

2. Material und Methoden

2.1. Tierhaltung

Alle Tiere wurden im Tierhaus am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Charité, Universitätskliniken Berlin, Campus Benjamin Franklin gehalten. Für die Versuche erteilte das Landesamt für Landesschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin die Genehmigung (T0066-98, O0139/05).

Jeweils 3 Sprague Dawley Ratten wurden in mit Weichholzspänen eingestreuten Käfigen aus Makrolon (Maße 590 x 380 mm, 200 mm Höhe) mit einem Standarddeckel von EBECO[®] gehalten. Die Aufzucht erfolgte bei einer Raumtemperatur von $22 \pm 1^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5\%$ und einem künstlichem Hell-Dunkel Rhythmus (150-220 Lux) von jeweils 12 Stunden. Bei 10-fachem Luftwechsel pro Stunde betrug die Raumluftgeschwindigkeit in 1,6m Höhe 0,3 m/s. Die Tiere erhielten eine Standardrattendiät Altromin C1000 (Fa. Altromin, Lage/Lippe, Deutschland) sowie Trinkwasser ad libitum.

2.2. Tötung und Organentnahme

Die Tötung der Tiere erfolgte durch Dekapitation oder durch Herzentnahme in Isofluran-Inhalationsnarkose. Die Narkotisierung wurde in einem Käfig aus Makrolon (L x B x H, 590 x 380 x 200, mm) mit einem für die Narkosemittelzu- und Abfuhr umgebauten Standarddeckel durchgeführt. Die Einleitung erfolgte über einen Isofluranverdampfer (Fa. Dräger Medical Deutschland GmbH, Lübeck) mit 5 Vol. % Isofluran (Forene; Fa. Abbott, Wiesbaden, Deutschland) und anschließender Gabe von 3 Vol.% Isofluran. Nach 3 min wurde die Narkosetiefe durch das Setzen eines Schmerzreizes mit Hilfe einer anatomischen Pinzette überprüft und die Herzentnahme bei ausreichender Analgesie begonnen. In einzelnen Fällen wurden außerdem Aorta, Diaphragma, beide Nieren, eine Probe roter Muskel (*M. gastrocnemius*), ein weißer Muskel (*M. psoas major*) entnommen, präpariert, gewogen und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.3. *In vitro* Methoden zur Genotypisierung

Die Untersuchungen wurden an heterozygoten SERCA2a-transgenen Ratten und transgen negativen Nachkommen der Linie 1167 durchgeführt. Alle gezüchteten Tiere wurden genotypisiert. Dies erfolgte entweder mit Northern Blot-Technik unter Nutzung einer Transgen-spezifischen DNA-Sonde oder mit PCR unter Verwendung Transgen-spezifischer Primer. Jedes genotypisierte Tier

wurde exakt in einem Stammbaum erfasst. Bei der Verpaarung der Zuchttiere wurde jeweils ein transgen-positiver Rattenbock mit zwei transgen-positiven Weibchen in einem Käfig für eine Woche zusammengesetzt. Geschwister wurden untereinander nicht verpaart.

2.3.1. Schwanzspitzen-Biopsie

Zur Isolierung genomischer DNA wurde den gezüchteten Jungtieren drei Wochen post partum ein ca. 0,5 cm langes Stück des Schwanzendes entnommen. Das Resektat wurde bis zur DNA-Isolierung in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen (Safe Lock) bei -20°C gelagert. Um die bei der Resektion entstandene geringfügige Blutung schnell zu stoppen, wurde die entstandene kleine Schnittwunde mit Hilfe von Histoacryl[®] Gewebekleber (Fa. B. Braun-Dexon GmbH, Tuttlingen) versiegelt.

2.3.2. Genomische DNA-Isolierung

Die bei -20°C in einem 2 ml Eppendorf-Röhrchen gelagerten kleinen Schwanzstückchen wurden zunächst für 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut und anschließend mit 0,7 ml „Tail“-Lysepuffer versetzt, der 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1% SDS und 50 mM Tris, pH 8,0 enthält. Nach Zugabe von 35 μl (ca. 15 IE) des proteolytischen Enzyms Proteinase K (Fa. GibcoBRL; 10 mg/ml) wurden die Proben über Nacht für 12 - 16 h bei $+55^{\circ}\text{C}$ in einem Eppendorf-Thermocomfort-Mixer (Thermomixer Comfort; Fa. Eppendorf, Hamburg) mit 550 U/min inkubiert. Der proteolytische Abbau der Zellproteine durch Proteinase K ist ein essenzieller Schritt bei der DNA-Isolierung. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Serinprotease, welche peptidische Bindungen X-Y spaltet. Dabei kann X eine aromatische, aliphatische oder hydrophobe Aminosäure und Y jede beliebige Aminosäure sein. Die Zugabe von Proteinkinase K im Überschuss garantierte für alle zu analysierenden Proben einen kompletten Abbau der Zellproteine bis hin zu freien Aminosäuren. Die komplett proteolysierten Proben wurden am nächsten Morgen zunächst für 10 min auf Eis gekühlt, danach zu jeder Probe 300 μl 6 M NaCl hinzu pipettiert und bei 4°C für 30 min bei 18800 g zentrifugiert (Megafuge 1.OR, Rotor 3041; Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland). Verbliebenes partikuläres Material sedimentiert dabei als Pellet. Der klare, Nukleinsäuren (DNA, RNA), Aminosäuren und Peptidfragmente enthaltende Überstand wurde in ein neues steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und 5 μl RNase A (10 $\mu\text{l}/\text{ml}$ 100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl; Fa. Sigma) zupipettiert, um in der Probe enthaltene RNA zu hydrolysieren. Diese Mischung wurde im Eppendorf-Thermocomfort-Mixer ohne zu schütteln für 30 min bei 37°C inkubiert. Nach kurzem Abkühlen auf Eis, wurde anschließend die in der Lösung enthaltene DNA durch Zugabe von 1 ml -20°C kaltem Isopropanol (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) ausgefällt. Die Reaktionsgefäße wurden dann für mindestens 10 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen und anschließend bei 4°C für

10 min bei 18000 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde vorsichtig entfernt und verworfen. Zur Entfernung von Isopropanolresten wurde das erhaltene glasige DNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol (-20 °C) gewaschen und erneut für 10 min mit 18000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Vakuum-Membranpumpe vorsichtig abgesaugt und das Pellet bei RT für 15-20 min getrocknet. Die sedimentierte DNA wurde dann in 30 µl sterilem TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA; pH 7,6) bei 37 °C für 60 min in einem Thermoblock in Lösung gebracht.

2.3.3. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in 1:50 verdünnten DNA-Originallösungen erfolgte durch Messung der Absorption in Präzisionsküvetten mit 1 cm Schichtdicke (Suprasil, Fa. Hellma, Mühlheim, Deutschland) bei Wellenlängen von 260 nm (Nukleinsäure) bzw. 280 nm (Protein) im Spektrophotometer UV-VIS 1202 (Fa. Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Dabei entsprach ein Extinktionswert von 1 einer Konzentration von 50 µg dsDNA/ml. Zur Messung wurden jeweils 100 µl verdünnte DNA-Lösung eingesetzt und die Extinktion bei den o. g. Wellenlängen gegen einen H₂O-Leerwert gemessen. Die Konzentration der DNA-Originallösung errechnete sich wie folgt:

$$[\text{dsDNA}] (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} \cdot 50^a \cdot \text{VF}$$

OD₂₆₀ - Extinktion bei 260 nm, a - Multiplikationsfaktor für dsDNA (1 µg/ml $\hat{=}$ Extinktion von 1),
VF - Verdünnungsfaktor

2.3.4. ApaI-Restriktionsverdau genomischer DNA

Um die isolierte genomische Proben-DNA vor der Gelelektrophorese spezifisch zu fragmentieren, wurde diese mit der Restriktionsendonuklease Apa I verdaut. Dadurch wird aus genomischer DNA SERCA2-transgen positiver Tiere ein transgen-spezifisches ApaI-ApaI-Fragment freigesetzt. Dies lässt sich durch anschließende Hybridisierung mit einer transgen-spezifischen DNA-Sonde im Southern Blot als transgen-spezifische 1,2 kb-Bande nachweisen. Das Restriktionsenzym Apa I schneidet in doppelsträngiger DNA spezifisch die Zielsequenz mit der Basenfolge GGGCC↓C. Das transgen-spezifische ApaI-ApaI-Fragment enthält Sequenzen des Intron 1 des Hühner-β-Aktin-Gens (49;134), die nur im SERCA2-Transgen, nicht jedoch im endogenen SERCA2-Gen enthalten sind. Der 30 µl-Ansatz für den Restriktionsverdau enthielt 20 µg genomische DNA, 1 mM Dithiothreitol, 10 mM MgCl₂, 10 mM Tris/HCl, pH 7.5 und 60 IE ApaI. Dieser Ansatz wurde über Nacht für 12 h bei 37°C in einem Wärmeschrank (Function Line; Fa. Heraeus, Hanau) inkubiert.

2.3.5. DNA-Elektrophorese

Die ApaI-geschnittenen DNA-Proben wurden in einem horizontalen 0,8%-en Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch die Siebstruktur der Agarose wird eine Auftrennung der negativ geladenen Nukleinsäuren nach ihrer Größe und der daraus resultierenden unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld möglich. Für die anzufertigenden Lösungen wurde ionenfreies Wasser aus der Reinstwasseranlage (OPTILAB Plus; Fa. MembraPure) benutzt. Zur Herstellung des Gels wurden 2,8 g Agarose (ultraPure; Fa. GibcoBrl) in 350 ml 1x TAE-Puffer verrührt (40 mM Tris; 0,11% v/v Eisessig; 1 mM EDTA; pH 8,0) und anschließend bis zur vollständigen Lösung der Agarosepartikel 3 x 1 min bei 600 Watt in einer Mikrowelle (Micromat; Fa. AEG, Frankfurt) erhitzt. Der Lösung wurden nach Abkühlen auf ca. 60°C 5 µl einer Ethidiumbromidstammlösung (10 mg/ml) zugesetzt und ein 6 - 8 mm dickes Maxi-Flachgel (19,5cm x 24,5 cm) gegossen. Durch die spätere Interkalation von Ethidiumbromid zwischen die Basen der Nukleinsäuren wird der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex nach Anregung durch UV-Licht als rot-orange leuchtende Bande sichtbar und die Detektion von bis zu 5 ng dsDNA ermöglicht. In die mit flüssiger Agaroselösung gefüllte horizontale Gelelektrophoresekammer (Horizontal-Elektrophoresekammer Horizon 20.25; Lifetechnologies; Fa. GibcoBrl, Karlsruhe, Deutschland) wurde ein 2 mm dicker Kamm für Geltaschen mit 40 µl Volumen eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde 1xTAE-Puffer in die Kammer gegossen, so dass sich eine 2-3 mm Überschichtung des Gels mit Laufpuffer ergab. Danach wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Zu den 30 µl Apa-I-verdauten DNA-Proben wurden je 5 µl TE-Ladepuffer für DNA (60 mM Tris/HCl, 6 mM EDTA, pH 7,4; 40% w/v Saccharose; 0,25% w/v Bromphenolblau) pipettiert. Es wurde anschließend gut gemischt und 35 µl dieses Gemisches jeweils in eine Geltasche am Gelstart pipettiert. Für Kontrollzwecke wurden in freie Geltaschen jeweils 4 µg 1-kb-DNA-Größenmarker (Fa. GibcoBrl), 36 µl Positivkontrolle (20 µg dsDNA), 36 µl Negativkontrolle (20 µg dsDNA) und 1 µg Apa-I-restriktionsverdaute, aufgereinigte transgene SERCA2-Plasmid-DNA aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für 150 min bei konstanter Spannung von 80 V (Power Pack 300; Lifetechnologies, Fa. GibcoBrl, Karlsruhe, Deutschland).

2.3.6. Southern Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurden die DNA-Fragmente auf eine positiv geladene Nylonmembran (Hybond-N⁺, Fa. Amersham) transferiert. Dieses sog. Southern Blotting wurde nach Edward M. Southern benannt, der diese Technik des Transfers und Fixierens auf einer Membran von zuvor elektrophoretisch getrennten DNA-Fragmenten in den 70er Jahren in Edinburgh entwickelte, um einzelne transferierte DNA-Fragmente später durch Hybridisierung mit markierten

Sonden spezifisch nachweisen zu können. Das Agarosegel wurde zuerst vorbehandelt, um einen effizienten Transfer zu gewährleisten. Dazu wurden das Agarosegel, die Hybond-N⁺-Membran, und ein der gleichen Größe entsprechendes Chromatographie-Whatmanpapier 3MM kurz in 20xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0) gewaschen und in einer Vakuum-Blot-Apparatur (Vacu-Blot-System VB 11 inklusive Vakuum Membranpumpe PM 12617-86; Fa. Biometra, Göttingen, Deutschland) in umgekehrter Reihenfolge, blasenfrei übereinander geschichtet. Das oben liegende Agarosegel wurde mit 0,25 N HCl überschichtet. Die Salzsäure wurde durch einen angelegten Unterdruck von 0,2 bar langsam, ca. 20 min lang durch das Agarosegel sowie die darunter liegende Nylonmembran/Whatman-Papierschicht gezogen. Die komplette Durchdrängung des Gels mit HCl wurde durch einen Farbumschlag des im Gel befindlichen Bromphenolblaus von blau nach gelb angezeigt. Im sauren Milieu wird die DNA im Gel teilweise depuriniert und zerbricht dann in kleinere Fragmente. Dieser Schritt ist insbesondere für den effizienten Transfer von DNA-Fragmenten über 5 kb notwendig. Die restliche Salzsäure im oberen Teil der Blotting-Apparatur wurde abgesaugt und zwecks Denaturierung der DNA durch 0,5 N NaOH/1,5 NaCl ersetzt. Die Denaturierungslösung wurde unter Vakuum wiederum für ca. 25 min, bis es zum erneuten Farbumschlag von gelb nach blau, durch Agarosegel, Membran und Whatmanpapier gezogen. Der eigentliche Transfer der getrennten DNA-Stränge wurde dann für 1,5 h mit 20xSSC fortgesetzt. Am Ende des Transfers wurde die feuchte Nylonmembran entnommen und die transferierten DNA-Stränge in einem UV-Stratalinker (UV-Stratalinker 1800; Fa. Stratagene, LaJolla, USA) mit funktionellen Gruppen der Membranmatrix zweimal 52 sec bei 120 mJ kovalent vernetzt, so dass nun ein Hybridisieren ohne ein Ablösen von DNA-Fragmenten möglich wurde. Für die Hybridisierung wurde eine durch „random priming“ ³²P-markierte, transgen-spezifische 1,2 kb Sonde (134) benutzt. Zur Prähybridisierung wurde die UV-behandelte Membran zuerst in ein Hybridisierungsrohr (Hybridisierungsglasrohre 19,5 x 4 cm; Fa. Biometra, Göttingen) mit 10 ml Prähybridisierungsmix (30% v/v 20xSSC, 10% v/v 100 x Dehnhardt's, 5% v/v 20% SDS) und 1 ml Heringssperma-DNA (500 mg) in einen Hybridisierungssofen gegeben und für 60 min bei 64 °C inkubiert (Mini-Hybridisierungssofen OV 3; Fa. Biometra, Göttingen). Die für die Blockierung unspezifischen DNA-Bindungsstellen benutzte Heringssperma-DNA wurde vor Gebrauch bei 95 °C denaturiert (Thermoblock DB-2D; Fa. Techne, Duxford, UK) und danach 5 min auf Eis gekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde anschließend durch 10 ml Hybridisierungsmixtur ersetzt, die neben 1 ml Heringssperma-DNA die ³²P-markierte, transgen-spezifische DNA-Sonde enthielt. Die Hybridisierung im Hybridisierungssofen erfolgte bei 64 °C über Nacht für ca. 16 h. Dabei lagern sich die einsträngigen, radioaktiv markierten transgen-spezifischen DNA-Sondenfragmente komplementär an entsprechende membrangebundene DNA-Einzelfragmente transgen-positiver Tiere an. Am nächsten Morgen wurde die Nylon-Transfermem-

bran aus der Hybridisierungsmixtur entnommen und in einer Kunststoffschale (20 cm x 20 cm) mehrfach gewaschen. Die ersten drei der insgesamt 4 Waschschrte wurden für jeweils 15 min bei RT, der letzte für 30 min bei 64°C durchgeführt. Zum Waschen wurden für Schritt I. bis IV. 1 Liter Waschlösung verwendet (I. 2xSSC/0,1% SDS, II. 0,5xSSC/0,1% SDS, III. 0,1xSSC/0,1% SDS, IV. 0,1xSSC/1,0% SDS). Der Nachweis der spezifisch ³²P-markierten 1,2 kb DNA-Bande erfolgte mit der „Storage Phosphor“-Technik auf einem PhosphorImager (BAS Reader 1500; Fa. Fujifilm, Düsseldorf, Deutschland). Die Membran wurde in einer Entwicklungskassette auf eine PhosphorImager Platte (Typ BAS-III 20 x 40 cm; Fa. Fuji Photo Film Co., Ltd.) gelegt, die für 1 h exponiert wurde. Die exponierte Platte wurde im PhosphorImager mit Laserlicht definierter Wellenlänge angeregt und das emittierte Lichtsignal vom Gerät in ein Bildsignal umgewandelt. Die Bildauswertung erfolgte unter Nutzung der Software BAS-reader 2.05 und AIDA 2.11 (Fa. Raytest, Straubenhardt, Deutschland).

2.3.7. PCR

Für den Nachweis des SERCA-Transgens mittels PCR wurden humane CMV-Sequenzen amplifiziert, da diese nur im SERCA2-Transgen, nicht jedoch im Rattengenom von Wildtyp-Tieren vorkommen. Für die Amplifikation von transgen-spezifischen CMV-Enhancer-Sequenzen wurde ein Teilstück (Basenpaar 119 - 422) des humanen Cytomegalie-Virus immediate-early Enhancer (hCMV-IE) genutzt (s. hCMV-c β -Aktin/rSERCA2-Transgen in der Einleitung). Mit Hilfe der PCR lässt sich dieser SERCA2a-Transgen spezifische Genabschnitt als Template gezielt vervielfältigen (102). Dabei basiert das Prinzip der PCR auf der Trennung des DNA-Doppelstranges (dsDNA) in zwei Einzelstränge (ssDNA) durch Hitze-Denaturierung, der darauf folgenden Anlagerung sequenzspezifischer Oligonukleotide, sogenannter Primer, an die freien 3'-OH Enden der beiden ssDNA (Annealing) und der anschließenden Katalyse durch eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, die in Gegenwart freier Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP) die Primer verlängert (Elongation) und den zum entsprechenden ssDNA komplementären Strang synthetisiert. Für die PCR wurde die DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums *Thermus aquaticus* (GenTherm™DNA Polymerase; Fa. Rapidozym, Berlin, Deutschland) verwendet. Als Forward Primer wurde CMVIE71:5 (5'-TTACGGGGTCATTAGTTCATAGCC-3'), als Reverse Primer CMV351:5 (5'-GTAGGAAAGTCCCATAAGGTCATGT-3') der Fa. Proligo verwendet (**Abb. 2.1**). Aus den für die Elongation benötigten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTP - set, 100 mM solution; Fa. Rapidozym, Berlin, Deutschland) wurde vor Gebrauch ein Mastermix hergestellt, der alle Nukleosidtriphosphate in einer Konzentration von 10 mM enthielt.



Abbildung 2.1. Teilsequenz des humanen CMV-Immediate-Early Enhancer zwischen den Basenpaaren 119 und 422. Hybridisierungsbereiche der CMVIE71:5-Sense und CMV351:5-Antisense Oligonukleotid-Primer (Fa. Prologo Biochemie GmbH, Hamburg, Deutschland) sind blau dargestellt. Die Primerbindungsstellen für den Sense- bzw. Anti-sense-Primer befinden sich -994 bzw. -691 Basenpaare upstream der TATA Box. Dies entspricht im Humanen Herpes Virus 5 mit der Genbankdatennummer AC146999 der Nukleotidsequenz 46357 bis 46660.

Die PCR-Ansätze wurden auf Eis in 200 μ l PCR-Reaktionsgefäßen (8er-Strip Reaktionsgefäße; Fa. Neolab, Heidelberg, Deutschland) pipettiert. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze ist in **Tab. 2.1** dargestellt. Neben der Template-DNA, den spezifischen Primern und der hitzebeständigen Polymerase enthält der Reaktionsansatz für optimale Reaktionsbedingungen einen geeigneten Puffer, $MgCl_2$ und dNTP's. Die Magnesiumionen haben einen positiven Einfluss auf die Denaturierung der dsDNA, das Primer-Annealing, die Spezifität des Templateproduktes und sind außerdem ein Kofaktor für die meisten DNA-Polymerasen.

Tabelle 2.1: PCR-Ansatz zur Amplifikation transgen-spezifischer CMV-Sequenzen

Komponenten	Endkonzentration/absolute Menge	μ l/Ansatz
10x Puffer (160 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% Tween 20, 670 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25°C)	1x Puffer (16 mM $(NH_4)_2SO_4$, 0,1% Tween 20, 67 mM Tris-HCl)	2,5
$MgCl_2$ (50 mM)	1,5 mM	0,75
dNTP (je 10 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP)	0,1 mM	0,25
DNA-Polymerase (5U/ μ l)	0,02U/ μ l	0,1
Sense Primer CMVIE71:5 (10 μ M)	0,25 μ M	0,625
Antisense Primer CMV351:5 (10 μ M)	0,25 μ M	0,625
DNA (50 ng/ μ l)	2 ng/ μ l	1 μ l
ddH ₂ O	-----	19,15

Nach dem Herstellen des Ansatzes wurde dieser sofort in einen Thermozykler (Mastercycler Gradient; Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) gestellt und die PCR gestartet. Jede Zyklusphase läuft für die stattfindenden Prozesse unter optimierten Temperaturbedingungen ab. Die Zyklusbedingungen wurden folgendermaßen gewählt:

Vordenaturierung:	94°C	2 min	
Denaturierung:	95°C	30 sec	} 34 Zyklen
Primer-Annealing:	63,5°C	1 min	
Elongation:	72°C	30 sec	
Elongation	72°C	6 min	
Lagerung	4°C	bis zur Elektrophorese	

Mit jedem Durchlaufen des Zyklus wird die Anzahl der DNA-Moleküle exponentiell amplifiziert (2^n bei n Zyklen), wobei die neu synthetisierte DNA im nachfolgenden Zyklus selbst wieder als Template dient. Nach Abschluss der PCR wurde die amplifizierte DNA am selben oder nächsten Tag in einem 1,5%-en Agaroseminigel (100 x 60 x 5) für 30 min bei konstanter Spannung von 90 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Die Herstellung des Agarosegels erfolgte wie prinzipiell in Abschnitt 2.3.5 beschrieben. Durch das sowohl im TAE-Elektrophoresepuffer als auch im Agaroseminigel enthaltene Ethidiumbromid (0,5 µg/ml) konnten die DNA-Fragmente bei UV-Exposition sichtbar gemacht werden. Der Elektrophoreseverlauf wurde anhand des in der Front laufenden Bromphenol-Marker-Farbstoffes kontrolliert. Um das nach der Elektrophorese entstandene Bandenmuster zu dokumentieren, wurde das Gel bei UV-Exposition (254 nm) in einer Bild-dokumentationsanlage (Raytest mit DIANA Chemiluminescence Detection System; Raytest, Straubenhardt, Deutschland) fotografiert. Die Größenbestimmung der einzelnen Fragmente erfolgte durch Vergleich mit den Banden einer 100 bp DNA-Leiter (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder, Fa. Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland), die in einer Gelspur aufgetrennt wurde (0,25 µg/Bahn).

2.4. *In vitro* Methoden zur kardialen Phänotypisierung

2.4.1. RNA-Isolierung

Aus ca. 100 mg Gewebeproben des linken Ventrikels - zuvor in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert - wurde die gesamte zelluläre RNA mit der sog. Einschrittmethode nach Chomczynski und Sacchi isoliert (19). Dazu wurde die monophasische Lösung TRIzol® (Fa. InVitrogen) benutzt, die Guanidinisothiocyanat (GTC) und Phenol enthält. Durch das chaotopie GTC werden die Gewebekomponenten lysiert, Proteine denaturiert und RNAsen inaktiviert; während durch das enthaltene Phenol im sauren Milieu denaturierte Proteine und kleinere DNA-Fragmente aus dem Lysat entfernt werden. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: In einem sterilen Polypropylenröhrchen (Ø18 mm/Länge 95 mm; Fa. Greiner) wurden die Gewebeproben in 1 ml

TRIzol[®] mit einem Polytron-Homogenisator (Polytron PT 10/35 mit Schaft PT-DA 3007/2; Fa. Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz) 3 x 10 s bei 15 000 U/min homogenisiert. Zur vollständigen Lyse der Homogenate erfolgte eine Inkubation für 5 min bei RT. Der Röhrcheninhalt wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 0,2 ml Chloroform (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) versetzt, gut durchmischt und erneut für 3 min bei RT inkubiert. Danach wurde bei 4°C für 15 min bei 10 000 g in einer Biofuge „Fresco“ (Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland) zentrifugiert. Nach Überführung der wässrigen RNA-haltigen Phase in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße wurde diese zur RNA-Ausfällung mit 0,5 ml -20°C kaltem Isopropanol versetzt, für 20 min bei -20°C inkubiert und bei 4°C für 10 min wie zuvor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene gallertartige Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol (-20 °C) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 000 g/10 min/4 °C) und Entfernung des Überstandes wurde das RNA-Pellet bei für ca. 5 min bei RT getrocknet und in 30 µl DEPC-behandeltem 2-fach autoklaviertem H₂O gelöst. Um das RNA-Pellet komplett zu lösen, erfolgt in manchen Fällen eine zusätzliche Inkubation bei 60°C für 15 min. Anschließend wurde die RNA-Konzentration der 1:50 verdünnten Proben spektrophotometrisch bestimmt (UV-VIS Spektrophotometer UV 1202, Fa. Shimadzu, Duisburg, Deutschland). Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen einen H₂O-Leerwert gemessen. Die RNA-Konzentration der unverdünnten RNA-Originallösung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{260} * 40^a * \text{VF}$$

OD₂₆₀ - Extinktion bei 260 nm, a - Multiplikationsfaktor für RNA (1 µg/ml ≙ Extinktion von 1),
VF - Verdünnungsfaktor,

2.4.2. Northern Blot

Alle benutzten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem, 2-fach autoklaviertem Wasser angesetzt. Alle Arbeiten wurden unter einem Abzug durchgeführt. Zwecks Denaturierung wurde zuerst 15 bzw. 20 µg isolierte Gesamt-RNA in 10 µl H₂O mit 30 µl RNA-Probenpuffer (10 ml deionisiertes Formamid, 3,5 ml 37% Formaldehyd, 2 ml 5xRNA-Elektrophoresepuffer (200 mM MOPS, 50 mM NaAcetat 10 mM EDTA, pH 7,0)) gemischt, für 5 min auf 65°C erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und mit 5 µl RNA-Ladepuffer (50% w/w RNAse-freies Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25% w/v Bromphenolblau, 0,25% w/v Xylencyanol) versetzt. Die denaturierten RNA-Proben wurden dann in einzelne Geltaschen eines ca. 6 mm dicken, 10 min vorgelaufenen, 11,5 x 14 cm Agarose-Midigels (1% Agarose, 6,5% Formaldehyd, in 1xRNA-Elektrophoresepuffer bestehend aus 40 mM MOPS, 10 mM NaAcetat, 1 mM EDAT, pH 7,0, 0,01% Ethidiumbromid) pipettiert und bei 80 V für 2 h getrennt. Für die elektrophoretische Auftrennung wurde eine mit 1xRNA-Elektrophoresepuffer

gefüllte horizontale Gelelektrophoresekammer (Horizontal-Elektrophoresekammer Horizon 11.14; Fa. Lifetechnologies; GibcoBrl, Karlsruhe) mit einem Elektrodenabstand von 24 cm benutzt. Eine Geltasche wurde mit 1 µg RNA-Größenmarker (0,5 bis 9 kb) belegt, der vor dem Auftragen 3 min bei 60°C in 1xDenaturierungspuffer inkubiert wurde.

Die elektrophoretisch aufgetrennte mRNA wurde anschließend mittels Kapillarblot auf eine Nylonmembran transferiert und UV-fixiert. Das Kapillarblot-Sandwich wurde wie folgt luftblasenfrei geschichtet: Eine Blotbank wurde in ein 18 x 13,5 x 2,5 cm Wanne (Blot Transfer System 11.14; Fa. GibcoBRL, Karlsruhe, Deutschland) mit ca. 450 ml 20xSSC (Pufferreservoir) gestellt und mit einer Doppellage in 20xSSC getränkten Chromatographiepapierstreifen (11 x 23 cm 3MM Whatman-Papier) so belegt, dass die Papierstreifenenden in das Pufferreservoir eintauchten. Auf diese Doppelschicht wurde zuerst das Agarosegel mit der Geloberseite nach unten, dann eine 11 x 14 cm Nylontransfermembran (Hybond-N⁺, Fa. Amersham) sowie zwei Lagen in 20xSSC getränktes 3MM Whatman-Papier mit den gleichen Maßen luftblasenfrei aufgelegt. Auf dieses Transfersandwich wurde ein ca. 10 cm hoher, mit einem 1 kg-Gewicht beschwerter Stapel von saugfähigen Papiertüchern (11 x 14 cm, Fa. Apura) gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass der Saugpapierstapel nur Kontakt zur obersten Whatman-Papierlage hatte. Der Kapillartransfer erfolgte über Nacht für maximal 18 h. Unter Ausnutzung der Kapillarkräfte werden die im Gel enthaltenen Ribonukleinsäuren im 20xSSC-Pufferstrom auf die Nylonmembran transferiert und dort aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen gebunden. Am Ende des Transfers wurde die feuchte Nylonmembran entnommen und die transferierte RNA in einem UV-Stratalinker 1800 (Fa. Stratagene, LaJolla, USA) mit funktionellen Gruppen der Membranmatrix 2x für 52 s mit 120 mJ kovalent vernetzt. Für die Hybridisierung in einem Hybridisierungsöfen OV3 mit 19,5 x 4 cm Hybridisierungsglasrohren wurden durch „random priming“ ³²P-markierte cDNA-Sonden zum quantitativen Nachweis von SERCA2-, PLB-, NCX, Calsequestrin-, ANF-, GAPDH- und β-Actin-mRNA genutzt. Diese Sonden wurden entweder durch restriktionsenzymspezifisches Schneiden der entsprechenden Plasmide und anschließender Trennung des herausgeschnittenen Inserts von der Vektor-DNA im 1% Agarosegel oder durch RT-PCR gewonnen. **Tab. 2.2** zeigt sowohl die im Northern- oder RNA-Dot Blot (s. Methoden 2.4.3) verwendeten cDNA-Sonden als auch die zugehörigen Schnittstellen der sondenspezifisch verwendeten Restriktionsenzyme und die Länge des dabei entstehenden Fragments. Die Hybridisierungstemperaturen der Sonden sind ebenfalls aufgeführt. Für Normierungszwecke wurden die Blots gestriipt und anschließend mit einer spezifischen ³²P-markierten DNA-Sonde für GAPDH-mRNA hybridisiert.

Die Prähybridisierung der Nylonmembran mit kovalent fixierter RNA wurde für 3 h bei 67°C in 10 ml Prähybridisierungslösung durchgeführt. Darin waren enthalten 2,5 ml 20xSSC, 0,5 ml 1 M

Tabelle 2.2. Auflistung verwendeter cDNA-Sonden

cDNA-Sonde	Schnittstelle/ Ursprung	Länge des Restriktions- fragments (kb)	Hybridisierungstemp- eratur (°C)
SERCA2 (Ratte)	EcoR11-EcoR1	1,8	65
PLB (Ratte)	EcoR1-BamH1	0,7	65
GAPDH (Hühnchen)	Pst1-Pst1	1,2	45
NCX (Meerschwein)	EcoR1-EcoR1	1,5	50
CSQ (Kaninchen)	HindIII-BamH1	0,57	65
ANF (Ratte)	PCR (216 bp)	0,78	65
β-Actin (Ratte)	PCR (264 bp)	0,26	65

Hinweis: Zur Herstellung der ANF-cDNA-Sonde mittels RT-PCR wurden Forward (5'-GCCCCGCTTCATCGGTCTG-3') und Reverse Primer (5'-CAGCATGGGCTCCTTCTCCATCAC-3') verwendet, die anhand der Sequenz von ANF (Genbank Datennummer M27498) generiert wurden. Für die β-Actin-cDNA-Sonde wurden Forward (5'-CATTGAACACGGCATTGTCAC-3') bzw. Reverse Primer (5'-CCGTCTCCGGAGTCCATCAC-3') basierend auf der Sequenz für β-Actin (Genbank Datennummer AF122902) benutzt.

NaH₂PO₄, pH 8,0, 0,5 ml 100x Denhardt's-Lösung, 5 ml deionisiertes Formamid, 0,5 ml 20% SDS sowie 1 ml 500 mg Heringssperma-DNA. Letztere Lösung wurde vor der Zugabe zur Prähybridisierungslösung wie unter 2.3.6 beschrieben vorbehandelt. Am Ende der Prähybridisierungsphase wurden zum 10 ml Prähybridisierungsmix 20 - 40 ng der entsprechenden ³²P-markierten DNA-Sonde zugegeben. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht für ca. 16 h. Die optimale Hybridisierungstemperatur für die jeweilig eingesetzte ³²P-markierte cDNA-Sonde ist **Tab. 2.2** zu entnehmen. Für die Markierung der entsprechenden DNA-Sonden wurde ein Prime-It[®]II Random Primer Labeling Kit der Fa. Stratagene verwendet. Bei dieser Markierungsmethode dienen im Reaktionsgemisch gebildete Komplexe zwischen sog. Random-Nonamerprimern und der entsprechenden Sonden-DNA als Substrat für das Klenowfragment der DNA-Polymerase I Exo(-) Klenow. Das Enzym synthetisiert neue DNA-Stränge indem an freien 3'-OH-Gruppen der komplexierten Primer Nukleotidmonophosphate eingebaut werden. Die ³²P-Markierung der neu synthetisierten DNA-Stränge in Gegenwart von [α-³²P]dCTP erfolgt durch Austausch eines nicht-radioaktiven Desoxycytosinnukleotids durch ein ³²P-markiertes Desoxycytosinnukleotid. In 50 µl Markierungsansatz waren enthalten: 23 µl Sonden-DNA (20 - 40 ng), 10 µl Random-Nonamerprimer, 10 µl 5xdCTP-Primerpuffer mit 0,1 mM dATP, 0,1 mM dGTP, 1 mM dTTP, 5 µl [α-³²P]dCTP (ca. 5 µCi) und 2 µl gepufferte Glycerollösung mit 10U Exo(-)Klenow. Die 23 µl Sonden-DNA (20 - 40 ng) und 10 µl Random-nonaprimers wurden zuerst gemischt, 5 min bei 95°C inkubiert und 5 min im Eisbad abgekühlt. Danach wurden die restlichen Komponenten des o. g. Markierungsansatzes zugegeben. Dieser Ansatz wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf Sephadex[®]-Quick Spin[™]-Säulen (Fa. Roche/Boehringer Mannheim) an-

hand der Vorschrift des Herstellers aufgetragen, um nicht in DNA eingebaute Nukleotide zu entfernen. Die Radioaktivität des ^{32}P -markierten DNA enthaltenden Eluates betrug 2-3 μCi . Zur Bestimmung der spezifischen Sondenaktivität wurde 1 μl Eluat entnommen, in 10 ml H_2O verdünnt und im β -Szintillationsmessgerät nach Cerenkov gemessen. Das Eluat wurde 5 min bei 95°C inkubiert, 5 min in Eisbad abgekühlt und zum Prähybridisierungsmix wie oben beschrieben pipettiert.

Nach der Hybridisierung über Nacht wurde die Nylonmembran am nächsten Morgen aus der Hybridisierungsmixtur entnommen und in einer Kunststoffschale (20 cm x 20 cm) mehrfach gewaschen. Die ersten drei der insgesamt 4 Waschschrte wurden für jeweils 15 min bei RT, der letzte für 30 min bei 64°C durchgeführt. Zum Waschen wurden für Schritt I. bis IV. 1 Liter Waschlösung verwendet (I. $2\times\text{SSC}/0,1\%$ SDS, II. $0,5\times\text{SSC}/0,1\%$ SDS, III. $0,1\times\text{SSC}/0,1\%$ SDS, IV. $0,1\times\text{SSC}/1,0\%$ SDS). Der Nachweis der entsprechenden spezifisch radioaktiv markierten RNA-Banden erfolgte mittels der „Storage Phosphor“-Technik auf einem PhosphorImager unter Nutzung einer Entwicklungskassette mit PhosphorImager-Platte. Die Expositionszeit betrug 1,5 bis 2 h. Die Auswertung des erhaltenen PhosphorImager-Bildes erfolgte mit der Software PhosphorImager BAS 2.05 und AIDA 2.11 wie bereits unter 2.3.6 beschrieben.

Vor einer nachfolgenden Hybridisierung mit der ^{32}P -markierten GAPDH-Sonde wurden die Blots gestrippt. Das Strippen der Blots erfolgte in drei Schritten. Zuerst Inkubation bei 100°C in $1\ \text{l}\ 0,1\%$ SDS für 40 min. Anschließend wurde der Blot in einer Schale mit $0,5\ \text{l}\ 2\times\text{SSC}$ zweimal für 10 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert.

Für Arbeiten mit RNA wurde ausschließlich deionisiertes Formamid benutzt. Die Deionisierung erfolgte durch 4-stündiges Rühren von 50 ml Formamid (Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit 5 g Mixed Bed Resin AG® 501-X8 (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) bei RT in einem mit Alufolie abgedunkelten 100 ml Becherglas auf einem Magnetrührer. Das deionisierte Formamid wurde danach dekantiert, in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen portioniert und bis zum Einsatz für Northern- bzw. Dot Blots bei -20°C bis gelagert.

2.4.3. Dot Blot für RNA

Zu 10 μl Gesamt-RNA-Lösung ($1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurden 30 μl denaturierende RNA-Pufferlösung (500 μl deionisiertes Formamid, 162 μl 37% Formaldehyd, 100 μl 5xRNA-Elektrophoresepuffer, bestehend aus 200 mM MOPS, 50 mM NaAcetat 10 mM EDTA, pH 7,0) pipettiert. Das Denaturierungsgemisch wurde bei 65°C für 15 min inkubiert, anschließend schnell auf Eis abgekühlt, mit 10 μl $20\times\text{SSC}$ versetzt und davon 7,5 oder 15 μl in die einzelne Vertiefungen einer vorbereiteten Bio-Dot-Apparatur (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) pipettiert, so dass die pro Vertiefung aufgetragene

RNA Menge 1,5 µg oder 3 µg betrug. Die Dotblot-Apparatur wurde wie folgt vorbereitet: Ein 9 x 12 cm großes Stück einer Nylontransfermembran (HybondTM-N⁺, Fa. Amersham) wurde für 10 min in 10xSSC eingeweicht und danach in die Bio-Dot-Apparatur mit 96 einzelnen Mikrotitervertiefungen fest eingespannt. Die Nylonmembranfläche am Boden jeder Vertiefung betrug einheitlich 7 mm². Die maximale RNA-Bindungskapazität dieser Membran lag bei ca. 2 µg denaturierter RNA pro Dot. Bei angelegtem Vakuum wurde die Membran jeder Mikrotitervertiefung zunächst mit 100 µl 10xSSC gewaschen. Das angelegte Vakuum wurde so eingestellt, dass 100 µl/min vakuumfiltriert wurden. In die leeren Vertiefungen wurden anschließend die denaturierten RNA-Proben pipettiert und langsam vakuumfiltriert. Danach wurde jede Mikrotitervertiefung 3 x mit je 500 µl 10xSSC gewaschen. Die Membran wurde dann aus der Apparatur entnommen, auf Whatman 2 MM-Papier kurz getrocknet und, wie bereits unter 2.4.2 beschrieben, UV-bestrahlt. Die weitere Prozessierung der Membran zum quantitativen Nachweis der membrangebundenen spezifischen mRNAs erfolgte wie unter 2.4.2. für die Northern Blot-Technik beschrieben. Es wurde immer nur eine Dot Blot-Membran mit einer ³²P-markierten spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Beim Einsatz der Dot Blot-Analyse zur mRNA-Quantifizierung von SERCA, PLB, NCX, Calsequestrin, ANF, GAPDH und β-Actin war durch Northern Blot-Vorversuche sichergestellt, dass alle genutzten cDNA-Sonden (**Tab. 2.2**) jeweils nur mit einer RNA-Bande spezifisch reagierten.

2.4.4. Dot Blot für DNA

Die Durchführung des DNA-Dot Blots erfolgte mit Ausnahme der im Folgenden aufgeführten Änderungen in allen Punkten wie beim RNA-Dotblot (s. Methoden 2.4.3) beschrieben. Anstelle der RNA-Lösung wurde jedoch DNA-Lösung (1 µg/µl) verwendet und pro Vertiefung der Bio Dot-Apparatur 0,25, 0,5, 1 und 2 µg DNA aufgetragen. Die Prozessierung der Membran zum quantitativen Nachweis membrangebundener SERCA-DNA erfolgte wie unter 2.4.2. für die Northern Blot-Technik beschrieben. Dabei wurde stets nur eine Dot Blot-Membran mit der ³²P-markierten SERCA-spezifischen cDNA-Sonde (**Tab. 2.2**) hybridisiert.

2.4.5. Isolation von Kardiomyozyten

Enzymatisch isolierte Kardiomyozyten aus SERCA2-transgenen und nicht-transgenen Rattenherzen wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. H. Scholz aus dem Institut für Vegetative Physiologie, Charité - Universitätsmedizin, Campus Mitte im Rahmen einer Kooperation isoliert und zur Verfügung gestellt. Als proteolytisches Enzym wurde Kollagenase (Typ II, Worthington) genutzt. Bei der Isolierung wurde wie folgt vorgegangen: Nach Injektion von 5000 I.E./kg Heparin i.p. und Tötung der Tiere durch Dekapitation wurde das Herz nach Thorakotomie entnommen und in eis-

kalte Krebs-Henseleit-Lösung mit 120 mM NaCl; 25 mM NaHCO₃; 0,5 mM MgSO₄; 1,2 mM KH₂PO₄; 4,72 mM KCl; 11 mM Glukose, 1 mM Ca²⁺; pH 7,4 überführt. Nach Kanülierung der Aorta wurde das Herz bei konstantem Fluß von 10 ml/min in Krebs-Henseleit-Lösung mit 1 mM CaCl₂ für 5 min perfundiert. Anschließend erfolgte eine dreiminütige Perfusion mit calciumfreier Lösung bestehend aus 118 mM NaCl, 4 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 1,6 mM NAHPO₄, 24 mM NaHCO₃, 5 mM Pyruvat, 20 mM Taurin und 10 mM Glukose, pH 7,4. Es folgte eine rezirkulierende Perfusion in der gleichen Lösung, die mit 20 µM CaCl₂, 1 mg ml⁻¹ Rinderserumalbumin und Kollagenase (Typ II, Worthington, 225 units mg⁻¹) versetzt wurde. Zum Auswaschen des proteolytischen Enzyms wurde danach mit 50 mM L-Glutaminsäure, 30 mM KCl, 3 mM MgSO₄, 0,1 mM EGTA, 30 mM KH₂PO₄, 10 mM HEPES, 20 mM Taurin und 10 mM Glucose, pH 7,3 („Kraftbrühe“) für 5 min perfundiert. In „Kraftbrühe“ wurden der verdaute linke Ventrikel in einer Petrischale mit zwei Pinzetten vorsichtig in kleine Stücke zerteilt. Der Inhalt wurde durch mehrere Lagen Mull filtriert und Teile des Kardiomyozytenfiltrats in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen portioniert. Nach Sedimentation der Myozyten wurden die Röhrchen in flüssigem N₂ eingefroren und bis zur Analyse der kardialen SERCA2a Proteinspiegel mittels Western Blot-Technik bei -80°C gelagert. Alle benutzten Glasgefäße waren silikonisiert. Die Perfusionslösungen wurden auf 37°C thermostatisiert und mit 95% O₂/5% CO₂ begast.

2.4.6. Herzhomogenate

Herzhomogenate wurden aus 20-30 mg in flüssigem N₂ schockgefrorenen, bei -80°C gelagerten linksventrikulären Myokard hergestellt. Die Homogenisation erfolgte in einem Falcon-Polypropylenröhrchen (12 x 75 mm) mit 30-fachen Volumen eiskaltem Homogenisationsmedium (0,25 M Saccharose, 10 mM Histidin, 50 mM NaH₂PO₄, 10 mM NaF, 1mM EDTA, 0,3 mM PMSF, 0,5 mM DTT, pH 7,4). Homogenisiert wurde im Eisbad 6 x 10 s mit einem Polytron-Homogenisator (Schaft PTA 10 S) bei ca. 21000 U/min mit zwischenzeitlichen Pausen von je 15 s. Das Homogenat wurde durch Polyamidgaze (Porenweite 140 µm, Fa. Neolab; Heidelberg, Deutschland) filtriert, um nicht genügend zerkleinerte Bindegewebsanteile zu entfernen. Der Proteinverlust durch die Filtration lag bei 5 %. Das filtrierte Homogenat wurde in 1,5 ml Eppendorf-Röhrchen zu 50 bzw. 100 µl filtriert und in flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Für Messungen des Oxalat-stimulierten Ca²⁺-Transportes bei Phosphorylierungsexperimenten wurden 100 µl Homogenat vor N₂-Schockgefrierung mit 50 µl Phosphoproteinschutzpuffer versetzt, der 250 mM Saccharose, 10 mM Histidin, 150 mM KH₂PO₄, 50 mM NaF und 30 mM EDTA enthielt.

2.4.7. Myofibrillen-freie Membranpräparate

Für die Bestimmung der sarkolemmalen Na-Ca-Austausch(NCX)-Aktivität *in vitro* war die Präparation von Membranpräparaten erforderlich, da die NCX-Aktivität in Rattenherzhomogenaten unterhalb der Nachweisgrenze der unter 2.4.6.2 beschriebenen Na-abhängigen Ca-Transportmethode lag. Bei der gewählten Membranpräparationsmethode wurden alle Zentrifugationen ausschließlich bei über 100.000 g gemacht. Dadurch war gewährleistet, dass das gesamte in Homogenaten befindliche partikuläre Membranmaterial inklusive sarkolemmaler Membranvesikel ohne Verlust isoliert werden konnte. Zytoplasmatische Proteine und bei hoher Ionenstärke gelöste kontraktile Proteine wurden komplett, mitochondriale Proteine teilweise entfernt. Mit der Methode wurde eine 3-5-fache Anreicherung sarkolemmaler Membranfragmente erreicht, was eine verlässliche Messung der sarkolemmalen NCX-Aktivität ermöglichte. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen.

Schockgefrorenes bei -80°C gelagertes, pulverisiertes linksventrikuläres Gewebe (0,2 g) wurde in ein Polypropylenreagenzglas (12 x 75 mm) gegeben und dazu 1 ml eiskalter hypertoner Homogenisationspuffer gegeben, der 0,75 mM KCl, 1mM EDTA, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF), 5 mM Histidin-HCl, pH 7,4 enthielt. Der eisgekühlte Inhalt wurde 3 x 15 sec mit einem Polytron-Homogenisator PT 10/35 mit zugehörigem Schaft PTA 10 S (Fa. Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz) bei 21.000 U/min homogenisiert. Das Homogenat wurde in 13 x 56 mm Polykarbonat-Ultrazentrifugationsröhrchen (Fa. Beckmann, München, Deutschland) überführt, das Homogenisationsröhrchen zusammen mit dem Polytronschaft mit 1,5 ml eiskaltem Homogenisationspuffer gespült und der Inhalt zu dem 1 ml Homogenat im Ultrazentrifugationsröhrchen pipettiert. Es wurde anschließend in einer TL100 Ultrazentrifuge (Fa. Beckmann Instruments, München, Deutschland) mit einem Rotor TI 100.3 bei 148.000 g für 20 min bei 2°C zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde verworfen, das Pellet im Ultrazentrifugationsröhrchen wie vorher homogenisiert und zentrifugiert. Nach Verwerfung des erhaltenen zweiten Überstands wurde das Pellet in einen Glas-Teflon-Potter-Homogenisator mit 2 ml Fassungsvermögen überführt und nach Zugabe von 1,5 ml hypotonem Puffer mit 0,1 mM PMSF 10 mM Histidin-HCl, pH 7,4 durch 2x 10-faches Auf- und Abbewegen des Pistills im Eisbad resuspendiert. Diese Suspension wurde erneut in einem 13 x 56 mm Polykarbonat-Ultrazentrifugationsröhrchen überführt. Nach Spülen des Potter-Homogenisators mit 2 x 0,5 ml hypotonem Puffer und Überführung der Inhalte in das Zentrifugenröhrchen wurde erneut wie zuvor zentrifugiert. Das resultierende myofibrillenfreie Pellet wurde in 1 ml 0,25 M Saccharose, 10 mM Histidin-HCl pH 7,4 im Glas-Teflon-Potter-Homogenisator zu je 100 μl bis zur Homogenität resuspendiert. Die Membransuspension wurde portioniert, in flüssigem N_2 schockge-

froren und bis zur Messung des Na-Gradient-getriebenen $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transports oder immunchemischen Quantifizierung durch ELISA bei -80°C gelagert. Je $3 \times 10 \mu\text{l}$ wurden zusätzlich für die Proteinbestimmung portioniert.

2.4.8. Messung membranärer Ca^{2+} -Transportaktivitäten

2.4.8.1. Oxalat-stimulierter Ca^{2+} -Transport

Die Messung der Aktivität des SERCA-katalysierten Ca^{2+} -Transportes des SR erfolgte als Oxalat-stimulierte Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in Membranvesikel des SR, die in linksventrikulären Homogenaten enthalten sind. In Homogenaten weisen die Membranvesikel des SR zu 90% eine „Right-Side-Out“-Orientierung auf. Die Ca^{2+} -Transport-ATPase dieser Vesikel kann deshalb unter *in vitro* Bedingungen ATP-getrieben $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aus dem Ansatzmedium in das Lumen des SR-Vesikels transportieren. Zusätzliche in den Herzhomogenaten enthaltene Ca^{2+} -ATPase-Aktivitäten anderen subzellulären Ursprungs wurden durch die gewählten Reaktionsbedingungen (124;137) ausgeschaltet, so dass bei den Messungen nur der retikuläre SERCA2-katalysierte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transport erfasst wurde.

Für die Messung des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transportes wurde die sog. Millipore-Vakuum-Filtrationsmethode unter Einsatz von $^{45}\text{CaCl}_2$ genutzt (124;137). Hierbei wurde Homogenat mit einem $200 \mu\text{l}$ Reaktionsansatz inkubiert, der neben 10 mM KCl , 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaN_3 , $0,2 \text{ mM EGTA}$, 5 mM Tris ATP , 6 mM CrP , 10 mM K-Oxalat und 40 mM Imidazol variable Konzentrationen von radioaktiv markiertem $^{45}\text{CaCl}_2$ enthielt. Die freie $[\text{Ca}^{2+}]$ wird mit Hilfe eines $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ -Puffersystems eingestellt. Durch die SR Ca^{2+} -ATPase werden unter ATP Verbrauch $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aus dem extravesikulären Raum in das Vesikellumen transportiert. Intravesikuläre Ca^{2+} bilden mit Oxalatanionen schwer lösliches $^{45}\text{Ca-Oxalat}$, das bei Überschreiten des Löslichkeitsproduktes innerhalb der Vesikel präzipitiert. Dadurch wird die freie, intravesikuläre Ca^{2+} -Konzentration niedrig gehalten. Das vermindert den transmembranären Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten, gegen den die Ca^{2+} -Pumpe Ca^{2+} in den SR-Vesikel transportiert und vermindert den passiven Efflux aus den SR-Vesikeln.

Durch diesen Oxalateffekt wird die in SR-Vesikel transportierte Ca^{2+} -Menge im Vergleich zur transportierten Ca^{2+} -Menge ohne Oxalatzusatz ca. 100-fach gesteigert. Dadurch ist eine verlässliche Bestimmung des SR Ca^{2+} -Transports in Herzhomogenaten ohne aufwendige Präparation von SR-Membranfragmenten möglich. **Abb. 2.2** zeigt die prinzipiellen Ca^{2+} -Bewegungen, die sich zwischen Reaktionsmedium und dem von SR-Vesikeln ergeben.

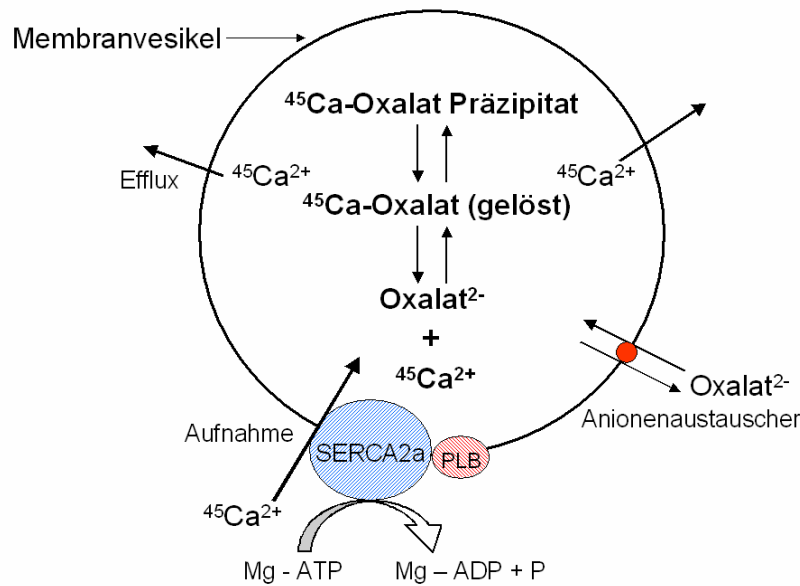


Abbildung 2.2 Prinzip der Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme. Senkung der intravesikulären freien $[\text{Ca}^{2+}]$ durch Komplexierung und Ca-Oxalatpräzipitation. Oxalat gelangt über einen Anionenaustauscherprozess in das Vesikellumen und ist für die Ca^{2+} -Aufnahme nicht geschwindigkeitslimitierend. SERCA2a - Isoform 2a der Ca-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, PLB - Phospholamban

Da in Herzhomogenaten neben Vesikeln des SR auch Membranfragmente des Sarkolemm und der Mitochondrien mit anderen Ca^{2+} -Transportsystemen enthalten sind, wurden die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass nur die SR Ca^{2+} -ATPase das Ca^{2+} in die Membranvesikel des SR transportiert. Durch den Zusatz von 10 mM NaN wird die mitochondriale Ca^{2+} -ATPase gehemmt. Die Ausschaltung möglicher Aktivität des durch 2 μM Orthovanadat hemmbaren Na/ Ca^{2+} -Austauschers erfolgte durch Arbeiten im komplett Na^+ -freien Medium. Der Anteil der ATP-abhängigen Ca^{2+} -Aufnahme in sarkolemmale Vesikel, der durch die ATPase der Plasmamembran katalysiert wird, ist unter den gewählten Reaktionsbedingungen $< 5\%$ (137). Für die Einstellung der gewünschten freien $[\text{Ca}^{2+}]$ mit einem Ca^{2+} /EGTA-Puffer wurde die Zugabe von 5 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ -Stammlösung variiert. Die EGTA-Konzentration betrug immer 200 μM .

Der ATP-abhängige Ca^{2+} -Transport wurde durch Zugabe von Homogenat gestartet. Der Oxalat-stimulierte Ca^{2+} -Aufnahmeprozess wurde in der Regel nach 2 min durch schnelle Filtration von 150 μl Reaktionsmedium durch 0,45 μm Membranfilter (Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland) in eine Vakuumfiltrationsapparatur beendet. Dadurch wurden die Membranvesikel vom Reaktionsmedium mit darin befindlichen Ca^{2+} , ATP und anderen Bestandteilen innerhalb von 2-3 s getrennt. Durch sofortiges Spülen mit 2 x 3 ml eiskalter Waschlösung (2 mM EGTA, 100 mM KCl, 40 mM Imidazol, pH 7,0) wurden evtl. noch laufende Ca^{2+} -Transportvorgänge komplett gestoppt sowie extravasikuläres Ca^{2+} mit EGTA komplexiert und als Filtrat entfernt.

Die verbleibende filterassoziierte Ca^{2+} -Menge entspricht der in die SR-Vesikel durch die SR Ca^{2+} -ATPase transportierten Ca^{2+} -Menge. Die gewaschenen Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt und bei 60°C für 30 min im Trockenschrank getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Irgasafe Plus, Fa. Zinsser Analytic) wurde die β -Strahlung als Maß für die filterassoziierte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Menge im Flüssigkeits-Szintillationszähler (Liquid Szintillation Analyzer TRI-CARB 2200CA, Fa. Packard BioScience GmbH, Dreieich) gegen ^{45}Ca -Standard gemessen. Der Variationskoeffizient der Methode liegt bei $< 5\%$. Routinemäßig wurden Doppelbestimmungen bei einer oder verschiedenen freien $[\text{Ca}^{2+}]$ durchgeführt. Wahlweise enthielt der Reaktionsansatz zusätzlich entweder $2\ \mu\text{M}$ katalytische (C) Untereinheit der cAMP abhängigen Protein Kinase A, $20\ \mu\text{M}$ Ruthenium-Rot, $10\ \mu\text{M}$ synthetisches Protein Kinase A Inhibitor Protein [PKI(6-22)Amid] oder $10\ \mu\text{M}$ Ionophor A 23187 (Gibco Brl, Life Technologies GmbH Eggenstein, Deutschland). Bei allen untersuchten Ca^{2+} -Konzentrationen ließ sich die Oxalat-stimulierte Ca^{2+} -Aufnahme durch Zugabe von $10\ \mu\text{M}$ Ionophor A 23187 und $10\ \mu\text{M}$ Protein Kinase A Inhibitor vollständig hemmen. Die freien Calciumkonzentrationen wurden mit Hilfe eines Computerprogramms von Fabiato (33) berechnet.

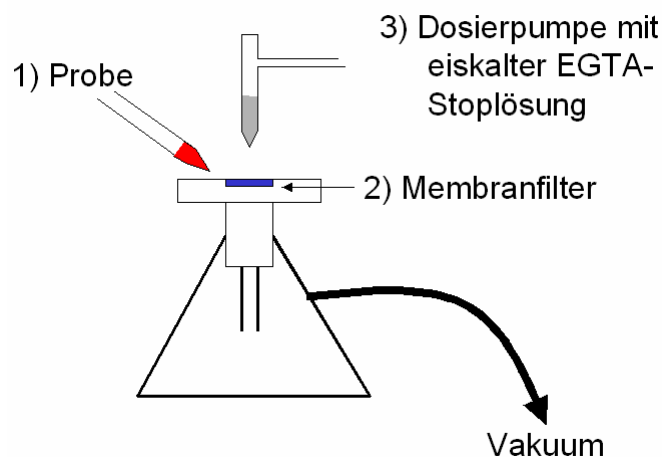


Abbildung 2.3 Prinzip der Millipore-Filtrationstechnik. Das Reaktionsmedium (1) wurde auf den Membranfilter überführt und vakuumfiltriert (2). Danach wird eine Stopplösung hinzugegeben (3) und schnell vakuumfiltriert. Genaue Beschreibung siehe Text.

2.4.8.2. Na^+ -Gradient getriebener $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transport

Die bei -80°C gelagerten Herzmembranpräparate wurden auf Eis aufgetaut und in einem $45\ \mu\text{l}$ Beladungsansatz jeweils mit $2,5\ \text{M}$ NaCl oder $2,5\ \text{M}$ KCl beladen. Die Proteinkonzentration im Beladungsansatz lag bei $5\ \text{mg/ml}$. Für die Versuche wurden 6-fach-Bestimmungen durchgeführt. Jeder Beladungsansatz wurde für 60 min bei 30°C in einem Thermomixer (Thermomixer 5436; Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) unter Schütteln inkubiert. Sofort im Anschluss erfolgte die Messung des Ca^{2+} -Transport wie folgt. Vorinkubation von $200\ \mu\text{l}$ ^{45}Ca -Transportmedium ($50\ \mu\text{M}$ $^{45}\text{CaCl}_2$, $250\ \text{mM}$ Saccharose, $160\ \text{mM}$ KCl, $2\ \mu\text{M}$ Valinomycin, $20\ \text{mM}$ HEPES/Tris, pH 7,4) in

einem Plastikröhrchen (Falcon 2052, 12 x 75 mm; Becton Dickinson Labware, New Jersey) für 2 min bei 37°C im Schüttelwasserbad (Wasserbad SW mit Thermostataufsatz U3; Julabo Labor-technik, Seelbach, Deutschland). Mit einer abgeschnittenen Gel-Loaderpipettenspitze (20 µl epT.I.P.S.; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) wurden 5 µl der mit Na⁺- oder K⁺-beladenen Membranen an die Plastikröhrcheninnenseite knapp über das Ca²⁺-Aufnahmemedium pipettiert und sofort gemixt (Vibrafix VF1; Janke & Kunkel, IKA Labortechnik). Nach 2 sec Vortexen mit einer zeitgesteuerten Start-Stopp-Apparatur: mit Eppendorf Multipette inklusive aufgesetztem 1,25 ml Dispenser, wurden 25 µl 20 mM LaCl₃ Stopplösung in den Reaktionsansatz schlagartig injiziert. LaCl₃ verdrängt sofort das gesamte extravasikulär gebundene Ca²⁺, so dass der NCX-vermittelte Ca²⁺-Transport sofort unterbunden wird. Sofort danach wurden 3 ml eiskalte Waschlösung (2 mM LaCl₃, 250 mM Saccharose, 160 mM KCl 20 mM HEPES/Tris, pH 7,4) mit einem Dispenser (Varispenser[®] Plus 4961 2-10 ml; Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zum Röhrcheninhalt gegeben und sofort durch 0,45 µM Nitrocellulose-Membranfilter (ME 25, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) vakuumfiltriert. Die Filter wurden nochmals mit 3 ml eiskalter Waschlösung gewaschen. Das Filter wurde im Anschluss mit einer flachen Pinzette in eine Szintillationsküvette (Super Polyethylene Vial; Packard Instrument Company) überführt und bei 60°C für 30 min im Wärmeschrank (OV3, Biometra, Göttingen, Deutschland) getrocknet. Die verbleibende filterassoziierte Ca²⁺-Menge entspricht derjenigen Ca²⁺-Menge, die durch den Na⁺-Gradient getriebenen Na⁺/Ca²⁺-Austauscher in die Membranvesikel transportiert wurde. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Liquid Scintillator Irgasafe Plus; Zinsser Analytic, Frankfurt, Germany) wurde die β-Strahlung als Maß für die filterassoziierte ⁴⁵Ca²⁺-Menge im Flüssigkeits-Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer TRI-CARB 2200CA, Fa. Packard BioScience GmbH, Dreieich) nach 8-12 Stunden gegen ⁴⁵Ca-Standard gemessen. Von den gemessenen Werten wurde die unspezifisch an Membranvesikel gebunden Calciummenge subtrahiert, die nach Verdünnung von K⁺-beladenen Vesikeln in das oben beschriebene Reaktionsmedium detektiert wurde.

2.4.9. Proteinbestimmung

Der qualitative Nachweis von Protein in Herzhomogenaten und isolierten Membranpräparaten erfolgte nach der Methode von Lowry. Für die Proteinbestimmung wurden folgende Lösungen benötigt.

Lösung A	Lösung B	Lösung C
2% Na ₂ CO ₃ in 0,1 N NaOH	0,5% CuSO ₄ * 5H ₂ O in 1% K-Na-Tartrat	50 ml Lösung A + 1 ml Lösung B

Zur Erstellung einer Eichkurve wurde von einer Proteinstammlösung (Bio-Rad; Protein Standard Assay) mit der Konzentration 1,37 mg/ml folgende Verdünnungsreihe hergestellt: 13,7 µg, 27,4 µg, 41,1 µg, 54,8 µg, 68,5 µg. Dazu wurden je 10, 20, 30, 40, 50 µl Bio-Rad Standardprotein in einem Reagenzglas vorgelegt und auf 500 µl H₂O aufgefüllt. Für den Leerwert wurden 500 µl H₂O vorgelegt. Zu bestimmende Proteinproben wurden dann im Verhältnis 1:2 mit NaOH verdünnt (50 µl Proteinprobe + 50 µl NaOH). Im Anschluss wurde zu allen Proben 2,5 ml Lösung C pipettiert und durchmischt. Im alkalischen Milieu kommt es dabei durch Wechselwirkungen der Kupfer(II)-Ionen mit den Stickstoffatomen der Peptidbindungen zur Bildung eines farbigen (blau-violetten) Komplexes. Nach 10-minütigem Stehen bei RT wurde zu allen Proben 0,25 ml Folin-Reagenz (Folin-Ciocalteu's-Phenol) hinzugefügt und gemischt.

Nach Zugabe des Folin-Reagenz wurde dieses durch die mit dem Cu²⁺ komplexierten Proteine reduziert. Der Kupfer-Protein Komplex bewirkt dabei die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form von Heteropolyphosphorsäuren im Folin-Reagenz vorliegen. Hierbei entstehen Mischoxide zwischen jeweils VI- und IV-wertigem Molybdän (Molybdänblaureaktion) bzw. Wolfram. Die Reduktion des Reagenz erfolgte, nachdem Cu²⁺ im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu⁺ reduziert wurde. Bei der Reduktion erfuhr das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau, der zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt wurde. Nach 40 min bei RT wurde die Extinktion des gebildeten Farbstoffs bei 585 nm mit einem Absorptionsspektralphotometer UV-VIS 1202 (Fa. Shimadzu, Duisburg, Deutschland) gemessen. Es erfolgten grundsätzlich Doppelbestimmungen. Die Proteinkonzentrationen wurden durch Auswertung der gemessenen Extinktion für Proben und Eichwerte mit der Software Radlig 3.0 (Fa. Kodak, Stuttgart, Deutschland) bestimmt.

2.4.10. Western Blot

Um die kardialen Proteinspiegel von SERCA2a zu quantifizieren, wurden Western Blot-Analysen durchgeführt (132). Bei -80°C gelagerte linksventrikuläre Homogenate wurden aufgetaut und mit Proteinsolubilisierungslösung versetzt. Zur Solubilisierung wurden 75 µl Homogenat mit 25 µl 4-fach konzentrierten Probenpuffer (200 mM H₃PO₄; 20 mM EDTA; 8% w/v SDS; 40% v/v Glycerin; 0,01% v/v Bromphenolblau; 0,001% v/v Pyronin; 4% 2-Mercaptoethanol; pH 6,8) gemischt und für 5 min bei 95° C inkubiert. Die Proteine wurden nach der Methode von Swank & Munkres (133) in einem 1,5 mm dicken Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgel (T= 13,8%; C=3,2%) in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur (MiniProtean II bzw. Protean II Maxi; Fa. Bio-Rad, München) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Trenngel enthielt außerdem 0,1% SDS, 6 M Harnstoff, 0,1 M H₃PO₄/Tris, pH 6,8. Das Sammelgel (T= 5,2%, C= 0,7%) enthielt 0,1% SDS und 123 mM Tris, pH

6,8. Die Acrylamidpolymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat initiiert. Der Elektrophoresepuffer enthielt 0,1% SDS und 0,1 M H_3PO_4 /Tris, pH 6,8. Während der Elektrophorese (120 V; 2 –3 h) wurde die Elektrophoresekammer gekühlt (4°C). Pro Bahn wurden 10 µg Herzprotein aufgetragen. Auf jeweils einer Gelbahn wurden solubilisierte Markerproteine mit Molekulargewichten zwischen 6,5 und 200 kDa getrennt.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Verlauf von 90 min bei 100 V vom Trenngel auf hydrophobe PVDF-Membran (Fa. Boehringer, Ingelheim) im Nassblotverfahren transferiert (Maxi TransBlot-Cell; Fa. Bio-Rad, München, Deutschland). Es wurde ein Standardtransferpuffer benutzt (25 mM Tris; 192 mM Glycin; 20% v/v Methanol; 0,01% w/v SDS). Das Transfersandwich war wie folgt zusammengesetzt: Gitter (+), Schwamm, Blotting-Papier (Fa. Bio-Rad), PVDF-Membran, Trenngel, Blotting-Papier, Schwamm, Gitter (-). Nach dem Elektrotransfer wurde die Membran mit H_2O gespült, in Saran-Folie eingeschlagen und bei 4 °C gelagert. Zur Überprüfung des Blotvorgangs wurde das Gel mit GelCode BlueStain (Fa. Pierce, Bonn, Deutschland) gefärbt. In der Regel ließen sich unterhalb der β -Galactosidase-Bande (122 kDa) keine angefärbten Banden finden.

Zum immunchemischen Nachweis von SERCA2a wurde die PVDF-Membran zuerst für 5 min in TBS-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 8,0) äquilibriert und anschließend in einem Hybridisierungsrohr in TBS-T-Blockierlösung (150 mM NaCl; 10 mM Tris; 5% w/v Magermilch; 0,1% v/v Tween-20; pH 8,0) für 60 min bei RT auf einem Roller (RM 5; Fa. Karl Hecht, Sondheim, Deutschland) inkubiert. Nach 3 x 10 min Waschen in TBS mit Tween 20 (150 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 8,0, 0,05% Tween 20) wurde mit SERCA2a-Kaninchenantiserum (1 : 5000 in TBS mit 1% Rinderserumalbumin) für 90 min bei RT oder für 12 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran bei RT 2 x für 10 min in TBS-T-Blockierlösung und 2x 5 min in TBS gewaschen. Die Membran wurde dann bei RT für 1 h mit Anti-Kaninchen-IgG-Peroxydase-Konjugat (SERCA2) inkubiert. Die Konjugate wurden 1:5000 in TBS mit 1% Blockmilch verdünnt. Danach wurde je einmal für 10 min mit TBS-T bzw. TBS gewaschen. Im Anschluss wurde die Membran für 10 min in 3 ml Chemilumineszenz-Reaktionslösung (SuperSignal West Pico Substrate, Fa. Pierce, Bonn, Deutschland) inkubiert und in eine Fotokassette mit Röntgenfilm (CRT 7; Fa. Kodak) transferiert. Die Filme wurden für 1-5 min belichtet. Die entwickelten Filme wurden mit einem Durchlichtscanner (Fa. Epson, Meerbusch) gescannt und die entsprechenden Banden mit Hilfe der Image-Software DIANA II (Version 1.6; Fa. Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt) ausgewertet.

2.4.11. Phospholamban-ELISA

Für diese Untersuchungen wurden zuerst 10 µl aufgetaute Herzmembransuspension (3-4 mg Protein/ml) in einem entsprechenden Volumen von 0,25 M Saccharose, 10 mM Histidin, pH 7,4 auf 50 µg/ml verdünnt. Davon wurden wiederum 100 µl 1:2 in 50 mM Bikarbonatpuffer (16 ml 0,2 M Na₂CO₃ + 34 ml 0,2 M NaHCO₃, pH 9,6) verdünnt. Die immunhistochemische Bestimmung wurde mit Hilfe des indirekten Enzyme-Linked Immunsorbent Assays (ELISA) nach Holtzhauer (53) durchgeführt. Mit dieser Methode kann Phospholamban (PLB) in Herzhomogenaten und Membranpräparaten unter Nutzung eines monoklonalen Antikörpers gegen PLB, der natives PLB erkennt, quantitativ nachgewiesen werden. Für den ELISA wurde ein 1:5000 verdünnter monoklonaler Anti-Phospholamban-Maus-Antikörper (Fa. Biomol, Hamburg, Deutschland) verwendet, der sowohl phosphoryliertes als auch nicht phosphoryliertes Phospholamban erkennt. Als zweiter Antikörper wurde ein 1:5000 verdünntes Anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Fa. Sigma, München, Deutschland) eingesetzt.

Da keine PLB-Standardlösung vorlag und nur anhand einer Positivkontrolle kalibriert wurde, konnte der PLB-Gehalt in Membranpräparaten nur semiquantitativ bestimmt werden. Für den Assay wurden je 200 µl der in Bikarbonat-Puffer verdünnten Probe (25 µg Protein/ml) in die Wells der ersten Reihe einer 96-Loch-Mikrotiterplatte (Maxisorp; Fa. Nunc, Wiesbaden, Deutschland) pipettiert und daraus insgesamt 7x seriell 1:2 in die darunter liegenden 7 Wellreihen mit Bikarbonatpuffer verdünnt. Die pro Well applizierte Membranproteinmenge lag somit zwischen 0,02 und 2,5 µg. Anschließend wurde die Mikrotiterplatte für 12 h über Nacht bei 4°C auf einem Mikroschaker (Fa. Dynatech, Chantilly, VA, USA) inkubiert, damit die Membranproteine an die feste Phase binden. Am nächsten Morgen wurde die Wells entleert und mit 250 µl 0,02 M phosphatgepufferter physiologischer Kochsalzlösung (9,55 g/l-Trockensubstanz; Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland) mit 0,1% Tween 20 (pH 7,4) für 1 h inkubiert. Anschließend wurde 4x mit je 250 µl PBS-Tween gewaschen und alle Flüssigkeitsreste in den Wells komplett entfernt. Danach wurden 100 µl in PBS-Tween mit 1% w/v IgG-freiem Rinderserumalbumin (Kat-Nr. 11930; Fa. SERVA, Heidelberg, Deutschland) 1:5000 verdünnter monoklonaler Anti-PLB-Antikörper (Fa. Sigma, München, Deutschland) in die einzelnen Wells pipettiert. Es wurde für 2 h bei RT inkubiert. Während der Inkubation erfolgte die spezifische Bindung des monoklonalen Anti-Phospholamban-Antikörpers mit dem Antigen auf der Festphase. Alle Wells wurden dann entleert und 3x mit je 250 µl PBS-Tween gewaschen. In die komplett entleerten Wells wurden dann 100 µl in PBS-Tween-1% w/v BSA 1:5000 verdünntes Anti-Maus-IgG-Peroxidas-Konjugat pipettiert und für 1 h bei RT inkubiert. Dabei bindet der enzymgekoppelte Sekundäantikörper an den primären PLB-Antikörper. Nach Entleerung der Wells wurde erneut 3x mit 250 µl PBS-Tween gewaschen. In die leeren Wells wurden danach 100 µl POD-

Substratlösung (15 mg o-Phenyldiamin, 0,3 ml 1 M Zitronensäure, 15 µl 30% H₂O₂, 14,7 ml H₂O) zugegeben und für 20 min bei RT inkubiert. In der nun ablaufenden Peroxidase-reaktion kommt es durch Oxidation von Ortho-Phenyldiamin durch den Wasserstoffdonator H₂O₂ zu einem gelblich/bräunlichen Farbumschlag. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl 10% H₂SO₄ gestoppt und die Extinktion des Reaktionsgemisches bei 492 nm mit einem Microplate Reader 3550 (Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) gemessen.

2.5. *In vivo* Methoden zur kardialen Phänotypcharakterisierung

2.5.1. Isoliertes, retrograd perfundiertes Herz

2.5.1.2. Perfusionsanlage

Die Untersuchungen der kontraktiven Funktion isolierter, retrograd nach Langendorff perfundierter Herzen vor und nach β-adrenerger Stimulation wurden an einer Perfusionsapparatur (Eigenbau) vorgenommen. **Abb. 2.4** zeigt ein Blockschema dieser Apparatur mit den verschiedenen Komponenten. Die Perfusionslösung (s. 2.5.1.4) wurde im Vorratsgefäß begast und erwärmt. Von einer Schlauchpumpe (Perimax 12, Förderbereich bis 25 ml/min; Fa. Spetec, Erding, Deutschland) gelangte das Perfusat flusskonstant (10 ml/min) über ein 0,45 µm Filter (Einmalfilterhalter FP 030, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) und eine Blasenfalle durch einen Wärmetauscher retrograd über eine Edelstahlkanüle in die Aorta ascendens des isolierten Rattenherzens. Infolge des retrograd gerichteten Perfusionsflusses – so wie beim Herzen *in situ* während der Diastole – schließen sich die Aortenklappen und das Perfusionsmedium gelangt über die Koronarostia zur Perfusion in die rechte und linke Koronararterie und entweicht anschließend wieder über den Sinus coronarius. Zur Koronarflussmessung (s. 2.5.1.6) wurde das aus dem Herz tropfenweise fließende Perfusat unterhalb der Wärmekammer auf eine mit einem Kraftaufnehmer verbundene Angelsehne geleitet, um die Tropfenzahl zu registrieren. Über ein Schlauchsystem wurde die Perfusionslösung in einen Abfallbehälter abgeleitet. Um Blutersatzlösung und Herz bei 37°C zu halten, wurden die doppelwandigen Vorratsgefäße, Blasenfalle, der Wärmetauscher und die Wärmekammer permanent mit 37°C warmem Wasser thermostatiert.

2.5.1.3. Perfusionslösung

Als Perfusionslösung wurde eine modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung mit 11,1 mM D-(+)-Glucose als Energie lieferndes Substrat verwendet (66). Diese Lösung enthielt 118 mM NaCl, 4,7 mM KCl,

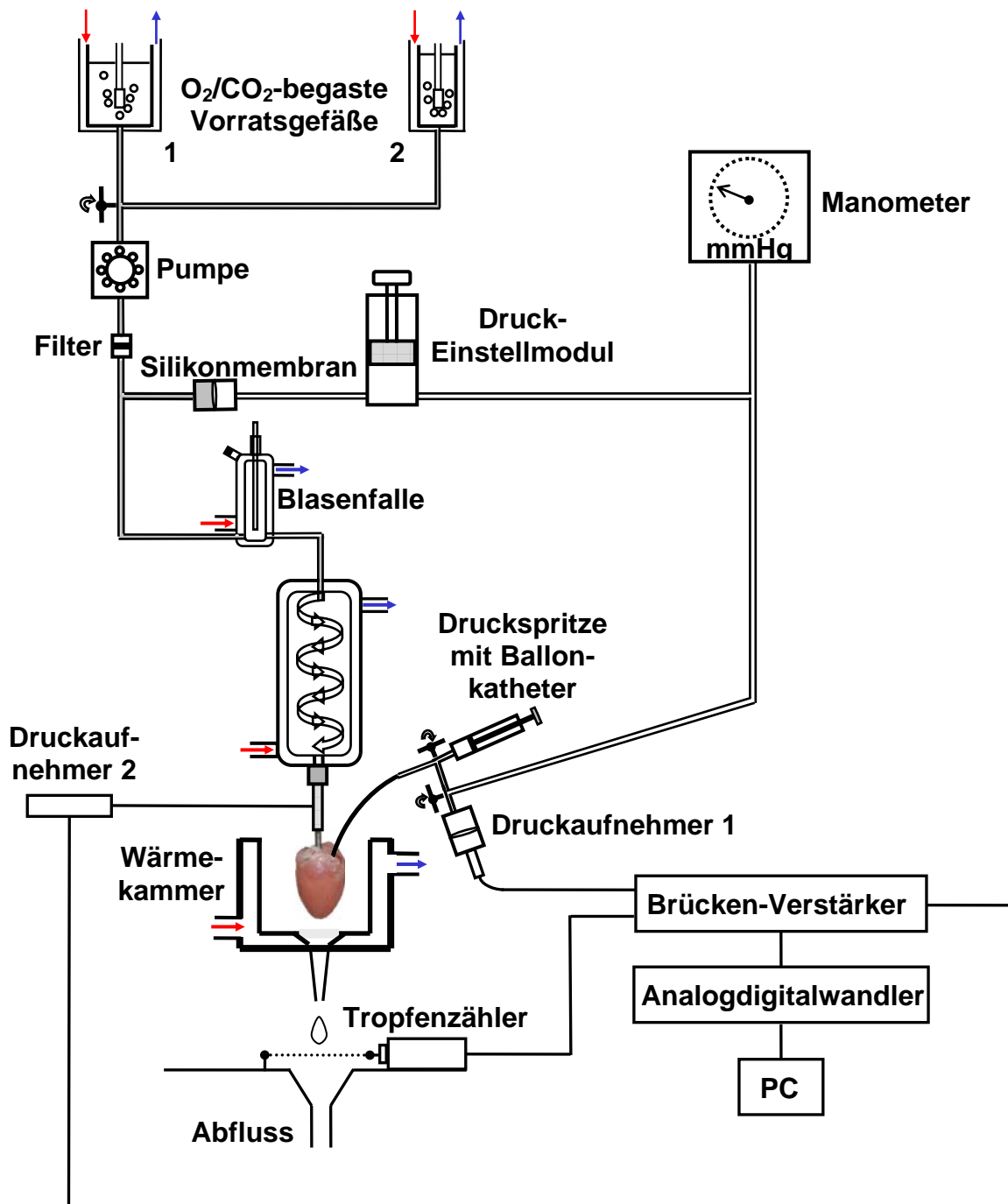


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der Versuchsanlage für die Untersuchung der linksventrikulären Funktion isolierter, retrograd perfundierter Rattenherzen mittels Ballonkatheter. Der Perfusionsdruck kann über das Druckeinstellmodul eingestellt und am Manometer abgelesen werden. Letztere können zusätzlich zur Eichung der angeschlossenen Druckaufnehmer genutzt werden. Druckaufnehmer 2 misst den aktuellen Perfusionsdruck unmittelbar vor dem Herzen. Die Pfeile zeigen die Thermostatierung der entsprechenden Gefäße bzw. Komponenten an.

2,1 mM MgSO₄·7H₂O, 0,06 mM EDTA, 24,7 mM NaHCO₃, 1,2 mM KH₂PO₄, 1,5 mM CaCl₂, 10 mM HEPES. Sie wurde am Versuchstag frisch aus den Stammlösungen 1-5 angesetzt (Tab. 2.3). Die Mischung erfolgte dabei wie folgt.

Tabelle 2.3: Zusammensetzung glucosefreier Krebs-Henseleit-Perfusionslösung. Als Lösungsmedium wurde deionisiertes Wasser (Reinstwasseranlage; Fa. Membrapure GmbH, Bodenheim, Deutschland) verwendet.

Stammlösung	1				2	3	4	5
Volumenanteil	100				50	7,8	25	100
Substanz	MgSO ₄ ·7H ₂ O	NaCl	KCl	0,5 M EDTA	NaHCO ₃	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	HEPES
g/l	5,18	68,9	3,51	1,2ml	41,5	20,9	6,66	23,8
mmol/l	21,0	1180	47	0,6	494	154	60	100

Pro Liter Perfusionslösung wurden unmittelbar vor dem Versuch 2 g D-(+)-Glucose zugesetzt. Die Perfusionslösung wurde im Vorratsbehälter 1 auf 37,0°C erwärmt und vor Beginn des Versuchs bis zur Einstellung eines physiologischen pH-Wertes von 7,4 über eine Glasfritte mit Carbogas (95% O₂, 5% CO₂) begast. Um Salzkristalle, Verunreinigungen und agglutinierte Bakterien, die als Koronargefäßemboli Myokardischämien auslösen können, aus der Perfusionslösung fern zu halten, ist dem System eine Einmalfilter-Einheit (FP 030, 0,45 µm; Schleicher & Schuell) vorgeschaltet.

2.5.1.4. Herzsolierung und Präparation

Zur Durchführung der retrograden Herzperfusion nach Langendorff wurden je 6 männliche heterozygote, 12-14 Wochen alte SERCA2-transgene und nicht-transgene Ratten der Linie 1167 mit einem Körpergewicht von 350-450 g verwendet. Die Herzentnahme der Tiere erfolgte in der Regel am Vormittag oder Nachmittag (Ruhephase des künstlichen Tagesrhythmus). Die Tiere wurden in einer Narkosebox für drei Minuten in 5 Vol. % Isofluran/95 Vol. % O₂ unter Nutzung eines Isofluran-Verdampfers bei einem O₂-Fluß von 600 ml/min einleitend narkotisiert. Die Erhaltungsnarkose erfolgte mit 3 Vol. % Enfluran/95 Vol.% O₂ bei unveränderten O₂-Fluß. Nach Eröffnung der Peritonealhöhle der narkotisierten Tiere wurde das Diaphragma sofort transversal eröffnet und mit zwei weiteren Schritten der Thorax transcostal jeweils rechts und links in der Axillarlinie eröffnet. Nach dem Aufklappen des anterioren Thorax wurde die Aorta ascendens mit einer kleinen gebogenen anatomischen Pinzette umfasst, vor dem Abgang des Truncus brachiocephalicus mit einer Schere durchtrennt. Sofort im Anschluss wurde das Herz ohne Verletzung mit einer feinen Schere aus seiner mediastinalen Verankerung gelöst und in ein Becherglas mit eiskalter unbegaster Krebs-Henseleit-Lösung gegeben. Bevor die Herzaktion in der kalten Lösung schnell zum Stillstand kam, sorgten herzeigene Kontraktionen für den Auswurf des noch im Herzen vorhandenen Restblutes und die Füllung von Vorhöfen und Kammern mit unbegastem Perfusionsmedium. Durch diese

innerhalb der Prothrombinzeit (Ratte 9 – 12 s) liegenden Prozesse konnte die Bildung von Thromben und damit das spätere Thrombembolierisiko deutlich gesenkt werden. Durch die Kühlung wurden außerdem die Herzstoffwechselprozesse und somit hypoxische Schäden reduziert. Nach wenigen Sekunden wurde das Herz durch Kanülierung der Aorta ascendens und Fixierung mittels Fadenschlaufe mit der Perfusionsanlage verbunden und die Koronarperfusion nach Langendorff (67) begonnen. Während die Herzaktion unter flusskonstanter Perfusion mit 37°C warmer Krebs-Henseleit-Lösung einsetzte, wurde das verbliebene Mediastinum und falls erforderlich Reste der Lungen entfernt. Zur Druckentlastung des rechten Ventrikels wurde die Arteria pulmonalis an ihrer Austrittsstelle durch einen kleinen Einschnitt eröffnet. Durch diese Form der Präparation konnte das perfusionsfreie Intervall auf weniger als 30 s reduziert werden, während die Stoffwechselaktivität durch Kühlung zusätzlich erniedrigt wurde. Die herzeigene Automatie wurde während des gesamten Versuchs belassen, so dass eine Herzfrequenzstimulation nicht durchgeführt wurde. Nach einer Einschlagzeit von 10 min wurde durch eine der Venae pulmonales über den linken Vorhof und durch die Mitralklappe ein selbstgefertigter Ballonkatheter in den linken Ventrikel des retrograd perfundierten Herzens eingeführt. Beim Einführen des Ballonkatheters wurde die Öffnung des Pulmonalgefäßes mit einer Schere je nach Bedarf erweitert. Das Ballonvolumen war dem Volumen des linken Ventrikels der 350-450 g Versuchstiere angepasst und betrug 70 µl. Ballon, Katheterschlauch und Flüssigkeit führendes System des Druckaufnehmers sind mit einem Gemisch aus Äthanol und Wasser 1:1 gefüllt, da in dieser Mischung die Löslichkeit von Luft reduziert ist und somit das nachträgliche Auftreten von Luftblasen im System vermindert wird. Über die Druckspritze wurde der sich im linken Ventrikel befindende Ballonkatheter mit dem Wasser-Äthanol-Gemisch unter linksventrikulärer Druckentwicklung stufenweise bis zu einer Vordehnung von 8 mmHg fein dosiert aufgeblasen. Die Registrierung der intraventrikulären Druckveränderungen erfolgte über den an das Ballonkatheter-Druckabnehmer-System angeschlossenen Analog-Digitalwandler (Powerlab 4/20, Fa. ADInstruments, Milford, MA).

2.5.1.5. β-adrenerge Stimulation

Nach einer Einschlagphase von 20 min wurden die basalen Druck-Zeit-Kurven registriert. Anschließend wurde das Herz mit steigenden Konzentrationen des β-adrenergen Agonisten Isoproterenol stimuliert (2×10^{-10} , 1×10^{-9} , 2×10^{-9} , 6×10^{-9} , 1×10^{-8} , 2×10^{-8} , 6×10^{-8} , 1×10^{-7}). Dafür wurden jeweils 50 ml Perfusat separat begast, erwärmt und kurz vor Perfusionsbeginn mit dem entsprechenden Volumen einer Isoproterenol-Stammlösung versehen, durchmischt und in das Vorratsgefäß 2 gegeben. Bei jeder getesteten Isoproterenolkonzentration wurde flusskonstant (10 ml/min)

für 5 min perfundiert. Die Isoproterenol-Stammlösungen wurden in N₂ begastem Wasser angesetzt, portioniert und für maximal 2 Wochen bei -80°C gelagert.

2.5.1.6. Datenaufzeichnung und -verarbeitung

Die Datenaufzeichnung erfolgte über einen Analogdigitalwandler (Powerlab 4/20, Fa. ADInstruments, Milford, MA) auf eine PC-Workstation (Fa. Eteque, 700 MHz P III). Mit der Software Chart v5.0 (Fa. Wisstech, Oberhausen, Deutschland) wurden Herzfrequenz (Herzschläge/min), linksventrikulärer Druck (mmHg) sowie dessen erste Ableitung, die Druckanstiegsgeschwindigkeit (mmHg/s), linksventrikulärer enddiastolischer Druck (mmHg), mittlerer Perfusionsdruck (mmHg) und mittlerer Koronarfluss (ml/min) mit einer Aufnahmezeit von 400 Messwerten/s registriert. Über das Ballonkatheter-Druckabnehmer-System (StathamP23XL, Fa. Spectramed, Oxnard, CA, USA) aufgezeichnete linksventrikuläre Druckkurven wurden mit Hilfe der Software Chart v5.0 weiter analysiert. Dazu wurden für jeden Versuchsabschnitt 6 aufeinander folgende Herzkontraktionen ausgewertet und aus den 6 errechneten Parametern die Mittelwerte gebildet.

Als Parameter der Kontraktionsphase wurde die maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit (erste Ableitung der Ventrikeldruckkurve, $+dP/dt_{\max}$) berechnet. Da diese bei erhöhter myokardialer Kontraktilität ansteigt und bei Verminderung abfällt (41;88), ist sie ein gut geeigneter Parameter zur Beschreibung der Kontraktilität.

Um die Relaxationsphase des Herzens zu charakterisieren, wurde die maximale linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit $-dP/dt_{\max}$ aus der ersten Ableitung der Ventrikeldruckkurve berechnet. Zusätzlich wurden folgende Zeitparameter gemessen: die Zeit bis zum 50%igen (RT_{50}) bzw. 97%igen (RT_{97}) Abfall der Kraft ausgehend vom maximal entwickelten intraventrikulären Druck sowie die Zeitkonstante der isovolumentrischen Relaxation (τ). Die RT_{50} bezieht sich dabei auf die diastolische Phase der Relaxation, während die Zeitkonstante τ die letzte Phase der isovolumentrischen Relaxation beschreibt. Beim Vergleich des Druck- und Volumenzyklus des Herzens *in vivo* ist deutlich geworden, dass ab Zeitpunkt der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit ($-dP/dt_{\max}$) das Volumen des Ventrikels konstant bleibt. Der Zeitpunkt $-dP/dt_{\max}$ stellt also *in vivo* den Beginn der isovolumentrischen Relaxationsphase dar. Der Verlauf der Druckkurve des isovolumentrisch relaxierenden Herzens *in vivo* und *in vitro* ähnelt von in diesem Punkt an einer Exponentialfunktion (140). Zur Bestimmung des τ -Wertes wurde das Programm Chart v5.0 herangezogen, welches zur Kalkulation die Formel $X_t = A_0 \exp(t-t_0/\tau) + B$ (A_0 : Druck zum Zeitpunkt von $-dP/dt_{\max}$, B: Schnittpunkt der variablen Asymptote mit der Ordinate, X_t : beliebiger Druck nach A_0 , t_0 und t: die entsprechenden Zeiten von A_0 und X_t) benutzt. τ wird dabei vom Programm berechnet, jedoch B

vom Programm geschätzt und so der mögliche Baseline-Drift berücksichtigt. Als Endpunkt der Datenerfassung wurde das vom Programm berechnete Ende der Druckkurve angesehen.

Zur Messung des mittleren Koronarflusses wurde das tropfenweise austretende Perfusat auf eine mit einem F30 Kraftaufnehmer (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) verbundene Angelsehne geleitet. Das durch jeden Tropfen ausgelöste Kraftsignal wurde elektronisch nach dem Ratemeter-Prinzip (beat-to-beat-Messung) mit der Software Chart v5.0 aufgezeichnet, die Tropfenzahl pro Minute errechnet und der mittlere Koronarfluss unter Berücksichtigung des vorher bestimmten Einzeltropfenvolumens registriert.

2.5.1.7. Geräte und sonstige Materialien

Brückenverstärker	Hugo Sachs Elektronik (HSE), March-Hugstetten, Deutschland
Analogdigitalwandler (Powerlab 4/20)	ADInstruments, Spechbarch, Deutschland
Software Chart v5.0	Wisstech, Oberhausen, Deutschland
Druckabnehmer Statham P23XL	Spectramed, Oxnard, CA, USA
Kraftaufnehmer F30	Hugo Sachs Elektronik (HSE), March-Hugstetten, Deutschland
Einmal Filterhalter FP 030 (Porenweite 0,45 µm)	Firma Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Schlauchpumpe (Perimax 12)	Spetec, Erding, Deutschland
PC Arbeitsplatz (PIII, 700 MHz, 256 MB RAM)	Eteque Computer, Berlin, Deutschland
Langendorff-Perfusionsanlage	Eigenbau in Kooperation mit K. Duwe (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin)
Wasserbad C3	Lauda-Königshofen, Deutschland
Umwälzthermostat MT	Lauda-Königshofen, Deutschland

2.5.1.8. Chemikalien

Carbogengas (95% O ₂ , 5% CO ₂)	Linde, München, Deutschland
Glucose	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isoproterenol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Calciumchlorid (CaCl ₂ *2H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ *7H ₂ O)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

Natriumbikarbonat (NaCO_3)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydrogenphosphat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 1\text{H}_2\text{O}$)	Merck, Darmstadt, Deutschland
HEPES	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.6. Statistik

Für die statistische Überprüfung der Messwerte wurde die Statistik-Software SigmaStat 3.2 (SPSS Inc., Chicago, Illinois) benutzt. Die verteilungsfreie Varianzanalyse unabhängiger Stichproben von zwei Versuchsgruppen erfolgte mit dem nichtparametrischen Rangsummentest nach Mann-Whitney. Zur Überprüfung normalverteilter Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde der t -Test durchgeführt. Für die lineare Regressionsanalyse zur Überprüfung eines Zusammenhanges zwischen zwei Messwertmengen wurde die Methode der kleinsten Quadrate genutzt. Falls nicht ausdrücklich darauf verwiesen wird, sind alle Werte als Mittelwerte \pm SEM angegeben. Eine statistische Signifikanz wurde bei $p < 0.05$ angenommen.