

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Studienaufbau

##### 3.1.1. 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 (Genehmigungsnummer G 0054/00).

Jeweils drei Ratten wurden in Käfigen aus Makrolon (Maße 590 x 380 mm, 200 mm Höhe; einem Standarddeckel von EBECO<sup>®</sup>) gehalten. In den klimatisierten Räumen, mit künstlichem Tag-Nacht-Beleuchtungszyklus (Licht von 9 – 21 Uhr), betrug die Raumtemperatur 20 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 25 %. Die Tiere erhielten eine Standardrattendiät Altromin C1000 (Firma Altromin, Lage/Lippe, Deutschland) sowie Trinkwasser ad libitum.

##### 3.1.2. Versuchstiere für das Streptozotocin-Diabetesmodell

Als Versuchstiere dienten 16 männliche SERCA2-transgene Sprague-Dawley Ratten (TGR) und 22 nicht transgene Sprague-Dawley Ratten (WT) als Kontrollgruppe. Alle Tiere hatten bei Versuchsbeginn ein Ausgangsgewicht von 300 – 330 g.

###### 3.1.2.1. Versuchsablauf

Willkürlich ausgewählte TGR und WT der o.g. Gruppen wurden mit STZ behandelt um einen D.m. auszulösen. Den restlichen Tieren wurde das STZ- Lösungsmittel injiziert. Sie dienten als nicht-diabetische Kontrollen. Somit ergaben sich vier verschiedene Versuchsgruppen zu je 8 Tieren TGR-STZ und TGR-Kontrolle und je 11 Tieren WT-STZ und WT-Kontrolle.

Ein Tag nach Injektion ließ sich bei den mit STZ-behandelten Tieren ein erhöhter Blutglukosespiegel nachweisen, der nach abgelaufener Entzündungsphase weiter anstieg und nach 14 Tagen ein Plateau erreichte. Auf diesem Niveau lag der Blutzuckerspiegel (BZ) auch zum Zeitpunkt der invasiven Hämodynamikmessung und anschließenden Organentnahme in der sechsten Behandlungswoche.

###### 3.1.2.2. Untersuchte Werte

Körpergewicht (KG) und der BZ wurden über den Versuchszeitraum von sechs Wochen kontrolliert. Bei der invasiven Hämodynamikmessung wurden der arterielle Blutdruck und am Herzen die Herzfrequenz, LVP, LVEDP,  $+dP_{\max}/dt$  und  $-dP_{\max}/dt$  mit einem 2F-Millar-Tip-Katheter<sup>®</sup>

gemessen. Danach erfolgte die Entnahme und Bestimmung der Feuchtgewichte von Herz, Lunge, Leber und Nieren. Die Gewebe wurden sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80 °C gelagert.

### **3.1.3. Versuchstiere für das Modell der Drucküberlastherzhypertrophie**

Als Versuchstiere dienten männliche, sechs Wochen alte, SERCA2-transgene Sprague-Dawley Ratten und nicht-transgene Sprague-Dawley Ratten mit einem Ausgangsgewicht von 100 – 120 g. Die Haltung der Tiere erfolgte wie unter 3.1 beschrieben.

#### **3.1.3.1. Versuchsablauf**

Die TGR und WT wurden in zwei Gruppen zu  $n = 10$  randomisiert aufgeteilt: TGR-Aortenstenose (AS), TGR-Scheinoperiert (Sh), WT-AS und WT-Sh. Je 10 Tieren aus der TGR- und WT-Gruppe wurde die Aorta ascendens direkt oberhalb der Aortenklappe chirurgisch mit einem Hemoclip eingengt (Aortenstenose). Bei den restlichen TGR- und WT-Versuchstieren wurde die Aorta ascendens freigelegt, ohne dass der Clip gesetzt wurde (scheinoperiert). Diese Tiere dienten als Kontrollen. Es wurden Aorteneinengungen mit verschiedenen Durchmessern gewählt, um unterschiedliche Schweregrade einer chronischen linksventrikulären Hypertrophie zu erzielen. Als Maß für die erfolgte Einengung der Aorta durch den gesetzten, rhombenförmigen Clip wurde die kurze Clipdiagonale benutzt. Dieser Wert betrug somit wahlweise 1.0, 0.6 oder 0.4 mm. Sechs Wochen nach der Stenosierung der Aorta erfolgte die invasive Hämodynamikmessung und anschließend die Organentnahme.

#### **3.1.3.2. Untersuchte Werte**

Die Bestimmung von Körpergewicht, hämodynamischen Parametern und der Organgewichte sowie die Lagerung von Gewebeproben erfolgte wie unter 3.1.2.2 beschrieben.

## **3.2. Methoden im Tierversuch**

### **3.2.1. Erzeugen eines Diabetes mellitus**

Die Erzeugung eines D.m. erfolgte mittels STZ, einem aus *Streptomyces achromogenes* gewonnenen Antibiotikum, das einen hochspezifischen diabetogenen Effekt zeigt. Die Wirkung von STZ beruht auf einer gezielten Degranulation der insulinproduzierenden B-Zellen der Langerhans-Inseln des Pankreas, die bei entsprechender Dosis nach einigen Stunden zur Nekrose der B-Zellen führt. Abhängig von der STZ-Dosis entwickelt sich im Verlauf von ca. zwei Wochen ein

Insulinmangeldiabetes (IDDM) mit unterschiedlichem Schweregrad. Dieser würde bei Menschen, ohne Insulinsubstitution, innerhalb kurzer Zeit zu einer dekompensierten Ketoazidose und somit zum Tode führen. Bei Ratten bildet sich diese allerdings nicht so stark aus, so dass STZ-behandelte Tiere ohne Insulintherapie über einen längeren Zeitraum überlebensfähig bleiben (185).

### **3.2.1.1. Dosierung von Streptozotocin**

Der Schweregrad des STZ-induzierten D.m. ist dosis- und injektionsabhängig und reicht bei der Ratte von einer milden Form bei einer Dosis von 35 mg/kg KG bis zum fulminanten Verlauf mit Tod innerhalb von zwei bis drei Tagen bei Gabe von 100 mg/kg KG (185). Aus pharmakokinetischen Gründen liegt die diabetogene Dosis bei intravenöser Injektion wesentlich unter der bei einer intraperitonealen Injektion.

Für die vorliegende Arbeit wurde eine STZ-Dosis von 70 mg/kg KG i.p. gewählt. Diese Dosis war einerseits für eine sichere Induktion eines D.m. ausreichend und gewährte andererseits das Überleben der diabetischen Tiere bis zum Versuchende. Die Erfolgsquote der D.m.-Induktion lag bei 87,5 %. Die Mortalität der diabetischen Ratten im sechswöchigen Versuchszeitraum betrug 34 %. Bei dem gewählten Versuchsprotokoll ist mit keinen toxischen myokardialen oder renalen Nebenwirkungen zu rechnen (185). STZ-induzierte kardiale Veränderungen können deshalb als diabetes-spezifisch bewertet werden.

### **3.2.1.2. Lösung und Applikation**

Die STZ-Injektionslösung (122 mg/ml) wurde vor der Injektion frisch in 0,1 M Na-Citrat-Puffer (pH 4,5) angesetzt. Tieren der Kontrollgruppen wurde ein adäquates Volumen Citrat-Pufferlösung ohne STZ injiziert. Alle Injektionen erfolgten intraperitoneal.

### **3.2.1.3. Kontrolle des diabetischen Status**

Zwischen dem dritten und 16. Tag nach STZ-Applikation wurde die Blutzucker (BZ) - Konzentration jeden zweiten Tag bestimmt. Das Kriterium für einen erfolgreich induzierten D.m. war ein BZ-Spiegel von  $\geq 500$  mg/dl (27,7 mmol/l) am 14. Tag. Nur STZ-behandelte Tiere, die dieses Kriterium erfüllten, wurden im Versuch belassen. Die Kontrolle des BZ erfolgte danach in regelmäßigen Abständen über die gesamte Versuchsdauer hinweg. Zur Bestimmung diente je ein Tropfen Kapillarblut aus der Schwanzspitze der Ratte. Die Blutprobe wurde auf einen Glukose-Teststreifen aufgebracht und automatisch in einem handelsüblichen Messgerät (Akku-Chek<sup>®</sup>) gemessen. Das Testprinzip der BZ-Bestimmung beruht auf der Bioamperometrie. Durch das Enzym Glucose-Dehydrogenase im Teststreifen wird die Glucose in der Blutprobe in Gluconolacton umgesetzt. Bei dieser Reaktion entsteht ein elektrisches Potential, das

proportional der umgesetzten Glukosemenge ist. Mit dem benutzten Gerät lässt sich ein Blutzuckerkonzentrationsbereich von 10 bis 600 mg/dl (0,6 – 33,3 mmol/l) erfassen.

### **3.2.2. Erzeugung einer Drucküberlasthypertrophie**

Um eine Herzmuskelhypertrophie durch eine chronische Drucküberlast zu erzeugen, wurde das Lumen der Aorta ascendens durch eine mikrochirurgische Cliptechnik eingengt. Bei Kontrolltieren wurde lediglich eine Thorakotomie und Freilegung der Aorta (Scheinoperation) durchgeführt. Da die Mortalität bei dieser Operation bei adulten Tieren durch die dramatische Einengung der Aorta sehr hoch ist, wurde die Stenosierung der Aorta bei jungen, fünf bis sechs Wochen alten Ratten durchgeführt. Aufgrund des geringen Aortendurchmessers, der sich noch im Wachstum befindenden Tiere, ist die Stenose zum Operationszeitpunkt minimal, so dass der operative Eingriff gut überstanden wird. Die Aorteneinengung wird mit zunehmenden Wachstum der Tiere prozentual größer. Der sich kontinuierlich vergrößernde Strömungswiderstand führt zu einer massiven Zunahme der Nachlast. Verbunden damit ist eine Hypertrophieinduktion des linken Ventrikels. In den Aortenstenosegruppen wurde bei adulten Tieren eine Einengung der Aorta ascendens auf ca. 90 – 40 % des normalen Lumens erzielt. Daraus errechnet sich nach dem Hagen-Poiseuillesche Gesetz eine Erhöhung des Strömungswiderstandes im Bereich der Stenose um das bis zu 39-fache bei 40 %-iger Einengung des Aortenlumens.

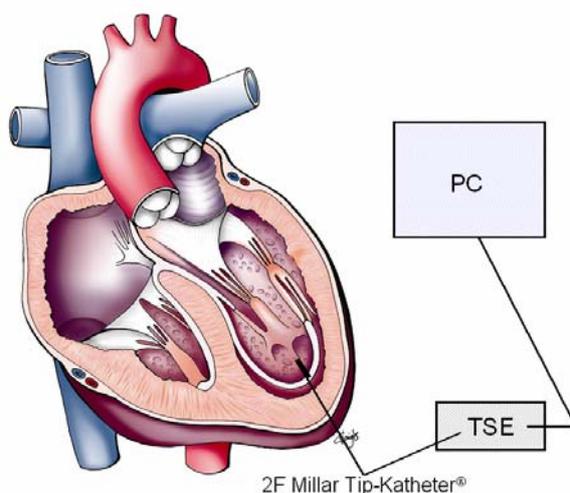
#### **3.2.2.1. Experimentelle Durchführung der mikrochirurgischen Aortenstenosierung**

Die Tiere wurden mit einem Gemisch aus Ketamin 50 mg/kg KG und Xylanzin 6 mg/kg KG narkotisiert. Die erforderliche analgetische Wirkung wird dabei hauptsächlich durch Ketamin, die muskelrelaxierende und sedierende vor allem durch Xylanzin erzielt. Die Dauer der Narkose betrug bei der angegebenen Dosierung ungefähr 45 Minuten. Nach Erreichen des Toleranzstadiums wurden die Versuchstiere endotracheal mit einem Venenverweilkatheter intubiert und mit Hilfe eines Nagerbeatmungsgeräts mit Raumluft beatmet. Das Beatmungsvolumen betrug 120 – 150 ml/min, die Beatmungsfrequenz 60 min<sup>-1</sup>. Anschließend erfolgte ein ca. zwei Zentimeter langer Hautschnitt rechts parasternal von der zweiten bis zur vierten Rippe. Dann wurden die beiden Musculi pectoralis major und minor mit einer Schere durchtrennt, so dass man die Rippen und Interkostalmuskulatur sah. Jetzt wurde die dritte Rippe mit einem Schnitt durchtrennt und die Interkostalmuskulatur, parallel zum Sternum, zur zweiten und vierten Rippe hin durchschnitten. Nach Eröffnung der Pleurahöhle wurde die

Thoraxöffnung gespreizt und der Thymus mit einem Haken nach kranial gehoben. Das Perikard wurde eröffnet und die Aorta ascendens aus ihrem Gefäßbett mobilisiert, so dass sie mit einer gebogenen Pinzette angehoben werden konnte. Mit einer Hemoclip<sup>®</sup>-Anlegezange wurde ein steriler Metallclip, mit einem variablen Durchmesser der kurzen Diagonalen von 0.4 – 1.0 mm und einer Länge von 1 mm (lange Diagonale), um die Aorta ascendens gelegt (s. **Abb. 3.6**). Nach anschließender Repositionierung der Aorta erfolgte der Verschluss des Thorax durch Vernähen der vorher durchtrennten Muskelschichten unter einer leichten Überdruckbeatmung, um den erzeugten Pneumothorax zu minimieren. Postoperativ wurden die Tiere über 48 Stunden im 12 Stundenrhythmus überwacht und zur Schmerzbehandlung mit dem Opiat Finadyne<sup>®</sup> behandelt. Der Versuch endete nach sechs Wochen mit der invasiven Hämodynamikmessung und der Organentnahme.

### 3.2.3. Invasive Hämodynamikmessung

Sechs Wochen nach der Operation der Tiere wurden diese hämodynamisch charakterisiert und anschließend zwecks Organentnahme in Narkose getötet. Für diese Messung linksventrikulärer Funktionsparameter bestand die intraperitoneal verabreichte Narkose aus Ketamin 35 mg/kgKG und Thiobutabarbital 65 ml/kgKG. Nach dem Erreichen des Toleranzstadiums wurde endotracheal intubiert und mit dem unter 3.2.2.1 beschriebenen Nagerbeatmungsgerät (Raumluft, 150 – 200 ml/min) beatmet. Danach wurde auf der ventralen Halsseite in der Medianlinie ein Hautschnitt vorgenommen. Es wurden die Faszien der Halsmuskeln (M. sternocleidomastoideus, M. sternohyoideus, M. omohyoideus und M. thyrohyoideus) voneinander getrennt, so dass die rechte Gefäßnervenscheide mit der Arteria carotis, dem Nervus vagus und der Vena jugularis interna freipräpariert werden konnte.



**Abb. 3.1 Schematische Darstellung der Messung linksventrikulärer Drücke.** Hämodynamikparameter werden mittels eines Millar Tip-Katheter<sup>®</sup> über die Herzspitze nach zuvor erfolgter Thorakotomie gemessen. TSE – Messverstärker, PC – Personal Computer

Nachdem die A. carotis vom Nervus vagus und der Vena jugularis interna isoliert war, konnte sie mit einer Gefäßklemme abgedrückt und so ohne Blutverlust eröffnet werden. Durch diese Öffnung wurde ein Millar Tip-Katheter<sup>®</sup> (Durchmesser 2 French) über die A. carotis bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Somit konnten die Pulsfrequenz und der aortale Blutdruck blutig hinter der Stenose ermittelt werden. Anschließend wurde die linke Thoraxseite eröffnet und der Millar-Tip-Katheter<sup>®</sup> über die Herzspitze in den linken Ventrikel eingeführt (**Abb.3.1**). Dort wurde dann der LVP, LVEDP, dPmax/dt und dPmin/dt gemessen. Das System bestand aus einem Millar-Tip-Katheter<sup>®</sup> und einem TSE Messverstärker, der mit einem PC verbunden war. Für die Datenerfassung und Auswertung wurde die Software BioSys<sup>®</sup> verwendet.

#### **3.2.4. Tötung und Organentnahme der Tiere**

Die Tötung der narkotisierten Tiere erfolgte durch die Entnahme des Herzens. Anschließend 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. Zur Beurteilung des Status der Herzinsuffizienz wurde zusätzlich das Leber- und Lungenfeuchtgewicht bestimmt. Für eine histologische Befundung wurden Gewebeproben von Niere, Aorta und Myokard genommen und in einer Dubosq-Basil Lösung fixiert.

#### **3.2.5. Kontraktilitätsmessung am isolierten Papillarmuskel**

Die Herzentnahme erfolgte in tiefer Äthernarkose. Das entnommene Herz wurde in eine Blutersatzlösung (in mmol/l) überführt: NaCl 137; KCl 2,68; CaCl<sub>2</sub> 0,75; MgCl<sub>2</sub> 1,8; NaHCO<sub>3</sub> 4,9; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42; Glucose 5,55; pH 7,4; Temperatur 37 °C. Diese Lösung wurde zuvor ca. 20 min mit 95 % Sauerstoff/ 5 % Kohlendioxid oxygeniert. Der pO<sub>2</sub> lag bei 70 kPa. Nach Ermittlung der Ventrikelgewichte wurden die linksventrikulären Papillarmuskeln mit einer Mikroskopierschere präpariert. Nach erfolgter Präparation, wurden an die Enden eines Papillarmuskels zwei Klemmen aus Wolframdraht im Abstand von ca. 5 mm angebracht. Der Durchmesser der Rattenpapillarmuskeln betrug durchschnittlich 0,8 mm. Das Präparat war horizontal in der Messkammer fixiert. Dabei war die eine Klemme mit einem isometrischen Kraftaufnehmer verbunden, die andere an einem Haken gehängt, der beweglich mit einer Mikroschraube zur Einstellung der Vorlast verbunden war. Die Messkammer enthielt ca. 5 ml oxygenierte Blutersatzlösung, die über ein Schlauchsystem kontinuierlich mit der gleichen

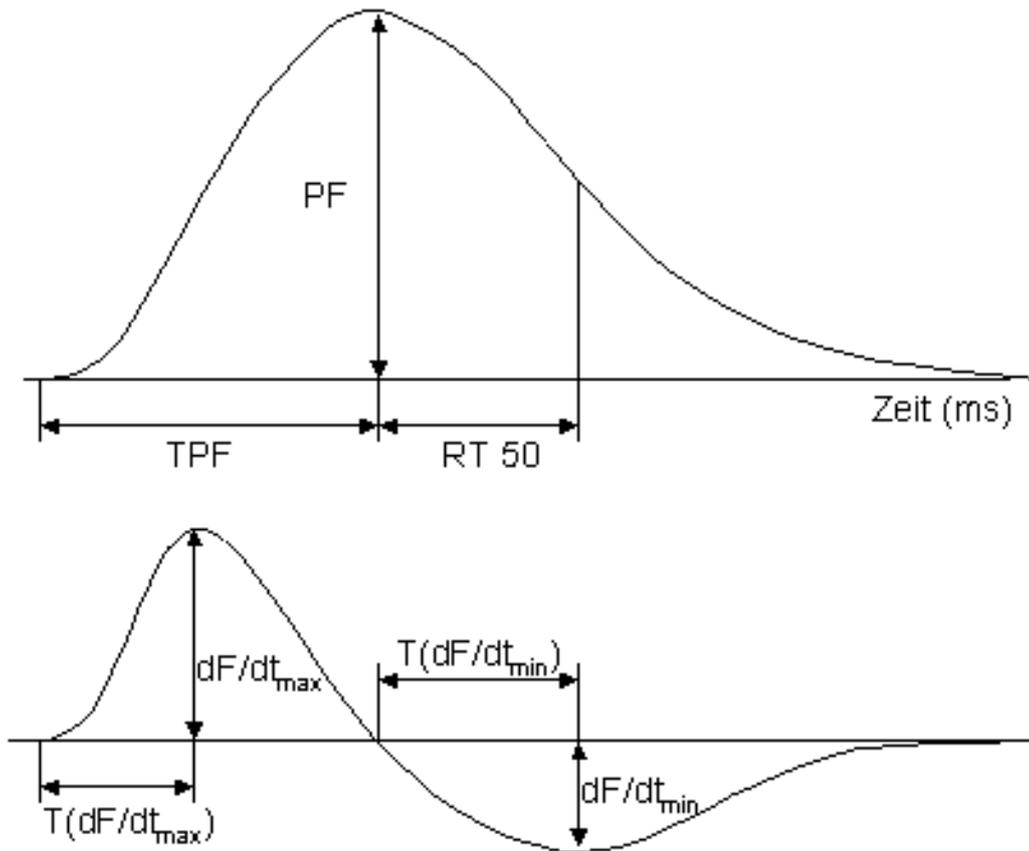
Lösung in einem doppelwandigen thermostatisierbaren Vorratsgefäß (Inhalt 25 ml) rezirkulierend ausgetauscht wurde. Die Temperatur der Versuchslösung in der Messkammer wurde konstant bei 31 °C gehalten. Die elektrische Stimulation des Papillarmuskelpräparates erfolgte über zwei in der Messkammer parallel angeordnete Plattenelektroden aus Platin mittels spannungskonstantem biphasischen Rechteckimpuls mit einer Dauer von 7 ms. Bei einer Vorlast von 0,1 bis 0,2 mN wurde das Präparat zur Äquilibration für 20 – 30 min mit 0,25 Hz stimuliert. Die Reizstromstärke von 30 – 60 mA lag 1,3fach über der Reizstärke, die zur Auslösung einer maximalen kontraktiven Antwort erforderlich war. Ein mechanoelektrischer Wandler übertrug das Kraftsignal vom Kraftmessgerät auf einen Oszillographen sowie über einen Analog-Digital-Wandler auf einen PC. Die Aufzeichnung und Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe eines im Labor von Dr. Günther (Physiologisches Institut der Charité, Universitätskliniken Berlin, Campus Mitte) erstellten Computerprogramms. Nach der Äquilibrationsphase wurden die  $[Ca^{2+}]$  in der Blutersatzlösung und die Reizfrequenz auf 1,5 mM bzw. auf 0,5 Hz erhöht. Die Vorlast wurde parallel dazu auf 0,5 bis 1 mN eingestellt. Diese Vorlast gewährleistete eine halbmaximale, stabile Kraftentwicklung über mehrere Stunden. Kriterium für die Funktionsstabilität der Präparate war eine über zwei bis drei Stunden bestehende konstante Kraftentwicklung sowie stabile Kontraktions- und Relaxationsgeschwindigkeit.

Durch schrittweise mechanische Dehnung des Präparates wurde vorher die Vorlast ermittelt, bei der eine maximale Kraftentwicklung erreicht wurde. Im Verlaufe eines Experiments wurden die Mechanogramme normaler rhythmischer 0,5 Hz-Kontraktionen sowie potenziierter Kontraktionen nach Extrastimulation (postextrastimulatorische Potenzierungen – PEP) zur Charakterisierung der Kraft-Intervall-Beziehungen aufgezeichnet.

An dem aufgezeichneten Mechanogramm, bzw. dessen ersten Ableitung wurden folgende weitere Parameter errechnet:

$(dF/dt_{max})/PF$ ,  $(dF/dt_{min})/PF$  und ein  $V_{max}$ -äquivalent als Maß für die maximale lastfreie Verkürzungsgeschwindigkeit der Sarkomere, was mit der Geschwindigkeit des Kreuzbrückenzyklus korreliert.

Eine maximale PEP durch Extrastimulationen wurde bei den Papillarmuskeln in der Regel bei einem Extrastimulationsintervall von 180 bis 500 ms erzielt.  $PEP_{max}$  ist die größte Potenzierung nach Extrastimulation relativ zur vorhergehenden rhythmischen Kontraktion. Nachpausenpotenzierungen entstanden durch Unterbrechen der rhythmischen Stimulation für eine Dauer von 7,5 bis 240 s.



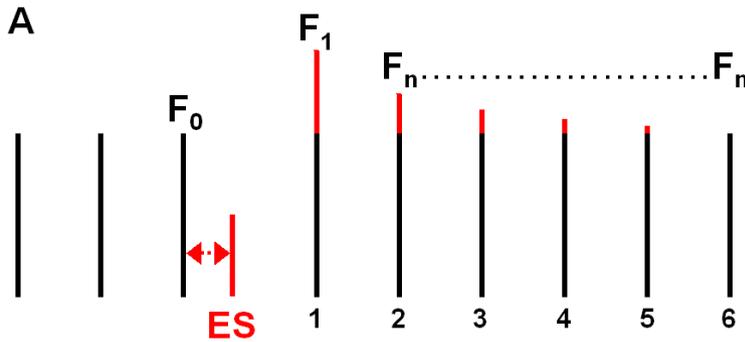
**Abb. 3.2 Parameter des Mechanogramms.** Aus dem Kraftsignal und dessen erster Ableitung dienen folgende Parameter zur Charakterisierung von Kontraktion und Relaxation:

PF – maximale Kontraktionsamplitude der Einzelkontraktion (Peak Force); TPF – Dauer des Kraftanstiegs bis zum Erreichen von PF (Time to Peak);  $RT_{50}$  – Relaxationszeit bis zum Erreichen von 50 % von PF;  $dF/dt_{max}$  – maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit errechnet aus der 1. Ableitung des Kraftsignals;  $dF/dt_{min}$  – maximale Kraftabfallgeschwindigkeit errechnet aus der 1. Ableitung des Kraftsignals;  $T(dF/dt_{max})$  – Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kraftanstiegsgeschwindigkeit;  $T(dF/dt_{min})$  – Zeit bis zum Erreichen der maximalen Kraftabfallgeschwindigkeit

Das schrittweise Abklingen der Potenzierung von  $PEP_{max}$  sowie das Abklingen der Potenzierung nach Reizpausen (NPP) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$PEP_n \text{ (bzw. NPP}_n) = (F_n - F_0) / (F_1 - F_n)$$

Dabei bedeutet  $F_n$  die maximale Kraftamplitude der aktuellen rhythmischen Nachfolgekontraktion nach Intervention,  $F_0$  die maximale Kraftamplitude der letzten rhythmischen Kontraktion vor Intervention,  $F_1$  die maximale Kraftamplitude der 1. postextrastimulatorischen Kontraktion bzw. die maximale Kraftamplitude der 1. Nachpausenkontraktion. Das Verhältnis der einzelnen Parameter ist in **Abb. 3.3** schematisch dargestellt.



**Abb. 3.3 Schematische Darstellung von extrasystolischer Potenzierung an isolierten Papillarmuskeln.** Extrasystolische Potenzierung (PEP).  $F_0$  – die maximale Kraftamplitude der letzten rhythmischen Kontraktion vor Intervention;  $F_1$  – die maximale Kraftamplitude der 1. postextrastimulatorischen Kontraktion bzw. die maximale Kraftamplitude der 1. Nachpausenkontraktion;  $F_n$  – maximale Kraftamplitude der aktuellen rhythmischen Nachfolgekontraktion nach Intervention; ES - Extrasystole

### 3.2.6. Histologische Untersuchung des Herzens

Der Herzmuskel wurde in der Mitte zwischen Apex und Herzbasis in horizontale Scheiben geschnitten und in einer frisch angesetzten alkoholischen Bouin-Lösung, modifiziert nach Dubosq-Basil (1905) (65,04 % v/v Pikrinsäurelösung, 28,32 % v/v Formaldehyd, 6,64 % v/v Eisessig), fixiert. Nach 24 Stunden wurde die Probe in 80 % Alkohol überführt und bis zum Schneiden und Färben der Präparate bei RT darin gelagert. Mit einem Entwässerungsautomaten wurde durch eine aufsteigende Alkoholreihe (80 % Ethanol, 100 % Ethanol, 100 % Isopropanol) den Präparaten das Wasser entzogen und gleichzeitig mit Paraffin durchtränkt. Danach lag das entwässerte und paraffindurchtränkte Probenmaterial in der Reaktionskammer vor. Zuletzt wurden die Proben manuell in Paraffinblöcke gegossen und vor dem Schneiden gekühlt. Mit einem Mikrotom wurden die Paraffinblöcke dann in 2 – 3  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten, im Wasserbad bei 40 °C zwischen gelagert, auf einen Objektträger gezogen und auf einer Wärmeplatte getrocknet. Routinemäßig wurden alle Paraffinschnitte mit Mayer`s Hämatoxylin-Eosin (HE) und Puchtler`s Picro-Sirius Red (SiR) gefärbt (Romeis 1989). In der HE-Färbung stellen sich der Zellkern blau, das Muskel- und Bindegewebe rosa bis rot dar. Sie diente als Übersichtsfärbung, bei der besonders die Veränderungen der Kardiomyozyten bestimmt werden konnte. In der SiR-Färbung hingegen erscheinen Kerne blau, Myozyten gelb und Kollagenfasern rot. Diese Färbung eignet sich besonders gut um den Kollagenfaseranteil und somit abgelaufene reaktive Umbauvorgänge der extrazellulären Matrix zu beurteilen. Für diese Arbeiten wurde ein Färbeautomat benutzt.

Die Betrachtung der Gewebeschnitte erfolgte mit einem Lichtmikroskop (Axiphot, Zeiss). Alle Auswertungen wurden von zwei verschiedenen Untersuchern in einer Blindstudie durchgeführt, um die subjektive Konstante möglichst gering zu halten.

Bei der HE-Färbung wurde zuerst auf generelle Gewebeauffälligkeit zwischen den einzelnen Tiergruppen geachtet. Anschließend wurden die Kardiomyozyten hinsichtlich ihres Durchmessers verglichen. Hierzu wurden repräsentative Schnittareale (10 pro Schnitt, 6 Schnitte pro Herz, 7 Tiere pro Gruppe) ausgewählt, digitalisiert und dann mit einer Bildanalysesoftware morphometrisch bearbeitet und ausgewertet. Der Durchmesser eines Myozyten wurde immer an der Stelle der maximalen Zellkernschnittfläche bestimmt.

Die SiR-gefärbten Schnitte wurden bezüglich ihres Gesamtkollagenanteils verglichen. Auch hier wurden repräsentative Schnitte (30 pro Schnitt) ausgewählt, digitalisiert und semiquantitativ ausgewertet. Die fibrotischen Anteile wurden über eine Schwelleneinstellung (Threshold) detektiert (10 x Objektiv), bei der sich die Anteile in Form schwarzer Pixel darstellen lassen. So konnte der prozentuale Anteil der schwarzen Pixel bezogen auf die ausgewertete Gesamtfläche von  $301146.94 \mu\text{m}^2$  bestimmt werden (94;95;103).

### 3.2.7. Herstellung von Herzhomogenaten

Als Untersuchungsmaterial für die durchgeführten biochemischen Messungen dienten linksventrikuläre Homogenate. Bei der Homogenisation entstehen aus myozytären Membranen (Sarkolemm, SR, mitochondriale Membranen), die verschiedene Regulatorproteine enthalten (u.a. SERCA, PLB), zuerst Membranfragmente. Aus diesen bilden sich im verwendeten Homogenisationsmedium aus thermodynamischen Gründen spontan Membranvesikel. Jedes Vesikel enthält in seiner Membran entsprechende  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportproteine und bildet ein abgeschlossenes Kompartiment. Aufgrund dieser Vesikelbildung sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxmessungen in Herzmuskelhomogenaten möglich. In Abhängigkeit von der gewählten  $\text{Ca}^{2+}$ -Fluxmethode, können entweder retikuläre oder sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporte selektiv gemessen werden (194).

Bei  $4^\circ\text{C}$  wurden 20 – 30 mg tiefgefrorenes Myokard nach Zugabe des 30-fachen Volumens an eiskaltem Homogenisationsmedium (s. **Tab. 3.1**) in einem Polykarbonröhrchen (Fa. Falken) bei ca. 24000 U/min. mit zwischenzeitlichen Pausen von je 15 sec (Aktivitätsverluste durch Erwärmung) insgesamt 6 mal für 10 sec mit einem elektrischen Polytron-Dispergiergerät homogenisiert. Danach wurde durch Polyamidgaze (Porenweite  $140 \mu\text{m}$ , NEOLAB; Heidelberg) filtriert, um größere, nicht genügend zerkleinerte Bindegewebsanteile zu entfernen. Der Proteinverlust durch die Filtration lag unter 5 % des Gesamtproteins. Portionen von 50 und  $100 \mu\text{l}$  wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

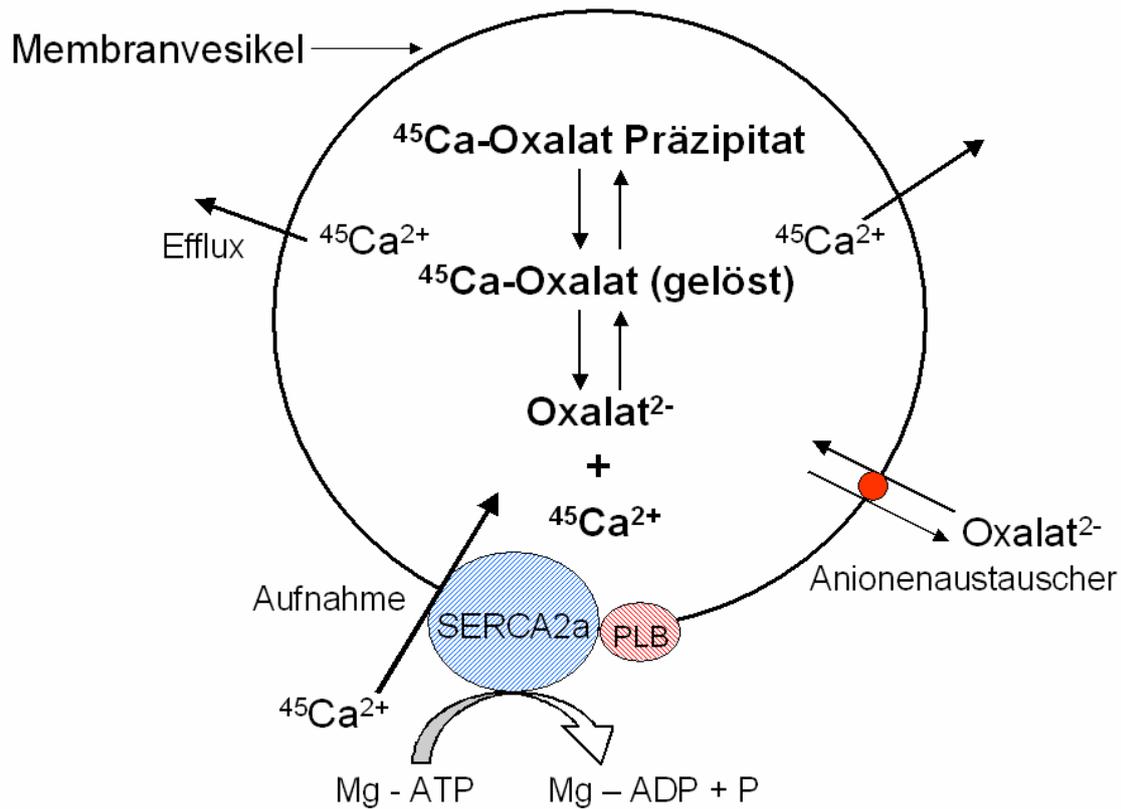
### 3.2.8. Oxalat-stimulierte $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme

Die Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme erfolgte mit der Millipore-Vakuum-Filtrationsmethode unter Einsatz von radioaktiv markiertem Calciumchlorid ( $^{45}\text{CaCl}_2$ ) (109;171). Grundlage der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportmessungen ist das Prinzip der oxalat-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme. Hierbei wird eine Probe des Homogenats mit einem Reaktionsmedium (s. **Tab 3.1**) inkubiert, das radioaktiv markiertes  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  enthält. Die freie  $[\text{Ca}^{2+}]$  wird mit Hilfe eines  $\text{Ca}^{2+}$ /EGTA- Puffersystems eingestellt. Durch die in der Membran des SR lokalisierte  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a werden unter ATP Verbrauch  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  aus dem extravesikulären Raum in das Vesikellumen transportiert. Dieses  $\text{Ca}^{2+}$  bildet dann im Vesikel mit Oxalatanionen schwer lösliches  $^{45}\text{Ca}$ -Oxalat, das im Lumen der SR-Vesikel präzipitiert. Dadurch wird die freie, intravesikuläre  $[\text{Ca}^{2+}]$  niedrig gehalten, so dass der Konzentrationsgradient, gegen den die  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpe  $\text{Ca}^{2+}$  in den SR-Vesikel transportiert wesentlich vermindert wird. Außerdem wird der passive  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux aus den SR-Vesikeln minimiert und bleibt somit vernachlässigbar klein (siehe **Abb. 3.4**).

**Tab. 3.1 Zusammensetzung des Reaktionsansatz (200  $\mu\text{l}$ ) für die Bestimmung der oxalat-stimulierten Transportaktivität in Herzhomogenaten:**

Reaktionsansatz	Volumen, $\mu\text{l}$	Endkonzentration, mM
160 mM Imidazol	50	40
20 mM $\text{MgCl}_2$		5
400 mM KCl		10
0,1 M $\text{NaN}_3$	20	10
2 mM EGTA	20	0,2
50 mM ATP Tris	20	5
300 mM CrP	4	6
$\text{H}_2\text{O}$ , $\text{Ca}^{2+}$ frei	49,5	
5 mM $^{45}\text{CaCl}_2$	5,5	0,1375
0,1 M K-Oxalat	20	10
Homogenat (3-5 mg/ml)	10	30 – 50 ng

Durch diesen Oxalateffekt wird die in SR-Vesikeln transportierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge im Vergleich zur transportierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge ohne Oxalatzusatz ca. 100-fach gesteigert. Dadurch ist eine verlässliche Bestimmung des SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transports in Herzhomogenaten ohne aufwendige Präparation von SR-Membranfragmenten möglich. Diese Prozesse sind in **Abb. 3.4** schematisch dargestellt.



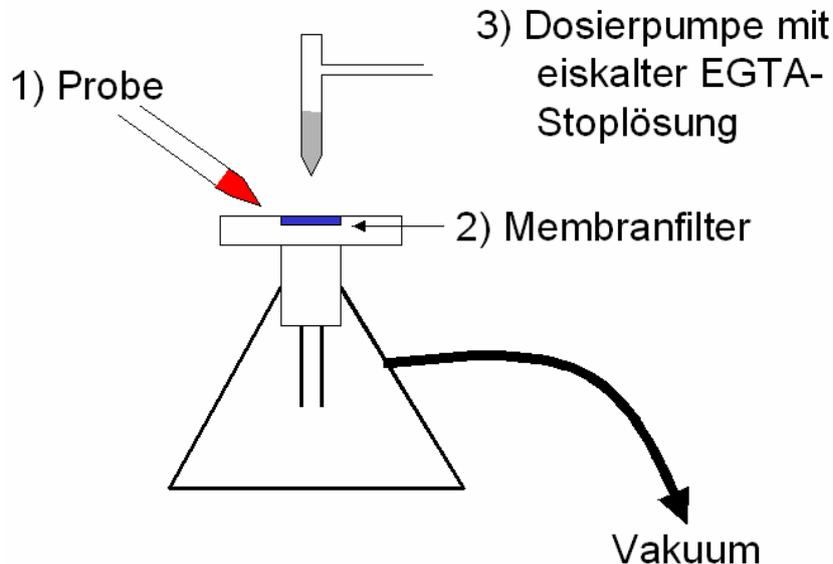
**Abb. 3.4 Prinzip der Oxalat-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme.** Senkung der intravesikulären freien  $[\text{Ca}^{2+}]$  durch Oxalatpräzipitation. Dadurch arbeitet SERCA2a gegen einen niedrigeren Konzentrationsgradienten und es kommt somit zu einer Steigerung der aufgenommenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge um den Faktor 100. Der passive  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux ist stark vermindert.

Da in Herzhomogenaten auch Membranfragmente (Sarkolemm, Mitochondrien) mit anderen  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsystemen enthalten sind, wurden bei diesem Protokoll die Reaktionsbedingungen so gewählt, dass nur die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase das  $\text{Ca}^{2+}$  transportiert.

Der Zusatz von 10 mM  $\text{NaN}_3$  diente als wirksamer Hemmstoff der mitochondrialen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase. Die Ausschaltung des  $\text{Na}/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers erfolgte durch Arbeiten im  $\text{Na}^+$ -freien Milieu. Der Anteil der ATP-abhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in sarkolemmnale Vesikel, der durch die PMCA katalysiert wird, ist unter den gewählten Reaktionsbedingungen vernachlässigbar klein ( $< 5\%$ ) (193). Zur Einstellung der gewünschten freien  $[\text{Ca}^{2+}]$  wurde die Zugabe von 5 mM  $^{45}\text{CaCl}_2$  variiert. Die EGTA-Konzentration betrug immer 200  $\mu\text{M}$  ( $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ -Puffer).

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme wurde durch Zugabe des Homogenats zum Reaktionsansatz gestartet. Der Oxalat-stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmeprozess wurde nach 2.0 min wie folgt beendet: 150  $\mu\text{l}$  des Reaktionsmediums wurden auf einen Membranfilter (Sartorius, Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) gegeben und vakuumfiltriert. Dadurch wurden die Vesikel von im Reaktionsmedium befindlichen  $\text{Ca}^{2+}$ , ATP und anderen Bestandteilen des Aufnahmemediums schlagartig 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 laufender  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportvorgänge zusätzlich gestoppt.

Die Waschlösung enthielt EGTA, welches noch auf dem Filter vorhandene bzw. an Membranpartikel gebundene  $\text{Ca}^{2+}$  komplexiert und während der Filtration entfernt.



**Abb. 3.5 Versuchsaufbau 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.

Die verbleibende filterassoziierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge entspricht der in SR-Vesikel durch die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase transportierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Menge. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen überführt und bei  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 30 min im Trockenschrank getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Irgasafe Plus, Zinsser Analytic) wurde die  $\beta$ -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) gemessen. Der Variationskoeffizient der Methode liegt bei  $< 5\%$ . Routinemäßig wurden Doppelbestimmungen bei einer oder verschiedenen freien  $[\text{Ca}^{2+}]$  durchgeführt.

### 3.2.9. Proteinbestimmung

Der qualitative Nachweis von Protein in Herzhomogenaten erfolgte nach der Methode von Lowry (122) mit Rinderserumalbumin als Eichprotein. Bei dieser Methode bildet sich zuerst in alkalischer Lösung ein Protein-Kupfer-Komplex. Bei dem nachfolgenden Reaktionsschritt erfolgt die Reduktion des Folin-Ciocalteu's-Phenol-Reagenzes (Folin-Reagenz) durch die mit dem  $\text{Cu}^{2+}$  komplexierten Proteinen. Der Kupfer-Protein Komplex bewirkt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form von Heteropolyphosphorsäuren vorliegen. Es entstehen Mischoxide zwischen jeweils VI- und IV-wertigem Molybdän (Molybdänblaureaktion) bzw.

Wolfram. Die Reduktion des Reagenzes erfolgt, nachdem  $\text{Cu}^{2+}$  im Kupfer-Protein-Komplex zu  $\text{Cu}^+$  reduziert wird. Bei der Reduktion erfährt das Folin-Reagenz einen Farbumschlag von gelb nach blau. Die resultierende Blaufärbung wird zur quantitativen Bestimmung der Proteinkonzentration benutzt. Dazu wird für mehrere Proben bekannter Proteinkonzentrationen die Extinktion des bei der Reaktion mit dem Folin-Reagenz entstehenden blauen Farbstoffs ermittelt. Nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz:

$$E_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d$$

- $E_{\lambda}$  - Extinktion bei der Wellenlänge  $\lambda$   
 $\epsilon_{\lambda}$  - molarer Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge  $\lambda$   
 $c$  - Konzentration  
 $d$  - Schichtdicke

wird die gemessene Extinktion als Funktion der Proteinkonzentration graphisch dargestellt und der molare Extinktionskoeffizient aus dem Anstieg der resultierenden Geraden ermittelt. Unter Verwendung des so erhaltenen molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich dann für eine beliebige Proteinprobe wiederum unter Anwendung des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration bestimmen.

Für die Proteinbestimmung sind folgende Reagenzien erforderlich:

Lösung A: 2%ige Lösung von  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  + K-Na-Tartrat in 0,1 N NaOH

Lösung B: 0,5%ige Lösung von  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Lösung C: 50 ml Lösung A + 1 ml Lösung B (kurz vor Gebrauch mischen)

Die Proteinbestimmung wurde wie folgt ausgeführt:

Von einer Proteinstammlösung (BioRad®; Protein Standard Assay) mit der Konzentration 1,37 mg/ml wird folgende Verdünnungsreihe hergestellt: 13,7  $\mu\text{g}$ , 27,4  $\mu\text{g}$ , 41,1  $\mu\text{g}$ , 54,8  $\mu\text{g}$ , 68,5  $\mu\text{g}$ .

Dazu werden je 10, 20, 30, 40, 50  $\mu\text{l}$  BioRad® Standardprotein in einem Reagenzglas vorgelegt und auf 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Für den Leerwert wird 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  vorgelegt. Die zu bestimmenden Proben werden im Verhältnis 1:1 mit NaOH verdünnt (50  $\mu\text{l}$  Proteinprobe + 50  $\mu\text{l}$  NaOH) und mit 2,5 ml Lösung C durchmischt. Analog wird mit dem Leerwert verfahren. Nach 10-minütigem Stehen bei RT wurde zu allen Proben 0,25 ml Folin-Reagenz (vor Gebrauch 1:1 verdünnen) hinzugefügt und der Reaktionsansatz durch Vortexen sofort durchmischt. Nach 40 – 60 minütiger Reaktionszeit bei RT wurde die Extinktion des gebildeten Farbstoffs bei 585 nm an einem Absorptionsspektrophotometer vermessen. Für jede Probe wurde eine Doppelbestim-

mung durchgeführt. Die gemessenen Extinktionen wurden mit Hilfe eines Computerprogramms als Funktion der Konzentration der Eichproteinlösungen aufgetragen. Das Programm ermittelte den molaren Extinktionskoeffizienten ( $\epsilon_\lambda$ ) und berechnete entsprechend des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Proteinkonzentrationen der zu vermessenden Proben.

### 3.3. *Genotypisierung von Ratten der Linie 1167*

Da die Untersuchungen an heterozygoten SERCA2a-transgene Ratten der Linie 1167 vorgenommen wurden, war eine Genotypisierung der gezüchteten Tiere erforderlich. Das erfolgte mit Southernblottechnik unter Nutzung einer transgen-spezifischen DNA-Sonde. Jedes genotypisierte Tier wurde exakt in einem Stammbaum erfasst. Bei der Verpaarung der Zuchttiere wurden jeweils ein transgen-positiver Rattenbock wurde mit zwei transgen-positiven Weibchen für eine Woche in einen Käfig zusammengesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Geschwister untereinander verpaart wurden.

#### 3.3.1. **Biopsie des Rattenschwanzes**

Zwecks Isolierung genomischer DNA wurde den gezüchteten Jungtieren drei Wochen post partum ein ca. 0.5 cm langes Stück des Schwanzendes entnommen. Dieses Resektat wurde bis zur DNA-Isolierung in einem 2 ml Eppendorfröhrchen (Safe Lock) bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Um die bei der Resektion entstandene geringfügige Blutung schnell zu stoppen und den Heilungsprozess zu fördern, wurde die entstandene kleine Schnittwunde mit Hilfe von Histoacryl<sup>®</sup> Gewebekleber (Fa. B. Braun-Dexon GmbH, Tuttlingen) versiegelt.

#### 3.3.2. **Genomische DNA- Isolierung (Salz-Alkohol-Extraktion)**

Die bei  $-80^\circ\text{C}$  in einem 2 ml Eppendorfröhrchen gelagerten kleinen Schwanzstückchen wurde zunächst für 5 min bei RT aufgetaut und anschließend 0.7 ml „Tail“-Lysepuffer versetzt, der 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, 1 % SDS und 50 mM Tris, pH 8.0 enthielt. Nach Zugabe von 35  $\mu\text{l}$  (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-Schüttler mit 550 U/min inkubiert. Der proteolytische Abbau der Zellproteine durch Proteinase K ist ein essentieller Schritt bei der DNA-Isolierung. Bei diesem Enzym handelt es sich um eine Serinprotease, welche peptidische Bindungen X-Y, wobei X eine aromatische, aliphatische oder hydrophobe Aminosäure und Y jede beliebige Aminosäure sein kann, spaltet. 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 proteolytierten Proben wurden am nächsten Morgen zunächst für 10 min auf Eis 10 min gekühlt. Danach wurden zu jeder Probe 300 µl 6 M NaCl zupipetiert und bei 4 °C für 30 min bei 18800 g zentrifugiert. 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 µl/ml 100 mM Tris/HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl; Fa. Sigma) zupipetiert, 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) ausgefällt. Die Reaktionsgefäße wurden dann für mindestens 10 min bei Raumtemperatur (RT) stehen gelassen und anschließend mit bei 4 °C für 10 min bei 18800 g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde sorgfältig 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 18800 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mittels einer Vakuum-Membranpumpe vorsichtig entfernt und das Pellet bei RT für 15-20 min getrocknet. Die 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.

### 3.3.3. Bestimmung der DNA- Konzentration mittels Absorptionsspektrometrie

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in 1:50 verdünnten DNA-Originallösungen erfolgte durch die Messung der optischen Dichte (OD) im UV-VIS 1202 Spektrophotometer. In der Regel wurden in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß (Eppendorf) 2 µl Original-DNA-Lösung vorgelegt, 98 µl steriles H<sub>2</sub>O zugegeben, vorsichtig vermischt und der Inhalt in eine Präzisionsquartzküvette (Suprasil, Fa. Hellma) überführt. Die Extinktion wurde gegen einen H<sub>2</sub>O-Leerwert bei einer Wellenlänge von 260 nm (Nukleinsäure) bzw. 280 nm (Protein) gemessen. Die DNA-Konzentration (c) der Originallösung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$c [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{OD}_{260} \times 50_a \times 50_b) / 1000;$$

OD<sub>260</sub> – Extinktion bei 260 nm, a - Verdünnungsfaktor, b – Multiplikationsfaktor für doppelsträngige DNA.

### 3.3.4. ApaI-Restriktionsverdau genomischer DNA

Um die isolierte genomische Proben-DNA vor der Gelelektrophorese spezifisch zu fragmentieren, wurde diese mit der Restriktionsendonuklease Apa I verdaut. Dieser Schritt sorgt dafür, dass aus SERCA2-transgen positiver genomischer DNA ein transgen-spezifisches ApaI-ApaI-Fragment freigesetzt wird, das sich bei der anschließenden Hybridisierung als transgen-spezifische 1,2 kb-Bande nachweisen lässt. 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 (195), die nur im SERCA2-Transgen, nicht jedoch in endogenen SERCA2-Gen enthalten sind. Der 30 µl-Ansatz für den Restriktionsverdau enthielt 20 µg genomische DNA, 1 mM Dithiothreitol, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 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 inkubiert.

### 3.3.5. DNA-Elektrophorese und Southern Blot

Die ApaI-geschnittenen DNA-Proben wurden in einem 0,8 %-en Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Zur Herstellung des 0,8 %-en Gels wurden 2,8 g Agarose (ultraPure, GibcoBrl) in 350 ml 1x TAE-Puffer verrührt (40 mM Tris; 0,11 % v/v Eisessig; 0,001 M EDTA; pH 8,0) und anschließend bis zur vollständigen Lösung der Agarosepartikel 3 x 1 min bei 600 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Der Lösung wurden 5 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid (Fa. Sigma) zugesetzt und ein 6 – 8 mm dickes Maxigel (19,5cm x 20,5 cm) gegossen. In die mit flüssiger Agarose-lösung gefüllte horizontale Gelelektrophoresekammer wurde ein 2 mm dicker Kamm eingesetzt. Nach Erstarren der Agarose wurde 1x TEA-Puffer in die Kammer gegossen, so dass sich eine 2-3 mm Überschichtung des Gels mit Laufpuffer ergab. Danach wurde der Kamm entfernt. Zu den 30 µl ApaI-verdauten DNA-Proben wurden je 5 µl 6 x DNA-TE- Ladepuffer (60 mM Tris/HCl, 6 mM EDTA, pH 7.4; 40 % w/v Saccharose; 0,025 w/v Bromphenolblau) pipettiert. Diese Mischung wurde gut gemischt und dann vorsichtig in jeweils eine der vorgegebenen Ausparungen (Well) am Gelstart pipettiert. Für Kontrollzwecke wurde in vier weitere freie Wells mit 4 µl 1-kb-DNA-Größenmarker (1 µg/µl Fa. GibcoBrl), 36 µl Positivkontrolle (20 µg DNA), 36 µl Negativkontrolle (20 µg DNA) bzw. 1 µg Apa I-restriktionsverdauter, aufgereinigter transgener SERCA2-Plasmid-DNA aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei konstanter Spannung von 80 V für 150 min.

Anschließend wurden die nach der Größe getrennten DNA-Fragmente auf eine Nylonmembran 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 an der Edinburgher Universität entwickelte, um einzelne transferierte DNA-Fragmente später durch Hybridisierung mit markierten Sonden spezifisch nachweisen zu können. Für die durchgeführten Versuche wurden positiv geladene Nylontransfermembranen (Hybond-N<sup>+</sup>, Fa. Amersham) benutzt. Das Agarosegel wurde zuerst vorbehandelt, um einen effizienten Transfer zu gewährleisten. Dazu wurden das Agarosegel, die Nylontransfermembran, und ein der gleichen Größe entsprechendes Chromatographie-Whatmanpapier 3MM kurz in 20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7.0) gewaschen und in einer Vakuum-Blot-Apparatur 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-Papiersicht gezogen. Die komplette Durchdringung 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 kleineren 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 N 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 Neutralisierungslösung (20 x SSC) fortgesetzt. Am Ende des Transfers wurde die feuchte Nylonmembran entnommen und die transferierten DNA-Stränge in einem UV-Stratalinker mit funktionellen Gruppen der Membranmatrix kovalent vernetzt (2 x 1200 µJ x 100), so dass nun ein Hybridisieren ohne ein Ablösen von DNA-Fragmenten möglich wurde. Für die Hybridisierung wurde eine durch „random priming“ <sup>32</sup>P-markierte, transgen-spezifische 1,2 kb Sonde benutzt (195).

Zur Prähybridisierung wurde die UV-behandelte Membran zuerst in ein Hybridisierungsrohr mit 10 ml Prähybridisierungsmix (30 % v/v 20x SSC, 10 % v/v 100x 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. Das für die Blockierung unspezifischer DNA-Bindungsstellen benutzte Heringssperma-DNA wurde vor Gebrauch bei 95°C denaturiert und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Die Prähybridisierungslösung wurde durch 10 ml Hybridisierungsmixtur ersetzt, die neben 1 ml Heringssperma-DNA und die <sup>32</sup>P-markierte, transgenspezifische DNA-Sonde enthielt. Die Hybridisierung im Hybridisierungssofen erfolgte bei 64°C über Nacht (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- Transfermembran aus der Hybridisierungsmixtur entnommen und in einer Kunststoffschale (20 cm x 20 cm) sequentiell wie folgt gewaschen, um nichtgebundene radioaktive DNA-Sonde zu entfernen:

Waschschritt	Volumen	Waschlösung	Temperatur	Dauer
I	1l	2x SSC/0,1 %SDS	RT	15 min
II	1l	0,5x SCC/0,1 % SDS	RT	15 min
III	1l	0,1x SCC/0,1 % SDS	RT	15 min
IV	1l	0,1x SSC/1,0 % SDS	64°C	30 min

Der Nachweis des spezifisch radioaktiv markierten 1,2 kp DNA-Bande erfolgte mittels der „Storage Phosphor“-Technik auf einem PhosphorImager. 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 dann mit der PhosphorImager BAS 2.05 und AIDA 2.11 Software (Fa. Ray-Test).

### 3.4. *Bestimmung kardialer mRNA-Spiegel mit Northern Blot Technik*

#### 3.4.1. **RNA- Isolierung**

Aus ca. 100 mg Gewebeproben des linken Ventrikels - zuvor in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert - wurde die gesamte zelluläre RNA mit der sog. Einschrittmethode nach Chomczynski und Sacchi isoliert (37). Dazu wurde die monophasische Lösung TRIzol® (Fa. InVitrogen) benutzt, die Guanidinisothiocyanat (GTC) und Phenol enthält. Durch das chaotopie GTC werden die Gewebebestandteile 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 (18 mm/95 mm; Fa. Greiner bio-one) wurden die Gewebeprobe in 1 ml TRIzol® mit einem Polytron-Homogenisator 3 x 10 s bei 15 000 U/min homogenisiert. Die Homogenate wurden zwecks vollständiger Lyse für 5 min bei RT inkubiert. Der Röhrcheninhalt wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, mit 0,2 ml Chloroform (Fa. Merck) 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“

zentrifugiert. Die wässrige RNA-haltige Phase wurde in neue 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, zwecks RNA-Ausfällung mit 0,5 ml  $-20^{\circ}\text{C}$  kaltem Isopropanol vermischt und die Mischung für 20 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Danach wurde bei  $4^{\circ}\text{C}$  für 10 min wie vorher zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das erhaltene gallertartige Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation ( $10\,000\text{ g}/10\text{ min}/4^{\circ}\text{C}$ ) und Entfernung des Überstandes wurde das RNA-Pellet getrocknet und in  $30\ \mu\text{l}$  sterilem  $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. In manchen Fällen wurde zusätzlich 15 min bei  $60^{\circ}\text{C}$  inkubiert, um das RNA-Pellet komplett zu lösen. Anschließend wurde nach 1:50 Verdünnung die RNA-Konzentration der Proben spektrophotometrisch bestimmt. Die Extinktion wurde gegen einen  $\text{H}_2\text{O}$ -Leerwert bei einer Wellenlänge von 260 nm (Nukleinsäure) bzw. 280 nm (Protein) gemessen. Die RNA-Konzentration ( $C_{\text{RNA}}$ ) der unverdünnten RNA-Originallösung wurde mit folgender Formel berechnet:

$$C_{\text{RNA}}[\mu\text{g}/\mu\text{l}] = (\text{OD}_{260} \times 50_a \times 40_b)/1000;$$

$\text{OD}_{260}$  – Extinktion bei 260 nm, a - Verdünnungsfaktor, b – Multiplikationsfaktor für RNA.

Die RNA-Proben wurden bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 3.4.2. Northern Blot-Technik

Alle benutzten Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem, 2x autoklaviertem Wasser angesetzt und alle Arbeiten wurden unter einem Abzug durchgeführt. Zwecks Denaturierung wurden zuerst 15 bzw. 20  $\mu\text{g}$  isolierte Gesamt-RNA in  $10\ \mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  mit  $30\ \mu\text{l}$  RNA-Probenpuffer (10 ml deionisiertes Formamid, 3,5 ml 37% Formaldehyd, 2 ml 5 x RNA-Elektrophoresepuffer, bestehend aus 200 mM MOPS, 50 mM NaAcetat, 10 mM EDTA, pH 7,0) gemischt, für 5 min auf  $65^{\circ}\text{C}$  erhitzt, anschließend auf Eis gestellt und mit  $5\ \mu\text{l}$  RNA-Gelladepuffer (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,  $11.5 \times 14\text{ cm}$  Agarosegels (1% Agarose, 6.5% Formaldehyd, in 1x RNA-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 1 x RNA-Elektrophoresepuffer gefüllte horizontale Gelelektrophoresekammer mit einem Elektrodenabstand von 24 cm benutzt. Eine Geltasche wurde mit 1  $\mu\text{g}$  RNA-Größenmarkern (0.5 bis 9 kb) belegt, die vor dem Auftragen 3 min bei  $60^{\circ}\text{C}$  in 1x Denaturierungspuffer 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 Wanne mit 20 x SSC (Pufferreservoir) gestellt und mit einer Doppellage in 20 x SSC 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<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>, Fa. Amersham) sowie zwei Lagen in 20 x SSC 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, Apura) gelegt. Es wurde darauf geachtet, dass dieser Saugpapierstapel alleinigen 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 20 x SSC-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 mit funktionellen Gruppen der Membranmatrix kovalent vernetzt (2x 1200 µJ x 100). Für die Hybridisierung in einem Hybridisierungssofen OV3 wurden wahlweise verschiedene durch „random priming“ <sup>32</sup>P-markierte cDNA-Sonden zum quantitativen Nachweis von SERCA2-, GAPDH-, und ANF-mRNAs genutzt (s. **Tab. 3.2**). Für Normierungszwecke wurden die Blots gestrippt und anschließend mit spezifischen <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonden für β-Actin- bzw. 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 5 x SSC, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0, 5 x Denhardts-Lösung, 5 ml deionisiertes Formamid, 1% SDS sowie 500 mg Heringssperma-DNA. Diese DNA-Lösung (0,5g/ml) wurde vor der Zugabe zur Prähybridisierungslösung wie unter 3.1.4 beschrieben vorbehandelt. Am Ende der Prähybridisierungsphase wurde in die Hybridisierungsröhre zu den 10 ml der Prähybridisierungslösung 20 – 40 ng der entsprechenden <sup>32</sup>P-markierte DNA-Sonde zugegeben. Die eigentliche Hybridisierung erfolgte über Nacht für ca. 16 h. Die gewählte Hybridisierungstemperatur für die einzelnen Sonden ist in Tabelle 3.2 angegeben.

Für die Markierung der entsprechenden DNA-Sonden wurde ein Prime-It<sup>®</sup>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 des Klenowfragment der DNA-Polymerase I [Exo(-)Klenow].

**Tab 3.2 Auflistung aller benutzten cDNA-Sonden für Northern- bzw. Westernblote**

cDNA-Sonde/ PCR-Fragment	Schnittstelle/ Ursprung	Länge des Restriktions- fragmentes (kb)	Hybridisierungstemp- eratur (°C)
SERCA2 (Ratte)	EcoR11-EcoR1	1,8	65
GAPDH (Hühnchen)	Pst1-Pst1	1,2	45
ANF (Ratte)	PCR	0,78	65
β-Actin (Ratte)	PCR	0,26	65

Das Enzym synthetisiert neue DNA-Stränge indem an freien 3'-OH-Gruppen der komplexierten Primer Nukleotidmonophosphate eingebaut werden. Die  $^{32}\text{P}$ -Markierung der neu synthetisierten DNA-Stränge in Gegenwart von  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  erfolgt durch Austausch eines nichtradioaktiven Desoxycytosinnukleotids durch ein  $^{32}\text{P}$ -markiertes Desoxycytosinnukleotid. In 50  $\mu\text{l}$  Markierungsansatz waren enthalten: 23  $\mu\text{l}$  Sonden-DNA (20 – 40 ng), 10  $\mu\text{l}$  Random-9mer DesoxyRibonukleotide, 10  $\mu\text{l}$  5x dCTP-Primerpuffer mit 0,1 mM dATP, 01 mM dGTP, 1 mM dTTP, 5  $\mu\text{l}$   $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$  (ca. 5  $\mu\text{Ci}$ ) und 2  $\mu\text{l}$  gepufferte Glycerollösung mit Exo(-)Klenow (10 U). Die 23  $\mu\text{l}$  Sonden-DNA (20 – 40 ng) und 10  $\mu\text{l}$  Random-9mer DesoxyRibonukleotide 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. Das Gemisch wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Das Reaktionsgemisch wurde auf Sephadex®-Quick Spin™-Säulen (Fa. Roche/Boehringer Mannheim) aufgetragen, um nicht in DNA eingebaute Nukleotide zu entfernen. Die Radioaktivität des  $^{32}\text{P}$ -markierte DNA enthaltenden Eluates betrug 2-3  $\mu\text{Ci}$ . Zur Bestimmung der spezifischen Sondenaktivität wurde 1  $\mu\text{l}$  Eluat entnommen, in 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnt und im β-Szintillationsmeßgerät nach Cerenkov gemessen. Das Eluat wurde 5 min bei 95° C inkubiert, 5 min in Eisbad angekühlt und zum Prähybridisierungsmix wie oben beschrieben pipettiert.

Nach der Hybridisierung über Nacht wurde die Nylonmembran wie folgt gewaschen:

Waschschritt	Volumen	Waschlösung	Temperatur	Dauer
I	1l	2x SSC/0,1 %SDS	RT	15 min
II	1l	0,5x SCC/0,1 % SDS	RT	15 min
III	1l	0,1x SCC/0,1 % SDS	RT	15 min
IV	1l	0,1x SSC/0,1 % SDS	64°C	30 min

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 PhosphorImagerbildes erfolgte mit der Software PhosphorImager BAS 2.05 und AIDA 2.11 wie bereits unter 3.3.5 beschrieben.

Vor einer nachfolgenden Hybridisierung mit einer anderen spezifischen DNA-Sonde wurden die Blots gestrippt. Das Strippen der Blots erfolgte in drei Schritten. Zuerst Inkubation bei 100°C in 1 l 0,1% SDS für 40 min. Anschließend wurde der Blot in einer Schale mit 0,5 l 2 x SSC zweimal für 10 min bei RT unter leichtem Schwenken inkubiert.

### 3.5. *RNA-Dotblot-Technik*

Zu 10 µl Gesamt-RNA-Lösung (1 µg RNA/µl) wurden 30 µl denaturierende RNA-Pufferlösung (500 µl deionisiertes Formamid, 162 µl 37% Formaldehyd, 100 µl 5 x RNA-Elektrophorese-puffer, 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 x SSC versetzt und davon 7,5 oder 15 µl in die einzelne Vertiefungen einer vorbereiteten Bio-Dot-Apparatur (Fa. BioRad) pipettiert, so dass die pro Dot 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 Nylontransfermembranen (Hybond<sup>TM</sup>-N<sup>+</sup>, Fa. Amersham) wurde für 10 min in 10 x SSC eingeweicht und danach in die Bio-Dot-Apparatur mit 96 einzelnen Mikrotitervertiefungen eingespannt. Die Nylonmembranfläche am Boden jeder Vertiefung betrug einheitlich 7 mm<sup>2</sup>. Die maximale RNA-Bindung an dieser Membranfläche betrug ca. 2 µg denaturierte Gesamt-RNA. Bei angelegtem Vakuum wurde die Membran am Boden der Mikrotitervertiefung zunächst mit 100 µl 10x SSC gewaschen. Das angelegte Vakuum wurde so eingestellt, dass pro Minute 100 µl Flüssigkeit vakuumfiltriert wurden. Danach wurden die denaturierten RNA-Probe pipettiert und vakuumfiltriert. Die Membranflächen aller Mikrotitervertiefungen wurden anschließend 3 x mit je 500 µl 10 x SSC gewaschen. Die Membran wurde aus der Apparatur entnommen, auf Whatman 2 MM-Papier kurz getrocknet und wie bereits unter 3.3 beschrieben UV-bestrahlt. Die weitere Prozessierung der Membran zum quantitativen Nachweis der membrangebundener spezifischer mRNAs erfolgte wie unter 3.3. für die Northernblottechnik beschrieben. Es wurde immer nur eine Dotblotmembran mit einer <sup>32</sup>P-markierter spezifischer cDNA-Sonde hybridisiert. Die Dotblotanalyse zur mRNA-Quantifizierung wurde nur dann eingesetzt, wenn durch Northernblot-Vorversuche

sichergestellt war, dass die entsprechende cDNA-Sonde nur mit einer RNA-Bande spezifisch reagierte.

### 3.6. *Westernblot-Analyse*

Um die kardialen Proteinspiegel SERCA2a und PLB zu quantifizieren, wurden Westernblotanalysen durchgeführt (186). Bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagerte linksventrikuläre Homogenate wurden aufgetaut und mit Proteinsolubilisierungslösung versetzt. Zwecks Solubilisierung wurden  $75\ \mu\text{l}$  Homogenat mit  $25\ \mu\text{l}$  4-fach konzentrierten Probenpuffer ( $200\ \text{mM H}_3\text{PO}_4$ ;  $20\ \text{mM EDTA}$ ;  $8\ \%$  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  $95^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Proteine wurden nach der Methode von Swank & Munkres (176) in einem  $1,5\ \text{mm}$  dicken Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgel ( $T=13,8\%$ ;  $C=3,2\%$ ) in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur elektrophoretisch aufgetrennt. Das Trenngel enthielt außerdem  $0,1\%$  SDS,  $6\ \text{M}$  Harnstoff,  $0,1\ \text{M H}_3\text{PO}_4/\text{Tris}$ , pH 6,8. Das Sammelgel ( $T=5,2\%$ ,  $C=0,7\%$ ) enthielt  $0,1\%$  SDS und  $123\ \text{mM Tris}$ , pH 6,8. Die Acrylamidpolymerisation wurde durch Zugabe von TEMED und Ammoniumpersulfat initiiert. Der Elektrophoresepuffer enthielt  $0,1\ \%$  SDS und  $0,1\ \text{M H}_3\text{PO}_4/\text{Tris}$ , pH 6,8. Während der Elektrophorese ( $120\ \text{V}$ ;  $2 - 3\ \text{h}$ ) wurde die Elektrophoresekammer gekühlt ( $4^{\circ}\text{C}$ ). Pro Bahn wurden  $10\ \mu\text{g}$  Herzprotein aufgetragen. Auf jeweils einer Gelbahn wurden solubilisierete Molekulargewichtsmarkerproteine ( $6,5$  bis  $200\ \text{kDa}$ ) getrennt.

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden im Verlaufe von  $90\ \text{min}$  bei  $100\ \text{V}$  vom Trenngel auf hydrophobe PVDF-Membran (Fa. Boehringer, Ingelheim) im Naßblotverfahren transferiert. Es wurde ein Standardtransferpuffer benutzt ( $25\ \text{mM Tris}$ ;  $192\ \text{mM Glycin}$ ;  $20\ \%$  v/v Methanol;  $0,01\ \%$  w/v SDS). Das Transfersandwich war wie folgt zusammengesetzt: Gitter (+), Schwamm, Blotting-Papier (BioRad), PVDF-Membran, Trenngel, Blotting-Papier, Schwamm, Gitter (-). Anschließend wurde die Membran mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült, in Saran-Folie eingeschlagen und bei  $4\ ^{\circ}\text{C}$  gelagert. Zur Überprüfung des Blotvorgangs wurde das Gel mit GelCode BlueStain (Pierce, Bonn) gefärbt. In der Regel ließen sich unterhalb der  $\beta$ -Galactosidase-Bande ( $122\ \text{kDa}$ ) keine angefärbten Banden finden.

Zum immunchemischen Nachweis von SERCA2a und PLB wurde die PDVF-Membran zuerst für  $5\ \text{min}$  in TBS-Puffer ( $150\ \text{mM NaCl}$ ;  $10\ \text{mM Tris}$ ; pH 8,0) equilibriert und anschließend in einem Hybridisierungsrohr in TBS-T-Blockierlösung ( $150\ \text{mM NaCl}$ ;  $10\ \text{mM Tris}$ ;  $5\ \%$  w/v Magermilch;  $0,1\ \%$  v/v Tween-20; pH 8,0) für  $60\ \text{min}$  bei RT auf einem Roller inkubiert. Nach

3x 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) bzw. mit einem 1: 2000 verdünnten monoklonalen PLB-Mausantikörper (Fa. Biomol) in TBS mit 1 % Rinderserumalbumin für 90 min bei RT oder für 12 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran bei RT 2x 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) bzw. Anti-Maus-IgG-Peroxydase-Konjugat (PLB) 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, Pierce) inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Photokassette mit Röntgenfilm (Kodak CRT 7) transferiert. Die Filme wurden für 1-5 min belichtet. Die entwickelten Filme wurden mit einem Durchlichtscanner gescannt und die entsprechenden Banden mit Hilfe der Image-Software DIANA II ausgewertet.

### ***3.7 Herstellung des Clipgerätes***

Um die Aorta standardisiert einzuengen wurde ein Weck<sup>®</sup>-Clipgerät (siehe **Abb. 3.6**) umgebaut. Da der Durchmesser des Clips variabel gestaltet werden sollte, wurde ein Gewinde gefräst und nach entsprechender Voreinstellung eine Imbus-Sechskant-Justierschraube eingesetzt, die mit einer Mutter festzustellen ist. Mit Hilfe von Eichmetallstiften mit einem Durchmesser von 0.4 bis 1.0 mm, konnten die Clips unterschiedlich stark verschlossen werden (siehe **Abb. 3.6**). Durch dieses Vorgehen konnte die Aorta ascendens der Versuchstiere unterschiedlich stark und reproduzierbar stenotisiert werden.

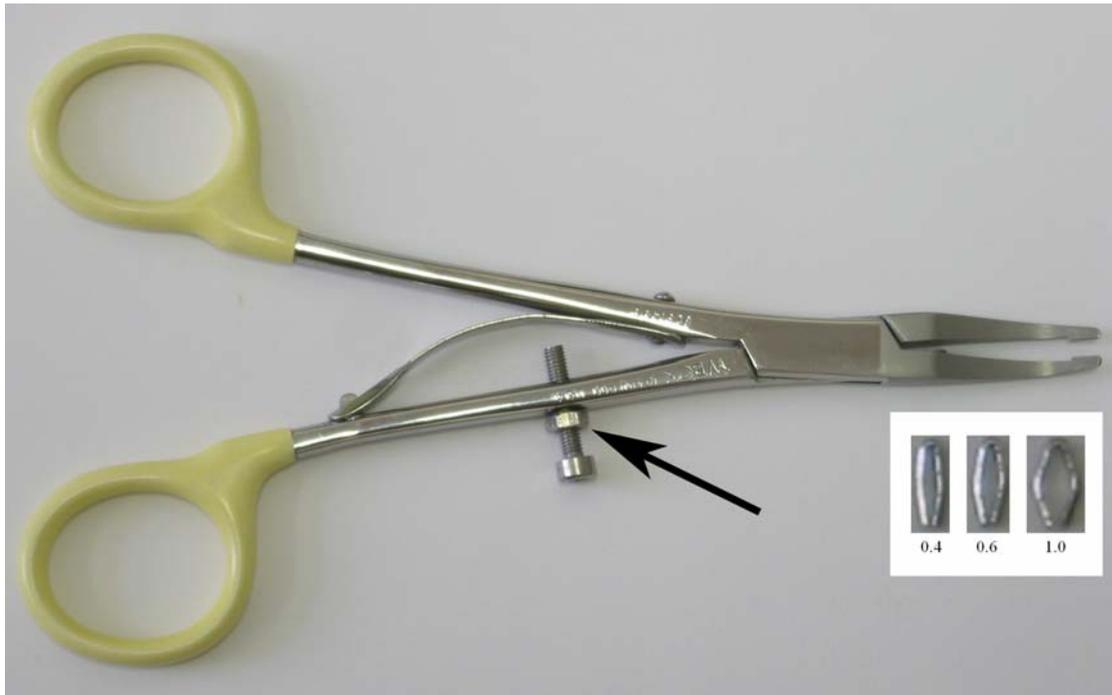


Abb. 3.6 Clipzange mit Imbusschraube (Pfeil) zum Verstellen des Durchmessers und dazugehörigen Hemoclips mit verschiedenen Durchmesser der kurzen Diagonalen (0.4, 0.6, 1.0 mm).

### 3.8 *Verwendete Chemikalien, Geräte, Instrumente und Programme*

Alle verwendeten Chemikalien waren von p.A.-Qualität, bzw. geeignet für molekularbiologische Arbeiten.

#### 3.8.1 **Operation, Hämodynamikmessung und Kontraktilitätsmessung**

##### Geräte:

- Schermaschine favorita II (Aesculap, Melsungen)
- Nagerbeatmungsgerät (Hugo-Sachs-Elektronik, March-Hugstetten)
- OP-Kaltlichtlampe KL 150 B (Schott, Mainz)
- 2F Mikro-Tip<sup>®</sup>-Katheter Transducer (Millar Instruments, Houston)
- Messverstärker inkl. Software BioSys (TSE, Bad Homburg)
- Kleintieroperationstisch, beheizbar (Braun, Tuttlingen)

##### OP-Besteck/Instrumente

- 1 Nadelhalter (Aesculap, Melsungen)
- 1 kleine spitze Schere (Aesculap, Melsungen)
- 1 große Schere (Aesculap, Melsungen)
- 1 kleine anatomische Pinzette (Aesculap, Melsungen)
- 1 kleine anatomische Pinzette vorn gebogen (45°) (Aesculap, Melsungen)
- 1 chirurgische Pinzette (Aesculap, Melsungen)
- 1 Hemoclip Anlegezange (Aesculap, Melsungen)
- 1 gebogene Klemme (Aesculap, Melsungen)
- 2 kleine Gefäßklemmen (Aesculap, Melsungen)
- 1 kleine spitze Pinzette (Aesculap, Melsungen)
- 1 kleine Augenschere (für A. Carotis) (Aesculap, Melsungen)

1 Standard-Hemoclip-Anlegezange (Pilling Weck, Karlstein)

Narkosemittel:

Inactin<sup>®</sup> (Thiobutabarbital); (RBI, Natick, USA)  
Ketanest<sup>®</sup> 50mg/ml (Ketamin); (Parke-Davis, Berlin)  
Proxylax<sup>®</sup> (Xylanzin 2%)

Nahtmaterial:

Hautnaht: 4/0 nicht resorbierbar Perma Hand<sup>®</sup> Seide (Ethicon; Norderstett)  
3/0 Dexon<sup>®</sup> II resorbierbar (Braun, Tuttlingen)

Papillarmuskelkontraktilitätsmessung:

Plugsys System 6039 (Hugo- Sachs-Elektronik, March- Hugstetten)  
Oszillograph (Nicolet Pro 10, Nicolet, Hoechberg)

### **3.8.2 Histologische Untersuchung**

Geräte:

Mikrotom: HM 355S (Mikrotom, Bad Schwalbach)  
Entwässerungsautomat: Histokinette (American Optical, Basel- Freilager)  
Färbeautomat: HMS 760 (Mikrotom, Bad Schwalbach)

PC-Programme:

Bildanalysesoftware: ScionImage 1,62a

### **3.8.3 Southern Blot**

Geräte:

Thermomixer Comfort (Eppendorf, Hamburg)  
Megafuge 1.0R, Rotor 3041 (Heraeus, Hanau)  
Reinwasseranlage OPTILAB Plus (MembraPure)  
UV-VIS Spektrophotometer UV1202 (Shimadzu, Duisburg)  
Wärmeschrank FunctionLine (Heraeus, Hanau)  
Thermoblock (Dri-Block) DB-2D (Techne, Duxford, UK)  
Mikrowelle Micromat (AEG, Frankfurt)  
Horizontal-Elektrophoresekammer: Horizon 20.25 (Kamm: 39 x 2,0) (Lifetechnologies; GibcoBrl, Karlsruhe)  
Netzgerät für Gelelektrophoresekammer PowerPack 300 (Lifetechnologies; GibcoBrl, Karlsruhe)  
CCD Kamera DIANA (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt)  
UV-Licht Transilluminator 4000 (Stratagene, La Jolla, USA)  
Vacu-Blot-System VB 11 (Biometra Göttingen)  
Vakuum Membranpumpe PM 12617-86 (Biometra Göttingen)  
UV-Stratalinker 1800 (Stratagene, La Jolla, USA)  
Hybridisierungsglasrohre (Biometra Göttingen)  
Mini-Hybridisierungsöfen OV 3 (Biometra Göttingen)  
Tri Carp Szintillationsmeßgerät (Packard, Kassel)  
Phosphor-Imager-Platte BAS-MP 20405 (Fujifilm, Düsseldorf)  
Phosphor-Imager BAS Reader 1500 (Fujifilm, Düsseldorf)

Horizontal-Elektrophoresekammer: Mini-Sub Cell GT (Kamm :15 x 1,5) (Bio-Rad, Hemel Hempstead)

PC-Programme:

AIDA Version 2.11 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt)

DIANA II V1.6 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt)

Phosphor-Imager BAS Reader 2.9 (Fujifilm, Düsseldorf)

### **3.8.4 Northern Blot**

Geräte:

Homogenisator: Dispergier- Gerät: Polytron PT 10/35 (Kinematica AG, Littau/Luzern)

Homogenisatorschaft: Stator: Polytron PT-DA 3007/2 (Kinematica AG, Littau/Luzern)

Horizontal-Elektrophoresekammer: Horizon 11.14 (Kamm: 2,0) (Lifetechnologies; GibcoBrl, Karlsruhe)

Bio-Dot Mikrofiltrations-Apperatur (Bio-Rad, München)

### **3.8.5 Western Blot**

Geräte:

Homogenisator/Dispergiergerät Polytron PT 3000 (Kinematica AG, Littau/Luzern)

Homogenisatorschaft/Stator: Polytron PT-DA 3007/2 (Kinematica AG, Littau/Luzern)

Vertikal-Elektrophoresekammer: MiniProtean II (Bio-Rad, München)

Vertikal-Elektrophoresekammer: Protean II Maxi (Bio-Rad, München)

Blotting Einheit: Maxi TransBlot-Cell (BioRad, München)

Rocking Platform (Biometra Göttingen)

Roller RM 5 (Hecht, Winnenden)

Scanner (Epson, Meerbusch)

PC-Programme:

DIANA II V1.6 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt)

Radlig 3.0 (Kodak, Stuttgart)

Streptozotocin reinst; Sigma Chemie, Deisenhofen

## **3.9 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 mehr als zwei Versuchsgruppen erfolgte mit dem Kruskal-Wallis-Test, gefolgt vom Dunn-Test für die Überprüfung von Unterschieden zwischen zwei Gruppen. 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.