

4. Diskussion

Störungen der intrazellulären Ca^{2+} -Regulation in der Herzmuskelzelle sind ursächlich an Kontraktions- und Relaxationsstörungen im hypertrophierten und insuffizienten Herzmuskel beteiligt. Bei der Regulation der kardialen Ca^{2+} -Homöostase spielt die Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA2) eine wichtige Rolle. Dieses Ca^{2+} -Transportsystem leistet während der Relaxationsphase des Herzens mit ca. 90% den größten Beitrag zur Senkung der diastolischen Ca^{2+} -Konzentration und sichert damit die Bereitstellung von Ca^{2+} für die nächste Kontraktion. Störungen dieses Transportmechanismus scheinen daher funktionell am bedeutungsvollsten zu sein und sind sowohl bei tierexperimenteller Herzinsuffizienz als auch bei Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz belegt (s. Einleitung 1.2.2). Interventionen, mit denen die Ca^{2+} -Transportaktivität des SR gesteigert werden kann, sind aus diesem Grund von großem theoretischen und praktischen Interesse (s. Einleitung 1.3). Da das SR Ca^{2+} -Transportsystem jedoch Teil der komplexen kardialen Regulation und diese wiederum im komplexen *in vivo* Zusammenhang des menschlichen Organismus zu sehen ist, sind geeignete Modelle erforderlich, mit denen aus einer interventionellen Steigerung der SR- Ca^{2+} -Transportfunktion resultierende funktionelle Veränderungen im Gesamtzusammenhang des Organismus untersucht werden können. Eine Analyse des kardialen Phänotyps sollte zunächst unter normalen physiologischen Bedingungen erfolgen, damit grundlegende Erkenntnisse über Vor- und Nachteile einer gesteigerten SR Ca^{2+} -Transportaktivität im intakten Herzen gewonnen werden können. Aufbauend auf diesen Erkenntnissen kann dann untersucht werden, ob eine gesteigerte SR Ca^{2+} -Transportaktivität bzw. -reserve im gesunden Herzen unter sekundär induzierten pathologischen Bedingungen vor der Entwicklung einer kontraktile Dysfunktion schützt. Transgene Tiermodelle mit konstitutiver Überexpression von SERCA2a sind in diesem Zusammenhang von großem wissenschaftlichen Interesse. Deshalb wurde in dieser Arbeit der kardiale Phänotyp eines transgenen Rattenmodells mit kardialer SERCA2a-Überexpression charakterisiert.

4.1. Transgene Ratten als Tiermodell

Die für gentechnische Interventionen häufig genutzte primäre neonatale Herzzellkultur bzw. enzymatisch isolierte adulte Kardiomyozyten sind als isolierte Systeme aus der komplexen Regulation des Gesamtorganismus herausgelöst und nur für differenzierte Fragestellungen zugänglich. Daher bieten bisher nur Tiermodelle die Möglichkeit, interventionell hervorgerufene Veränderungen im funktionellen Gesamtkontext des Organismus zu untersuchen. Primaten sind zwar dem Menschen am nächsten verwandt und in entwicklungsbiologischer, biochemischer und anatomischer Hinsicht ähnlich, weisen jedoch lange Generationszeiten und eine hohe Lebenserwartung auf, weshalb Beobach-

tungen unter Umständen über sehr lange Zeiträume erfolgen müssen. Neben den hohen Zuchtkosten besteht zudem keine gesellschaftliche Akzeptanz gegenüber Primaten als Tiermodell. Aus diesem Grund werden andere Labortiere, wie z. B. Nagetiere genutzt. Experimentell sehr häufig eingesetzte Mäuse (*Mus musculus*) ähneln in biologischer und genetischer Hinsicht dem Menschen. Gewonnene Erkenntnisse bezüglich der Herzfunktion sind daher zu einem großen Teil auf den Menschen übertragbar. Hinsichtlich der Größe und Anzahl der Gene gleicht das Mausgenom dem des Menschen. Außerdem haben Mäuse eine hohe Reproduktionsrate, werden sehr schnell geschlechtsreif und verfügen über eine geringe Lebenserwartung. Dadurch können Beobachtungen auch über mehrere Generationen erfolgen. Obwohl die Maus derzeit das wichtigste Tiermodell für menschliche Erkrankungen ist, stellt die Ratte in einigen Fällen den geeigneteren Organismus dar. So ist die Generationszeit bei Ratten zwar länger als bei Mäusen, erstere sind jedoch für physiologische und pharmakologische sowie Verhaltensbeobachtungen teilweise besser charakterisiert und zugänglich. So ist der für Analysen zu Verfügung stehende Gewebeumfang größer und eine Miniaturisierung operativer und interventioneller Techniken entfällt. Neben einer ausführlich beschriebenen Herzphysiologie ähnelt der Normalblutdruck der Ratte dem des Menschen. Im Vergleich zu anderen Kleintieren ist die Ruheherzfrequenz mit ca. 270 Schlägen pro Minute ebenfalls deutlich niedriger. Im Gegensatz zu Mausmodellen mit ca. 2-fach höherer Herzfrequenz ist dadurch eine bessere Vergleichbarkeit mit den physiologischen Parametern des Menschen gegeben. Dazu zählt auch, dass regulierende Mechanismen wie β -adrenerge Stimuli oder die Kraft-Frequenz-Beziehung bei der Maus zur Steigerung der kardialen Leistung eine geringere Bedeutung haben (39;61). Zudem zeigten vergleichende Untersuchungen der kardialen Calciumsensitivität für Mäuse reduzierte Werte (38), so dass die Ratte als Modellorganismus zur Untersuchung der Calciumhomöostase bessere Vergleichsmöglichkeiten mit der humanen myokardialen Calciumregulation aufweist. Veränderte transmembranäre Ca^{2+} -Transporte und daraus resultierende funktionelle Konsequenzen können daher besser mit einem Rattenmodell untersucht werden.

4.2. Zucht SERCA2-transgener Ratten

Die in dieser Arbeit untersuchten SERCA2-transgenen Ratten enthalten in ihrem Genom zusätzlich zum endogenen SERCA2-Gen ein SERCA2-Transgen (Linie 1167), dessen Expression unter Kontrolle eines humanen CMV-Enhancers/Hühnchen- β Aktin-Promotors steht. Bei der Zucht der SERCA2-transgenen Ratten konnten keine homozygoten Tiere generiert werden. Dies ist auch bei anderen transgenen Maus- und Rattenlinien der Fall (5;49). Eine homozygote Expression des SERCA2-Transgens ist jedoch möglich und konnte kürzlich bei einer SERCA2-transgenen Rattenlinie gezeigt werden (101). Bei 49% der Nachkommen der charakterisierten Rattenlinie lag eine

heterozygote Ausprägung des SERCA2-Transgens vor. Entgegen der Mendelschen Vererbungslehre, die bei Verpaarung zweier heterozygot transgener Elterntiere für 25% der Nachkommen Merkmalsfreiheit postuliert, konnte das SERCA2-Transgens bei 51% der Nachkommen durch Genotypisierung nicht nachgewiesen werden. Dafür zugrunde liegende Ursachen sind bisher nicht bekannt. Da sowohl für die Embryonalentwicklung als auch für die Spermienmotilität und -fertilität intrazelluläre Ca^{2+} -Oszillationen (82) bzw. intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen (7) eine entscheidende Rolle spielen, sind funktionelle Veränderungen an Spermium oder Eizellen denkbar. Bei hypothetischer Annahme, dass entweder Eizellen oder Spermien, die das SERCA2-Transgen im Genom enthalten, nicht entwicklungs-, überlebens- oder befruchtungsfähig sind, ergibt sich eine Merkmalsverteilung, die der beobachteten sehr nahe kommt. Um dies zu überprüfen, wären jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, die nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit waren. Auffällig war auch eine erhebliche Variation der Wurfgrößen. Inzuchtprobleme, mit denen bei der Zucht transgener Tierlinien immer zu rechnen ist, könnten dafür eine mögliche Ursache sein. Mit 9 Nachkommen pro Wurf war die durchschnittliche Wurfgröße jedoch normal. Die Genotypisierung der in dieser Arbeit untersuchten Tiere erfolgte vorwiegend mittels Southern Blot-Technik, wurde aber später durch die nichtradioaktive, einfachere PCR-Methode ergänzt. Um die Validität der PCR-Methode zu gewährleisten, erfolgte die Genotypisierung mittels PCR anfangs stets parallel zum Southern Blot. Nicht eindeutige PCR-Ergebnisse wurden grundsätzlich mit der Southern Blot-Technik wiederholt.

4.3. Konstitutive SERCA2a-Überexpression in Herzen transgener Ratten

Verglichen mit den jeweiligen transgen-negativen Geschwistertieren, waren die linksventrikulären SERCA2-mRNA-Spiegel männlicher und weiblicher heterozygot SERCA2-transgener Ratten der Linie 1167 im Mittel 1,5-fach gesteigert. Quantifizierungen der linksatrialen SERCA2-mRNA-Spiegel männlicher Ratten zeigten ähnliche Ergebnisse. SERCA2-mRNA-Spiegel des linken Vorhofs weiblicher Tiere wurden nicht untersucht. Unterschiede zu männlichen Tieren sind jedoch nicht zu erwarten, da auf Ventrikel Ebene ebenfalls keine geschlechtsabhängigen Unterschiede gezeigt werden konnten. Die in TG ca. 1,5-fach höheren SERCA2-mRNA-Spiegel stehen allerdings im Gegensatz zu der in SERCA2-transgenen Tieren nachgewiesenen 7,6-fach höheren Kopienzahl des SERCA2-Transgens. Demzufolge bleibt ein großer Anteil zusätzlich in das Genom von TG integrierter transgener SERCA2-Kopien entweder transkriptionell inaktiv oder wird möglicherweise fehlerhaft oder überhaupt nicht transkribiert. Welche Effekte dafür im Einzelnen eine Rolle spielen, konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft werden. Vermutlich spielen aber Positionierungseffekte der zusätzlich integrierten, transgenen SERCA2-Sequenzen eine große Rolle, da im Genom der Integra-

tionsort solcher Sequenzen bisher nicht kontrolliert werden kann. In anderen muskulären Geweben, wie z.B. im Skelettmuskel, Zwerchfell und Ösophagus konnten bei transgenen Tieren ebenfalls verstärkte SERCA2-mRNA-Signale detektiert werden, während diese in nicht muskulären Geweben von TG wie z. B. in Lunge, Milz, Hoden, Aorta, Leber und Gehirn nicht nachgewiesen werden konnten. Dies lässt vermuten, dass der zur Generierung der SERCA2-transgenen Rattenlinie genutzte nicht gewebespezifische Hühnchen- β Aktin-Promotor eine vorwiegend muskelspezifische Expression des SERCA2-Transgens induziert. Andererseits konnten trotz 1,5-fach erhöhter kardialer SERCA2-mRNA-Spiegel bei TG für die dazugehörigen SERCA2-Proteinspiegel im Western Blot im Mittel nur um 24% erhöhte Werte nachgewiesen werden. Das zeigt, dass die SERCA2a-Transkripte nicht 1:1 in SERCA2a-transgenen Ratten translatiert werden. Vergleichbare SERCA2-mRNA-Proteinverhältnisse konnten auch bei heterozygot SERCA2-transgenen Mausmodellen (5;49) gezeigt werden, bei denen eine um 31% bzw. 20% gesteigerte SERCA2-Proteinexpression nachgewiesen werden konnte. Die mögliche Ursache für die Diskrepanz zwischen den deutlich erhöhten SERCA2-mRNA-Spiegeln und geringer gesteigerter SERCA2-Proteinexpression wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Sie könnte jedoch mit einer verminderten Translationseffizienz des SERCA2-Transgens zusammenhängen. Möglicherweise werden die transgenen SERCA2-Moleküle auch nicht vollständig in die SR-Membranen integriert bzw. es stehen innerhalb der SR-Membranen nicht genügend freie Positionen für die vom SERCA2-Transgen kodierten zusätzlichen SERCA2-Moleküle zur Verfügung. Für die letzte Option sprechen Befunde von He et al., die belegen, dass die SERCA2a-Proteinsyntheserate in Herzen SERCA2a-transgener Mäuse im Vergleich zu nicht-transgenen Kontrollen um 82% erhöht ist (49). Ebenso ist eine vermehrte Degradation des im Überschuss neu gebildeten transgenen SERCA2-Proteins denkbar. Andere Arbeitsgruppen erzielten in einer SERCA2-transgenen heterozygoten Maus- bzw. homozygoten Rattenlinie unter Einsatz eines ventrikelspezifischen alpha-Myosin-Schwere-Ketten (α -MHC)- bzw. Myosin-Leichte-Ketten-2-Promoters eine Überexpression des SERCA2-Proteins von 54 bzw. 70% (5;49;101). Für eine hohe SERCA2-Proteinexpression scheint daher unter anderem auch die Wahl des Promotors ausschlaggebend zu sein. Allerdings ist bei einer homozygoten SERCA2-transgenen Rattenlinie im Vergleich zu heterozygoten Merkmalsträgern prinzipiell mit einer stärkeren und maximal mit einer doppelt so hohen Proteinexpression zu rechnen. Es soll auch erwähnt werden, dass bei Verwendung eines α -MHC-Promotors für transgene SERCA2-Konstrukte unter pathophysiologischen Bedingungen, z. B. bei Drucküberlasthypertrophie mit einer Abschaltung dieses Promotors zu rechnen ist. Entsprechend ist nicht zu erwarten, dass eine hypertrophiebedingte reduzierte SERCA2-Expression des endogenen SERCA2-Gens durch Expression des α -MHC-SERCA2-Transgens kompensiert werden kann. Deshalb sind transgene α -MHC-SERCA2-Tiermodelle nicht geeignet, die funktionelle

Bedeutung einer transgenen SERCA2-Überexpression unter pathologischen Bedingungen zu untersuchen.

4.4. Kardiale Expression anderer Proteine des SR

Um zu untersuchen, ob eine gesteigerte SERCA2-Expression die mRNA- oder Proteinspiegel anderer an der Ca^{2+} -Regulation beteiligter Gene verändert, wurden zunächst ausgewählte mRNA-Spiegel quantifiziert. Sowohl ventrikulär als auch atrial ergaben sich für die PLB-mRNA-Spiegel zwischen NTG und TG beiderlei Geschlechts keine signifikanten Unterschiede. Entsprechende Untersuchungen an männlichen SERCA2-transgenen Ratten und Mäusen von anderen Arbeitsgruppen bestätigen diese Ergebnisse (59;101;103). Überdies wurden die linksventrikulären und linksatrialen mRNA-Spiegel von CSQ und ANF in männlichen NTG und TG vergleichend bestimmt. Unterschiede konnten jedoch nicht festgestellt werden. Weiterführende Analysen in weiblichen NTG und TG wurden in diesem Fall nicht erwogen, da zuvor quantifizierte mRNA-Spiegel von PLB ebenfalls keine geschlechtsabhängigen Unterschiede aufwiesen. Die Expression anderer an der Ca^{2+} -Regulation beteiligter Proteine war somit in TG und NTG beiderlei Geschlechts nicht kompensatorisch verändert.

4.5. SERCA2-Überexpression und Ca^{2+} -Transportaktivität

Funktionelle Veränderungen der SR Funktion, die möglicherweise aus einer gesteigerten SERCA2-Proteinexpression hervorgehen, wurden zunächst anhand von Messungen des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transports in linksventrikulären Homogenaten von TG und NTG vergleichend untersucht. Diese Methode wurde gewählt, da mit ihr der ATP-abhängige SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Transport in SR-Vesikel bei ausgewählten freien Ca^{2+} -Konzentrationen *in vitro* gemessen werden kann (118). Um dabei mögliche Einflüsse auf die SR Ca^{2+} -Transportaktivität durch eine veränderte *in vitro* Phosphorylierung des SERCA2a-Modulatorproteins PLB ausschließen zu können, wurden die SR Ca^{2+} -Transport-Messungen in Gegenwart von 2 μM Proteinkinase A Inhibitor Peptid durchgeführt. Eine mögliche *in vitro* Phospholambanphosphorylierung durch endogene Proteinkinase A wurde somit unterbunden. Wurde die SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Aufnahme bei unterschiedlichen submikromolaren freien Ca^{2+} -Konzentrationen in linksventrikulären Homogenaten gemessen, so war diese in TG beiderlei Geschlechts im Vergleich zu gleichaltrigen transgen-negativen Geschwistertieren signifikant höher (**Abb. 3.16**). Dabei zeigten weibliche Tiere gegenüber ihren Kontrollen eine maximale Steigerung der Ca^{2+} -Aufnahme um 49%. Die geringere Steigerung der Ca^{2+} -Transportaktivität von 19% bei männlichen TG ist möglicherweise durch das untersuchte Probenmaterial zu erklären. Diesen Tieren wurde unter Narkose und künstlicher Beatmung ein Pneumo-

thorax gesetzt, so dass zum Zeitpunkt der Probengewinnung eine myokardiale Schädigung mit Einfluss auf die SR-Funktion nicht ausgeschlossen werden konnte. Um zu überprüfen, ob die in linksventrikulären Homogenaten gemessene Oxalat-stimulierte Aufnahme von Ca^{2+} in das SR SERCA2-spezifisch erfolgte, wurde die inhibitorische Wirkung des spezifischen SERCA-Hemmstoffes Thapsigargin in NTG und TG vergleichend untersucht. In Anwesenheit verschiedener Konzentrationen von Thapsigargin wurde der kardiale Oxalat-stimulierte Ca^{2+} -Transport bei NTG und TG identisch stark gehemmt. Sowohl bei TG als auch NTG wurde oberhalb von 10 nM Thapsigargin eine komplette Ausschaltung des SERCA2-katalysierten Ca^{2+} -Transports beobachtet (**Abb. 3.15**). Dies zeigt, dass die in linksventrikulären Homogenaten gemessene Ca^{2+} -Aufnahme in das SR ausschließlich und spezifisch SERCA2-katalysiert erfolgt. Außerdem erwies sich die Thapsigargin-Dosis-Wirkungsbeziehung bei NTG und TG mit endogener bzw. endogener plus transgener SERCA2-Expression identisch. Daraus kann geschlossen werden, dass auch die Wechselwirkung des Inhibitors mit endogenen als auch mit dem transgenen Ca^{2+} -Transportenzym identisch ist.

Da mit der Methode des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transportes ausschließlich der Ca^{2+} -Netto-Transport in die SR Vesikel gemessen wird, musste bei diesen Analysen zusätzlich ausgeschlossen werden, dass die in TG vorhandenen höheren Ca^{2+} -Aufnahmeraten nicht durch einen veränderten Ca^{2+} -Efflux über Ca^{2+} -Freisetzungskanäle zustande kommen. Daher wurde letzterer durch Zugabe von 20 μM des Ryanodinrezeptorblockers Ruthenium-Rot (RR) im Reaktionsansatz gehemmt. Messungen der Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme in Gegenwart von RR zeigten bei NTG und TG eine identische Steigerungen der Ca^{2+} -Transportrate. Deshalb kann ausgeschlossen werden, dass die gemessenen höheren Ca^{2+} -Transportaktivitäten von TG durch eine Veränderung des Ca^{2+} -Effluxes aus SR-Vesikeln bedingt ist (**Abb. 3.18**). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die durch das SERCA2-Transgen kodierte SR-Pumpmoleküle funktionell sind und auch für eine gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in die SR Vesikel verantwortlich sind.

Da der SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Transport durch das reversibel phosphorylierbare Phospholamban kontrolliert wird, wurde der Phospholambangehalt in TG und NTG vergleichend untersucht. Der in linksventrikulären Membranpräparaten mittels ELISA bestimmte Gehalt an immunreaktivem PLB unterschied sich in TG und NTG nicht. Fehlende Unterschiede der PLB-mRNA-Spiegel zwischen TG und NTG unterstützen diesen Befund. Bei den untersuchten SERCA2-transgenen Ratten liegt demnach im Kammermyokard sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein höherer SERCA2/PLB-Quotient vor als bei NTG. Eine unveränderte Expression von PLB auf mRNA- und Proteinebene wurde auch in anderen SERCA2-überexprimierenden transgenen Ratten- und Mausmodellen gefunden (5;59;101;103). Bei den eigenen Untersuchungen der Ca^{2+} -Abhängigkeit des SERCA2-katalysierten Ca^{2+} -Transportes in SERCA2-überexprimierenden Herzen

war auffällig, dass sich - trotz unverändertem PLB-Gehalt - die Ca^{2+} -Affinität des kardialen Ca^{2+} -Transportes trotz SERCA2-Überexpression nicht signifikant von der nicht-transgener Tiere unterschied. So wurden für männliche TG und NTG $\text{EC}_{50}(\text{Ca}^{2+})$ -Werte von 0,38 bzw. 0,41 μM bestimmt. Das stimmt mit Befunden von Baker et al. überein, die an SERCA2-transgenen Mäusen mit ca. 30%iger kardialer SERCA2-Überexpression und unveränderten PLB-Spiegeln ebenfalls keine Ca^{2+} -Affinitätsunterschiede zwischen transgenen und nicht-transgenen Tieren feststellen konnten (5). Die ermittelten $\text{EC}_{50}(\text{Ca}^{2+})$ -Werte entsprechen der mittleren Ca^{2+} -Affinität aller in der Membran des SR befindlichen Ca^{2+} -ATPasen, d. h., sowohl der vom endogenen SERCA2-Gen als auch der vom SERCA2-Transgen kodierten ATPasen. Unter der Annahme, dass SERCA2-Transgen kodierte Ca^{2+} -ATPasen wegen der fehlenden PLB-Kontrolle eine doppelt so hohe Ca^{2+} -Affinität aufweisen wie PLB-kontrollierte, vom endogenen SERCA2-Gen kodierte Ca^{2+} -ATPasen und dem Umstand, dass ca. 20% der gesamten Population von Ca^{2+} -ATPasen im SR von TG vom SERCA2-Transgen kodiert werden, ergeben sich theoretisch errechnete Unterschiede der $\text{EC}_{50}(\text{Ca}^{2+})$ -Werte zwischen TG und NTG von maximal 12%. Wird bei der $\text{EC}_{50}(\text{Ca}^{2+})$ -Wertbestimmung ein Variationskoeffizient von 18% berücksichtigt, ist nicht auszuschließen, dass mögliche existierende Ca^{2+} -Affinitätsunterschiede zwischen TG und NTG wegen zu geringer Größe der Versuchsgruppen nicht nachgewiesen werden konnten.

Im Gegensatz dazu, wurden Unterschiede der Ca^{2+} -Affinitäten des SR Ca^{2+} -Transportsystems gefunden, wenn das SERCA/PLB-Verhältnis durch verminderte Expression von PLB vergrößert wurde. So wurde berichtet, dass durch PLB-Knockout in Mäusen bzw. Verhinderung der PLB-Expression mittels siRNA-Technik in neonatalen Rattenherzzellen die Ca^{2+} -Affinität des SR Ca^{2+} -Transportsystems vergrößert werden konnte. (73;139). Fehlende Unterschiede in der Ca^{2+} -Affinität zwischen NTG und TG könnten auch zustande kommen, wenn eine Verschiebung des Gleichgewichtes zwischen PLB-Monomer und PLB-Pentamer in Richtung Monomer hervorgerufen würde. Es ist nämlich das PLB-Monomer, das mit SERCA-Molekülen inhibitorisch interagiert (81). Dagegen spricht aber, dass bei PKA-katalysierter PLB-Phosphorylierung in NTG und TG Unterschiede bezüglich der maximalen Stimulierbarkeit des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transports gefunden werden konnten (s. unten). Ebenfalls denkbar ist das Vorhandensein von PLB im Überschuss bei nicht-transgenen Tieren, so dass zusätzlich in die Membranen des SR integrierte Ca^{2+} -Pumpen einer vergleichbaren PLB-Kontrolle unterliegen, wie SR Ca^{2+} -ATPasen, die vom endogenen SERCA2-Gen kodiert werden (5;16). Dagegen spricht allerdings, dass nur eine Subpopulation von Ca^{2+} -ATPasen in der Membran des kardialen SR nicht-transgener Tiere durch PLB kontrolliert wird. Obwohl für das Rattenherz unbekannt, wird der PLB kontrollierte Anteil aller SR Ca^{2+} -ATPasen im SR von Mäuseherzen auf ca 40% geschätzt (16). Es ist deshalb eher wahrscheinlich, dass die vom

SERCA2-Transgen kodierten Pumpen, die zusätzlich in die Membranen des kardialen SR transgener Ratten eingebaut sind, nicht dem inhibitorischen Einfluss durch unphosphoryliertes PLB unterliegen. Indirekt wird diese Schlussfolgerung durch die Ergebnisse der vergleichenden Analyse des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transportes unter nicht phosphorylierenden und phosphorylierenden Reaktionsbedingungen gestützt. So konnte die Ca^{2+} -Transportaktivität des sarkoplasmatischen Retikulums SERCA2-transgener Tiere *in vitro* weniger stark durch PKA-abhängige Phosphorylierung gesteigert werden als von NTG. Bei einer freien Ca^{2+} -Konzentration von $0,5 \mu\text{M}$ im Reaktionsansatz steht einer 1,6-fachen PKA-abhängigen Stimulierbarkeit des SR Ca^{2+} -Transportes in NTG nämlich nur eine 1,2-fache Stimulierbarkeit in TG gegenüber. Erklärbar wird dieser Unterschied, wenn man annimmt, dass die vom SERCA2-Transgen kodierten SERCA-Moleküle nicht PLB-kontrolliert sind und somit bereits unter nicht phosphorylierenden Bedingungen volle Ca^{2+} -Transportaktivität aufweisen, während die Aktivität PLB-kontrollierter, vom endogenen SERCA-Gen kodierter Ca^{2+} -ATPase Moleküle unter nicht phosphorylierenden Bedingungen nur eine partielle Aktivität aufweisen. Wegen wegfallender PLB-Inhibition bei phosphorylierenden Bedingungen erfahren letztere ATPasen eine deutliche Steigerung ihrer Aktivität, während die Ca^{2+} -Transportaktivität der SERCA2-transgenen Ca^{2+} -ATPasen ohne PLB-Kontrolle unverändert bleibt. Daraus folgt, dass der Aktivitätsunterschied zwischen TG und NTG unter nicht phosphorylierenden Bedingungen größer ist, als unter phosphorylierenden Bedingungen. Exakt das war bei den Ca^{2+} -Transportmessungen mit und ohne Zusatz von Proteinkinase A zu beobachten. Zusammen mit der oben beschriebenen unterschiedlichen Stimulierbarkeit des Ca^{2+} -Transportes durch PKA-abhängige Phosphorylierung ist dies ein starker indirekter Hinweis dafür, dass die Transgen kodierten kardialen Ca^{2+} -ATPasen im untersuchten transgenen Rattenmodell nicht oder im geringeren Umfang als die vom endogenen SERCA-Gen kodierten Pumpen durch PLB kontrolliert werden.

4.6. Sarkolemmaler Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher bei SERCA2-Überexpression

Der NCX-vermittelte Transport von zytosolischem Ca^{2+} in den Extrazellulärraum ist neben der SR Ca^{2+} -ATPase entscheidend an der Senkung der Ca^{2+} -Konzentration in der Diastole beteiligt. Untersuchungen beider Ca^{2+} -Transporter unter physiologischen und pathologischen Bedingungen haben gezeigt, dass sich Expression und Funktion beider Systeme in vielen Fällen reziprok zueinander verhalten können (111;125;136). Deshalb wurde die Expression von NCX auf mRNA-Ebene und zusätzlich funktionell der NCX-vermittelte Ca^{2+} -Transport in TG und NTG vergleichend untersucht. Es fanden sich weder auf mRNA-Ebene noch für die an isolierten Membranpräparaten gemessene Na^+ -abhängige $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität Unterschiede zwischen TG und NTG. Deshalb kann geschlossen werden, dass die transgene Überexpression von Ca^{2+} -ATPasen des SR und der damit

verbundene verbesserte Ca^{2+} -Rücktransport in das kardiale SR transgener Tiere keine adaptativen Veränderungen der NCX-Expression und der *in vitro* gemessenen NCX-Aktivität verursacht. Offen bleibt, ob ein verstärkter SERCA2-katalysierter Ca^{2+} -Rücktransport in das SR der intakten Herzmuskelzelle den NCX-vermittelten transsarkolemmalen Ca^{2+} -Flux verändert.

4.7. Kardiale SERCA2-Überexpression und kontraktile Funktion *in vivo*

Da *in vitro* eine verbesserte Ca^{2+} -Transportfunktion des kardialen SR von SERCA2-überexprimierenden transgenen Herzen beobachtet wurde, sollte überprüft werden, ob sich diese Veränderungen auf die kontraktile Eigenschaften intakter Herzen auswirken. Hämodynamische Messungen von linksventrikulären Funktionsparametern an narkotisierten, thorakotomierten Tieren mittels Millar-Tipkatheter ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen SERCA2-überexprimierenden TG verglichen mit NTG. Das trifft sowohl für systolische als auch diastolische Funktionsparameter zu. Allerdings war auffällig, dass die maximale Druckabfallgeschwindigkeit ($-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$) bei TG um 16% größer war als bei NTG. Aufgrund der relativ hohen Streuung der Einzelwerte und relativ kleiner Versuchsgruppen erreicht dieser Unterschied aber keine statistische Signifikanz. Vergleichbare Befunde bezüglich der linksventrikulären Funktion wurden von Ito et al. für ein transgenes Mausmodell mit ca. 20-30%-iger kardialer SERCA2-Überexpression berichtet (59). Für dasselbe Mausmodell wurden allerdings in einer anderen Untersuchung signifikant erhöhte maximale linksventrikuläre Druckabfallgeschwindigkeiten nachgewiesen (49). Die Ergebnisse der invasiven Hämodynamikmessungen lassen somit vermuten, dass eine geringfügige kardiale SERCA2-Überexpression von 20-30% die kontraktile Eigenschaften intakter Rattenherzen *in situ* nicht oder höchstens marginal verändert. Methodenkritisch muss allerdings vermerkt werden, dass sowohl die eigenen Untersuchungen als auch die hämodynamischen Messungen an SERCA2-transgenen Mausmodellen an narkotisierten, und z. T. thorakotomierten Tieren durchgeführt wurden. Es kann deshalb nicht ausgeschlossen werden, dass mögliche funktionelle Auswirkungen einer moderaten SERCA2-Überexpression durch die kardiodepressive Wirkung der eingesetzten Narkosemittel (145) überdeckt wurden. Möglich wäre auch, dass unter *in vivo* Bedingungen günstige funktionelle Auswirkungen einer SERCA2-Überexpression durch gegenregulatorische Kreislaufmechanismen kompensiert werden.

4.8. Transgene SERCA2-Überexpression und Funktion isolierter Herzen

Um mögliche kontraktile Auswirkungen einer SERCA2-Überexpression weiter zu untersuchen, wurden Messungen an isoliert perfundierten Herzen vorgenommen, die im Gegensatz zur Situation *in vivo* nicht der neuroendokrinen Regulation unterliegen. Für die Untersuchungen wurden die iso-

volumetrischen kontraktile Eigenschaften des linken Ventrikels spontan schlagender Herzen von NTG und TG mittels eines linksventrikulären Ballonkatheters vergleichend untersucht. Diese Untersuchungen erfolgten bei konstantem Koronarfluss und einem konstanten linksventrikulären enddiastolischen Druck von 8 mmHg. Sowohl für die Frequenz spontan schlagender Herzen als auch für verschiedene systolische und diastolische Funktionsparameter wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen TG und NTG gefunden. Dieses Ergebnis entspricht den Befunden, die am Herzen *in vivo* erhoben wurden und zeigen, dass eine geringfügig verbesserte Ausstattung des SR mit Ca^{2+} -ATPasen offensichtlich ohne funktionelle Konsequenzen für die Pumpfunktion des Herzens transgener Ratten bleibt. Das könnte mit Besonderheiten des Nagerherzens zusammenhängen. So ist bekannt, dass das Rattenherz ebenso wie das Mäuseherz über ausgesprochen hohe basale SR Ca^{2+} -Transportaktivitäten verfügt (8), was eine sehr hohe Ca^{2+} -Transportreserve dieser Organelle bewirkt. Es ist deshalb denkbar, dass zusätzlich in die Membranen des SR inkorporierte SERCA2-Transgen kodierte Ca^{2+} -ATPasen zwar die Ca^{2+} -Transportreserve weiter erhöhen, jedoch funktionell stumm bleiben, wenn nur geringe Ca^{2+} -Transportleistungen zu erbringen sind. Das wäre z.B. im isoliert perfundierten Herzen unter basalen Bedingungen bei einer spontanen Herzfrequenz von ca. 250 min^{-1} bzw. unter Narkose der Fall. Daraus ergab sich die Frage, ob eine transgene SERCA2-Überexpression im intakten Herzen funktionell wirksam wird, wenn bei höheren Herzfrequenzen und bei verstärktem transsarkolemalem Ca^{2+} -Influx höhere Ca^{2+} -Transportleistungen des SR zur Aufrechterhaltung der kardialen Ca^{2+} -Homöostase notwendig sind. Aus diesem Grunde wurden Untersuchungen an isoliert perfundierten Herzen vorgenommen, die steigenden Konzentrationen des β -Adrenozeptoragonisten Isoproterenol ausgesetzt wurden. Durch β -adrenerge Stimulation kann der Ca^{2+} -Einstrom in Kardiomyozyten über L-Typ- Ca^{2+} -Kanäle massiv gesteigert werden (55), so dass das SR pro Herzzyklus eine wesentlich größere Menge an Ca^{2+} aufnehmen und freisetzen muss. Die Ca^{2+} -Belastung des SR der einzelnen Herzmuskelzelle wird durch Steigerung der Herzfrequenz unter β -adrenerger Stimulierung zusätzlich erhöht. Somit ist davon auszugehen, dass die Ca^{2+} -Transportreserve des SR unter diesen Bedingungen wesentlich stärker in Anspruch genommen wird als unter basalen Bedingungen. Tatsächlich wurde gefunden, dass sich die systolische und die diastolische linksventrikuläre Funktion transgener Herzen durch Isoproterenol deutlich stärker steigern lässt als in Kontrollherzen ohne SERCA2-Überexpression. So konnte z.B. der maximal entwickelte linksventrikuläre Druck (dLVP) und die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($+\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$) in TG durch Isoproterenol ca. 20% mehr gesteigert werden als in NTG. Die lusitrope Isoproterenolwirkung war in isolierten Herzen von TG noch wesentlich stärker ausgeprägt als in NTG. Bemerkenswerterweise zeigt der Vergleich der $-\text{dP}/\text{dt}_{\text{max}}$ -Werte von TG und NTG eine ca. 30% stärkere Isoproterenolwirkung in TG. Die Ergebnisse belegen, dass sich die moderate kar-

diale SERCA2-Überexpression im untersuchten Tiermodell auf Organebene nur dann funktionell auswirkt, wenn das Ca^{2+} -Transportsystem des kardialen SR stärker beansprucht wird als das unter basalen Bedingungen der Fall ist. Eine konstitutive kardiale SERCA2-Überexpression scheint dabei den Relaxationsprozess deutlich stärker zu verbessern als die systolische Funktion. Aufgrund der erhobenen Befunde wird deshalb postuliert, dass die vom SERCA2-Transgen kodierten, in die Membranen des SR integrierten Ca^{2+} -ATPasen nur bei hoher Ca^{2+} -Belastung einen funktionellen Beitrag zur Beschleunigung der diastolischen Ca^{2+} -Senkung und somit zur Relaxation leisten können. Sekundär werden systolische Funktionsparameter verbessert, weil offensichtlich durch einen verstärkten Ca^{2+} -Rücktransport in das Lumen des SR die Beladung des SR mit Ca^{2+} unter diesen Bedingungen ebenfalls erhöht ist, so dass systolisch eine größere Menge Aktivator- Ca^{2+} freigesetzt werden kann.

4.9. Ausblick

Die zugrunde liegenden Pathomechanismen von linksventrikulären Funktionsstörungen bei pathologischer Myokardhypertrophie insbesondere infolge chronischer Drucküberlastung sind bisher nur unzureichend geklärt. Bezüglich der pathologischen Veränderungen in hypertrophierten Myozyten sprechen sowohl Befunde an terminal insuffizienten humanen Herzen als auch viele experimentelle Daten dafür, dass Störungen des SERCA2-katalysierten Ca^{2+} -Rücktransportes in das sarkoplasmatische Retikulum pathogenetisch bedeutungsvoll sind.

Die Entwicklung neuer experimenteller Modelle und Ansätze, mit deren Hilfe untersucht werden kann, wie diese Störungen verhindert bzw. korrigiert werden können, sind deshalb von Interesse. Ausgehend von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, könnte ein Ziel neuer experimenteller Forschungsvorhaben sein, durch Untersuchungen an dem in dieser Arbeit charakterisierten SERCA2-transgenen Rattenmodell herauszufinden, ob durch eine primär verbesserte SERCA2-Ausstattung des SR kontraktile Funktionsstörungen bei unterschiedlichen Formen einer experimentell-induzierten chronischen linksventrikulären Drucküberlastung verhindert werden können. Zusätzlich könnte in diesem Zusammenhang geklärt werden, ob eine präventive Stabilisierung der myozytären Ca^{2+} -Homöostase mittels transgener SERCA2-Überexpression den bei chronischer linksventrikulärer Drucküberlast funktionell ungünstigen Umbau der extrazellulären Matrix verhindern kann. Es ist zu erwarten, dass durch solche Untersuchungen neue Erkenntnisse zu einer möglichen Präventivwirkung einer primär verbesserten Ca^{2+} -ATPase-Ausstattung des SR bei Drucküberlasthypertrophie gewonnen werden können.