

8. Appendix

8.1. Reaktionsbedingungen

Um die optimalen Reaktionsbedingungen für den Oxalat-stimulierten Transport von Ca^{2+} in SR Membranvesikel zu finden, wurden an linksventrikulären Homogenaten einzelner SERCA2a-transgener und nicht-transgener Tiere Vorversuche durchgeführt.

8.2. Stabilität auf Eis gelagerter Herzhomogenate

Die aus schockgefrorenem Gewebe gewonnen linksventrikulären Homogenate von SERCA2a transgenen (TG) und nicht-transgenen (NTG) Ratten der Linie 1167 wurden vor Messung des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transports auf Eis gelagert. Um überprüfen zu können, ob sich die SR Ca^{2+} -Aufnahme in Abhängigkeit von der Lagerungszeit auf Eis verändert, wurden Aliquote von linksventrikulären Homogenaten eines willkürlich gewählten NTG vor Messung der SR Ca^{2+} -Aufnahme für die Zeit von 5, 10, 20, 30 und 60 min auf Eis belassen. Nach 20 bzw. 60 Minuten Eislagerung war die Ca^{2+} -Aufnahme um 10 bzw. 30% vermindert. Um die dadurch bedingten Variationen bei Messungen des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transports auszuschließen, wurden die Homogenate erst kurz vor jeder Messung aufgetaut und maximal 15 Minuten auf Eis gelagert.

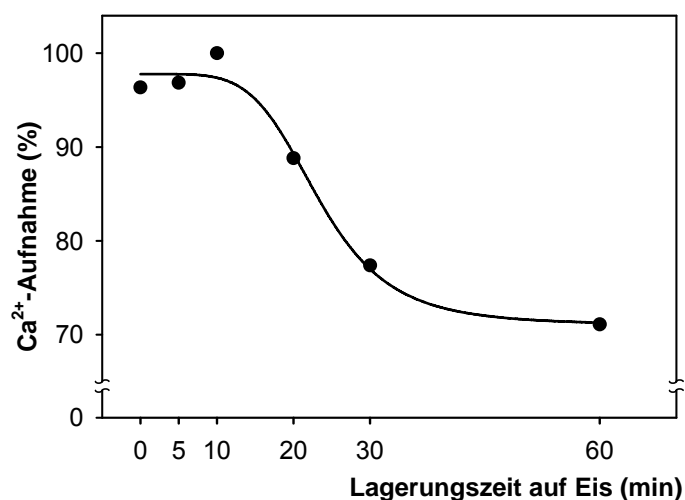


Abbildung 7.1. SR Ca^{2+} -Aufnahme in Abhängigkeit von der Lagerungszeit der linksventrikulären Homogenate auf Eis. Zur Messung des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transports wurden die Homogenate eines nicht-transgenen Tieres verwendet. Die freie $[\text{Ca}^{2+}]$ im Standardmedium (s. Methoden 2.4.6.1) betrug $0,89 \mu\text{M}$. Prozentual angegebene Mittelwerte von Dreifachbestimmungen sind auf die maximal erreichte Ca^{2+} -Aufnahme normiert.

8.3. Temperaturabhängigkeit

Alle Messungen des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transportes in linksventrikulären Homogenaten wurden bei einer Temperatur von 37°C im Reaktionsansatz durchgeführt, was der physiologischen Temperatur *in vivo* entsprach. Um die Temperaturabhängigkeit des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -

Transportes in linksventrikulären Homogenaten zu untersuchen, wurde der SERCA2a-katalysierte Ca^{2+} -Transport über einen Temperaturbereich von 22– 42°C gemessen (s. **Abb. 7.2**). Dabei zeigte sich eine starke Temperaturabhängigkeit, wobei die Ca^{2+} -Aufnahmerate bei ansteigenden Temperaturen im Reaktionsmedium im o. a. Temperaturbereich zunahm.

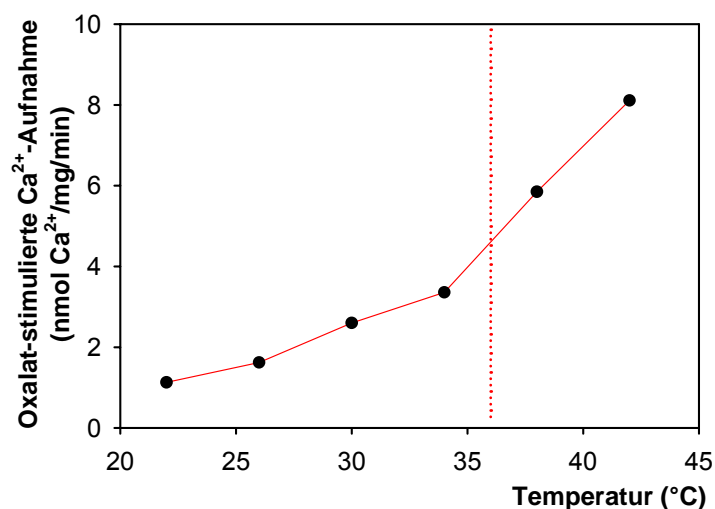


Fig. 7.2. Temperaturabhängigkeit des Oxalat-stimulierten SERCA2-katalysierten Ca^{2+} -Transports. Die Messung der Ca^{2+} -Aufnahme erfolgte in linksventrikulären Homogenaten von einem nicht-transgenen Tier. Dargestellt sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen im Standardmedium (s. Methoden 2.4.6.1) bei einer freien $[\text{Ca}^{2+}]$ von 0,89 μM . Die Reaktionszeit betrug 2 min. Die gestrichelte Linie zeigt die Standardtemperatur von 37°C an.

8.4. Proteinabhängigkeit

Um den Einfluss unterschiedlicher Proteinkonzentrationen bei Messungen des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transports in linksventrikulären Homogenaten zu charakterisieren, wurde die Ca^{2+} -Aufnahme bei Proteinkonzentrationen im Reaktionsansatz im Bereich von 7,5 bis 60 mg/ml gemessen. Dabei nahm die nach 2 min gemessene SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Aufnahme linear um 0,61 nmol Ca^{2+} /mg Protein zu. Alle Messungen des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transports wurden deshalb nur bei Proteinkonzentrationen durchgeführt, die diese lineare Abhängigkeit gewährleisteten.

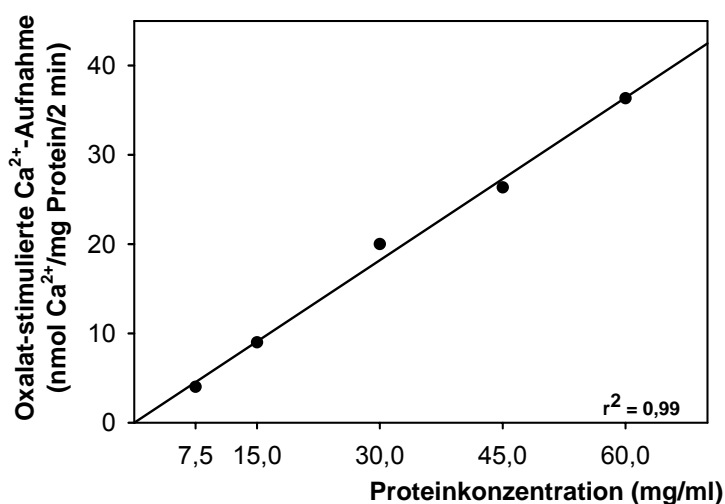


Abbildung 7.3. Proteinabhängigkeit des Oxalat-stimulierten SERCA2a-katalysierten Ca^{2+} -Transports in linksventrikulären Homogenaten. Gezeigt ist die Ca^{2+} -Aufnahme von einer nicht-transgenen Ratte. Gemessen wurde im Standardmedium (s. Methoden 2.4.6.1) bei einer freien $[\text{Ca}^{2+}]$ von 0,89 μM . Abgebildet sind die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen.

8.5. Zeitabhängigkeit

Zur weiteren Charakterisierung des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Transports wurde die Ca^{2+} -Aufnahme in linksventrikulären Homogenaten vergleichend für NTG und TG unter Standardbedingungen (s. Methoden 2.4.6.1) für Reaktionszeiten zwischen 1 bis 30 min bei zwei freien $[\text{Ca}^{2+}]$ von 0,36 und 3,82 μM gemessen (Abb. 6.4). Dabei ergab sich eine Abhängigkeit, die sich wie folgt beschreiben lässt:

$$Y = Y_{\max} * \frac{t}{t + K}$$

Y - Oxalat-stimulierte SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Aufnahme (nmol Ca^{2+} /mg Protein), Y_{\max} - maximale Y, t - Zeit (min), K - Konstante

Sowohl bei einer freien Ca^{2+} -Konzentration von 0,36 (Abb. 6.4 A) als auch bei 3,82 μM (Abb. 6.4B) war die Ca^{2+} -Aufnahme für TG zu allen gemessenen Zeitpunkten größer als für NTG.

Dabei nahm die SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Aufnahme innerhalb der ersten 3 min sowohl für NTG als auch TG linear zu (Insets Abb. 6.4). Verglichen mit NTG war die maximale transgen-induzierte Ca^{2+} -Aufnahme in diesem linearen Abhängigkeitsbereich bei TG bei einer freien $[\text{Ca}^{2+}]$ von 0,36 μM im Mittel 2,24-fach höher. Bei 3,82 μM freier $[\text{Ca}^{2+}]$ war sie 1,85-fach höher. Alle in dieser Arbeit gezeigten Ca^{2+} -Transportwerte wurden deshalb in der linearen Reaktionsphase 2 min nach dem Start der Ca^{2+} -Aufnahmereaktion gemessen.

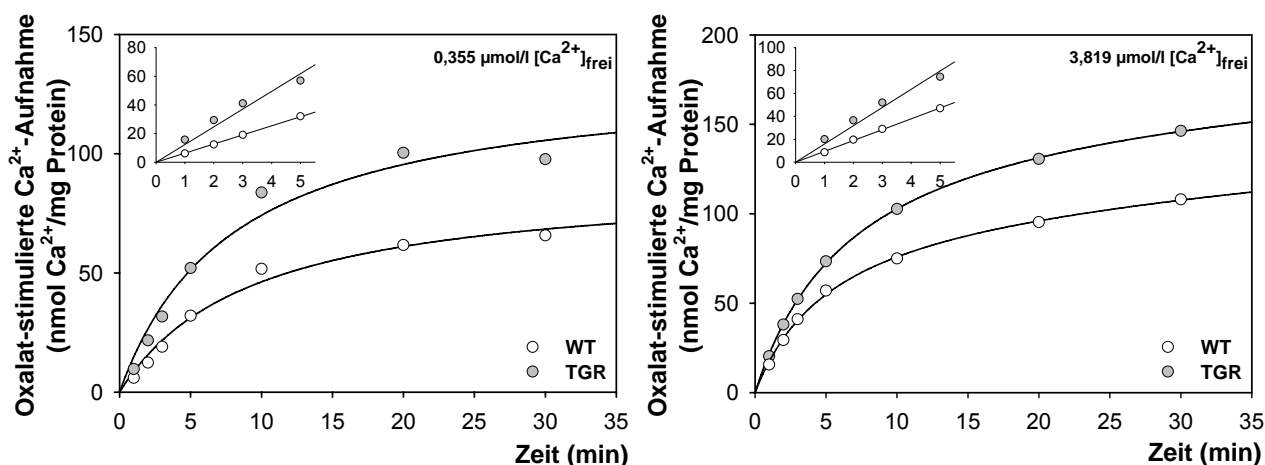


Abbildung 7.4. Zeitabhängigkeit der Oxalat-stimulierten Ca^{2+} -Aufnahme in linksventrikulären Homogenaten. Der SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Transport wurde für jeweils eine nicht-transgene (NTG) und SERCA2-transgene Ratte (TG) bei einer freien Ca^{2+} -Konzentration von 0,355 (A) und 3,819 μM (B) im Standardmedium (s. Methoden 2.4.6.1) gemessen. Die eingebetteten Abbildungen zeigen die lineare Abhängigkeit der Ca^{2+} -Aufnahme in den ersten 4 Reaktionsminuten. Dargestellt sind Mittelwerte von Dreifachbestimmungen. Der Variationskoeffizient war bei allen Messungen maximal 20%.