

3. Ergebnisse

3.1. Genotypisierung und Zucht SERCA2-transgener Ratten

3.1.1. Genotypisierung mit Southern Blot-Technik

Alle in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse beziehen sich auf ein transgenes Rattenmodell (Linie 1167), dessen Genom zusätzlich zum endogenen SERCA2-Gen ein SERCA2-Transgen enthält. Die Expression dieses Transgens steht unter Kontrolle eines humanen CMV-Enhancers/Hühnchen- β Aktin-Promotors. Diese transgene Linie wurde ursprünglich von Dr. Roland Vetter am Max-Delbrück-Zentrum in Berlin Buch generiert und später am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, CBF, Charité – Universitätsmedizin Berlin, weiter gezüchtet.

Um zwischen transgen-negativen und SERCA2a-Transgen positiven Tieren unterscheiden zu können, wurden alle Nachkommen mittels Southern Blot-Analyse oder PCR unter Nutzung einer transgen-spezifischen Sonde bzw. spezifischer Primer 3-4 Wochen post partum genotypisiert. **Abb. 3.1** zeigt exemplarisch das Ergebnis einer solchen Southern Blot-Analyse von insgesamt 38 Nachkommen heterozygoter transgen positiver Elterntiere.

3.1.2. Genotypisierung mit PCR

Alternativ wurde die Genotypisierung mit PCR-Analysen zur spezifischen Detektion des SERCA2-Transgens durchgeführt. Dafür wurde eine 304 bp lange transgen-spezifische Teilsequenz des humanen CMV-Immediate-Early Enhancer (s. Abschnitt 2.3.7) amplifiziert, die nur im Genom von heterozygot transgenen, jedoch nicht im Genom von nicht-transgenen Nachkommen enthalten ist. Diese wurde anschließend in einem 1,5%-igen Agarose-Minigel elektrophoretisch aufgetrennt. **Abb. 3.2** zeigt eine exemplarische PCR-Analyse.

3.1.3. Kopienanzahl des SERCA2-Transgens

Um bei SERCA2-transgenen Ratten Aussagen über die Anzahl zusätzlich im Rattengenom integrierter Kopien des SERCA2-Transgens machen zu können, wurde eine SERCA2-spezifische cDNA-Sonde benutzt, die sowohl das endogene als auch das transgene SERCA2-Gen detektiert. Dazu wurden im Dot Blot definierte Mengen linksventrikulärer DNA für jeweils 3 NTG und TG aufgetragen und mit der SERCA2-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert (s. Methoden 2.4.4). Der zugehörige Dot Blot ist in **Abb. 3.3 A** dargestellt. Die ermittelte Signalintensität der spezifischen Sonde wurde in Abhängigkeit von definierten Mengen pro Dot aufgetragener linksventrikulärer NTG- und TG-DNA dargestellt. (**Abb. 3.3 B**). Sowohl bei NTG als auch bei TG nahm die Signalintensität der SERCA2-cDNA-Sonde mit steigender DNA-Konzentration linear zu, wobei sich für

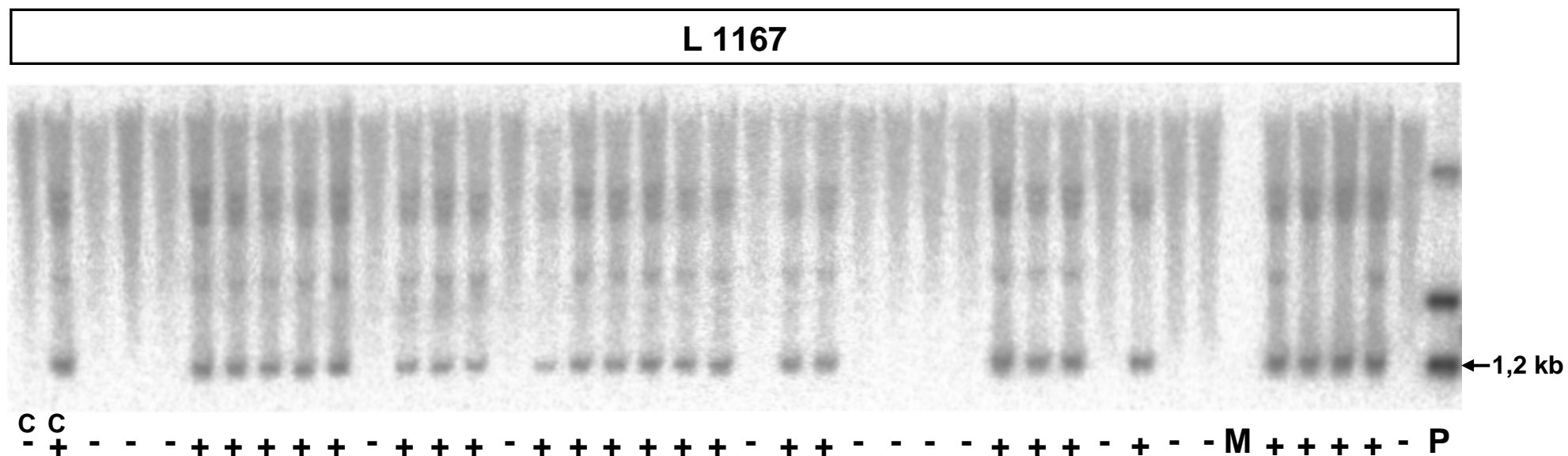


Abbildung 3.1. Southern Blot genomischer DNA von Nachkommen der SERCA2-transgenen Ratten der Linie L 1167.

Die Abbildung zeigt das DNA-Bandenmuster von 14 transgen-negativen (-) und 24 transgen-positiven (+) Tieren von insgesamt 5 Würfen nach Verpaarung jeweils eines heterozygoten Muttertiers mit einem heterozygoten positiven Vater. Zum Vergleich sind links jeweils eine Negativ(- C) und Positivkontrolle (+C) sowie auf der rechten Seite eine Bahn ApaI-geschnittene Plasmid-DNA (P) aufgetragen. M - Bahn mit DNA-Leiter belegt (keine Hybridisierung mit transgen-spezifischer Sonde). Genomische DNA (20 µg) und Plasmid-DNA (1 µg) wurden mit dem Restriktionsenzym Apa I verdaut, in einem 1%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, durch Vacu-Blotting auf eine Nylonmembran transferiert und UV-fixiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit einer transgen-spezifischen Apa I - Apa I [³²P]-Sonde. Details in Materialien & Methoden.

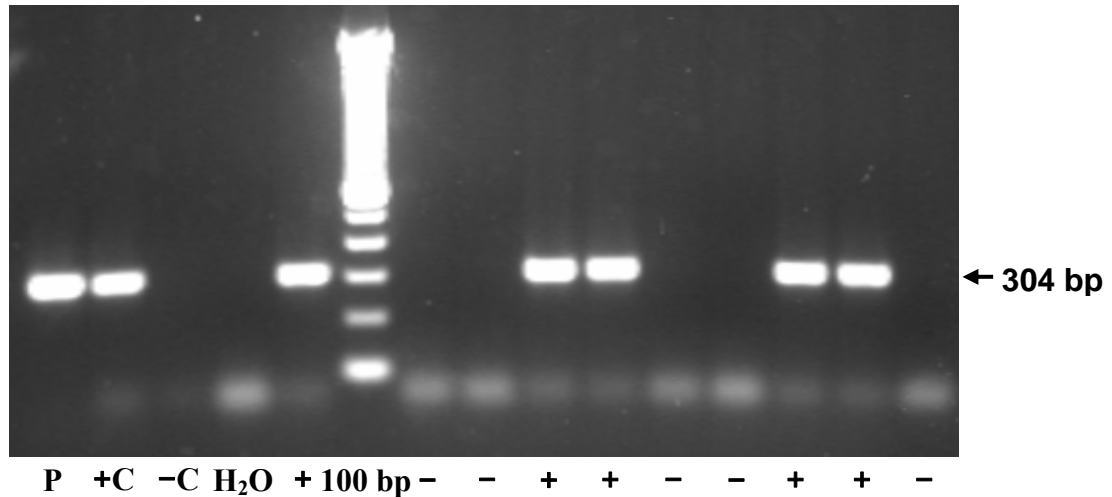


Abbildung 3.2. Ethidiumbromid gefärbtes 1,5% Agarosegel mit PCR-Produkten der Teilsequenz des transgen-spezifischen humanen CMV-Immediate-Early-Enhancer von Nachkommen SERCA2-transgener Ratten der Linie L1167. Die Abbildung zeigt jeweils 5 transgen-negative (-) und transgen-positive (+) Tiere. Als Positivkontrolle (+C) wurde die durch Southern Blot-Analysen geprüfte DNA von transgen-positiven Tieren gepoolt und 50 ng Template DNA mittels SERCA2-transgen-spezifischer Primer amplifiziert. Für die Negativkontrolle (-C) wurde ebenso verfahren. Zusätzlich wurde 1,33 ng Apa-1 geschnittene SERCA-Plasmid-DNA (P) amplifiziert. Um Kontaminationen auszuschließen, wurde der PCR-Mastermix ohne Template eingesetzt (H_2O). In eine Bahn wurden 2,5 μg 100 bp DNA-Leiter (0,5 $\mu g/\mu l$) pipettiert (100bp).

TG im Vergleich zu NTG bei allen aufgetragenen DNA-Proben stärkere Signale ergaben. Im Verhältnis zu NTG nahm dabei für TG die cDNA-Sonden-Signalintensität pro aufgetragener Menge DNA im Mittel um den Faktor 7,6 zu. Das entsprach einer 7,6-fach höheren Kopienzahl des in transgene Ratten integrierten SERCA2-Transgens.

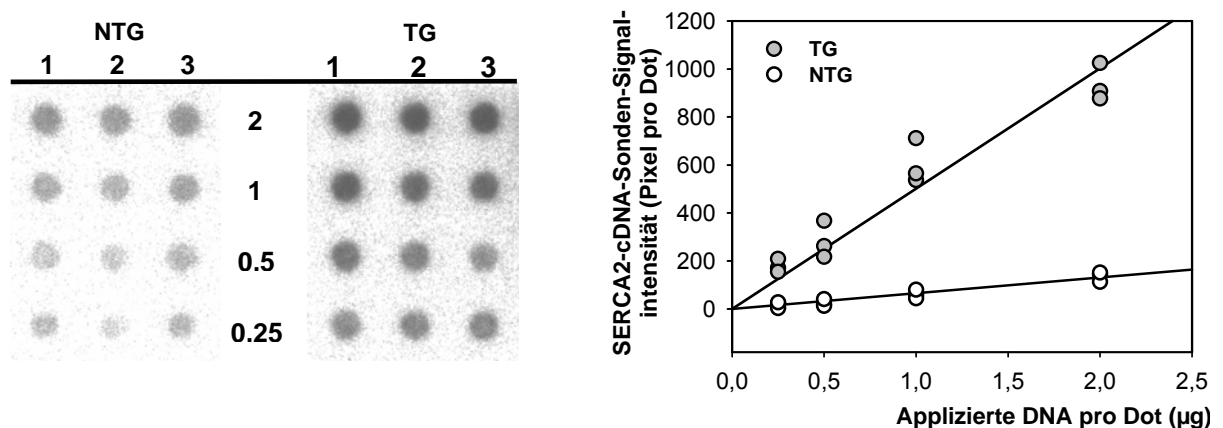


Abbildung 3.3. Abhängigkeit des SERCA2-spezifischen cDNA-Sonden-Signals von im Dot Blot aufgetragener linksventrikulärer DNA. Definierte Mengen linksventrikulärer DNA (0,25 - 2 μg) von je 3 männlichen nicht-transgenen (NTG) und SERCA2-transgenen Ratten (TG) der Linie 1167 wurden im Dot Blot mit einer spezifischen ^{32}P -markierten SERCA2-cDNA-Sonde hybridisiert (A) und das Sonden-Signal (Pixel pro Dot) in Abhängigkeit von der aufgetragenen DNA-Menge quantitativ analysiert (B). Dargestellt sind die Einzelmesswerte der im Dot Blot für jede definierte DNA-Menge aufgetragenen Triplikate. Der positive lineare Zusammenhang (NTG: $r^2=0,91$; TG : $r^2=0,94$) wird durch entsprechende Regressionsgeraden (TG: $y=501,44 x$; NTG: $y=65,66 x$) dargestellt.

3.1.4. Genotypverteilung und Wurfgröße

Wie **Abb. 3.4** zeigt, brachte die Zucht in der Zeit vom 01.07.1995 bis zum 14.07.04 1116 Nachkommen hervor. Darunter waren 49% heterozygote transgen-positive (TG) und 51% transgen-negative Tiere (NTG). Das Verhältnis von männlichen zu weiblichen Tieren war in allen Gruppen 1:1 (**Abb. 3.4**). Homozygote transgene Nachkommen gingen aus der Zucht nicht hervor.

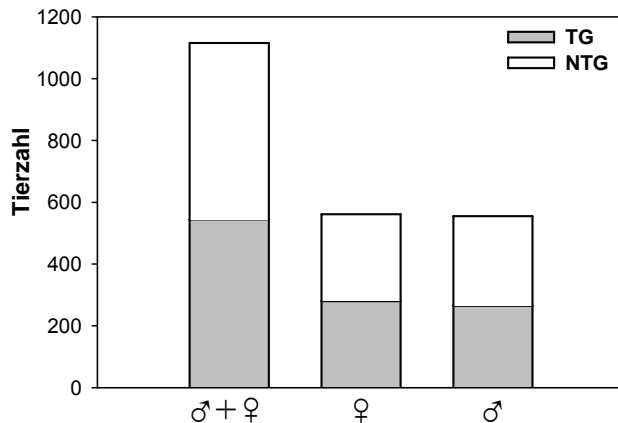


Abbildung 3.4. Anzahl der transgenen (TG) und nicht-transgenen Nachkommen (NTG) heterozygoter SERCA2a-transgener Ratten der Linie 1167. Die Analyse wurde retrospektiv für einen Zeitraum von 9 Jahren anhand der vorliegenden Zucht Datenbank durchgeführt. ♀ - weiblich, ♂ - männlich.

Genotypisierte Tiere wurden fortlaufend in einer Datenbank und in einem Stammbaum erfasst. **Abb. 3.5** zeigt exemplarisch einen Auszug aus diesem Stammbaum. Ausgehend vom einem heterozygoten Elternpaar (♀ 5358, ♂ 5174) werden insgesamt 3 Generationen von Nachkommen gezeigt. Nachkommen desselben Wurfs sowie Tiere aus einem Wurf geringer Größe (≤ 4) wurden nicht verpaart.

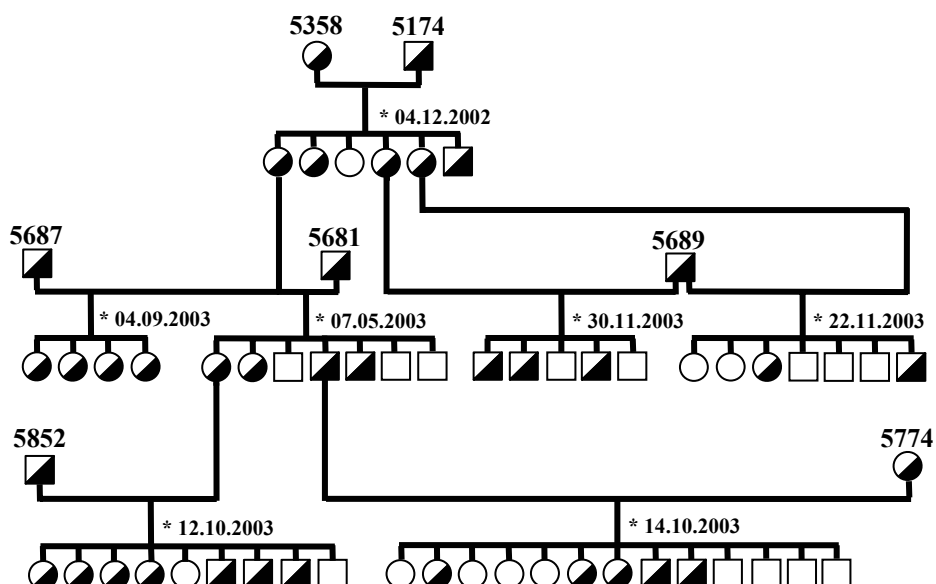


Abbildung 3.5 Stammbaumauszug der SERCA2a-transgenen Rattenlinie 1167. Das Diagramm zeigt insgesamt 7 Würfe heterozygoter Elterntiere. Die Wurfgröße betrug zum Zeitpunkt der Entnahme der Schwanzbiopsien zwischen 4 und 13 Tieren. Tiernummern sind jeweils nur für die Elterntiere angegeben. Quadrate - männliche Tiere; Kreise - weibliche Tiere; leere Symbole - transgen-negative Tiere; halbgefüllte Symbole - heterozygote SERCA2a-transgene Tiere. * - Geburtsdatum des entsprechenden Wurfs.

Eine Analyse aller in **Abb. 3.4** aufgeführten Tiere ergab eine erhebliche Variation der Tierzahl pro Wurf zum Zeitpunkt der Genotypisierung in der 3-4 Lebenswoche. Im Gegensatz zu dem in **Abb. 3.4** gezeigten 1:1 Verhältnis zwischen männlichen und weiblichen Tieren bzw. transgen-positiven und transgen-negativen Tieren, variierten diese Verhältnisse innerhalb der einzelnen Würfe. Die durchschnittliche Wurfgröße betrug 9 Nachkommen. Die Variation war allerdings erheblich (**Abb. 3.6**).

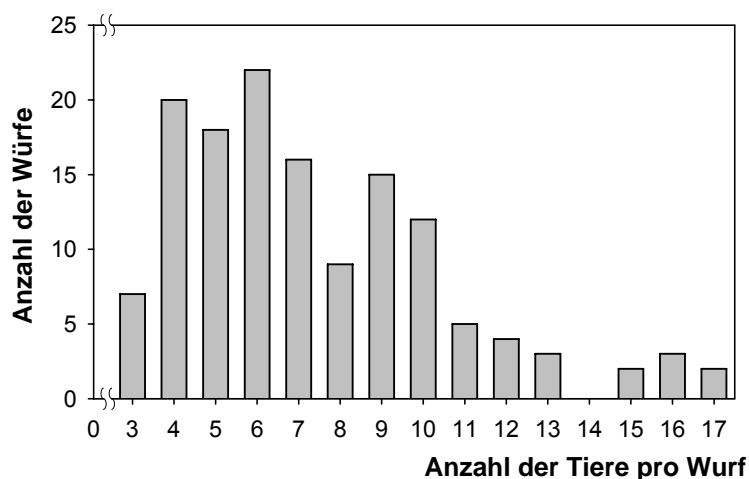


Abbildung 3.6 Wurfgrößenverteilung der SERCA2a-transgenen Rattenlinie 1167. Die Analyse umfasste insgesamt 1116 Tiere, die zwischen Juli 1995 und Juli 2004 genotypisiert wurden.

3.2. Allgemeiner Phänotyp SERCA2-transgener Ratten

Bei der tierärztlichen Untersuchung der gezüchteten Nachkommen der Linie L1167, die zusammen mit den Veterinärmedizinerinnen Frau Dr. Grothe und Herrn Dr. Klug vorgenommen wurden, konnten bezüglich äußerem Erscheinungsbild, Ernährungszustand, Beschaffenheit des Fells, Wasser- und Futteraufnahme, Beweglichkeit und Verhalten im Käfig keine Unterschiede zwischen nicht-transgenen und SERCA2-transgenen Tieren beiderlei Geschlechts beobachtet werden. Es fanden sich auch keine Anhaltspunkte für eine veränderte Sterblichkeit bei TG. Das trifft auch auf Körpergewichte bzw. Körpergewichtsentwicklung zu. **Abb. 3.7** zeigt die postnatale Körpergewichtsentwicklung über einen Zeitraum von bis zu 70 Wochen. Zum Vergleich sind die Körpergewichte von 6-58 Wochen alten Sprague Dawley[®] Mollegard Ratten der Fa. Taconic M&B (<http://www.taconic.com>) aufgetragen, aus denen die transgenen Tiere ursprünglich generiert wurden. Erwartungsgemäß zeigen sowohl transgene als auch nicht-transgene männliche Tiere im Vergleich zu den weiblichen eine größere Gewichtszunahme und weisen deutlich höhere Körpergewichte als gleichaltrige weibliche Tiere auf.

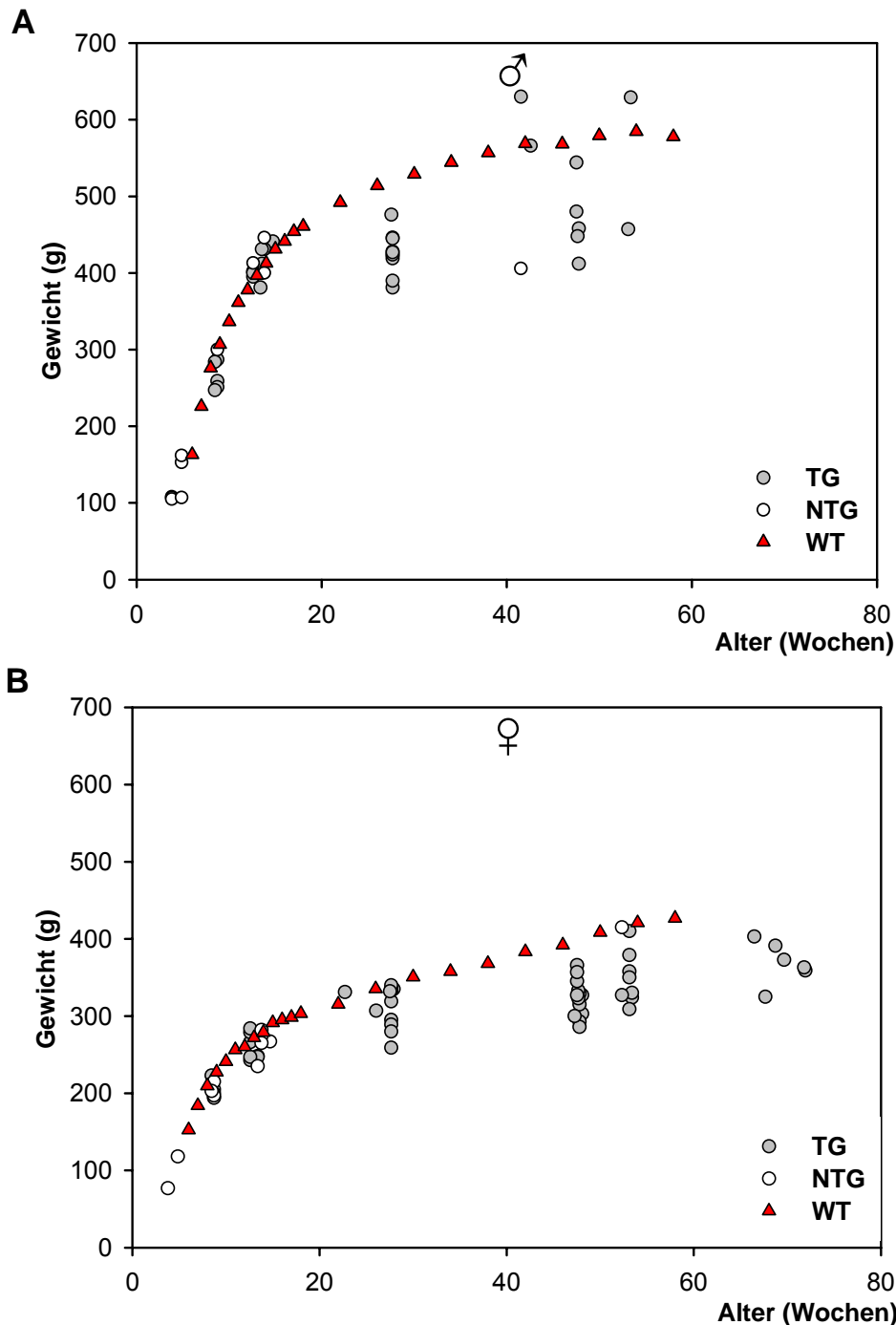


Abbildung 3.7 Körpergewichtsentwicklung von Nachkommen SERCA2-transgener Ratten der Linie 1167 (n=110). Abbildung A zeigt die Körpergewichte von 32 transgen-positiven (TG) und 11 negativen (NTG) männlichen Ratten. In Abbildung B sind 54 transgen-positive u. 13 transgen-negative weibliche Tiere abgebildet. Die Analyse umfasst einzelne zwischen April und Oktober 2004 geborene Tiere. Die geringe Anzahl analysierter transgen-negativer Ratten ist durch das aus Kostengründen notwendige Abtöten nicht mehr für die Zucht benötigter Tiere bedingt. Für Vergleichszwecke wurden die entsprechenden Werte von 6-58 Wochen alten Sprague Dawley®-Mollegard Ratten (WT, n=20 pro Altersgruppe) zusätzlich dargestellt. Entsprechende Daten wurden den Internetseiten der Fa. Taconic M&B entnommen.

Der Vergleich der Körpergewichte gleichaltriger transgen-positiver und negativer Tiere zeigte keine signifikanten Gruppenunterschiede. Das trifft auch auf die Körpergewichte der gezüchteten NTG

und TG zu, wenn diese mit den Körpergewichtsangaben des o.a. Outbred Stamms der Fa. Taconic verglichen werden.

3.3. Kardialer Phänotyp SERCA2-transgener Ratten

3.3.1. Herzfeuchtgewichte

Zur Charakterisierung des kardialen Phänotyps wurden die Feuchtgewichte der verschiedenen Herzabschnitte von NTG und TG vergleichend untersucht. **Tab. 3.1** zeigt die ermittelten Werte für 9 Monate alte männliche SERCA2-transgene (TG) und nicht-transgene Ratten (NTG). Alle untersuchten Gewichtsparameter von TG unterschieden sich nicht von NTG. Untersuchungen von 5 bis 6 Monate alten Tieren ergaben ebenfalls keine Unterschiede (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tabelle 3.1 Vergleich der Herz und Körpergewichte von männlichen 9 Monate alten nicht-transgenen (NTG) und heterozygoten SERCA2-transgenen Ratten (TG) der Linie 1167.

Parameter	NTG (n=7)	TG (n=7)
BW (g)	475 ± 14	485 ± 7
HW (mg)	1347 ± 22	1382 ± 20
LV + S (mg)	962 ± 25	968 ± 18
RV (mg)	265 ± 14	282 ± 10
A (mg)	120 ± 10	132 ± 4
HW/BW (mg/g)	2,85 ± 0,06	2,85 ± 0,05
LV+S/BW (mg/g)	2,03 ± 0,04	2,00 ± 0,05
RV/BW (mg/g)	0,56 ± 0,03	0,58 ± 0,02
A/BW (mg/g)	0,26 ± 0,03	0,27 ± 0,01

$\bar{x} \pm \text{SEM}$, n - Anzahl der untersuchten Tiere, BW, Körpergewicht; HW, Herzgewicht; LV + S, linker Ventrikel + Septum; RV, rechter Ventrikel; A, linker + rechter Vorhof

3.3.2. SERCA2-mRNA im Herzen und anderen Geweben

Um das Ausmaß der Expression von SERCA2-mRNA im Herz und anderen Organen zu untersuchen, wurden vergleichend Northern Blot-Analysen isolierter kardialer RNA männlicher heterozygoter SERCA2-transgener Ratten (TG) und gleichgeschlechtlicher nicht-transgener Tiere (NTG) der Linie 1167 durchgeführt. Das Ergebnis einer solchen Analyse ist exemplarisch in **Abb. 3.8** dargestellt. Im Vergleich zu NTG zeigten sich für alle untersuchten Herzabschnitte von TG deutlich stärkere SERCA2-mRNA-Signale. In anderen Muskelgeweben, wie z.B. Skelettmuskel, Zwerchfell und Ösophagus waren die SERCA2-mRNA-Signale transgener Tiere verglichen mit NTG ebenfalls

deutlich größer. Im Gegensatz dazu konnten keine unterschiedlichen SERCA2-mRNA-Signale in Lunge, Milz, Hoden, Aorta, Leber und Gehirn von TG und NTG festgestellt bzw. überhaupt keine Signale detektiert werden. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Expression des hCMV-Enhancer/c β -Aktin-SERCA2-Transgens bevorzugt in muskulären Geweben erfolgt.

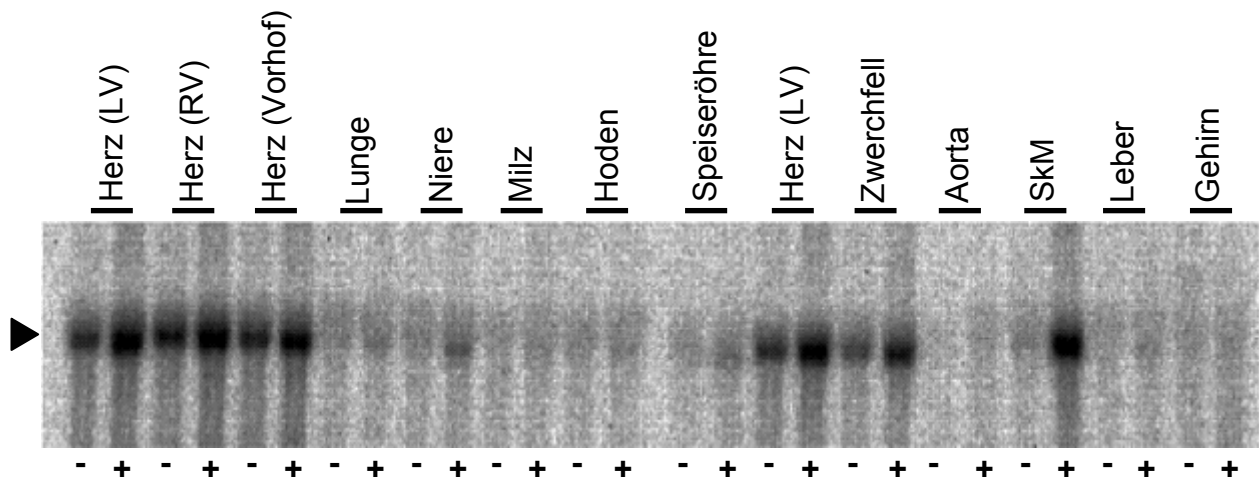


Abbildung 3.8. SERCA2-mRNA in unterschiedlichen Geweben nicht-transgener und SERCA2-transgener Ratten der Linie 1167. Für die vergleichende Northern Blot-Analyse sind jeweils eine Probe eines repräsentativen männlichen nicht-transgenen Tieres (-) und eines heterozygot transgenen Tieres (+) aufgetragen. Vorhofmyokard, Myokard des linken (LV) und rechten (RV) Ventrikels sowie 10 andere Gewebe wurden untersucht. Für die denaturierende Gelelektrophorese (6% Formaldehyd/1 % Agarose) wurden insgesamt 15 μ g RNA pro Bahn aufgetragen. SKM, Skelettmuskel (gemischt).

3.3.2.1. Kardiale SERCA2a-mRNA bei männlichen und weiblichen Tieren

Um zu überprüfen, ob diese SERCA2-Expressionsunterschiede auf Transkriptebene auch am Herzen weiblicher Tiere nachweisbar sind, wurden zusätzliche Northern- und Dot Blot-Analysen durchgeführt. **Abb. 3.9** zeigt exemplarische Northern Blots (**Abb. 3.9 A**) und die entsprechende densitometrische Auswertung dieser Blots (**Abb. 3.9 B**).

Die quantitative Analyse dieser Blots ergab auch in weiblichen TG höhere SERCA2-mRNA-Spiegel als in gleichgeschlechtlichen NTG. Der Unterschied von +57% für das auf GAPDH normierte SERCA2-Signal ist vergleichbar mit dem bereits publizierten 1,5-fach erhöhten SERCA2-mRNA-Spiegeln von männlichen transgenen Ratten der Linie L1167 (134).

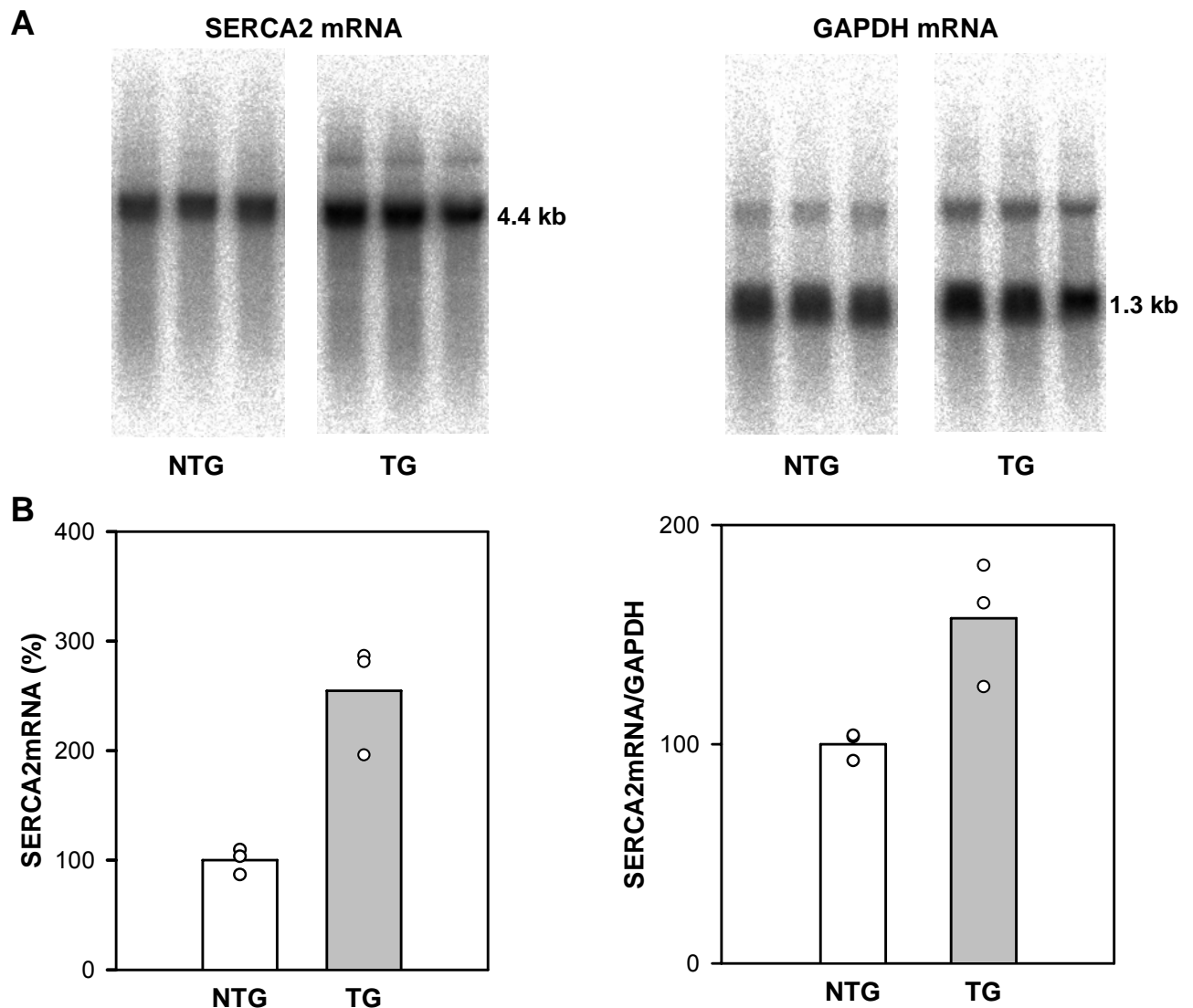


Abbildung 3.9. Northern Blot Analyse von linksventrikulärer SERCA2- und GAPDH-mRNA von weiblichen SERCA2-transgenen Ratten der Linie 1167. (A) Autoradiogramm eines Northern Blots, der mit einer SERCA2- bzw. GAPDH-spezifischen ^{32}P -DNA-Sonde sequenziell hybridisiert wurde. Für die Gelelektrophorese (6% Formaldehyd/1% Agarose) wurden insgesamt 15 μg RNA pro Bahn aufgetragen. (B) Ergebnis der Analyse der einzelnen Bandenintensitäten mit einem Bio-Imaging Analysegerät (s. Methoden). Die Säulen zeigen den Mittelwert von drei Tieren pro Gruppe. Die Einzelwerte für jedes Tier sind als Punkte dargestellt.

3.3.2.2. SERCA2a-mRNA-Signal im Dot Blot

Für die Quantifizierung der kardialen mRNA-Spiegel von SERCA2 und anderen Transkripten wurde zusätzlich zur Northern Blot-Technik die Dot Blot-Technik eingesetzt. Bei der Etablierung der Methode wurde zuerst die Abhängigkeit des SERCA2-mRNA-Signals von der aufgetragenen Menge an kardialer Gesamt-RNA untersucht. **Abb. 3.9** zeigt Ergebnisse dieser Untersuchungen für das SERCA2-mRNA-Signal. Die RNA wurde von jeweils 7 weiblichen NTG und TG isoliert, gepoolt und in variablen Mengen zwischen 0,5 und 3 μg pro Dot aufgetragen.

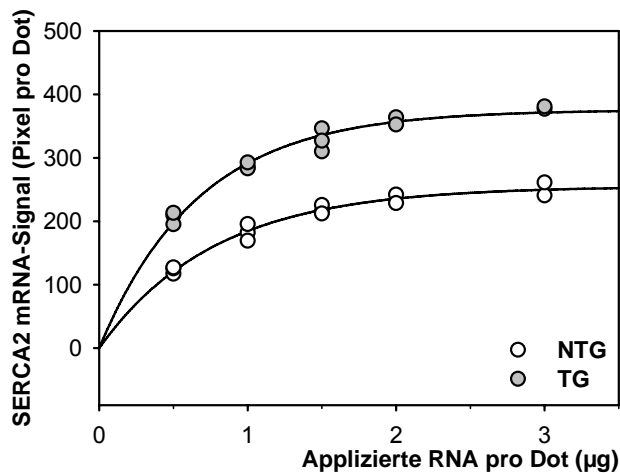


Abbildung 3.10. Abhängigkeit des SERCA2-mRNA-Signals von der aufgetragenen Menge an kardialer Gesamt-RNA. Im Dot Blot aufgetragene Mengen gepoolter Gesamt-RNA von 0,5 - 3 µg pro Dot aus je 7 Herzen weiblicher nicht-transgener (NTG) und SERCA2-transgener Ratten (TG) der Linie 1167 wurden quantitativ analysiert. Die Hybridisierung der Dot Blot-Membran erfolgte mit einer spezifischen ^{32}P -markierten SERCA2-cDNA-Sonde. Es wurden Zwei- bzw. Dreifachbestimmungen durchgeführt.

Wie in **Abb. 3.10** zu sehen ist, ergab sich in Abhängigkeit von der aufgetragenen RNA-Menge sowohl für TG als auch NTG eine typische Sättigungskinetik für das detektierte SERCA2-mRNA-Signal. Der beste Fit wurde mit folgendem Modell erzielt:

$$Y = Y_{\max} \frac{[X]}{[X] + K}$$

Y - SERCA2-mRNA-Signal (Pixel pro Dot), Y_{\max} - maximales SERCA2-mRNA Signal (Pixel pro Dot), [X] - RNA-Konzentration (µg/Dot), K - Konstante

Die maximale mRNA-Signalstärke wurde sowohl bei NTG als auch TG bei 3 µg Gesamt-RNA pro Dot erreicht. Offensichtlich wird bei dieser RNA-Menge die Bindungskapazität der verfügbaren Membranfläche (7 mm²) erreicht. Das mittlere SERCA2-mRNA-Signal aller aufgetragenen RNA-Proben von TG war um $+54 \pm 6\%$ größer als die entsprechenden Werte für NTG. Das mit dem Fittingmodell errechnete maximale SERCA2-mRNA-Signal von TG lag $+43\%$ über dem von NTG (462 ± 10 Pixel/Dot vs. 323 ± 9 , $p < 0.05$). Das entspricht den Unterschieden, die unter 3.3.2.1 mit der aufwendigeren Northern Blot-Technik erzielt wurden. Ausgehend davon wurden alle folgenden SERCA2-mRNA-Quantifizierungen mit dieser Dot Blot-Technik durchgeführt. In der Regel wurden 1,5 oder 3 µg isolierte kardiale Gesamt-RNA pro Dot eingesetzt.

3.3.2.3. mRNA-Spiegel von Transkripten anderer Ca^{2+} -regulierender Gene

Da eine veränderte Expression des SERCA2-Gens mit entsprechenden Expressionsveränderungen anderer Gene, die für Ca^{2+} -regulierende Proteine kodieren, verbunden sein kann, wurden die kardialen mRNA-Spiegel von PLB, NCX, Calsequestrin und SERCA2a vergleichend untersucht. Für Vergleichszwecke wurden die Blots zusätzlich mit spezifischen Sonden für β -Aktin, GAPDH und ANF hybridisiert. **Abb. 3.11** zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen von isolierter RNA aus dem linken Ventrikel männlicher TG und NTG. Wie bereits für weibliche Tiere gefunden, lagen die

SERCA-mRNA-Spiegel von TG 47% über denen von NTG. Auf das GAPDH-Signal normiert, betrug der Unterschied zwischen TG und NTG +50% bzw. auf das PLB-Signal normiert +52% (Abb. 3.11B). Die Spiegel von mRNA-Transkripten für PLB, NCX und CSQ von NTG und TG unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

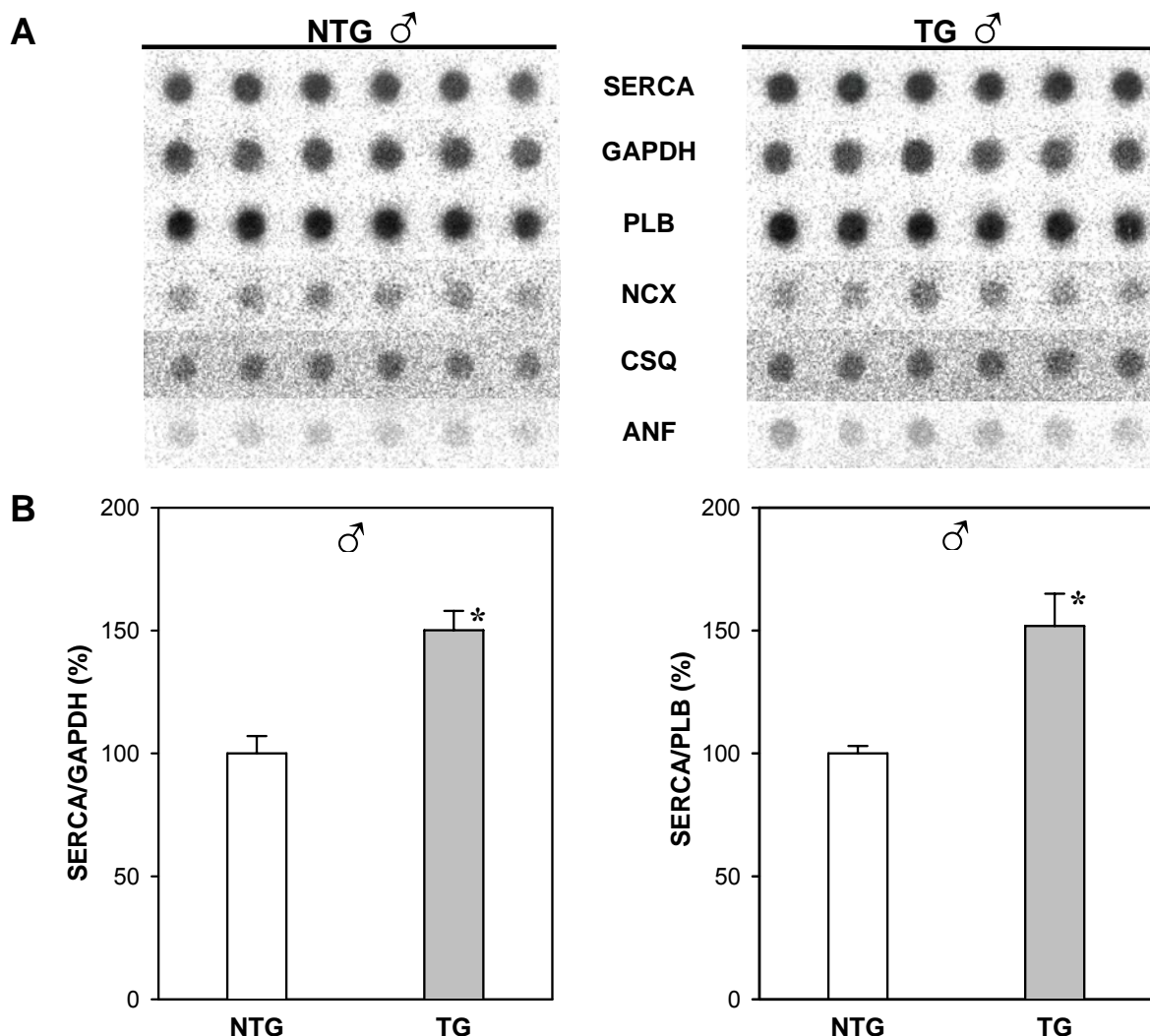


Abbildung 3.11. Quantitative Dot Blot-Analyse linksventrikulärer RNA-Spiegel für männliche nicht-transgene (NTG) und SERCA2-transgene (TG) Ratten der Linie 1167.(A) Autoradiogramm von Dot Blots linksventrikulärer mRNA für männliche NTG und TG, die nach Detektion mit entsprechend spezifisch ^{32}P -markierten DNA-Sonden für SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA), Phospholamban (PLB), $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), Calsequestrin (CSQ), atriales natriuretisches Peptid (ANF) und GAPDH hybridisiert wurden. 3 μg RNA-Gesamtgehalt pro Probe. (B) Dot Blot-Analyse linksventrikulärer RNA-Spiegel männlicher transgener Ratten der Linie 1167 und entsprechender Kontrolltiere. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ der auf GAPDH-mRNA normierten SERCA-mRNA-Werte (linkes Säulendiagramm) sowie des SERCA-mRNA/PLB-mRNA-Quotienten (rechtes Säulendiagramm). Insgesamt wurden je Gruppe sechs Versuchstiere analysiert. * $p < 0.05\%$.

Auch für weibliche Tiere ergab der quantitative Vergleich der mRNAs für PLB, NCX, CSQ ebenfalls keine Unterschiede zwischen NTG und TG (Abb. 3.12). Im Gegensatz dazu lag das auf PLB-mRNA normierte SERCA2-Signal von TG um 59% über dem entsprechenden Wert von NTG (Abb. 3.12 E).

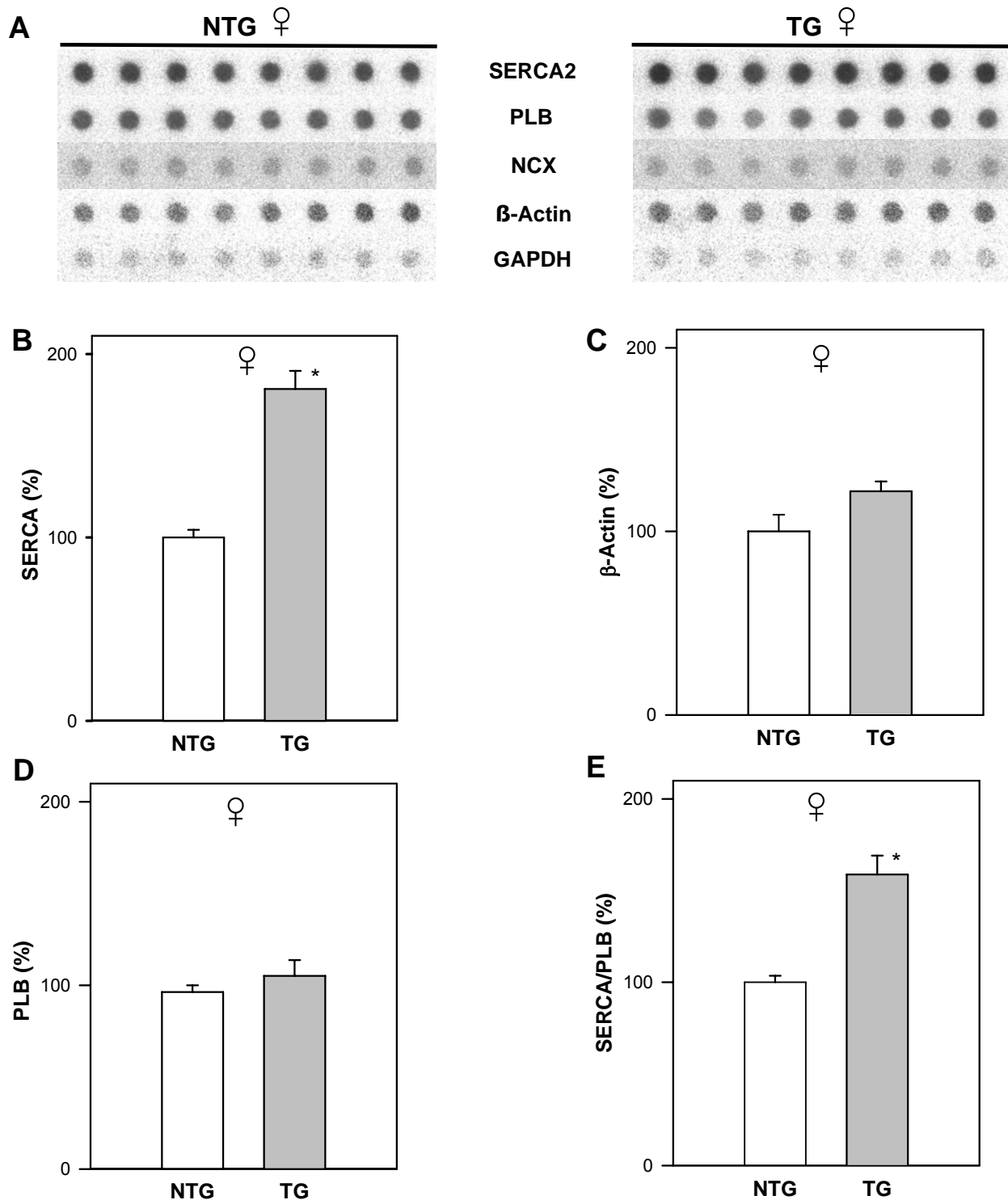


Abbildung 3.12. Quantitative Dot Blot-Analyse linksventrikulärer RNA-Spiegel für weibliche nicht-transgene (NTG) und SERCA2-transgene (TG) Ratten der Linie 1167. Dargestellt sind Autoradiogramme von Dot Blots mit 3 μ g RNA-Gesamtgehalt pro Dot. Die Detektion erfolgte mit entsprechend spezifisch 32 P-markierten DNA-Sonden für SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA2), Phospholamban (PLB), $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), β -Actin und Glycerolaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). In B-E sind die zugehörigen mRNA-Signalstärken der Dot Blot-Autoradiogramme aus Abbildung 3.12 für die SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA), Phospholamban (PLB), β -Actin und der auf PLB-mRNA normierten SERCA-mRNA-Spiegel dargestellt. Die Säulen präsentieren die Mittelwerte von je 8 NTG und TG. Die Einzelwerte sind als Punkte dargestellt. * $p < 0.05$ vs. NTG.

3.3.2.4. Atriale SERCA2a-mRNA-Spiegel

Da zwischen ventrikulärem und atrialem Myokard der Laborratte Expressionsunterschiede für Ca^{2+} -regulierende Proteine wie SERCA2a, NCX und PLB beschrieben wurden, wurden zusätzlich die atrialen mRNA-Spiegel von PLB, NCX, Calsequestrin und SERCA2a von NTG und TG vergleichend untersucht. **Abb. 3.13** zeigt entsprechende Dot Blots sowie deren densitometrische Auswertung.

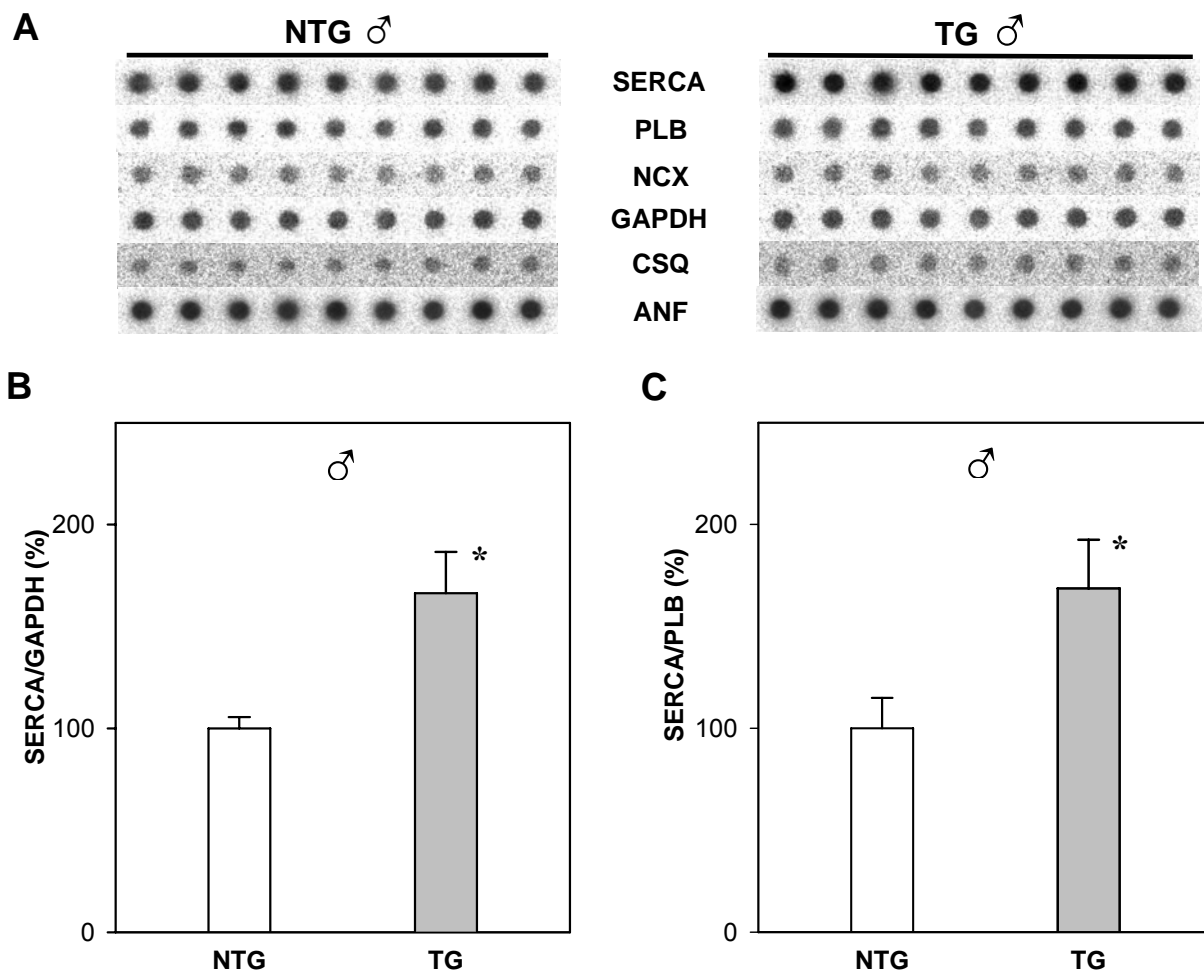


Abbildung 3.13. Quantitative Dot Blot Analyse atrialer RNA-Spiegel für männliche nicht-transgene (NTG) und SERCA2-transgene (TG) Ratten der Linie 1167 Abbildung A zeigt Autoradiogramme von Dot Blots mit Proben aus dem linken Vorhof für männliche TG und NTG, die mit entsprechend spezifischen ^{32}P -markierten DNA-Sonden für SR Ca^{2+} -ATPase (SERCA), Phospholamban (PLB), $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX), GAPDH, Calsequestrin (CSQ) und atriales natriuretisches Peptid (ANF) detektiert wurden. Pro Dot wurden 3 μg RNA aufgetragen. In Abbildung B ist die zugehörige Dot Blot-Analyse der linksatrialen RNA-Spiegel dargestellt. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ der auf GAPDH-mRNA normierten SERCA-mRNA-Werte (B) sowie des SERCA-mRNA/PLB-mRNA-Quotienten (C). Pro Gruppe wurden insgesamt je zwölf Versuchstiere analysiert. * $p < 0.05\%$

Normiert auf die GAPDH-mRNA-Werte ergaben sich für TG im Vergleich zu NTG um +66% höhere SERCA2-mRNA-Spiegel. Normiert auf den PLB-mRNA-Gehalt betrug der Unterschied +68% (**Abb. 3.14 B**). Wie für den linken Ventrikel fanden sich auch für das Vorhofmyokard keine Unterschiede zwischen TG und NTG für die mRNA-Spiegel von NCX, CSQ und ANF.

3.3.3. Kardiales SERCA2- und Phospholamban-Protein

Um herauszufinden, ob die gesteigerte Expression von SERCA2a-mRNA auch zu einer verstärkten Translation und damit zu einem erhöhten linksventrikulären SERCA2-Proteingehalt führt, wurden semiquantitative Western Blot-Analysen unter Verwendung eines SERCA2-spezifischen Antiserums durchgeführt. Für diese Untersuchungen wurden enzymatisch isolierte Kardiomyozyten von je 4 adulten NTG und TG genutzt. Wie in **Abb. 3.14** zu sehen ist, war das immunreaktive SERCA2-Signal in allen untersuchten Proben von TG stärker als das entsprechende Signal von NTG. Verglichen mit NTG ergab die densitometrische Quantifizierung einen um 24% erhöhten SERCA2-Proteingehalt in TG.

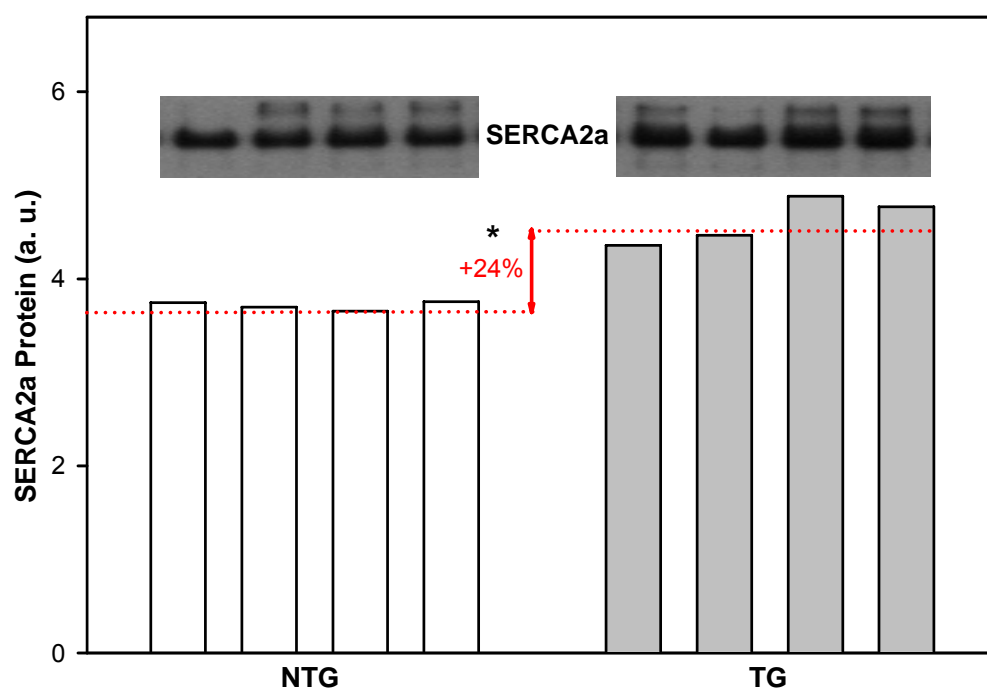


Abbildung 3.14. Western Blot-Analyse von SERCA2a Proteinspiegeln in adulten isolierten Kardiomyozyten von nicht-transgenen (NTG) und SERCA2-transgenen Ratten (TG). Kardiomyozyten von je 4 TG und NTG wurden enzymatisch isoliert und pro Tier die kardialen SERCA2-Proteinspiegel vierfach bestimmt. Die Insets zeigen für jeweils ein nicht-transgenes (NTG) und ein transgenes (TG) Tier einen repräsentativen Western Blot einer solchen Vierfachbestimmung. Darunter ist die zugehörige quantitative Analyse der Vierfachbestimmungen für je 4 Tiere pro Gruppe dargestellt. Pro Bahn wurden 10 µg Protein aufgetragen. a.u. - arbitrary units; * $p < 0.05$

Eine zusätzliche Quantifizierung des Modulatorproteins Phospholamban in linksventrikulären Membranpräparaten mittels PLB-ELISA ergab im Gegensatz zu SERCA2-Protein keine signifikanten Unterschiede zwischen NTG und TG (**Abb. 3.15**).

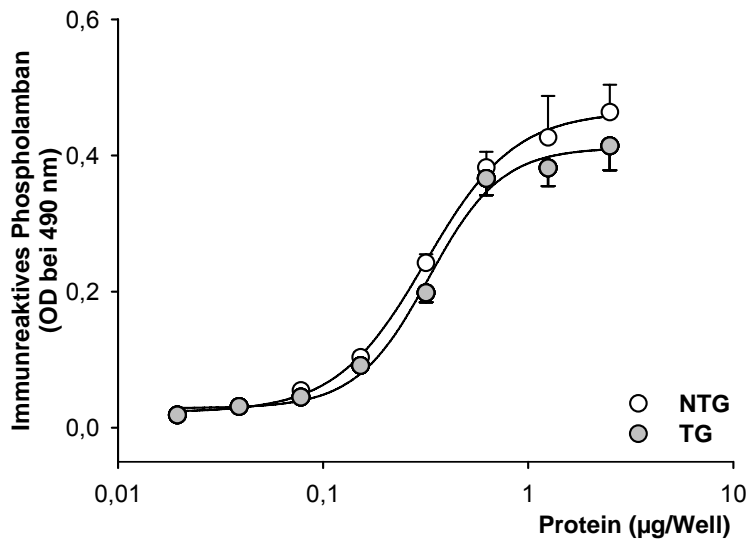


Abbildung 3.15. Linksventrikuläre immunreaktive Phospholambanspiegel in Membranpräparaten von nicht-transgenen (NTG) und SERCA2-transgenen (TG) Ratten. Die Bestimmung wurde für jeweils 5 männliche TG und NTG mit einem Phospholamban-ELISA durchgeführt. $\bar{x} \pm \text{SEM}$, OD – optische Dichte (s. a. Methoden 2.4.10).

3.3.4. SERCA2a-katalysierter Ca^{2+} -Transports *in vitro*

3.3.4.1. Ca^{2+} -Abhängigkeit

Um zu überprüfen, ob durch die beobachtete moderate Überexpression des SR Ca^{2+} -ATPase-Proteins funktionell die Ca^{2+} -Transportaktivität des SR verändert wird, wurde in linksventrikulären Homogenaten von weiblichen und männlichen SERCA2-transgenen und nicht-transgenen Ratten die Oxalat-stimulierte SR Ca^{2+} -Aufnahme vergleichend bei unterschiedlichen freien Ca^{2+} -Konzentrationen gemessen. **Abb. 3.16** zeigt das Ergebnis dieser Untersuchungen.

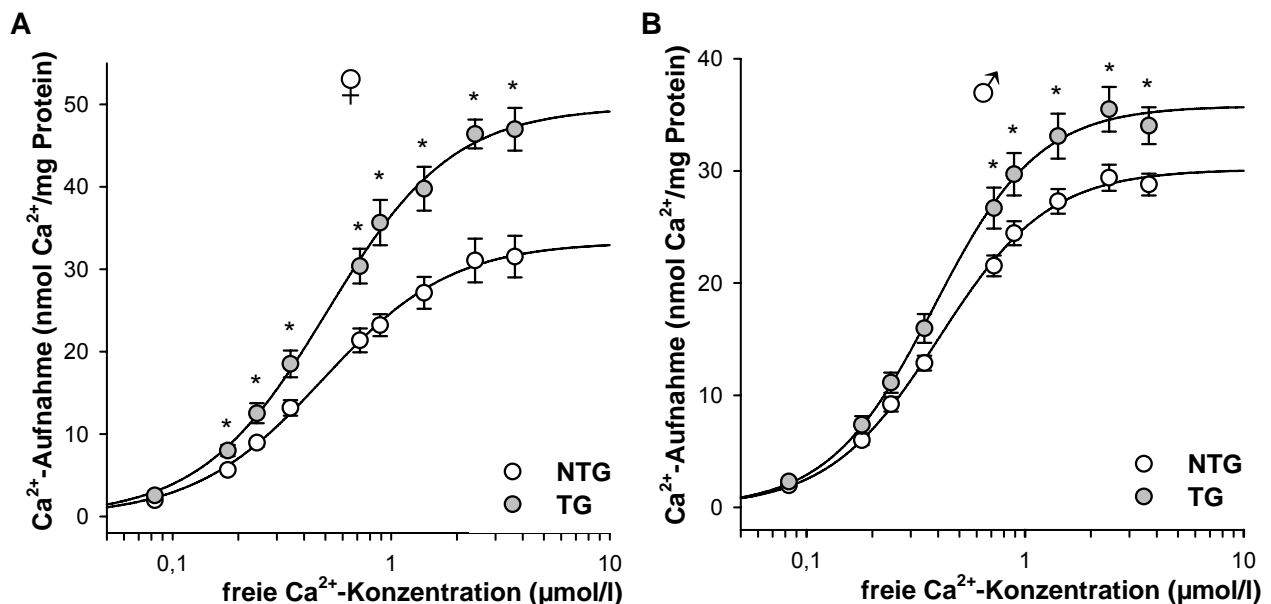


Abbildung 3.16. Oxalat-stimulierte SERCA2a-katalysierte Ca^{2+} -Aufnahme in linksventrikulären Homogenaten SERCA2-transgener und nicht-transgener Ratten (NTG) bei unterschiedlichen freien Ca^{2+} -Konzentrationen. (A) weibliche, (B) männliche Ratten. Die Herzproben männlicher Tiere stammten von scheinoperierten Kontrollratten eines separaten Projekts der AG Dr. Vetter, denen 6 Wochen zuvor unter Narkose und künstlicher Beatmung transient ein Pneumothorax gesetzt worden war. Die Ca^{2+} -Aufnahme wurde 2 min nach Reaktionsstart gestoppt. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ von je 6 Tieren pro Gruppe. * $p < 0,05$ versus NTG.

Für alle untersuchten Gruppen stieg die Ca^{2+} -Transportgeschwindigkeit bei wachsender Ca^{2+} -Konzentration kontinuierlich an, so dass sich bei semilogarithmischer Darstellung eine sigmoidale Abhängigkeit ergab. Bei einer freien Ca^{2+} -Konzentration von $3,68 \mu\text{M}$ wurden sowohl bei NTG als auch bei TG beiderlei Geschlechts nahezu maximale Ca^{2+} -Transportraten erreicht. Der beste Fit dieser nichtlinearen Abhängigkeit wurde für alle Gruppen mit der folgenden Gleichung erzielt:

$$V = \frac{V_{\max} - V_{\min}}{1 + 10^{(\log EC_{50} - [\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}})h}}$$

Dabei handelt es sich um ein sg. „Vier-Parameter-Logistikmodell“ mit V - SERCA-katalysierte Ca^{2+} -Aufnahme in $\text{nmol Ca}^{2+}/\text{mg Protein pro 2 min}$, V_{\max} - maximale Ca^{2+} -Aufnahme, V_{\min} - minimale Ca^{2+} -Aufnahme, $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ - freie Ca^{2+} -Konzentration ($\mu\text{mol/l}$), h - Hill-Koeffizient, EC_{50} - $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{free}}$ bei der die halbmaximale SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Aufnahmegeschwindigkeit erreicht wird.

Tab. 3.2 zeigt die dabei ermittelten kinetischen Parameter für den SERCA2-katalysierten Ca^{2+} -Transport von NTG und TG beiderlei Geschlechts. Die maximale Ca^{2+} -Transportrate lag bei weiblichen TG um 49% und bei männlichen TG um 19% über den entsprechenden Werten der nicht-transgenen Vergleichstiere entsprechenden Geschlechts. Die EC_{50} -Werte als Maß der Ca^{2+} -Affinität des retikulären Ca^{2+} -Transportsystems unterschieden sich zwischen NTG und TG sowohl bei weiblichen als auch männlichen Tieren nicht (**Tab. 3.2**).

Tabelle 3.2 Kalkulierte kinetische Parameter des SERCA2-katalysierten Ca^{2+} -Transports in linksventrikulären Homogenaten weiblicher und männlicher nicht-transgener (NTG) und SERCA2-transgener Ratten (TG)

Gruppe	V_{\max} ($\text{nmol Ca}^{2+}/\text{mg Protein}/2 \text{ min}$)	$EC_{50}(\text{Ca}^{2+})$ (μM)
Weibliche Tiere		
NTG	$33,3 \pm 0,6$	$0,49 \pm 0,02$
TG	$49,7 \pm 1,2 *$	$0,51 \pm 0,03$
Männliche Tiere		
NTG	$30,0 \pm 0,5$	$0,41 \pm 0,02$
TG	$35,8 \pm 0,7 *$	$0,38 \pm 0,01$

$\bar{x} \pm \text{SEM}$ für je 6 Tiere pro Gruppe. * $p < 0,05$ vs. gleichgeschlechtliche NTG.

3.3.4.2. Stimulierung durch Proteinkinase A

Es ist allgemein bekannt, dass der SERCA2-katalysierte kardiale Ca^{2+} -Transport des SR der Regulation durch reversible Phosphorylierung des Modulatorproteins Phospholamban unterliegt. Deshalb wurde geprüft, ob diese Regulation im Myokard SERCA2-transgener Ratten mit gesteigerter Ca^{2+} -Transportaktivität verändert ist. Zu diesem Zweck wurde der Oxalat-stimulierte Ca^{2+} -Transport in linksventrikulären Homogenaten von männlichen NTG und TG nach Phosphorylierung mit katalysiert.

lytischer Untereinheit der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) gemessen. Die Analysen erfolgten bei zwei unterschiedlichen submikromolaren freien Ca^{2+} -Konzentrationen. Vergleichend wurden die basalen Ca^{2+} -Transportaktivitäten ohne PKA-Zusatz bestimmt. Um mögliche endogene PKA-Aktivitäten in den untersuchten Ansätzen komplett zu unterdrücken, wurden letztere Messungen in Gegenwart eines Überschusses an synthetischem PKA-Inhibitorpeptid (PKI) durchgeführt.

Abb. 3.17 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Bei 0,18 und 0,50 μM Ca^{2+} im Ansatz und fehlender *in vitro*-Phosphorylierung von Phospholamban (+PKI) lagen die gemessenen Ca^{2+} -Transportgeschwindigkeiten von TG um 48,5 bzw. 42,4% über den entsprechenden Werten von NTG. Unter phosphorylierenden Bedingungen in Gegenwart von 2 μM katalytischer Untereinheit von PKA verringerte sich dieser Unterschied. So konnte bei 0,18 μM freiem Ca^{2+} zwischen TG und NTG kein signifikanter Unterschied beobachtet werden.

Bei 0,5 μM Ca^{2+} betrug der Unterschied der gemessenen Ca^{2+} -Transportraten zwischen TG und NTG lediglich 19,7%. Das könnte ein indirekter Hinweis auf eine fehlende Phospholambankontrolle von Ca^{2+} -ATPasen in der Membran des kardialen SR sein, die vom SERCA2-Transgen kodiert werden. Dafür spricht auch, dass einer 1,4- bis 1,6-fachen *in vitro*-Stimulierbarkeit des SR Ca^{2+} -Transportes von NTG bei TG lediglich eine 1,2-fache Steigerung gegenüber steht.

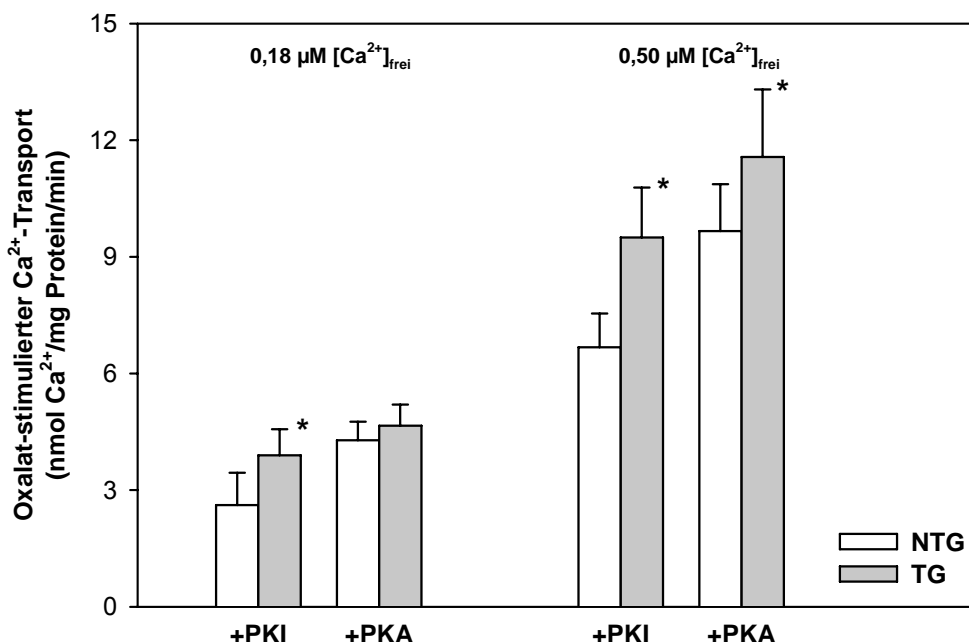


Abbildung 3.17. Oxalat-stimulierter Ca^{2+} -Transport in Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulums linksventrikulärer Homogenate von nicht-transgenen (NTG) und SERCA2-transgenen (TG) Ratten in Gegenwart von 2 μM katalytischer Untereinheit der Proteinkinase A (+PKA) oder 10 μM Inhibitorpeptid von PKA (+PKI). Die Messungen unter phosphorylierenden und nichtphosphorylierenden Bedingungen wurden bei submikromolaren freien Ca^{2+} -Konzentration von 0,18 und 0,5 μM durchgeführt. $\bar{X} \pm \text{SEM}$ für je 5 männliche TG und NTG. * $p < 0.05$ verglichen zum dazugehörigen Wert für NTG (s. auch Methoden unter 2.4.6.1)

3.3.4.3. Hemmung durch Thapsigargin

Das Alkaloid Thapsigargin ist ein hochspezifischer Hemmstoff aller Ca^{2+} -ATPasen des sarko-(endo)plasmatischen Retikulums (76). Die Interaktion zwischen Hemmstoff und Ca^{2+} -ATPase erfolgt mit einer Stöchiometrie von 1:1 (25;104) und ist grundsätzlich irreversibel (58;92).

Da die Ca^{2+} -ATPasen des kardialen SR in NTG ausschließlich von endogenen SERCA2-Gen kodiert werden, die Kodierung im Myokard von TG aber durch das endogene SERCA2-Gen und das SERCA2-Transgen erfolgt, wurde die Hemmwirkung von Thapsigargin auf den Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transport in linksventrikulären Homogenaten von NTG und TG vergleichend untersucht.

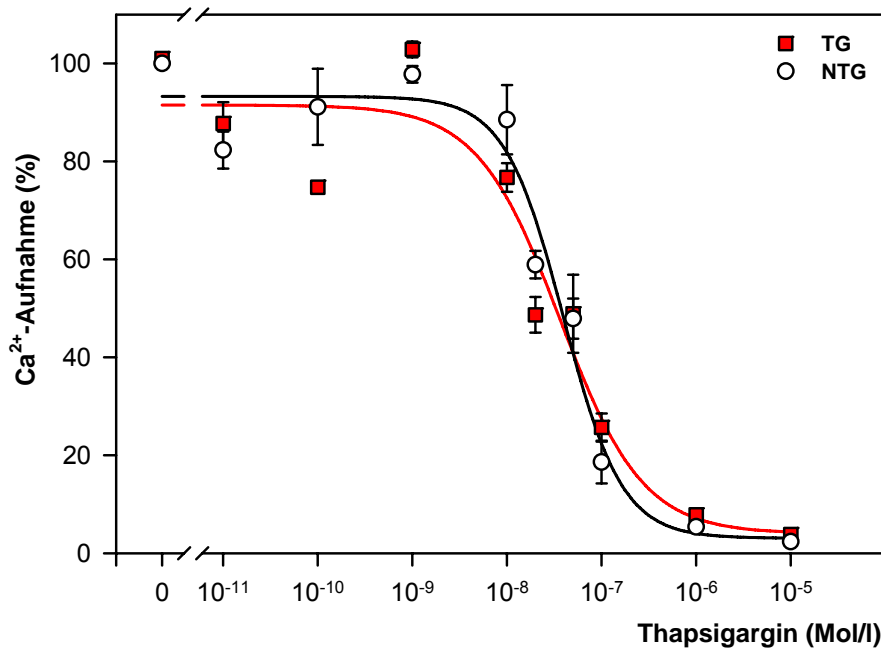


Abbildung 3.18 zeigt praktisch identische konzentrationsabhängige Hemmwirkungen von Thapsigargin auf den Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transport in linksventrikulären Homogenaten von nicht-transgenen (NTG) und SERCA2-transgenen (TG) Ratten. Die IC_{50} -Werte für die inhibitorische Wirkung von Thapsigargin bei TG und NTG unterschieden sich nicht ($3,55 \pm 1,56$ vs. $3,96 \pm 0,89$ nM bei NTG). $\bar{x} \pm \text{SEM}$ für 4 NTG und 3 TG (s. a. Methoden unter 2.4.7.1).

3.3.4.4. Einfluss von Ruthenium-Rot

Mit der Methode des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transportes wird ausschließlich der Netto-Transport von Ca^{2+} in SR-Vesikel gemessen, der sich aus der Differenz von SERCA2-katalysiertem Ca^{2+} -Transport in die Vesikel und Ca^{2+} -Efflux aus den Vesikeln ergibt. Prinzipiell könnte deshalb der erhöhte Oxalat-stimulierte Ca^{2+} -Transport transgener Tiere auch durch verminderten Ca^{2+} -Efflux über Ca^{2+} -Freisetzungskanäle zustande kommen, ohne dass der SERCA2-vermittelte Ca^{2+} -Transport gesteigert ist. Um zu das zu überprüfen, wurden vergleichende Untersuchungen des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transportes in linksventrikulären Homogenaten in Gegenwart und Abwesenheit von 20 μM Ruthenium-Rot durchgeführt. Ruthenium-Rot ist ein bekannter Hemmstoff des Ca^{2+} -

Effluxes über Ca^{2+} -Freisetzungskanäle des SR vom Ryanodinrezeptortyp (29). Wie **Abb. 3.19** zeigt, wurden in Gegenwart von Ruthenium-Rot sowohl bei transgenen als auch nicht-transgenen Tieren um $68,0 \pm 3,7$ bzw. $66,3 \pm 2,2\%$ gesteigerte Ca^{2+} -Transportwerte gemessen.

Entsprechend wiesen TG im Vergleich zu NTG in Gegenwart von Ruthenium-Rot eine um $+38,4\%$ erhöhte Ca^{2+} -Transportaktivität auf. Der entsprechende Wert ohne Ruthenium-Rot im Ansatz betrug $38,1\%$. Das zeigt, dass der Ruthenium-Rot-sensitive Efflux von Ca^{2+} aus kardialen SR-Vesikeln von TG und NTG identisch ist und somit nicht für die unterschiedlichen Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transportaktivitäten von TG und NTG verantwortlich sein kann.

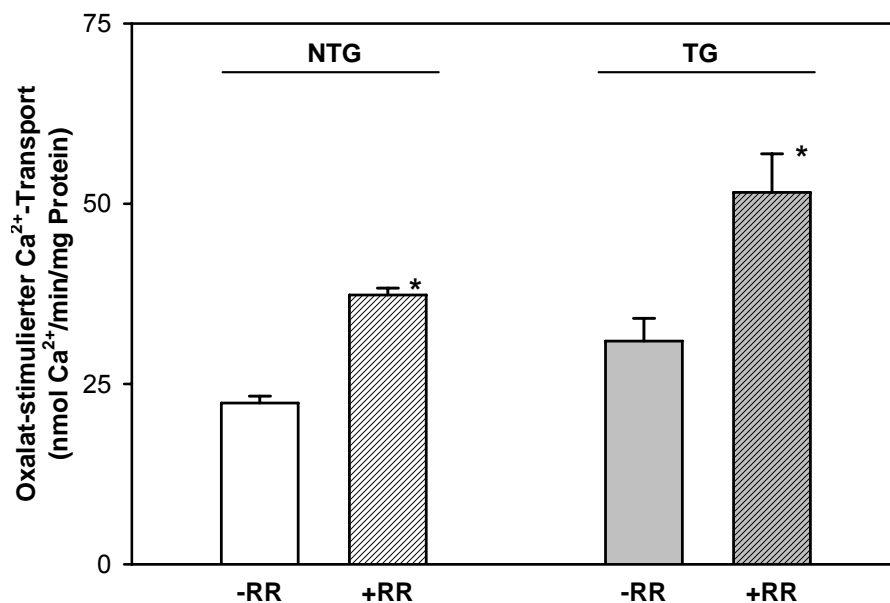


Abbildung 3.19. Wirkung von Ruthenium-Rot auf die Oxalat-stimulierte Ca^{2+} -Transportrate des sarkoplasmatischen Retikulums von nicht-transgenen (NTG) und SERCA2-transgenen (TG) Ratten. Die Messungen in linksventrikulären Homogenaten wurden ohne (-RR) und mit $20 \mu\text{M}$ Ruthenium-Rot (+RR) bei einer freien Ca^{2+} -Konzentration von $3,86 \mu\text{M}$ durchgeführt. $\bar{x} \pm \text{SD}$ für jeweils 8 männliche TG und NTG. * $p < 0,05$ verglichen zum entsprechenden Kontrollwert ohne Zusatz von RR (s. auch Methoden unter 2.4.7.1).

3.3.5. Sarkolemmale Na^+ - Ca^{2+} -Austauscheraktivität

Bei der Senkung der Ca^{2+} -Konzentration in der Diastole konkurrieren der sarkolemmale Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher und die SR Ca^{2+} -ATPase um zytosolisches Ca^{2+} (8). Außerdem ist bekannt, dass sich die SERCA-Expression und -Aktivität im Myokard reziprok zur Expression und Funktion des Na^+ / Ca^{2+} -Austauschers verhalten kann (126;136). Aus diesem Grund wurde geprüft, ob eine Zunahme der SR Ca^{2+} -Transportaktivität im Herzen transgener Tiere die Na^+ / Ca^{2+} -Austauscheraktivität beeinflusst. Zu diesem Zweck wurde der Na^+ -abhängige Ca^{2+} -Transport sarkolemmaler Membranvesikel von NTG und TG untersucht. Wie **Abb. 3.20** zeigt, konnten keine signifikanten NCX-Aktivitätsunterschiede zwischen SERCA2-überexprimierenden TG und NTG mit normaler SERCA2-Expression festgestellt werden.

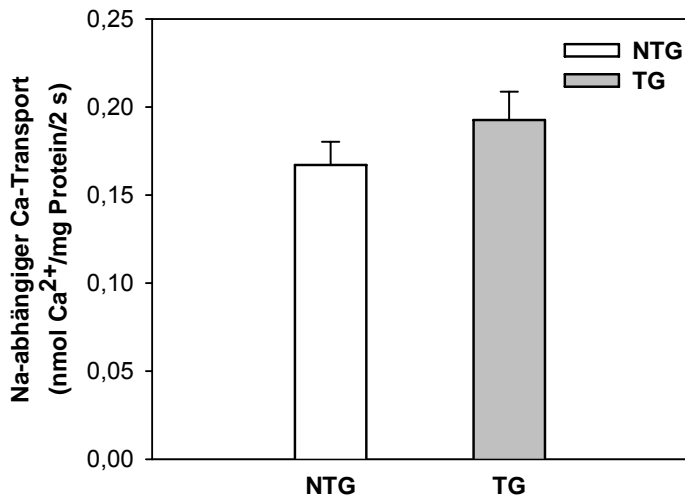


Abbildung 3.20. Na⁺-abhängiger Ca²⁺-Transport in Herzmembranpräparaten männlicher nicht-transgener (NTG) und SERCA2-transgener (TG) Ratten. Der sarkolemme Na⁺/Ca²⁺-Austausch wurde als initialer Na⁺-Gradient getriebener ⁴⁵Ca-Transport gemessen. Die Reaktion wurde nach 2 s mit einer speziellen Start-Stopp-Apparatur gestoppt. Der Reaktionsansatz enthielt 50 μM Ca²⁺ und 2 μM Valinomycin. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ für je 6 Tiere pro Gruppe (s. a. Methoden unter 2.4.7.2)

3.3.6. Isoliert perfundierte Herzen

3.3.6.1. Linksventrikuläre Kontraktilität und Relaxation

Die linksventrikulären Kontraktionsparameter isolierter isovolumetrisch kontrahierender, nach Langendorff retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen und nicht-transgenen Versuchstieren wurden vergleichend untersucht, um einen möglichen Einfluss einer SERCA2-Überexpression auf die Herzfunktion *ex vivo* zu untersuchen. Die Messungen an den spontan schlagenden Herzen erfolgten bei konstantem Koronarfluss von 10 ml/min. Nach einer Einschlagzeit von ca. 20 min wurde der linksventrikuläre enddiastolische Druck über den im linken Ventrikel befindlichen Ballonkatheter auf 8 mmHg eingestellt und der linksventrikuläre Druck kontinuierlich registriert. **Abb. 3.21** zeigt repräsentative linksventrikuläre Druckkurven sowie deren erste Ableitungen für NTG und TG.

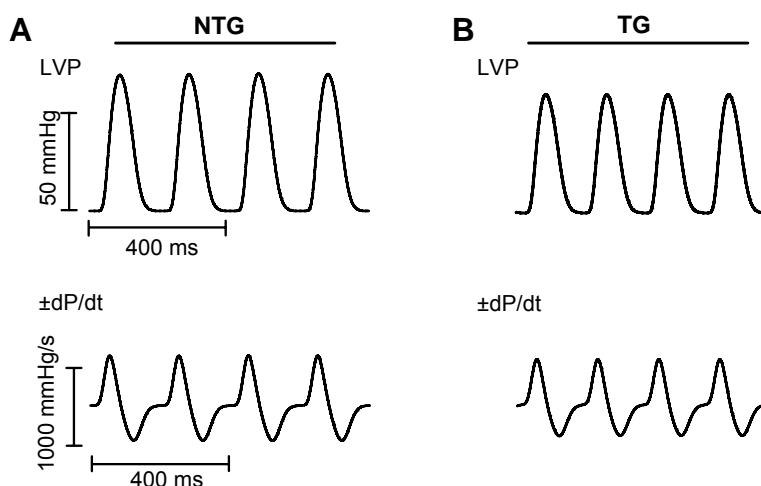


Abbildung 3.21. Registrierte linksventrikuläre Druckkurven und darunter deren 1. Ableitung je eines isovolumetrisch kontrahierenden isolierten Herzens einer nicht-transgenen (A) und einer SERCA2-transgenen (B) männlichen Ratte. Die spontan schlagenden Herzen wurden bei 37°C flusskonstant mit oxygenierter Blutersatzlösung retrograd perfundiert. Die Druckänderungen wurden mit Hilfe eines flüssigkeitsgefüllten Kunststoffballons, der über einen Katheter mit einem Druckaufnehmer verbunden war, digital registriert. Die Vorlast wurde bei 8 mmHg fixiert.

Tab. 3.3. zeigt die aus den registrierten Druckkurven bestimmten Funktionsparameter isolierter Herzen von NTG und TG. Für die Frequenz der spontan schlagenden Herzen, die normierten Druckanstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten, den Quotienten $-dP/dt_{\max}/+dP/dt_{\max}$, die diastolischen Zeitparameter RT_{50} und Tau ergaben sich zwischen SERCA2-transgenen und nicht-transgenen Herzen keine Unterschiede.

Tabelle 3.3. Funktionelle Charakteristik isovolumetrisch kontrahierender, nach Langendorff perfundierter Herzen SERCA2-transgener (TG) und nicht-transgener (NTG) Ratten.

Parameter	NTG (n=5)	TG (n=7)
BW (g)	429,3 ± 8,3	446,7 ± 35,1
Spontane Herzfrequenz (1/s)	222,0 ± 7,4	228,9 ± 5,6
LVEDP (mmHg)	7,9 ± 0,2	7,9 ± 0,2
Koronarfluss (ml/min)	10,5 ± 0,2	10,5 ± 0,2
dLVP (mm Hg)	70,4 ± 2,0	65,3 ± 2,1
+dP/dt _{max} (mm Hg/s)	1461,5 ± 30,0	1328,3 ± 37,5
-dP/dt _{max} (mm Hg/s)	-966,1 ± 23,1	-921,6 ± 37,0
-dP/dt _{max} /+dP/dt _{max}	0,66 ± 0,01	0,66 ± 0,02
+dP/dt _{max} /LVDP _{+dP/dtmax} (1/s)	45,3 ± 0,5	44,3 ± 0,3
-dP/dt _{max} /LVDP _{-dP/dtmax} (1/s)	-26,7 ± 0,7	-25,8 ± 0,7
RT ₅₀ (ms)	56,8 ± 0,9	54,9 ± 1,1
τ (ms)	27,8 ± 1,1	27,8 ± 1,0

n - Anzahl der untersuchten Tiere, BW, Körpergewicht, LVEDP - linksventrikulärer enddiastolischer Ballondruck, dLVP - maximal entwickelter linksventrikulärer Druck, +dP/dt_{max} - maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit, -dP/dt_{max} - maximale Druckabfallgeschwindigkeit, RT₅₀ - Zeit bis zum Druckabfall auf 50% dLVP, τ - Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation nach Erreichen von -dP/dt_{max}

Im Gegensatz zu *in vivo* Bedingungen, sind isolierte Herzen nicht innerviert. Um an diesen Herzen eine β-adrenerge Stimulation zu simulieren, wurden diese mit steigenden Isoproterenol-Konzentrationen perfundiert. Ziel war es, das Isoproterenol-bedingte chronotrope, ino- und lusitrope Antwortverhalten nicht-transgener und SERCA2-transgener Herzen vergleichend zu untersuchen, da für diese Effekte die Ca²⁺-Transportaktivität des SR eine zentrale Rolle spielt. **Abb. 3.22** zeigt registrierte linksventrikuläre Druckkurven eines isolierten transgenen bzw. nicht-transgenen Herzens, dessen oxygenierte Blutersatzlösung 20 nM Isoproterenol enthielt. Im Vergleich zu der gezeigten Registrierung in **Abb. 3.21** ist eine deutliche Zunahme der entwickelten Druckamplitude, sowie der maximalen Druckanstiegs- und Abfallgeschwindigkeiten zu erkennen.

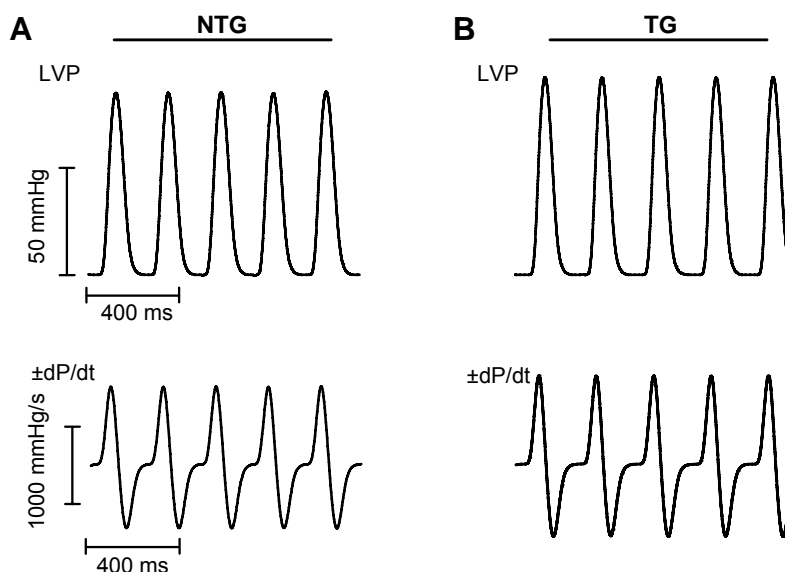


Abbildung 3.22. Repräsentative linksventrikuläre Druckkurven und dazugehörige 1. Ableitung β -adrenerg stimulierter isolierter Herzen einer nicht-transgenen (A) und einer SERCA2-transgenen (B) männlichen Ratte. Die spontan schlagenden, isovolumetrisch kontrahierenden Herzen wurden bei 37°C flusskonstant mit 20 nM Isoproterenol in der oxygenierten Blutersatzlösung perfundiert. Die Druckänderungen wurden mit Hilfe eines flüssigkeitsgefüllten Kunststoffballons, der über einen Katheter mit einem Druckaufnehmer verbunden war, digital registriert. Die Vorlast wurde bei 8 mmHg fixiert.

3.3.6.2. Chronotrope Isoproterenol-Wirkung

Aus dem Vergleich der Druckkurven in **Abb. 3.22** und **3.21** ist auch die deutlich positiv chronotrope Wirkung von Isoproterenol sowohl in Herzen von TG als auch in NTG zu erkennen. Wie zu erwarten, war die positiv chronotrope Wirkung von Isoproterenol dosisabhängig. **Abb. 3.23** zeigt entsprechende Dosis-Wirkungs-Kurven für TG und NTG. Sowohl ohne Isoproterenol als auch bei verschiedenen Isoproterenolkonzentrationen fanden sich keine signifikanten Schlagfrequenzunterschiede zwischen TG und NTG. Bei 20 nM Isoproterenol ergab sich für TG und NTG eine Steigerung der spontanen Herzfrequenz von $+15,8 \pm 4,0$ bzw. $+26,7 \pm 3,1\%$.

3.3.6.3. Inotrope Isoproterenol-Wirkung

Abb. 3.24 zeigt die Wirkung steigender Isoproterenolkonzentration auf den maximal entwickelten linksventrikulären Druck (dLVP). Die positiv inotrope Isoproterenolwirkung war im Vergleich zu NTG bei allen untersuchten Konzentrationen in Herzen von TG deutlich stärker ausgeprägt. So wurden bei 20 nM Isoproterenol in Herzen von TG um $57,6 \pm 6,1\%$ und in Herzen von NTG um $33,7 \pm 6,2\%$ erhöhte dLVP-Werte gemessen. Die aus den gefitteten Kurven errechnete maximale dLVP-Zunahme betrug bei TG $+54,2 \pm 4,5\%$. Bei NTG waren es $+36,5 \pm 3,0\%$ ($p < 0,05$). Die EC_{50} -Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven in **Abb. 3.24** unterschieden sich nicht signifikant voneinander ($2,61 \pm 0,49$ nM in NTG vs. $2,45 \pm 0,39$ nM in TG).

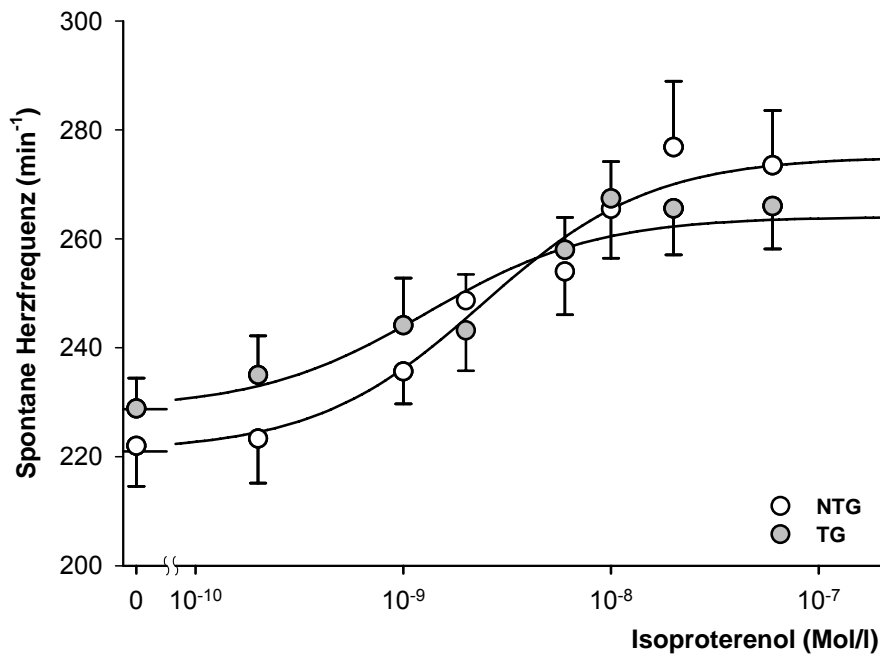


Abbildung 3.23. Wirkung ansteigender Isoproterenolkonzentrationen auf die spontane Herzfrequenz isovolumentrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen (TG) und nicht-transgenen (NTG) männlichen Ratten. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ für 5 NTG und 7 TG (s. a. Methoden unter 2.5.1).

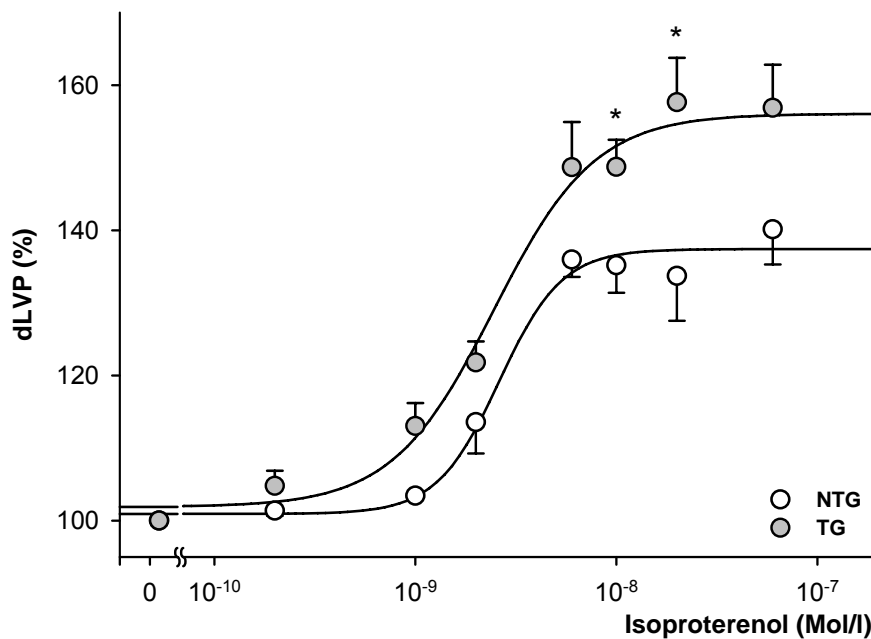


Abbildung 3.24. Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf den maximal entwickelten linksventrikulären Druck (dLVP) isovolumentrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen (TG) und nicht-transgenen (NTG) männlichen Ratten. Relative Veränderungen sind auf den Basalwert der jeweiligen Gruppe normiert. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ für 5 NTG und 7 TG, * $p < 0.05$ vs. NTG (s. a. Methoden unter 2.5.1).

Wie Abb. 3.25 zeigt, ergaben sich auch für die maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeiten bei Stimulation mit unterschiedlichen Isoproterenolkonzentrationen ähnliche Veränderungen wie bei dLVP. So nahm die maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit ($+dP/dt_{\text{max}}$) in Herzen von TG mit

steigender Isoproterenolkonzentrationen stärker zu als bei NTG. Die maximale Zunahme des $+dP/dt_{\max}$ -Wertes betrug bei TG $+96,7 \pm 6,1 \%$ und bei NTG $+71,6 \pm 6,1\%$. Wie im Falle der Dosis-Wirkungs-Kurven für dLVP wurden auch für die EC_{50} -Werte der beiden Kurven in **Abb. 3.25** keine signifikanten Unterschiede gefunden ($3,25 \pm 0,62$ in NTG vs. $3,29 \pm 0,51$ in TG).

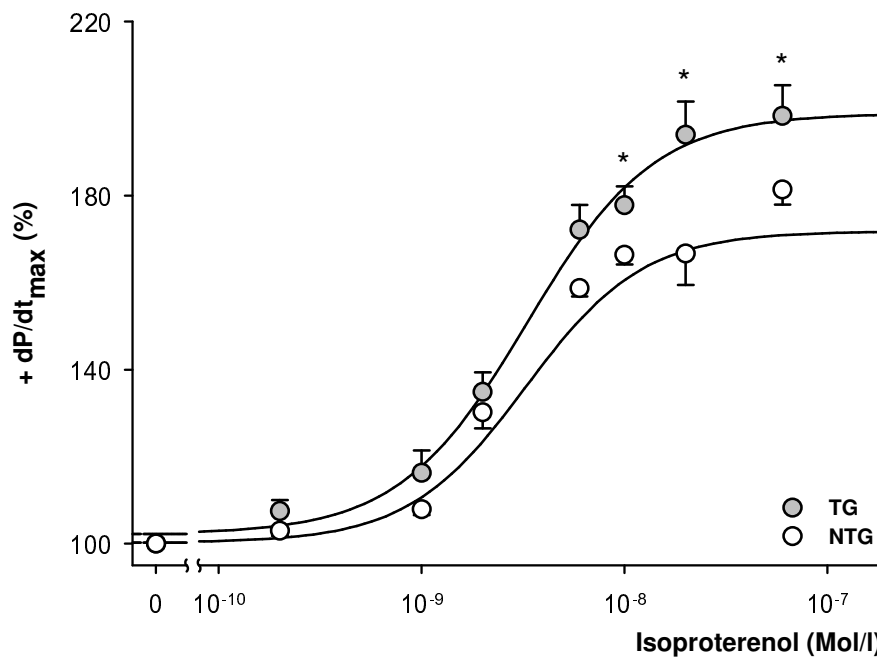


Abbildung 3.25. Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($+dP/dt_{\max}$) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen (TG) und nicht-transgenen (NTG) männlichen Ratten. Relative Veränderungen sind auf den Basalwert der jeweiligen Gruppe normiert. $\bar{x} \pm SEM$ für 5 NTG und 7 TG. * $p < 0,05$ vs NTG (s. a. Methoden unter 2.5.1).

3.3.6.4. Lusitrope Isoproterenol-Wirkung

Um die Isoproterenolwirkung auf den Relaxationsprozess von Herzen mit und ohne SERCA2-Überexpression vergleichend zu untersuchen, wurden zusätzlich die maximalen Druckabfallgeschwindigkeiten ($-dP/dt_{\max}$) sowie die Zeitparameter RT_{50} und Tau gemessen. **Abb. 3.26** zeigt die ermittelten Dosis-Wirkungs-Kurven für die maximale Druckabfallgeschwindigkeit isolierter SERCA2-transgener und nicht-transgener Herzen. Die Isoproterenol abhängige Steigerung der maximalen Druckabfallgeschwindigkeit war sowohl bei TG als auch bei NTG deutlich stärker ausgeprägt als die unter 3.3.6.3 beobachteten Isoproterenolwirkungen auf die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit. Entsprechend betrug die maximale Isoproterenolwirkung für den $-dP/dt_{\max}$ -Wert von TG $+128,1 \pm 9,4\%$ und von NTG $96,3 \pm 6,1\%$. Die Potenz von Isoproterenol unterschied sich jedoch zwischen TG und NTG nicht, was durch die ermittelten EC_{50} -Werte von $2,92 \pm 0,50$ nM in NTG und $2,69 \pm 0,42$ nM in TG belegt wird.

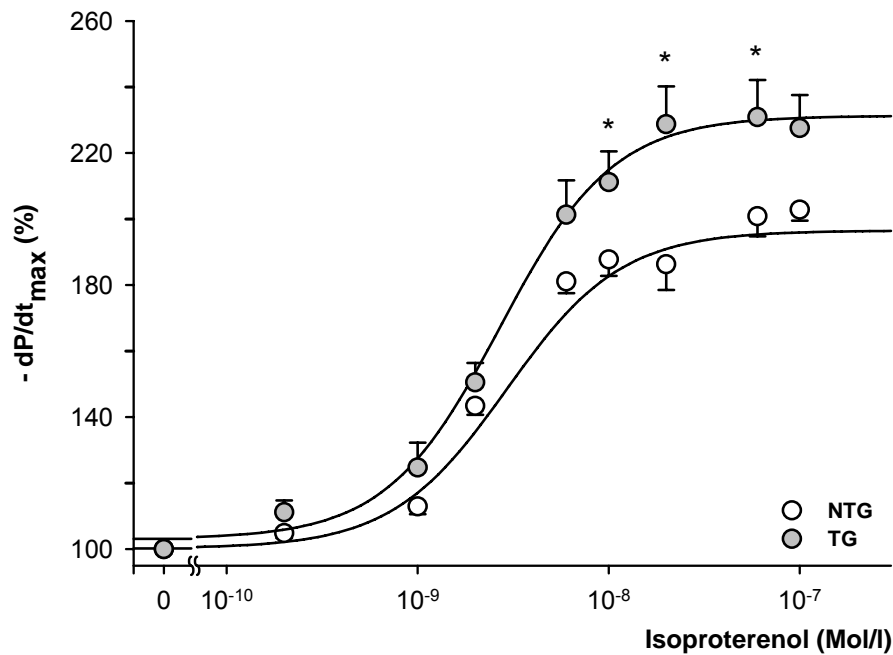


Abbildung 3.26. Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die maximale Druckabfallgeschwindigkeit ($-dP/dt_{\max}$) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen (TG) und nicht-transgenen (NTG) männlichen Ratten. Relative Veränderungen sind auf den Basalwert der jeweiligen Gruppe normiert. $\bar{X} \pm \text{SEM}$ für 5 NTG und 7 TG. * $p < 0.05$ vs NTG (s. a. Methoden unter 2.5.1).

Die Beschleunigung der Druckabfallgeschwindigkeit unter Isoproterenol war begleitet von einer dosisabhängigen Verkürzung der halbmaximalen Relaxationszeit RT_{50} . Die entsprechenden Dosis-Wirkungs-Kurven für Herzen von TG und NTG zeigt **Abb. 3.27**. Auffällig war, dass die halbmaximale Relaxationszeit bei niedrigeren Isoproterenolkonzentrationen zwischen 10^{-10} und 10^{-8} bei TG signifikant kürzer war als bei NTG, obwohl der bestehende Unterschied ohne Isoproterenol nicht signifikant unterschiedlich war ($56,8 \pm 0,91$ ms in NTG vs. $54,9 \pm 1,15$ ms in TG). Bei Isoproterenolkonzentrationen oberhalb von 10^{-8} unterschieden sich die RT_{50} -Werte von TG und NTG nicht signifikant voneinander. Aufgrund der in **Abb. 3.27** zu sehenden leichten Linksverschiebung der Dosis-Wirkungs-Kurve für TG ergab sich für die ermittelten EC_{50} -Werte von TG ($2,06 \pm 0,24$ nM) und NTG ($2,93 \pm 0,37$ nM) zwar ein geringfügiger Unterschied, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($p=0,065$).

Da die halbmaximale Relaxationszeit die erste Phase des Relaxationsprozesses charakterisiert, ist die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (Tau) ein Zeitmaß für die späte Phase der isovolumetrischen Relaxation ab Zeitpunkt des Erreichens des $-dP/dt_{\max}$ -Wertes. Wie **Abb. 3.28** zeigt, verminderte sich Tau in Herzen von TG und NTG unter Isoproterenol dosisabhängig. Sowohl ohne Isoproterenol als auch bei sehr niedrigen Isoproterenolkonzentrationen unterschieden sich die Tau-Werte von TG und NTG nicht signifikant voneinander. Im Gegensatz zu den beobachteten Unter-

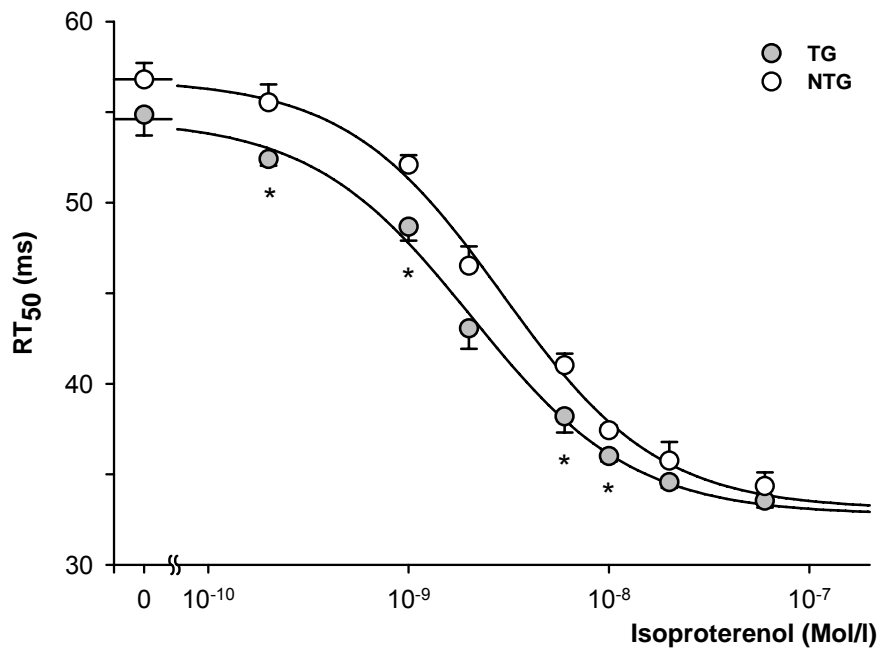


Abbildung 3.27. Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die halbmaximale Relaxationszeit (RT₅₀) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen (TG) und nicht-transgenen (NTG) männlichen Ratten. Relative Veränderungen sind auf den Basalwert der jeweiligen Gruppe normiert. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ für 5 NTG und 7 TG. * $p < 0.05$ vs NTG (s. a. Methoden unter 2.5.1).

schieden der RT₅₀-Werte verursachten hohe Isoproterenolkonzentrationen jedoch eine signifikant stärkere Senkung des Tau-Wertes bei TG als bei NTG ($16,9 \pm 0,4$ ms in TG vs. $18,5 \pm 0,5$ ms in NTG). Die EC₅₀-Werte der Dosis-Wirkungs-Kurven beider Gruppen zeigten hier ebenfalls keine Unterschiede ($2,00 \pm 0,26$ nM in TG vs. $2,17 \pm 0,41$ nM in NTG).

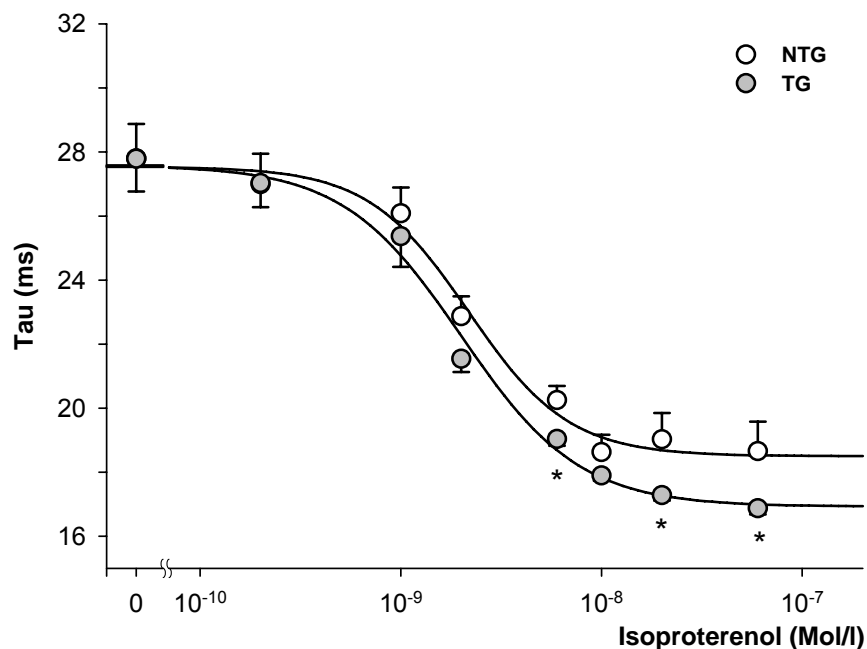


Abbildung 3.28. Wirkung ansteigender Isoproterenol-Konzentrationen auf die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (Tau) isovolumetrisch kontrahierender, retrograd perfundierter Herzen von SERCA2-transgenen (TG) und nicht-transgenen (NTG) männlichen Ratten. Relative Veränderungen sind auf den Basalwert der jeweiligen Gruppe normiert. $\bar{x} \pm \text{SEM}$ für 5 NTG und 7 TG. * $p < 0.05$ vs NTG (s. a. Methoden unter 2.5.1).

3.3.7. Linksventrikuläre Funktion *in situ*

Vergleichende hämodynamische Untersuchungen von SERCA2-transgenen und nicht-transgenen adulten männlichen Tieren mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 480 g zeigten keine signifikanten Unterschiede bezüglich des linksventrikulär entwickelten Druckes sowie der maximalen Druckanstiegs- und Druckabfallgeschwindigkeiten (Tab. 3.4). Diese Messungen wurden an narkotisierten, thorakotomierten künstlich beatmeten Versuchstieren mittels Millar Tip-Kathedertechnik durchgeführt. Obwohl die in Tab. 3.4 dargestellten Werte von TG tendenziell bis zu 16% über denen von NTG lagen, ergab eine statistische Überprüfung keine Signifikanz.

Tabelle 3.4 Linksventrikuläre Funktionsparameter narkotisierter nicht-transgener (NTG) und heterozygoter SERCA2a-transgener Ratten (TG) der Linie L1167.

Parameter	NTG (n=7)	TG (n=7)
dLVP (mm Hg)	87 ± 3	91 ± 9
dP/dt _{max} (mm Hg/s)	4934 ± 575	5193 ± 689
-dP/dt _{max} (mm Hg/s)	3125 ± 265	3615 ± 423

$\bar{x} \pm \text{SEM}$, n - Anzahl der untersuchten Tiere, dLVP, maximal entwickelter linksventrikulärer Druck; dP/dt_{max}, maximale linksventrikuläre Druckanstiegsgeschwindigkeit; -dP/dt_{max}, maximale linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeit