERCA2-Überexpression entwickelt. In dem von Vetter et al. generierten transgenen Rattenmodell wird die kardiale Überexpression der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase durch

einen konstitutiv aktiven humanen Zytomegalovirus (CMV)-Enhancer/Hühnchen  $\beta$ -Aktin-Promotor kontrolliert. Eine erste Phänotypcharakterisierung für diese Modell wurde 2002 publiziert (134). Ein transgenes Rattenmodell mit kardialer SERCA2-Überexpression wurde ein Jahr später von der Gruppe um Franz generiert und charakterisiert (101). Zur ventrikelspezifischen Expression des transgenen SERCA2-Konstrukts wurde in diesem Falle ein herzspezifischer Myosin-Leichtkette-Promotor verwendet. Sowohl unter basalen Bedingungen *in vivo* als auch nach Induktion einer Drucküberlasthypertrophie zeigten SERCA2-transgene Ratten mit gesteigerter SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportfunktion im Vergleich zu ihren transgen negativen Kontrolltieren bessere positive lusitropische und inotrope Effekte bzw. eine geringere Kontraktilitätsabnahme.

## 1.6. Zielstellung der Arbeit

Bei chronischem Herzversagen unterschiedlicher Ätiologie ist häufig eine Verminderung der SERCA2-Expression und des SERCA2-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) der Herzmuskelzelle pathogenetisch bedeutungsvoll. Geeignete Ansätze zur Prävention bzw. Korrektur dieser molekularen Veränderungen sind bisher jedoch nur ungenügend erforscht. Um im Kontext des Gesamtorganismus herauszufinden, ob eine primär verbesserte SERCA2-Ausstattung des SR kontraktile Funktionsstörungen unter pathologischen Bedingungen verhindern kann, sind transgene Tiere mit verbesserter kardialer SERCA2a-Expression potenziell gut geeignete Modelle. Das Erheben verlässlicher Daten zur Wertigkeit einer SERCA2a-Überexpression für die kontraktile Funktion des Herzens unter chronisch-pathologischen Bedingungen setzt jedoch voraus, dass der kardiale Phänotyp des jeweils eingesetzten transgenen Tiermodells unter physiologischen Bedingungen detailliert charakterisiert ist.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, den Genotyp sowie den kardialen Phänotyp eines SERCA2-transgenen Rattenmodells unter physiologischen Bedingungen im Detail zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk galt dabei den möglichen funktionellen Auswirkungen der transgen-bedingten kardialen SERCA2-Überexpression in Hinblick auf den SERCA2-katalysierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das SR sowie die kontraktile Eigenschaften isolierter Herzen SERCA2-transgener Tiere. Durch meine Untersuchungen sollten Grundlagen für nachfolgende Untersuchungen zur potenziellen Präventivwirkung einer primär verbesserten SERCA2a-Ausstattung des SR bei unterschiedlichen Formen chronischer Druckbelastung erarbeitet werden.