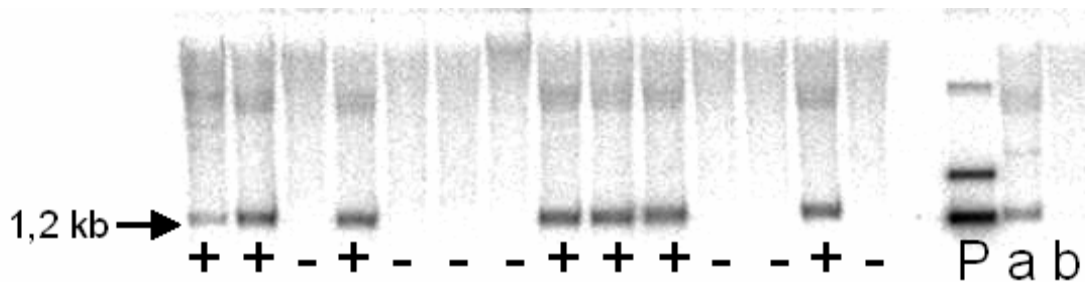


## 4 Ergebnisse

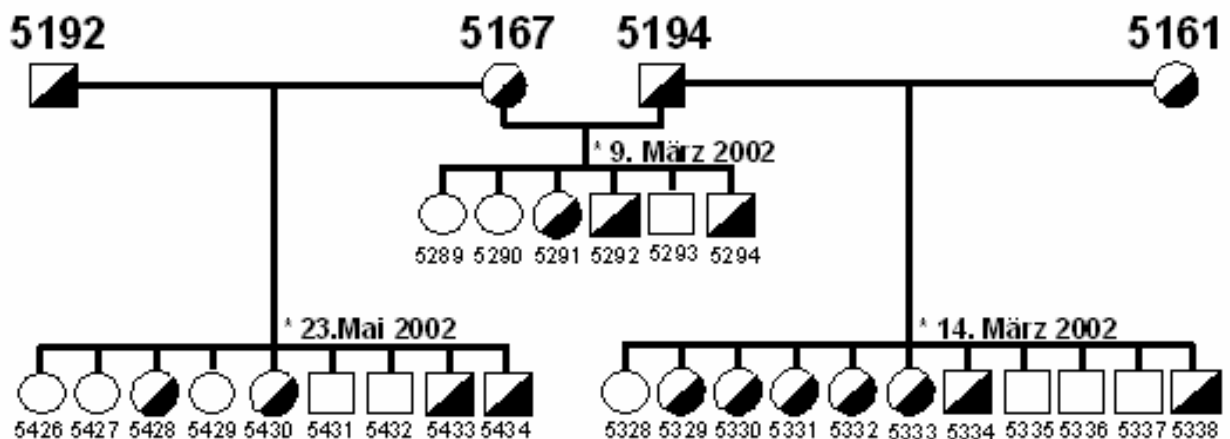
### 4.1 Allgemeine Charakterisierung von *SERCA2a*-transgenen Versuchstieren

Bei der Zucht von *SERCA2a*-transgenen Tieren (L1167) wurden keine homozygoten Ratten geboren. Daher mussten alle Nachkommen genotypisiert werden. **Abb. 4.1** zeigt ein typisches Ergebnis einer Genotypisierung mit Southern Blot Analyse genomischer DNA von insgesamt 14 Nachkommen heterozygoter Elterntiere.



**Abb. 4.1** Autoradiogramm eines Southern Blots genomischer DNA von Nachkommen der *SERCA2a* transgenen Linie 1167. Gezeigt wird eine Analyse von 7 transgen-negativen (-) und 7 -positiven (+) Ratten. Zum Vergleich werden entsprechende Banden für Plasmid-DNA (P) sowie je eine Positiv- (a) und Negativkontrolle (b) gezeigt. Genomische DNA (20 µg) und Plasmid-DNA (1 ng) wurden Apa I verdaut, elektrophoretisch in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran mit Vakuum geblottet und mit einem [<sup>32</sup>P]-markierten, transgen spezifischen Apa I-Apa I Fragment hybridisiert. Der Pfeil zeigt die transgen-spezifische Bande mit einer Größe von 1,2 kb.

Jedes genotypisierte Tier wurde in einem Stammbaum erfasst. **Abb. 4.2** zeigt exemplarisch einen Ausschnitt aus dem Stammbaum der transgenen *SERCA2a* Linie 1167. Durchschnittlich wurden 10 Tiere pro Wurf geboren. Die Verpaarung von heterozygoten transgenen Eltern ergab ca. 50 % heterozygote *SERCA2a*- transgene Nachkommen.



**Abb. 4.2** Auszug aus dem Stammbaum der *SERCA2a*-transgenen Linie 1167. Das Stammbaumdiagramm zeigt drei Würfe von vier verschiedenen heterozygoten Elterntieren. Quadrate - männliche Ratten; Kreise - Weibchen. Leere Symbole - transgen-negative Tiere; zweifarbige Symbole - heterozygote *SERCA2a*-transgene Tiere. Die Wurfgröße lag zwischen sechs und elf Tieren. \* - Geburtsdatum; die laufenden Tiernummern sind zusätzlich angegeben.

## 4.2 Charakterisierung des Phänotyps von *SERCA2a*-transgenen Ratten

### 4.2.1 Herz- und Körpergewichte

Die Herzen von TGR unterschieden sich makro- und mikroskopisch nicht von WT. **Tab. 4.1** zeigt vergleichend die Feuchtgewichte verschiedener Herzabschnitte 9 Monate alter männlicher TGR und WT. Für die verschiedenen Gewichtsparameter ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Gruppen. Keine Unterschiede zwischen Gewichtsparametern von TGR und WT fanden sich auch bei Tieren anderen Alters (nicht dargestellt).

**Tab. 4.1 Körper- und Herzgewichte von *SERCA2a*-transgenen Ratten und Tieren vom Wildtyp**

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

Mittelwerte ± SEM für 9 Monate alte männliche Ratten. WT – Wildtyp Ratte; TGR – *SERCA2a*-transgene Ratte; KG – Körpergewicht; HG – Herzgewicht; LV + S – linker Ventrikel und Septum; RV – rechter Ventrikel; A – rechter und linker Vorhof

### 4.2.2 Kardialer $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das SR

Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase *SERCA2a* den Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol in das SR katalysiert und in Voruntersuchungen in TGR erhöhte kardiale Spiegel von *SERCA2a*-mRNA (+55 %) und -Protein (+26 %) nachgewiesen werden konnten (195), wurde funktionell die *SERCA2a*-katalysierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität in linksventrikulären Homogenaten von TGR und WT vergleichend untersucht. **Abb. 4.3** zeigt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des *SERCA2a*-katalysierten Transportes von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR von TGR und WT. Die Ergebnisse zeigen, dass gesunde TGR mit moderater *SERCA2a*-Überexpression signifikant höhere kardiale SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivitäten aufwiesen als WT. Der durch die transgene *SERCA2a*-Überexpression induzierte Anstieg der

maximalen  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme rate war bei TGR um 37 % erhöht ( $25,4 \pm 2,1$  versus  $18,5 \pm 1,6$  nmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mg Protein/min bei WT;  $p < 0,05$ ).

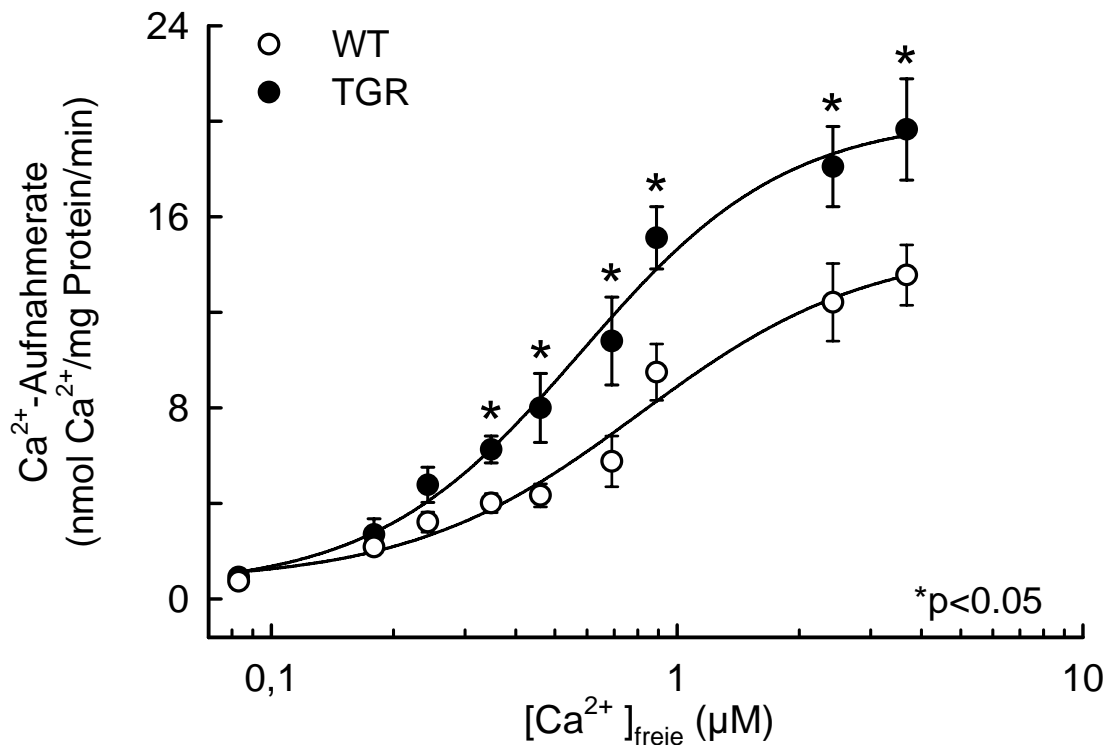
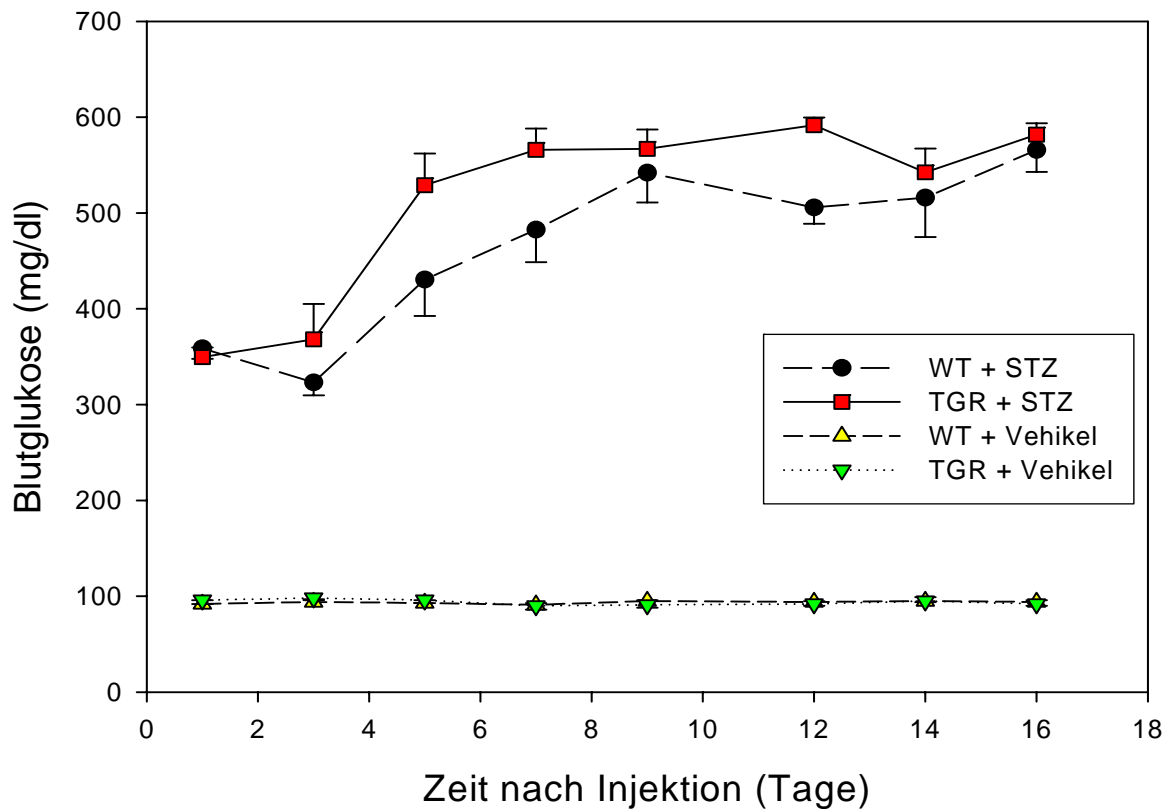


Abb. 4.3  $\text{Ca}^{2+}$ -Abhängigkeit des Oxalat-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes in das sarkoplasmatische Retikulum linksventrikulärer Homogenate SERCA2a-transgener (TGR) und nicht-transgener Wildtyp (WT) Ratten. Mittelwerte  $\pm$  SEM für je 5 TGR und WT.

### 4.3 Kardialer Phänotyp von SERCA2a-transgenen Ratten mit diabetischer Kardiomyopathie

#### 4.3.1 Blutzuckerprofil nach STZ-Behandlung

Nach der STZ-Injektion zur Induktion eines experimentellen Diabetes mellitus wurde im Abstand von drei Tagen der BZ-Spiegel bestimmt. In **Abb. 4.4** ist der zeitliche Verlauf des BZ-Profiles von STZ- und Vehikel-behandelten TGR und WT dargestellt. Im Vergleich zum normoglykämischen Ausgangswert stieg der BZ sowohl bei TGR als auch WT innerhalb von 16 Tagen um das 6-fache an, veränderte sich aber danach nicht mehr. Die Höhe des BZ unterschied sich zwischen den hyperglykämischen TGR und WT nicht signifikant. Vehikel behandelte Versuchstiere wiesen über den gesamten Versuchszeitraum einen normoglykämischen BZ-Wert von  $95 \pm 4$  mg/dl ( $5,27 \pm 0,22$  mM) auf. Zwischen TGR und WT bestand kein Unterschied.



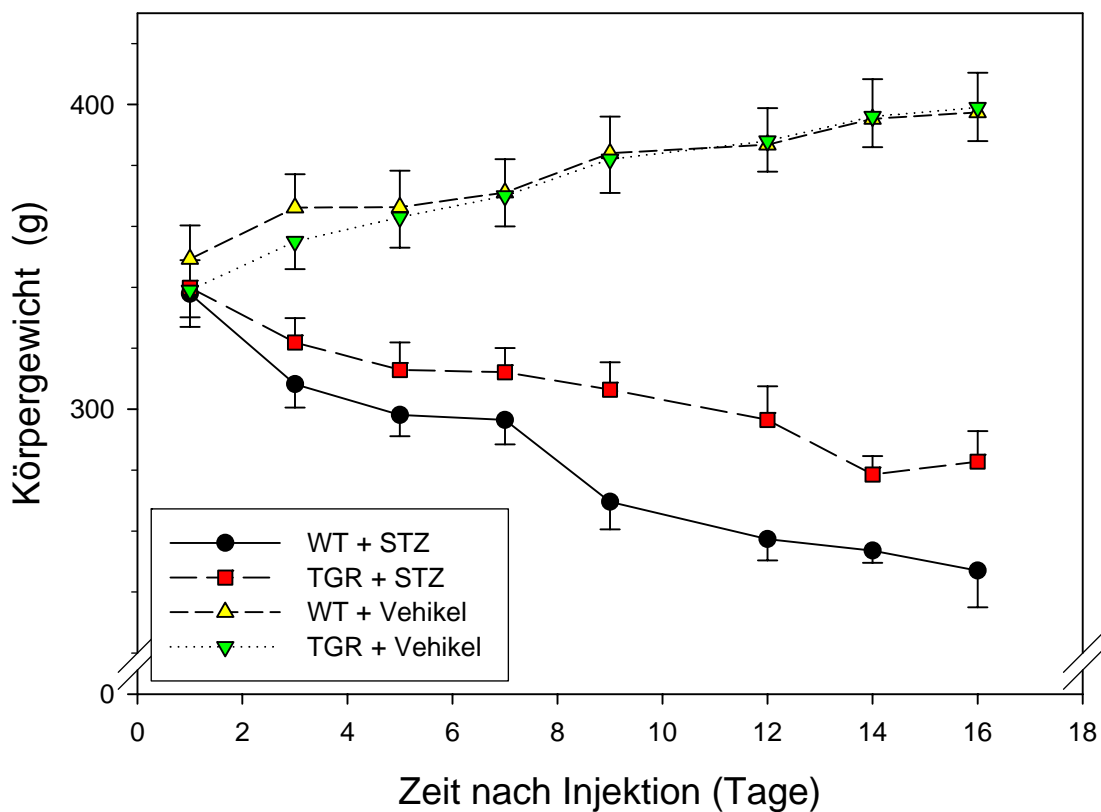
**Abb. 4.4 Verlauf des Blutzuckerspiegels** von Streptozotocin(STZ)- und Vehikel-behandelten Versuchstieren in den ersten 16 Tage nach i.p. Applikation. Mittelwerte  $\pm$  SEM für 7 bis 9 Tiere pro Gruppe. Die Einmaldosis von STZ betrug 50 mg/kg KG.

#### 4.3.2 Herz- und Körpergewichte diabetischer Tiere

Die experimentell erzeugte diabetische Stoffwechsellage verursachte eine erhebliche Beeinträchtigung des allgemeinen Gesundheitszustandes der Tiere. So war die natürliche Körpergewichtszunahme normoglykämischer Tiere im Verlauf der 6-wöchigen Versuchsdauer von einer Reduktion des KG von den beiden STZ-Behandlungsgruppen begleitet (**Abb. 4.5**). In den beiden STZ-behandelten Versuchsgruppen verminderte sich das KG um durchschnittlich 38 %, während es in den Vehikel-behandelten Gruppen um 20 % anstieg (s. auch **Tab 4.2**).

Die Körper- und Herzgewichtsdaten der Versuchstiere am Ende der 6-wöchigen Versuchsdauer sind in **Tab. 4.2** dargestellt. Die diabetischen Tiere wiesen im Vergleich zu Vehikel-behandelten Tieren signifikant verminderte Herz- und Körpergewichte auf. So betrug das Gesamtherzgewicht von diabetischen TGR nur 52 % des Kontrollwertes von nicht diabetischen TGR. Der entsprechende Wert bei diabetischen WT betrug 57 %. Ähnliche Veränderungen fanden sich bei Vergleichen der Feuchtgewichte einzelner Herzabschnitte. Aufgrund der proportionalen Veränderungen von Herz- und Körpergewichten blieben die relativen

Herzgewichtsparameter bei diabetischer Stoffwechsellaage allerdings unbeeinträchtigt. Andere typische Kennzeichen eines schweren D.m., wie erhöhter BZ, Polydipsie und Polyurie unterschieden sich zwischen diabetischen TGR und WT nicht (**Tab. 4.2**).



**Abb. 4.5 Veränderungen des Körpergewichts** von Streptozotocin(STZ)- und Vehikel-behandelten Versuchstieren in den ersten 16 Tage nach i.p. Applikation. Mittelwerte  $\pm$  SEM für 7 bis 9 Tiere pro Gruppe (s. auch **Abb. 4.4**).

**Tabelle 4.2 Allgemeine Charakteristik von SERCA2a-transgenen (TGR) und Wildtyp(WT)-Ratten ohne und mit Streptozotocin-induziertem Diabetes mellitus**

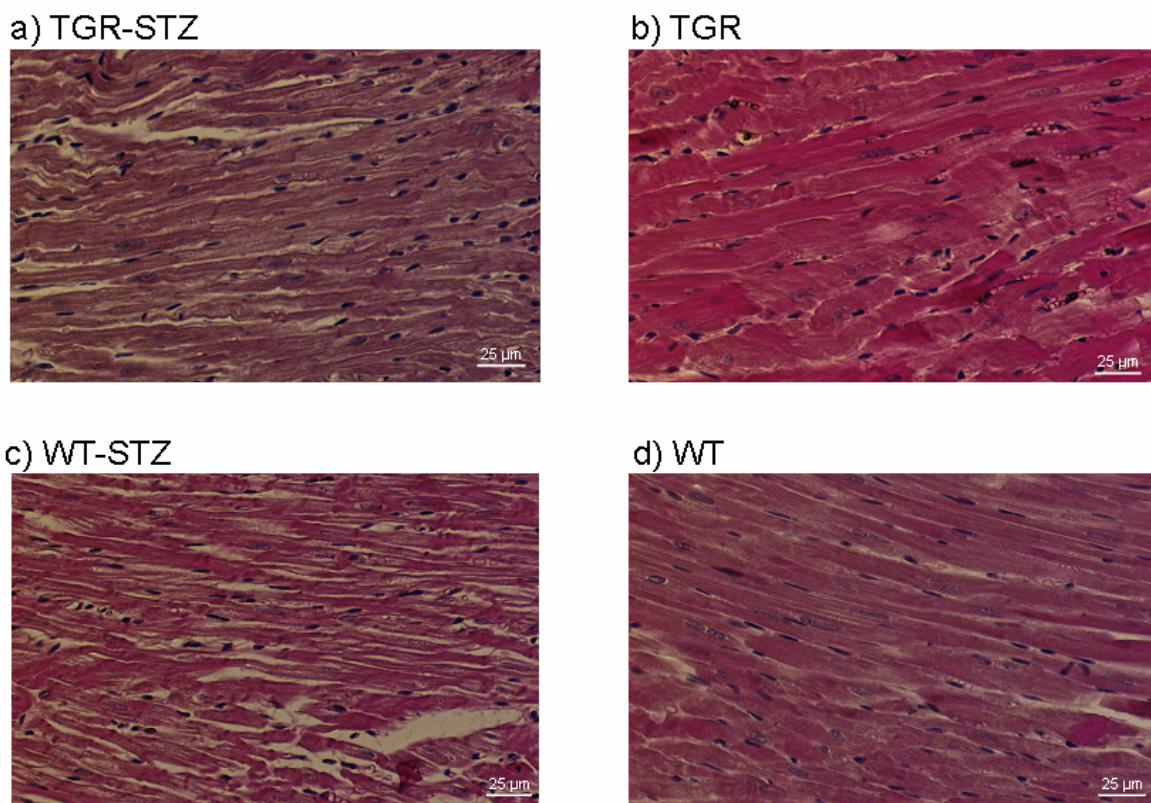
Parameter	Nicht-diabetisch		Diabetisch	
	WT (n=10)	TGR (n=7)	WT (n=11)	TGR (n=7)
KG, g	412 ± 12	424 ± 9	206 ± 4*	209 ± 7*
HG, mg	1286 ± 31	1377 ± 51	730 ± 15*	724 ± 34*
HG/KG, mg/g	3,21 ± 0,06	3,28 ± 0,09	3,52 ± 0,08*	3,44 ± 0,07*
LV + S, mg	882 ± 23	953 ± 39	478 ± 18*	480 ± 27*
LV+S/KG, mg/g	2,23 ± 0,03	2,28 ± 0,06	2,22 ± 0,08	2,20 ± 0,10
RV, mg	277 ± 7	291 ± 8	162 ± 6*	161 ± 5*
RV/KG, mg/g	0,68 ± 0,03	0,69 ± 0,03	0,78 ± 0,04	0,75 ± 0,03
A, mg	115 ± 7	115 ± 6	80 ± 4*	81 ± 7*
A/KG, mg/g	0,28 ± 0,1	0,28 ± 0,01	0,38 ± 0,02*	0,40 ± 0,03*
LG, mg	1776 ± 121	1819 ± 85	1211 ± 41*	1144 ± 93*
Blutglukose, mg/dl	93 ± 4	94 ± 4	571 ± 29*	588 ± 12*
Trinkmenge, ml H <sub>2</sub> O/d	28,3 ± 2,4	26,7 ± 3,1	108,9 ± 6,3*	107,7 ± 5,4*
Urinvolumen, ml/d	10,5 ± 1,3	10,8 ± 1,0	76,6 ± 9,2*	85,3 ± 5,8*

Mittelwerte ± SEM für 7 bis 11 Tiere pro Gruppe. KG – Körpergewicht; HG – Herzgewicht; LV + S – linker Ventrikel und Septum; RV – rechter Ventrikel; A – Vorhof; LG – Lungengewicht  
\* p<0,05 versus nicht diabetische WT bzw. TGR

### 4.3.3 Kardiomyozytendurchmesser und interstitieller Fibrose

Wegen der diabetesbedingten Abnahme des Herzgewichtes, wurde auf zellulärer Ebene untersucht, ob Kardiomyozyten diabetischer Herzen atrophiert sind. Zusätzlich wurde die extrazelluläre Matrix befundet. An Hämotoxylin-Eosin-(HE) und SiriusRed-(SiR)gefärbten seriellen Schnitten von Herzen der vier Versuchsgruppen wurden die linksventrikulären Myozytendurchmesser als Maß der Kardiomyozytengröße (HE-Färbung) und das Ausmaß der interstitiellen Fibrosierung (SiR-Färbung) morphometrisch analysiert. **Abb. 4.6** zeigt exemplarisch typische HE-gefärbte Schnitte für die vier Versuchsgruppen. Quantitativ ergaben sich bei Diabetes mellitus für TGR ( $11,3 \pm 0,1$  versus  $13,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$  in nicht-diabetischen TGR) und WT ( $10,4 \pm 0,3$  versus  $13,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$  in nicht diabetischen WT) verminderte Kardiomyozytendurchmesser

( $p < 0,001$ ). Der tendenzielle Unterschied der Zelldurchmesser zwischen der diabetischen TGR- und WT-Gruppe war statistisch nicht signifikant. Eine Boxplotdarstellung der gemessenen Werte zeigt **Abb. 4.7**.

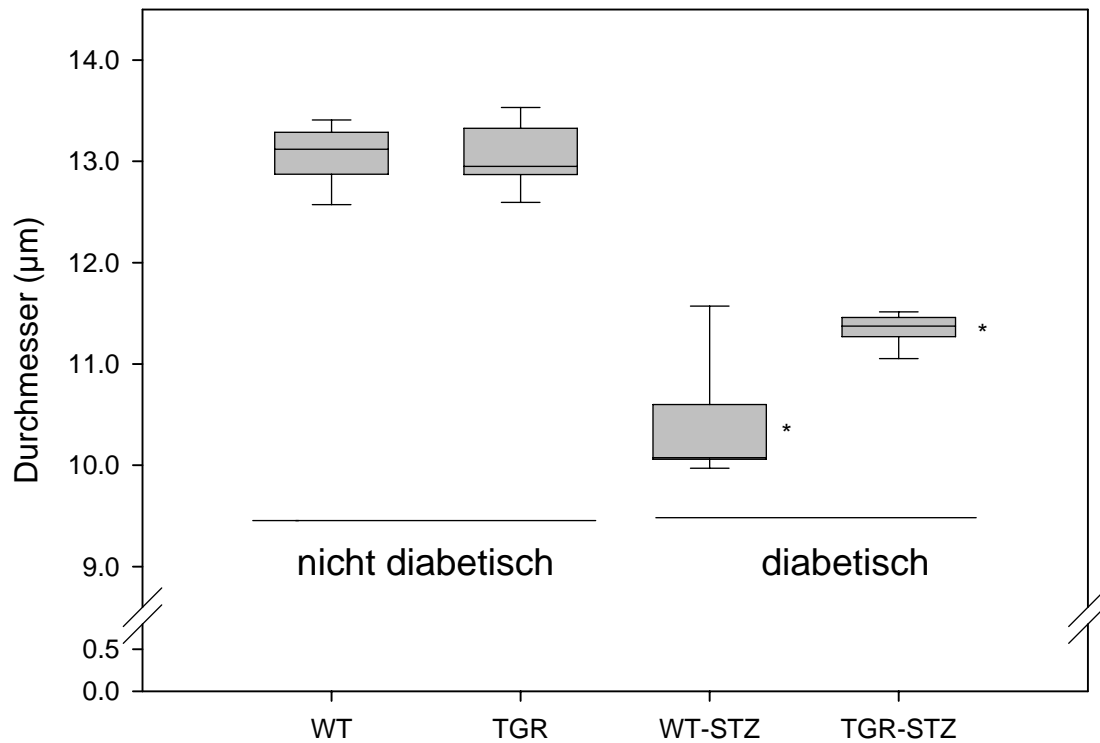


**Abb. 4.6** Exemplarische Hämotoxylin-Eosin-(HE) gefärbte Herzschnitte diabetischer und nicht-diabetischer SERCA2a-transgener (TGR) und nicht-transgener (WT) Ratten.

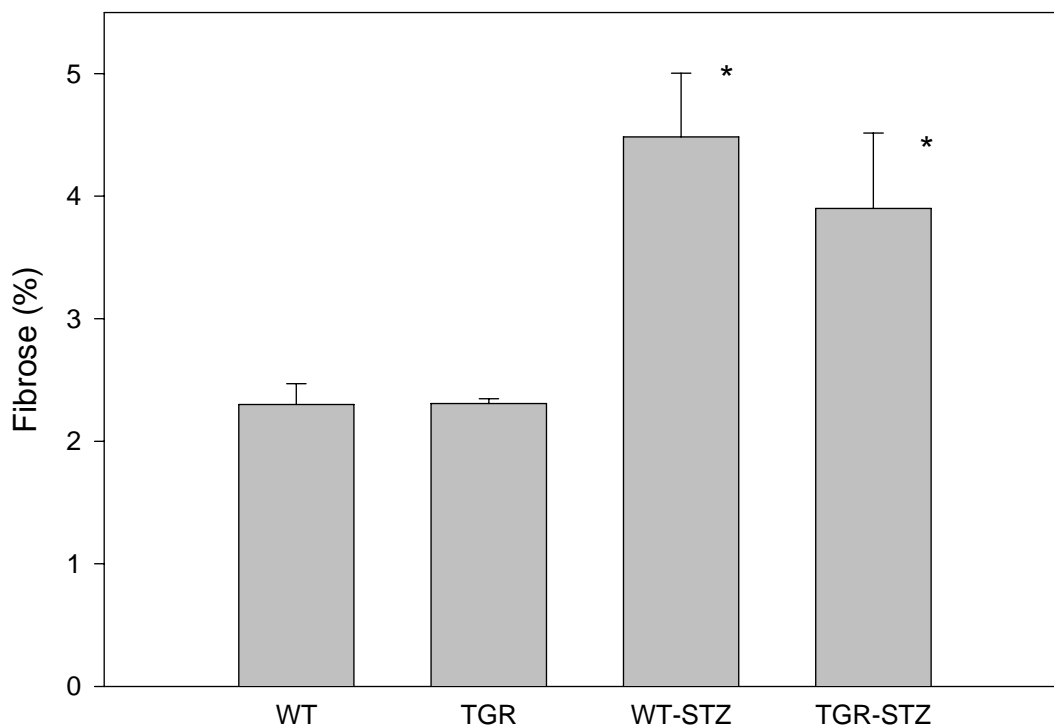
STZ – Streptozotocin behandelte diabetische Versuchstiere. Dargestellt sind Ausschnitte aus dem linken Ventrikel.

Da bekannt war, dass es bei diabetischer Stoffwechsellage zu ungünstigen qualitativen und quantitativen Veränderungen der extrazellulären Matrix kommt (75;142;198), wurde der relative Anteil von kollagenhaltiger Matrix an SiR-gefärbten Herzschnitten zusätzlich vergleichend analysiert. In Herzschnitten diabetischer TGR ( $3,9 \pm 0,62$  versus  $2,3 \pm 0,04$  % nicht-diabetischen TGR) und diabetischer WT ( $4,5 \pm 0,52$  versus  $2,3 \pm 0,17$  % nicht-diabetischen WT) wurde eine diabetesbedingte Zunahme der Kollagenmatrix gefunden, was das Vorliegen einer interstitiellen Fibrose anzeigt ( $p < 0,05$ ). Zwischen TGR und WT ohne und mit D.m. gab es keine signifikanten quantitativen Kollagenmatrixunterschiede (**Abb. 4.8**).

Die tendenziell geringer ausgeprägte interstitielle Fibrose in diabetischen TGR im Vergleich zu diabetischen WT erreichte keine statistische Signifikanz (**Abb. 4.8**).



**Abb. 4.7** Boxplotdarstellung der morphometrisch gemessenen Kardiomyozytendurchmesser diabetischer und nicht diabetischer SERCA2a-transgener (TGR) und nicht-transgener (WT) Ratten mit (diabetisch) und ohne (nicht diabetisch) Streptozotocin (STZ)-Gabe. Pro Tier wurden drei Schnitte des linken Ventrikels begutachtet und jeweils 10 Kardiomyozytendurchmesser ausgemessen  $n = 7$  Tiere pro Gruppe. \*  $p < 0,001$  versus WT bzw. TGR mit euglykämischer Stoffwechsellaage.



**Abb. 4.8** Darstellung der morphometrisch gemessenen interstitiellen Fibrose in SiriusRed-gefärbten Schnitten des linken Ventrikels diabetischer (STZ) und nicht diabetischer SERCA2a-transgener (TGR) und nicht-transgener (WT) Ratten. Als Fibrosemaß wurde der prozentuale Anteil der gefärbten Gesamtkollagenfläche an der analysierten Schnittgesamtfläche morphometrisch bestimmt. Mittelwerte  $\pm$  SEM für 7 Tiere pro Gruppe. Pro Tier wurden 30 Schnitte morphometrisch analysiert. \*  $p < 0,05$  versus nicht diabetische WT bzw. TGR



#### 4.3.4 Hämodynamische Charakteristik

Da das geförderte Blutvolumen entscheidend von der Pumpfunktion des Herzens abhängt, wurde die linksventrikuläre systolische und diastolische Funktion in diabetischen und nicht-diabetischen SERCA2a-transgenen und nicht-transgenen Ratten mittels Millar Tip-Katheter® Technik vergleichend untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen an narkotisierten, thorakotomierten Tieren zeigt **Tab. 4.3**. Die Herzfrequenz, der systolische und diastolische arterielle Blutdruck sowie der maximal entwickelte linksventrikuläre Druck diabetischer TGR und WT waren im Vergleich zu den entsprechenden nicht-diabetischen Kontrolltieren signifikant vermindert. Zudem wurde in TGR und WT ein diabetesbedingter 2,3- und 2,5-facher Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) beobachtet.

**Tabelle 4.3 Hämodynamische Charakteristik von SERCA2a-transgenen(TGR) Ratten und nicht-transgenen Wildtyp(WT)-Ratten mit und ohne Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus**

Parameter	Nicht-diabetisch		Diabetisch	
	WT (n=7)	TGR (n=7)	WT (n=8)	TGR (n=5)
HF, min <sup>-1</sup>	320 ± 16	339 ± 16	206 ± 8*	218 ± 15*
RR <sub>sys</sub> , mm Hg	130 ± 7	129 ± 5	98 ± 6*	90 ± 6*
RR <sub>dia</sub> , mm Hg	89 ± 4	85 ± 4	67 ± 6*	63 ± 5 *
LVP, mm Hg	109 ± 4	99 ± 4	90 ± 4 *	78 ± 6*
LVEDP, mmHg	2,4 ± 0,3	2,1 ± 0,5	5,6 ± 0,3*	5,3 ± 0,4*
+dP/dt <sub>max</sub> , mm Hg s <sup>-1</sup>	2719 ± 108	2717 ± 95	2356 ± 104	2412 ± 117
-dP/dt <sub>max</sub> , mm Hg s <sup>-1</sup>	2330 ± 123	2450 ± 76	1725 ± 145*	2175 ± 204#
+dP/dt <sub>max</sub> /-dP/dt <sub>max</sub>	1,16 ± 0,03	1,11 ± 0,02	1,36 ± 0,04*	1,13 ± 0,02#

Mittelwerte ± SEM; HF – Herzfrequenz; RR<sub>sys</sub> – systolischer Blutdruck; RR<sub>dia</sub> – diastolischer Blutdruck; LVP – linksventrikulärer systolischer Druck; LVEDP – linksventrikulärer enddiastolischer Druck; +dP/dt<sub>max</sub> – maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit der Systole; -dP/dt<sub>max</sub> – maximale Druckabfallgeschwindigkeit der Diastole.

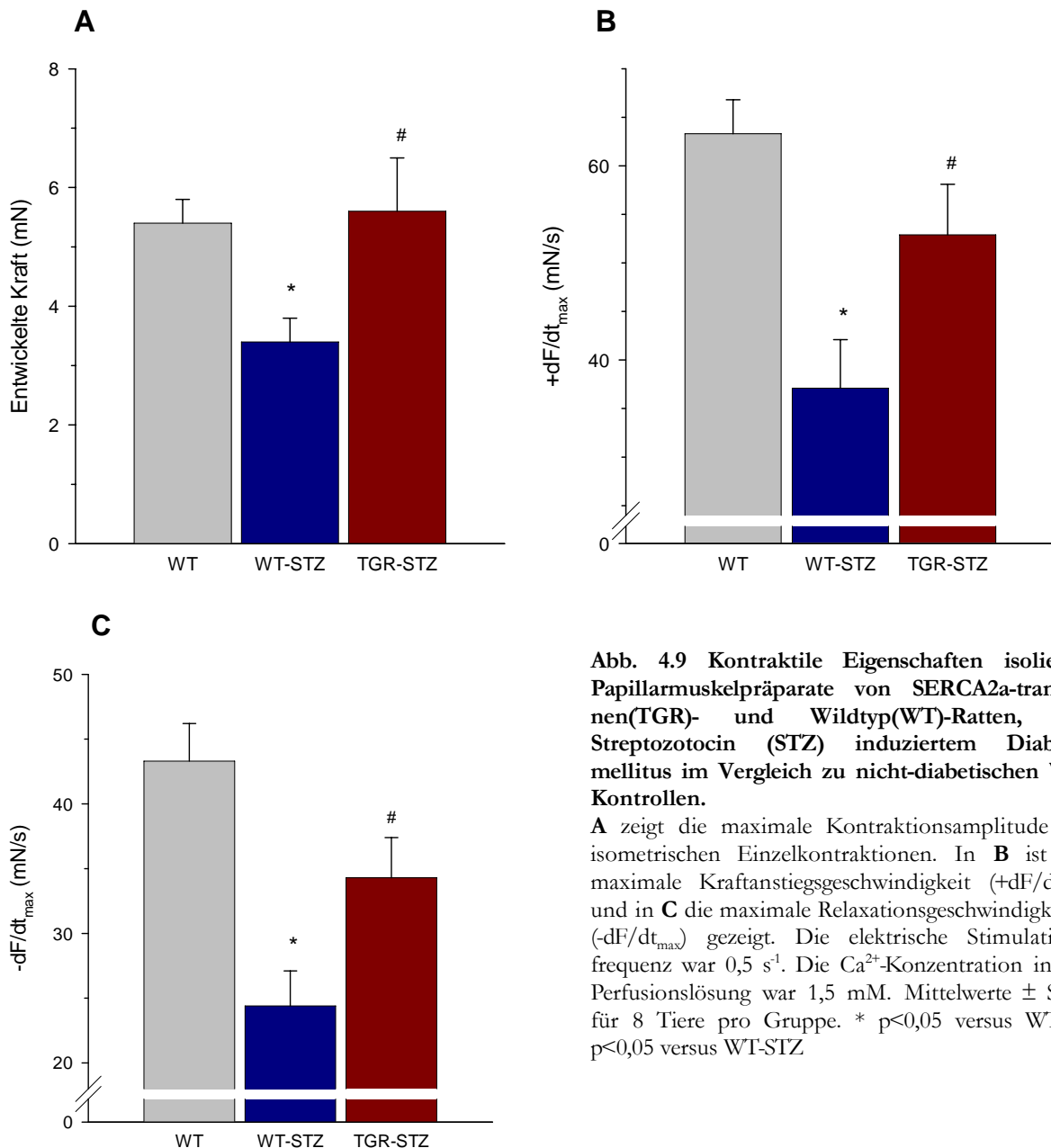
\* p<0,05 versus nicht diabetische WT bzw. TGR; # p<0,05 versus diabetische WT

Obwohl die linksventrikulären maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeiten (+dP/dt<sub>max</sub>) in diabetischen Tieren nicht signifikant verändert waren, wurde eine deutliche Abnahme der diastolischen linksventrikulären Druckabfallgeschwindigkeit (-dP/dt<sub>max</sub>) bei diabetischen WT beobachtet (-26 % versus nicht diabetische WT, p<0,05). Dieser Abfall fiel bei diabetischen TGR

deutlich geringer aus und unterschied sich nicht signifikant von Kontrollwerten nicht-diabetischer Versuchstiere (-11 % versus nicht-diabetische TGR sowie -7 % versus nicht-diabetische WT). Das Vorliegen einer wesentlich stärker ausgeprägten linksventrikulären diastolischen Funktionsstörung bei diabetischen WT im Vergleich zu diabetischen TGR wird auch durch den dimensionslosen Index  $+dP/dt_{\max}/-dP/dt_{\max}$  angezeigt. Bei nicht vorhandenen Gruppenunterschieden der  $+dP/dt_{\max}$ -Werte hängt die Größe des Index allein von den gemessenen  $-dP/dt_{\max}$ -Werten ab. Der höchste Indexwert wurde folglich bei diabetischen WT gefunden. Er unterschied sich signifikant von den Werten aller anderen Versuchsgruppen. Bemerkenswert ist, dass sich der entsprechende Wert von diabetischen TGR nicht signifikant von den ermittelten Werten nicht-diabetischer WT und TGR unterscheidet.

#### 4.3.5 Kontraktile Charakteristik isolierter Papillarmuskelpräparate

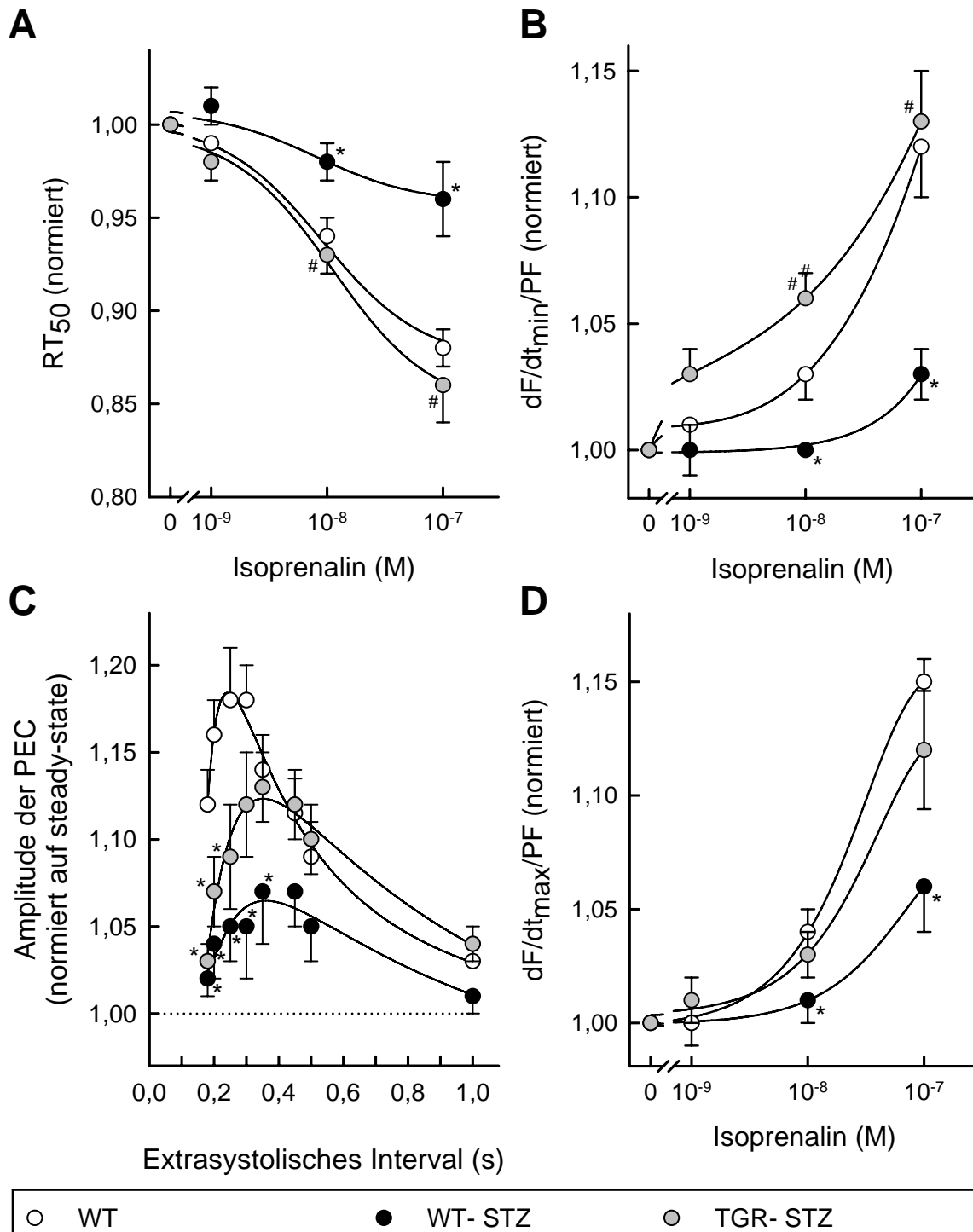
Da die *in situ* gemessenen Druckparameter von den vorliegenden Volumenverhältnissen im linken Ventrikel beeinflusst wurden, letztere aber mit der Miller-Tipkathetermethode nicht erfasst wurden, wurden zusätzliche Kontraktions- und Relaxationsparameter an isolierten, isometrisch kontrahierenden Papillarmuskelpräparaten bei definierter Vorlast gemessen. Das Hauptaugenmerk wurde dabei auf den Vergleich diabetischer Tiere mit und ohne transgener SERCA2a-Überexpression gelegt. Vergleichend wurden Untersuchungen an nicht-diabetischen WT durchgeführt. Wie **Abb. 4.9A** zeigt, unterschied sich die maximal entwickelte Kraft von Papillarmuskeln diabetischer SERCA2a-transgener Tiere nicht signifikant von den Werten nicht-diabetischer Tiere, während dieser Wert bei diabetischen WT um 39 % vermindert war. Die maximalen Kraftanstiegs- und Kraftabfallgeschwindigkeiten waren bei diabetischen WT ebenfalls deutlich vermindert (**Abb. 4.9 B, C**). Bei diabetischen TGR fielen diese Veränderungen erheblich schwächer aus. So lag die maximale Relaxationsrate diabetischer TGR um 35 % über der diabetischer WT ohne transgene SERCA2a-Expression. Um zu überprüfen, wie sich das Kontraktionsverhalten der Papillarmuskeln unter Belastungsbedingungen verhält, wurde zusätzlich das Antwortverhalten der Papillarmuskelpräparate auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation mit verschiedenen Isoprenalin-konzentrationen untersucht. Außerdem wurde die kontraktile Reaktion der Präparate auf interpolierte Extrasystolen als nichtpharmakologische Intervention untersucht.



**Abb. 4.9 Kontraktile Eigenschaften isolierter Papillarmuskelpreparate von SERCA2a-transgenen(TGR)- und Wildtyp(WT)-Ratten, mit Streptozotocin (STZ) induziertem Diabetes mellitus im Vergleich zu nicht-diabetischen WT-Kontrollen.**

**A** zeigt die maximale Kontraktionsamplitude der isometrischen Einzelkontraktionen. In **B** ist die maximale Kraftanstiegsgeschwindigkeit (+dF/dt<sub>max</sub>) und in **C** die maximale Relaxationsgeschwindigkeit (-dF/dt<sub>max</sub>) gezeigt. Die elektrische Stimulationsfrequenz war 0,5 s<sup>-1</sup>. Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in der Perfusionslösung war 1,5 mM. Mittelwerte ± SEM für 8 Tiere pro Gruppe. \* p<0,05 versus WT; # p<0,05 versus WT-STZ

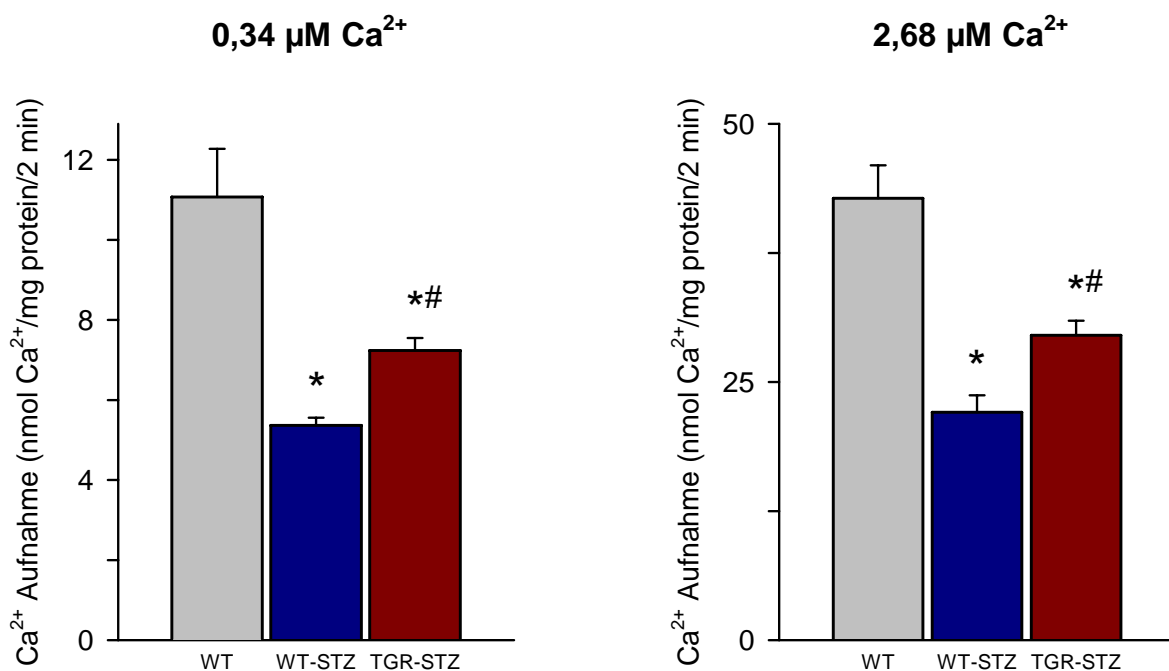
Wie **Abb.4.10** zeigt, verursachten sowohl Isoprenalin als auch Extrastimuli stark abgeschwächte positive lusitrope und inotrope Wirkungen an Papillarmuskeln diabetischer WT im Vergleich zu nicht-diabetischen WT-Kontrollen. Diese Veränderung fiel in Papillarmuskeln diabetischer Tiere mit transgener SERCA2a-Expression erheblich geringer aus. Insbesondere wurde die Relaxation durch ansteigende Isoprenalinkonzentrationen bei diabetischen TGR wesentlich stärker beschleunigt als bei diabetischen WT ohne transgene SERCA2a-Expression (s. **4.10 A, B**). Gleichzeitig war die postextrasystolische Potenzierung bei diabetischen SERCA2a-transgenen Tieren deutlich größer als bei diabetischen WT (s. **Abb. 4.10 C**). Da das Ausmaß der postextrasystolischen Potenzierung die Wiederverfügbarkeit von Aktivator-Ca<sup>2+</sup> des SR charakterisiert, weisen die Ergebnisse auf eine größere Verfügbarkeit von SR-Aktivator-Ca<sup>2+</sup> in SERCA2a-TGR mit diabetischer Stoffwechsellage als in diabetischen WT hin.



**Abb. 4.10** Einfluss von Isoprenalin (A, B, C) und extrasystolischer Stimuli (C) auf das kontraktile Verhalten von SERCA2a-transgenen und nicht-transgenen (WT) Ratten mit Streptozotocin(STZ)-induziertem Diabetes mellitus im Vergleich zu nicht-diabetischen WT-Kontrolltieren. In A und B sind Isoprenalin-induzierte Veränderungen von zwei ausgewählten Relaxationsparametern gezeigt. Zusätzlich zeigen C und D die inotrope Reaktion der Präparate auf extrasystolische Stimuli (C) und drei verschiedene Isoprenalinkonzentrationen (D). (A) Relaxationszeit bis zum Erreichen der halbmaximalen Kraft (RT<sub>50</sub>). (B) Relaxationsgeschwindigkeit ( $-dF/dt_{\text{max}}$ ) normiert auf den entsprechenden Wert der entwickelten Maximalkraft (PF). (C) Postextrasystolische Potenzierung der ersten postextrasystolischen Kontraktion (PEC). Teststimuli wurden 180 – 1000 ms nach einer normalen Kontraktion appliziert, um eine extrasystolische Kontraktion auszulösen. (D) maximale Kontraktionsgeschwindigkeit ( $+dF/dt_{\text{max}}$ ) normiert auf den Wert der jeweiligen Maximalkraft PF. Alle Werte wurden normiert auf die entsprechenden Basalwerte vor der Applikation von Isoprenalin bzw. des entsprechenden Extrastimulus. Mittelwerte  $\pm$  SEM; n = 7 pro Gruppe. \* p<0,05 versus WT ohne Diabetes mellitus. # p<0,05 versus diabetische WT

#### 4.3.6 Ca<sup>2+</sup>-Transport in das SR von Herzhomogenaten

Da die Kontraktilitätsmessungen indirekt auf eine verbesserte SR-Funktion in diabetischen SERCA2a-TGR hingewiesen hatten, wurde *in vitro* in linksventrikulären Homogenaten geprüft, ob tatsächlich eine verbesserte SR Ca<sup>2+</sup>-Transportfunktion in diabetischen TGR vorliegt (68;119;144;206). Zu diesem Zweck wurde die Oxalat-stimulierte Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in SR-Vesikeln analysiert. Bei diabetischen TGR und WT war die bei einer submikromolaren freien [Ca<sup>2+</sup>] von 0,34 µMol/l gemessene Geschwindigkeit der Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme um 35 % bzw. um 52 % im Vergleich mit WT ohne D.m. vermindert (**Abb. 4.11 A**). Der Vergleich von diabetischen TGR und WT zeigt, dass bei diabetischen TGR eine um 25 % höhere SERCA2a-katalysierte Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivität vorliegt (p<0,05). Ähnliche Unterschiede wurden auch bei einer höheren, die Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivität sättigenden [Ca<sup>2+</sup>] von 2,68 µM beobachtet (s. **Abb. 4.11 B**), bei der mögliche Einflüsse von PLB auf die Ca<sup>2+</sup>-Affinität der SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase vernachlässigt werden können.

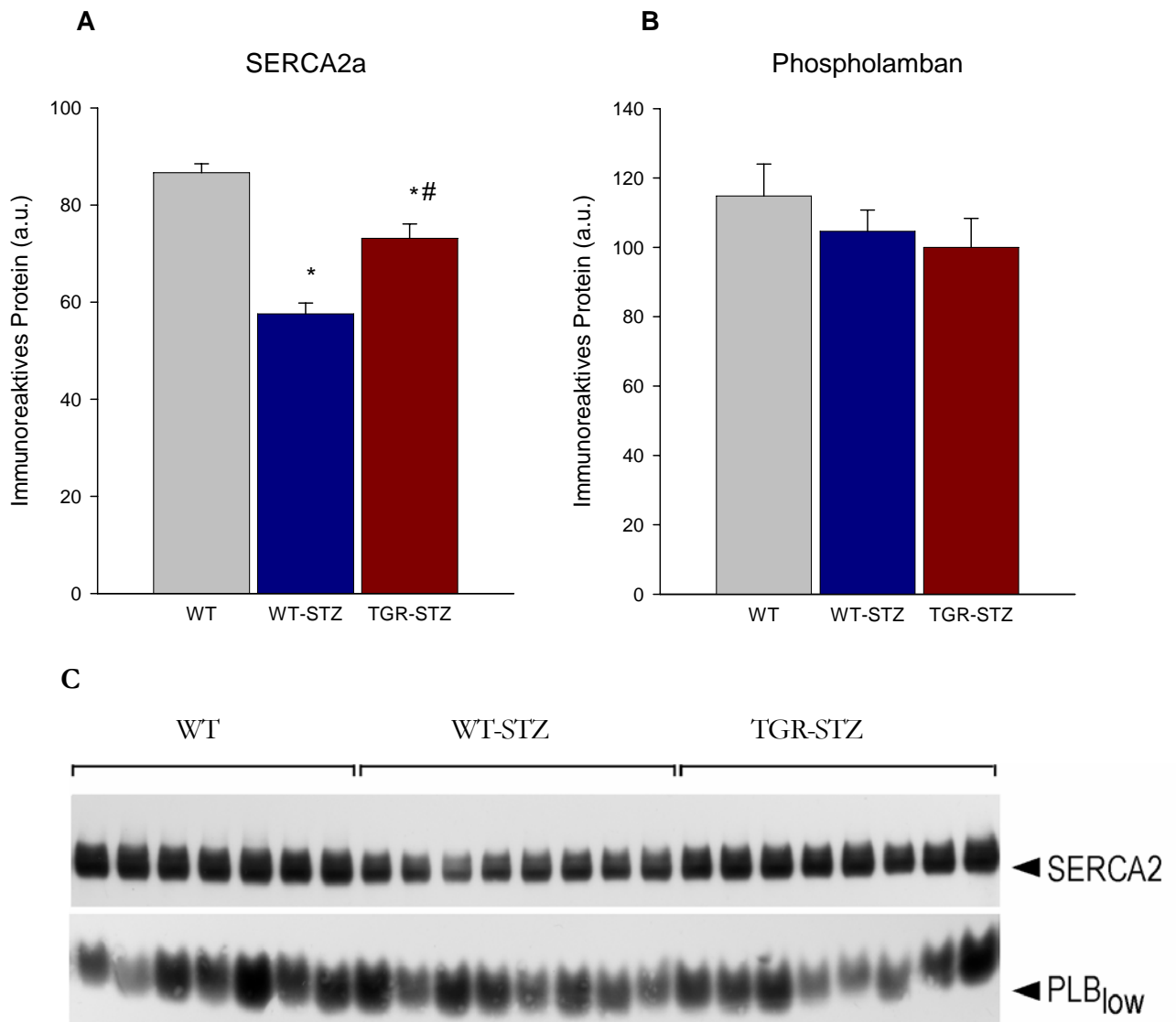


**Abb. 4.11** Unterschiede in der SR Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme in Homogenaten des linken Ventrikels von nicht-diabetischen Wildtypmäußen (WT) sowie WT und SERCA2a-transgenen Räten (TGR) mit Streptozotocin(STZ)induzierten Diabetes mellitus. Die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme wurde bei submikromolarer (0,34 µM) und sättigender (2,68 µM) freier Ca<sup>2+</sup>-Konzentration gemessen. Mittelwerte ± SEM (n = 8 pro Gruppe). \* p<0,05 versus WT Kontrollwerte; # p<0,05 versus WT-STZ

#### 4.3.7 Western-Blot Analyse

Um zu untersuchen, ob die Erhöhung der kardialen SR Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivität bei diabetischen TGR durch eine Erhöhung der SERCA2a-Proteinspiegel bedingt ist, wurden Western-Blot Analysen mit SERCA2a-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Sechs Wochen nach experimen-

teller Induktion eines Diabetes mellitus war der SERCA2a-Proteinspiegel im linken Ventrikel von WT mit um 33 % erniedrigt (Abb. 4.12 A). Dieser Abfall fiel bei diabetischen TGR geringer aus. Die SERCA2a-Spiegel von diabetischen TGR lagen um 25 % über den entsprechenden Werten von diabetischen nicht transgenen WT. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen bezüglich des Gehaltes an immunreaktiven Phospholamban festgestellt werden (Abb. 4.12 B + C).



**Abb. 4.12 Immunreaktive linksventrikuläre SERCA2a(A)- und Phospholamban(B)-Spiegel diabetischer (STZ) nicht-transgener (WT) und SERCA2a-transgener (TGR) Ratten im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren (WT) ohne Diabetes mellitus.** Repräsentative Western Blots verschiedener Tiere der drei experimentellen Gruppen sind in C gezeigt. Für die Detektion des kardialen SERCA2a-Proteins und der niedermolekularen Form von Phospholamban (PLB<sub>low</sub>) wurde das Chemolumineszenzprotokoll genutzt. Homogenatprotein pro Bahn: 10 µg. Mittelwerte ± SEM für 8 Tiere pro Gruppe. \* p<0,05 versus WT; # p<0,05 versus WT-STZ.

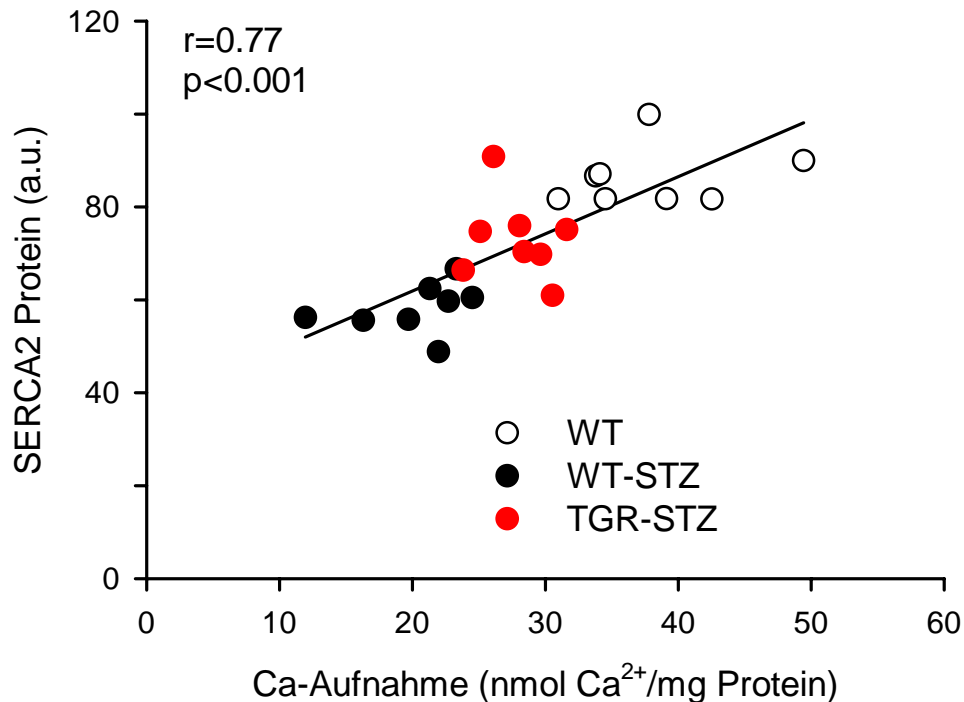


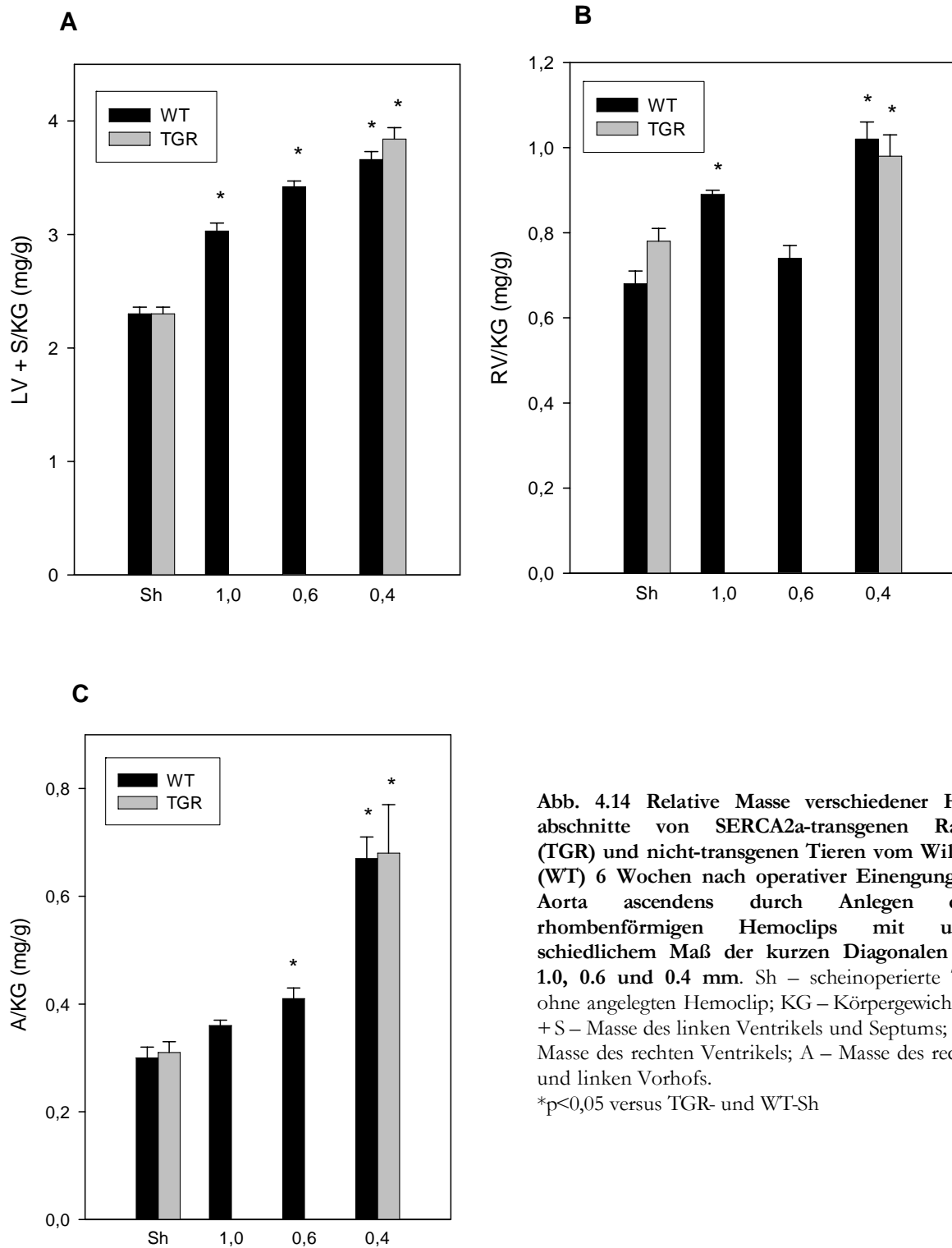
Abb. 4.13 Verhältnis zwischen Werten der retikulären Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme und immunreaktiven SERCA2a-Protein-Spiegeln in linksventrikulären Homogenaten nicht-diabetischer Wildtyp (WT)-Kontrollen, diabetischen WT und diabetischen SERCA2a-transgenen Ratten (TGR). Werte der SR Ca<sup>2+</sup>-Aufnahme sind Mittelwerte bei freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen bei 2,68  $\mu$ M. Die Ca<sup>2+</sup>-Aufnahmereaktion wurde nach 2 min beendet. Für den Western Blot wurden 10  $\mu$ g Homogenat pro Linie genommen. Regressionsgleichung:  $y = 1.225x + 37.507$ . STZ – Streptozotocin behandelte diabetische Ratten.

#### 4.4 Charakterisierung des Phänotyps von SERCA2a-transgenen Tieren mit einer Drucküberlastherzhypertrophie

##### 4.4.1 Beziehung zwischen Stenosegrad der Aorta ascendens und dem Ausmaß der Myokardhypertrophie

Grundsätzlich sollte in der vorliegenden Arbeit geklärt werden, ob eine moderate SERCA2-Überexpression und damit verbundene verbesserte Ausstattung des SR mit Ca-Pumpenmolekülen im intakten Myokard SERCA2a-transgener Versuchstiere das Entstehen kontraktile Funktionsstörungen bei experimentell ausgelöster Drucküberlast-Hypertrophie „präventiv“ verhindern kann. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde zuerst eine Methode zur Erzeugung einer definierten linksventrikulären Drucküberlasthypertrophie nach mikrochirurgischer Stenosierung der Aorta ascendens an nicht transgenen Sprague-Dawley Ratten etabliert. Insbesondere musste herausgefunden werden, welchen Einfluss der Grad der Einengung der Aorta ascendens auf das Ausmaß der linksventrikulären Myokardhypertrophie sowie auf den allgemeinen Gesundheitszustand der Versuchstiere hatte. Zu diesem Zweck wurde jeweils ein

Hemoclip mit Hilfe einer umgebauten Hemoclip-Anlegezange so an die Aorta ascendens 80 bis 100 g schwerer WT-Ratten angelegt, dass das kurze Diagonalenmaß des rhombenförmig verschlossenen Clips entweder 1,0, 0,6 oder 0,4 mm betrug (s. Hemoclip-Anlegezange **Abb. 3.6**)



**Abb. 4.14** Relative Masse verschiedener Herzabschnitte von SERCA2a-transgenen Ratten (TGR) und nicht-transgenen Tieren vom Wildtyp (WT) 6 Wochen nach operativer Einengung der Aorta ascendens durch Anlegen eines rhombenförmigen Hemoclips mit unterschiedlichem Maß der kurzen Diagonalen von 1,0, 0,6 und 0,4 mm. Sh – scheinoperierte Tiere ohne angelegten Hemoclip; KG – Körpergewicht; LV + S – Masse des linken Ventrikels und Septums; RV – Masse des rechten Ventrikels; A – Masse des rechten und linken Vorhofs.

\* $p < 0,05$  versus TGR- und WT-Sh



Tabelle 4.4 Körper-, Herz- und Lungengewichte von SERCA2a-transgenen (TGR) und nicht-transgenen Ratten (WT) 6 Wochen nach operativen Anlegen eines Hemoclips an die ascendierende Aorta

Experimentelle Gruppe	KG (g)	HG (mg)	HG/KG (mg/g)	LV + S (mg)	RV (mg)	A (mg)	Lunge (mg)	
<b>WT</b>								
<b>N</b>								
Sh	10	324 ± 13	1065 ± 51	3,28 ± 0,07	745 ± 29	220 ± 15	95 ± 9	1477 ± 43
AS 1.0	5	270 ± 4	1226 ± 20	4,32 ± 0,11*	860 ± 38	247 ± 7	106 ± 7	1337 ± 165
AS 0.6	9	247 ± 5	1158 ± 63	4,38 ± 0,17*	825 ± 40	200 ± 20	115 ± 15	1120 ± 116
AS 0.4	8	303 ± 8	1588 ± 34*	5,38 ± 0,12*	1078 ± 24*	304 ± 12*	206 ± 13*	2911 ± 281*
<b>TGR</b>								
Sh	10	299 ± 14	1041 ± 44	3,28 ± 0,07	703 ± 35	231 ± 12	95 ± 4	1450 ± 56
AS 0.4	7	294 ± 7	1605 ± 62*	5,54 ± 0,15*	1101 ± 33*	283 ± 16*	216 ± 24*	2911 ± 274*

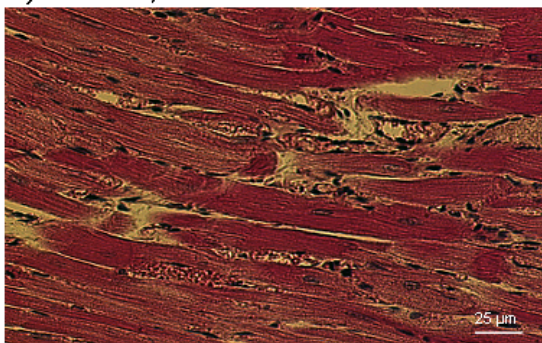
Sh – scheinoperierte Tiere ohne Hemoclip. AS – Tiere, deren ascendierende Aorta mit Hilfe eines Hemoclips eingengt wurde. Der Grad der Einengung der A. ascendens, gemessen als kleinste innere Diagonale des rautenförmigen Hemoclips, betrug 1 mm (AS 1.0), 0.6 mm (AS 0.6) oder 0.4 mm (AS 0.4). N – Anzahl der Versuchstiere. \*p<0,05 versus Sh von WT bzw. TGR; Mittelwerte ± SEM

Wie **Tabelle 4.4** zeigt, entwickelte sich nach 6-wöchiger Versuchsdauer eine unterschiedlich ausgeprägte linksventrikuläre Myokardhypertrophie. So betrug die Massenzunahme des linken Ventrikels von WT mit 1.0-, 0.6- und 0.4er Clipdiagonalenmaß entsprechend +38 %, +45 % und +54 %. Eine vergleichbare linksventrikuläre Hypertrophieausprägung bei der stärksten Einengung der A. ascendens konnte auch bei transgenen SERCA2a-Ratten beobachtet werden (s. **Abb. 4.14 A**). Nach 6-wöchiger Versuchsdauer konnten keine Veränderungen der Masse anderer Herzabschnitte beobachtet werden, wenn die Aortenstenosierung mit dem 1.0 und 0.6-Clip erfolgte.

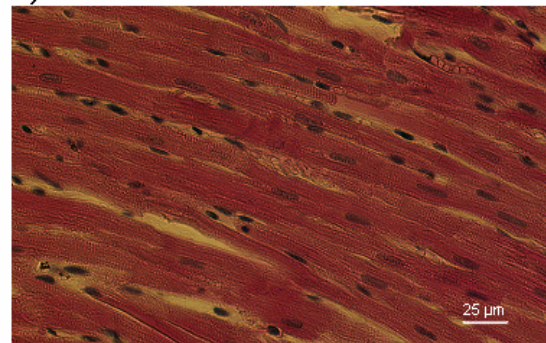
#### 4.4.2 Kardiomyozytendurchmesser und interstitieller Fibrose

Da eine Massenzunahme des adulten Myokards allein durch zelluläre Hypertrophie von Kardiomyozyten bedingt ist, wurde das Vorliegen und der Grad einer linksventrikulären Myokardhypertrophie durch morphometrische Analyse der linksventrikulären Kardiomyozytendurchmessers verifiziert. Hämotoxylin-Eosin-(HE) und SiriusRed-(SiR)gefärbte serielle Schnitte von Herzen der 7 Versuchsgruppen wurden morphometrisch analysiert.

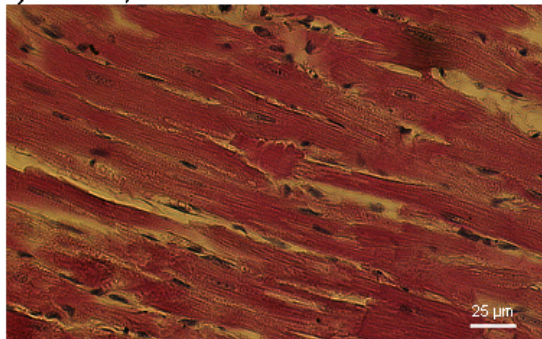
a) TGR-0,4



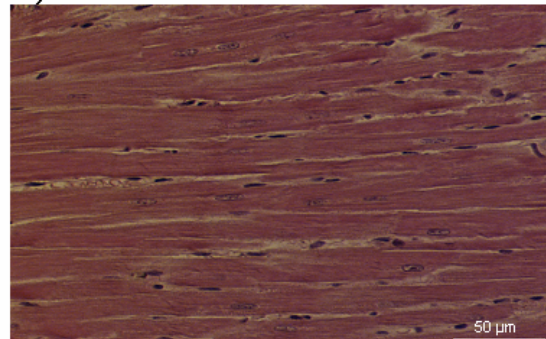
b) TGR-Sh



c) WT-0,4

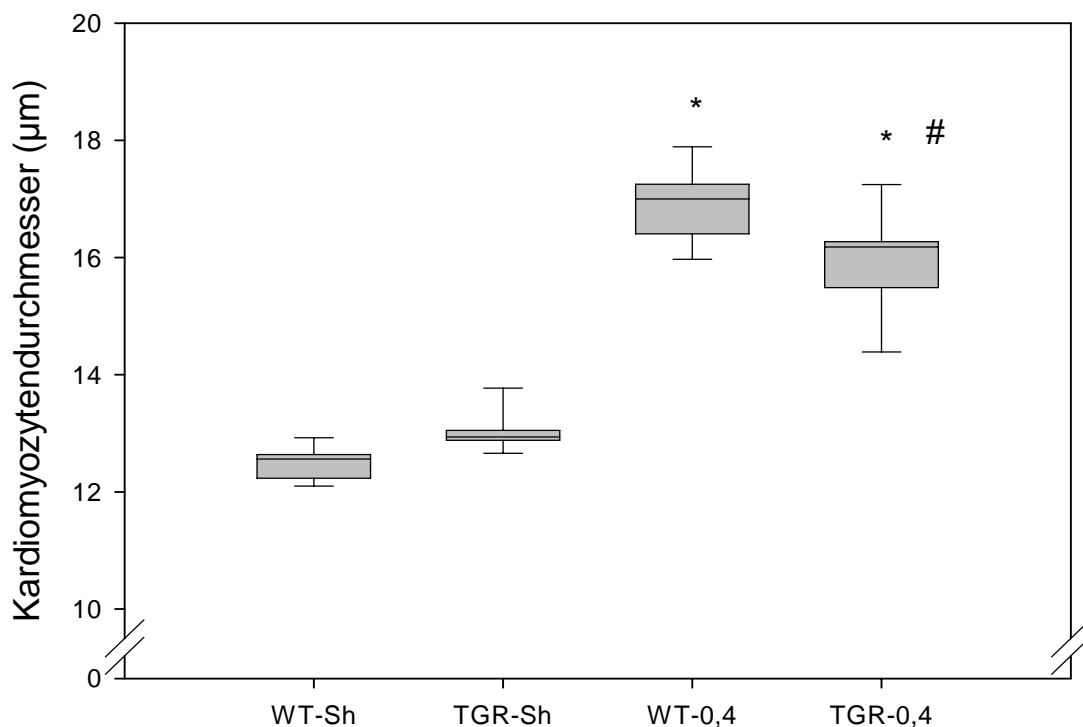


d) WT-Sh



**Abb. 4.15** Exemplarische Hämotoxylin-Eosin-(HE) gefärbte Schnitte SERCA2a-transgener (TGR) und nicht-transgener (WT) Ratten 6 Wochen nach Aortenkonstriktion (a + c), bzw. nach Scheinoperation (b + d). Der Grad der Einengung der A. ascendens, gemessen als kleinste innere Diagonale des rautenförmigen Hemoclips, betrug 0.4 mm. Eine Zunahme der Myozytendurchmesser in a) und c) ist deutlich zu erkennen.

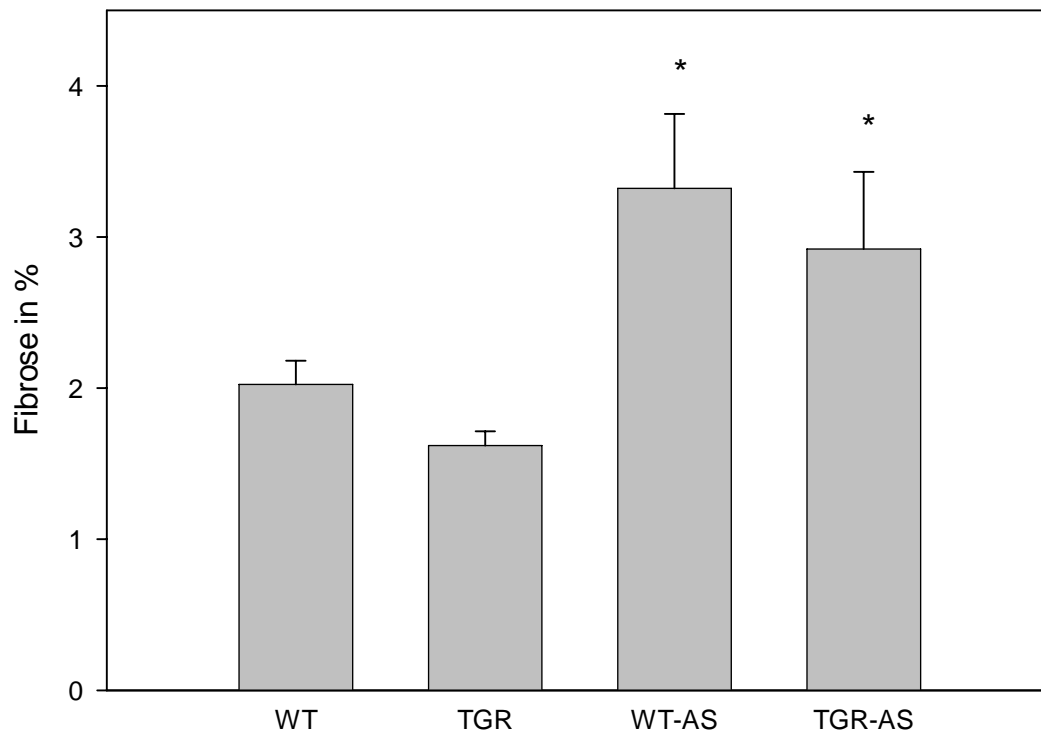
Die Bestimmung der Myozytendurchmesser als Maß der Kardiomyozytengröße erfolgte an HE-gefärbten Schnitten. Zusätzlich wurde das Ausmaß der interstitiellen Fibrosierung an SiR-gefärbten Schnitten charakterisiert. **Abb. 4.15** zeigt exemplarisch typische HE-gefärbte Schnitte für je ein transgenes (**Abb. 4.15 a + b**) und nicht-transgenes (**Abb. 4.15 c + d**) Versuchstier 6 Wochen nach Scheinoperation (**Abb. 4.15 b + d**) oder Aortenstenose mit einem 0.4er Hemoclip (**Abb. 4.15 a + c**). Die Kardiomyozyten des linken Ventrikels von transgenen und nicht-transgenen Versuchstieren mit supra-avalvulärer Aortenstenose wiesen im Vergleich zu den entsprechenden scheinoperierten Kontrolltieren um 22,3 % (TGR) und 36,8 % (WT) größere Myozytendurchmesser auf (**Abb. 4.16**). Wie die Boxplotdarstellung der ermittelten Werte in **Abb. 4.16** zeigt, wiesen Kardiomyozyten von WT-AS 0.4 im Vergleich zu TGR mit Aortenstenose auch größere absolute Zelldurchmesser auf ( $17,1 \pm 0,3 \mu\text{m}$  versus  $15,9 \pm 0,4 \mu\text{m}$  in TGR-AS 0.4,  $p < 0,01$ ).



**Abb. 4.16** Boxplotdarstellung der morphometrisch gemessenen Kardiomyozytendurchmesser SERCA2a-transgener (TGR) und nicht-transgener (WT) Ratten mit einer Einengung der Aorta ascendens auf 0.4 mm 6 Wochen postoperativ im Vergleich zu scheinoperierten (Sh) Tieren. Es wurden Messungen an 7 Tiere pro Gruppe durchgeführt. Pro Tier wurden 30 Kardiomyozyten ausgemessen (je 10 Messungen in drei unterschiedlichen Schnitten pro Tier). \* $p < 0,001$  versus TGR-AS bzw. WT-AS 0.4. # $p < 0,01$  versus WT-AS 0.4.

Zusätzlich zur morphometrischen Analyse der Kardiomyozytendurchmesser wurde die extrazelluläre Kollagenmatrix als Maß einer vorliegenden interstitiellen Fibrose an SiR-angefärbten Schnitten quantifiziert. Wie erwartet, kam es in chronisch drucküberlasteten Herzen mit AS 0.4 zu einer Zunahme der interstitiellen Kollagenmatrix (11;25;26;28;68). Der morphometrisch

ermittelte Wert für deren Anteil an der ausgewerteten Gewebeschnittgesamtläche betrug im druckbelasteten, hypertrophierten linken Ventrikel von WT und TGR das 1,65-fache bzw. 1,70-fache im Vergleich zu scheinoperierten WT- und TGR-Kontrollen.



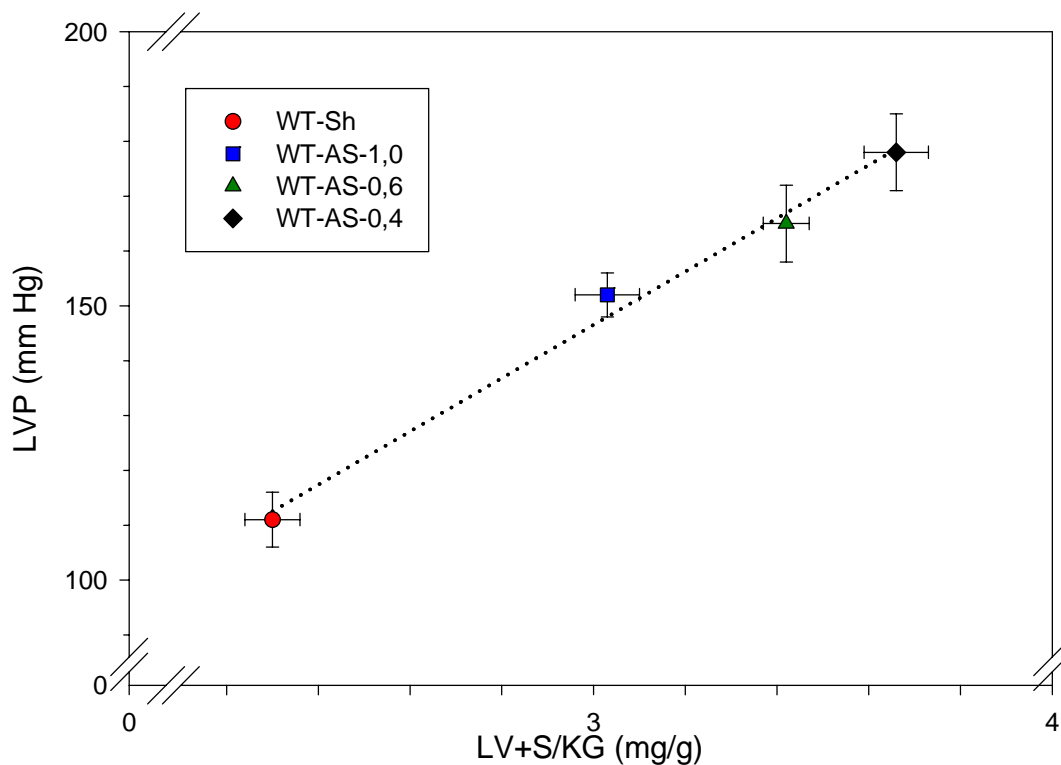
**Abb. 4.17** Ausmaß der extrazellulären Kollagenmatrix im linksventrikulären Myokard von SERCA2a-transgenen (TGR) und nicht-transgenen (WT) Ratten mit 6-wöchiger supra-avalvulären Aortenstenose (AS) im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolltieren ohne Aortenstenose. Die kurze Diagonale des angelegten Hemoclips betrug 0.4 mm. Mittelwerte  $\pm$  SEM für 7 Tiere pro Gruppe.

\* $p < 0,05$  verglichen mit WT und TGR. Pro Tier wurden 30 Schnitte morphometrisch analysiert.

#### 4.4.3 Hämodynamische Charakteristik

Sechs Wochen nach der supra-avalvulären Aortenkonstriktion wurde die linksventrikuläre Funktion mit Hilfe eines Millar Tip-Katheter<sup>®</sup> an narkotisierten, thorakotomierten Versuchstieren untersucht. Bezüglich der Herzfrequenz sowie des systolischen und diastolischen Blutdrucks konnten keine Unterschiede zwischen scheinoperierten nichthypertrphen WT- und TGR-Versuchstieren festgestellt werden (**Tab. 4.5**). Allerdings entwickelten die linken Ventrikel von WT und TGR mit Drucküberlasthypertrophie aufgrund der vergrößerten Muskelmasse signifikant höhere systolische Maximaldrücke. So lag der LVP von WT mit 0.4er supra-avalvulärer Aortenstenose 60 % über den Werten von WT-Kontrollen. Bei TGR betrug die entsprechende Zunahme 35 % ( $p < 0,05$ ). Wie in **Abb. 4.18** für nicht-transgene Versuchstiere zu sehen ist, bestand zwischen dem Ausmaß der linksventrikulären Hypertrophie und dem entwickelten LVP eine lineare Beziehung. Der hypertrophiebedingte Anstieg des LVP war bei TGR-AS 0.4 von einer Zunahme der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit  $+dP/dt_{\max}$  um 19 % ( $p < 0,05$  versus

TGR-Sh) begleitet. Bei WT-AS 0.4 betrug dieser Anstieg 44 % ( $p < 0,05$  versus WT-Sh). Die tendenziellen Unterschiede der absoluten Druckanstiegs- und Abfallswerte zwischen TGR-AS 0.4 und WT-AS 0.4 waren nicht signifikant (s. **Tab. 4.5**). Im Gegensatz dazu verlangsamte sich die normierte maximale Druckabfallsgeschwindigkeit  $-dp/dt_{max}/LVP$  bei WT-AS 0.4 um 23 % (**Abb. 4.19 C**). Bei TGR-AS 0.4 betrug diese Abnahme nur 9 % und unterschied sich nicht signifikant von scheinoperierten TGR. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Entstehung einer diastolischen Dysfunktion im schwer drucküberlasteten Herzen durch transgene SERCA2a-Überexpression in gesunden Tieren „präventiv“ vermindert werden kann. Der Schutzeffekt scheint erst unter den Bedingungen einer schweren Drucküberlasthypertrophie vorzuliegen, denn bei moderater LV-Hypertrophie (AS 1.0) bestanden keine Unterschiede zwischen WT und TGR. Zusätzlich unterstützt wurden diese Befunde durch die gemessenen LVEDP Werte. Der LVEDP ist beim diastolischen Herzversagen Ausdruck eines erhöhten linksventrikulären Füllungsdrucks. **Abb. 4.19 A** zeigt, dass sich der LVEDP sowohl bei WT-AS 0.6 als auch bei WT-AS 0.4 im Vergleich zu den Werten bei scheinoperierten WT verdreifachte. Bei TGR-AS 0.4 mit massiver Drucküberlasthypertrophie stieg der LVEDP verglichen mit scheinoperierten TGR nur leicht an. Dies Abstieg war statistisch nicht signifikant. Somit lag der LVEDP bei WT-AS 0.4 2,5-fach über dem Wert von TGR-AS 0.4.

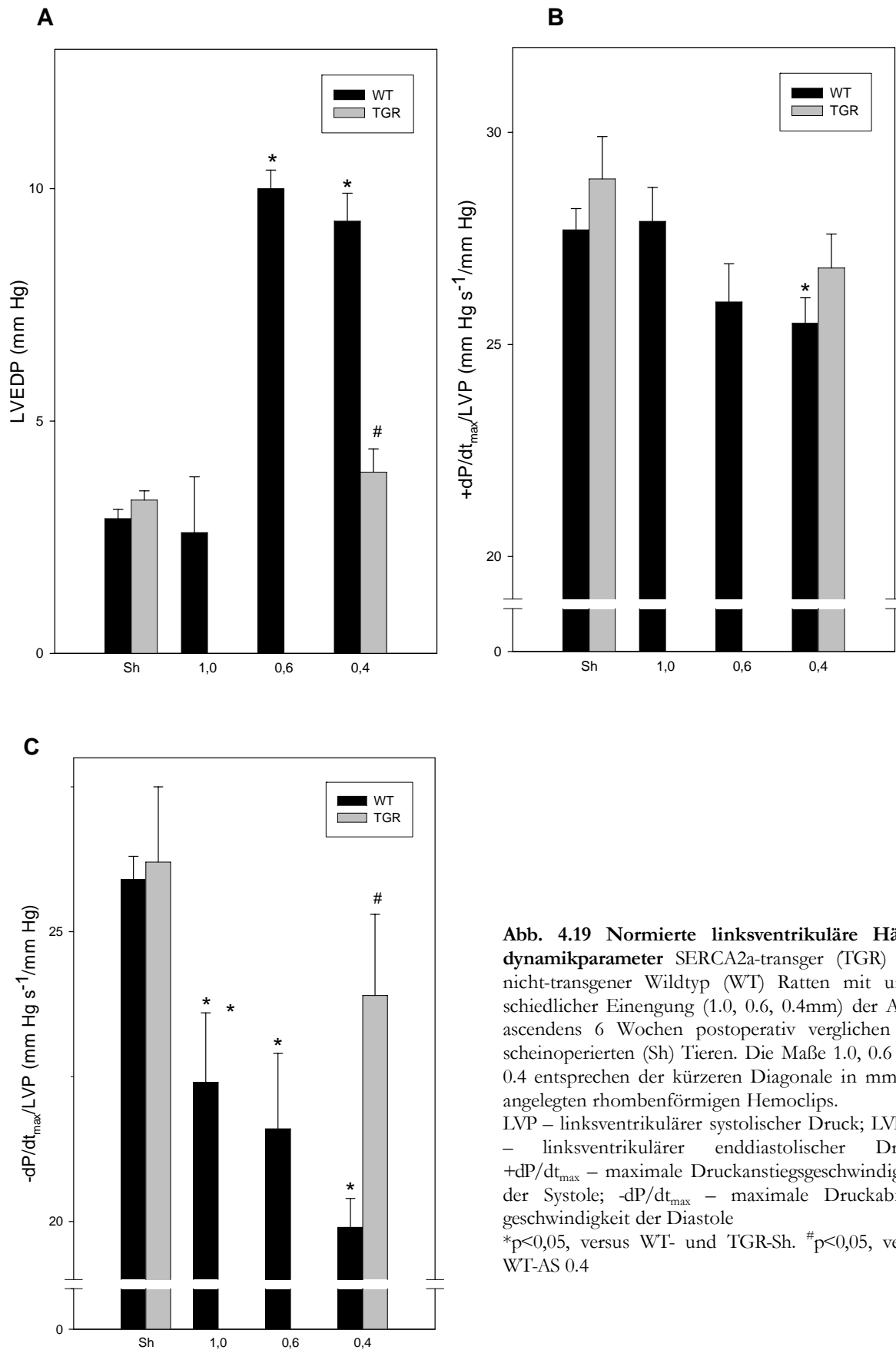


**Abb. 4.18** Lineare Beziehung zwischen Masse des linken Ventrikels und entwickeltem linksventrikulären Maximaldruck (LVP) von nicht-transgenen Tieren vom Wildtyp (WT) 6 Wochen nach operativer Einengung der Aorta ascendens (AS) durch Anlegen eines rhombenförmigen Hemoclips von 1.0, 0.6 und 0.4 mm kurzem Diagonalemaß. KG – Körpergewicht; Sh – scheinoperierte Tiere ohne angelegten Hemoclip; LV + S – linker Ventrikel und Septum

**Tabelle 4.5 Veränderungen von Hämodynamikparametern bei 6-wöchiger Aortenstenose nicht-transgener Wildtyp (WT) und transgener SERCA2a-(TGR) Ratten**

Experimentelle Gruppe	HF (s <sup>-1</sup> )	RR <sub>sys</sub> (mm Hg)	RR <sub>dia</sub> (mm Hg)	LVP (mm Hg)	+dP/dt <sub>max</sub> (mm Hg s <sup>-1</sup> )	-dP/dt <sub>max</sub> (mm Hg s <sup>-1</sup> )	+dP/dt <sub>max</sub> / -dP/dt <sub>max</sub> (mmHg s <sup>-1</sup> /mmHg s <sup>-1</sup> )	
<b>WT</b>								
<b>N</b>								
<b>Sh</b>	10	372 ± 8	134 ± 4	87 ± 3	111 ± 5	3080 ± 119	2895 ± 116	1,07 ± 0,01
<b>AS 1.0</b>	5	344 ± 33	126 ± 6	78 ± 5	152 ± 4*	4240 ± 150*	3420 ± 263	1,19 ± 0,05
<b>AS 0.6</b>	9	364 ± 10	143 ± 4	93 ± 2	165 ± 7*	4167 ± 197*	3600 ± 224*	1,22 ± 0,06*
<b>AS 0.4</b>	8	329 ± 9	130 ± 4	88 ± 2	178 ± 7*	4443 ± 188*	3575 ± 186*	1,27 ± 0,02*
<b>TGR</b>								
<b>Sh</b>	10	361 ± 11	131 ± 6	77 ± 6	114 ± 7	3380 ± 125	2990 ± 178	1,10 ± 0,02
<b>AS 0.4</b>	7	350 ± 15	121 ± 4	85 ± 1	154 ± 11*	4029 ± 230*	3414 ± 101	1,16 ± 0,03 <sup>#</sup>

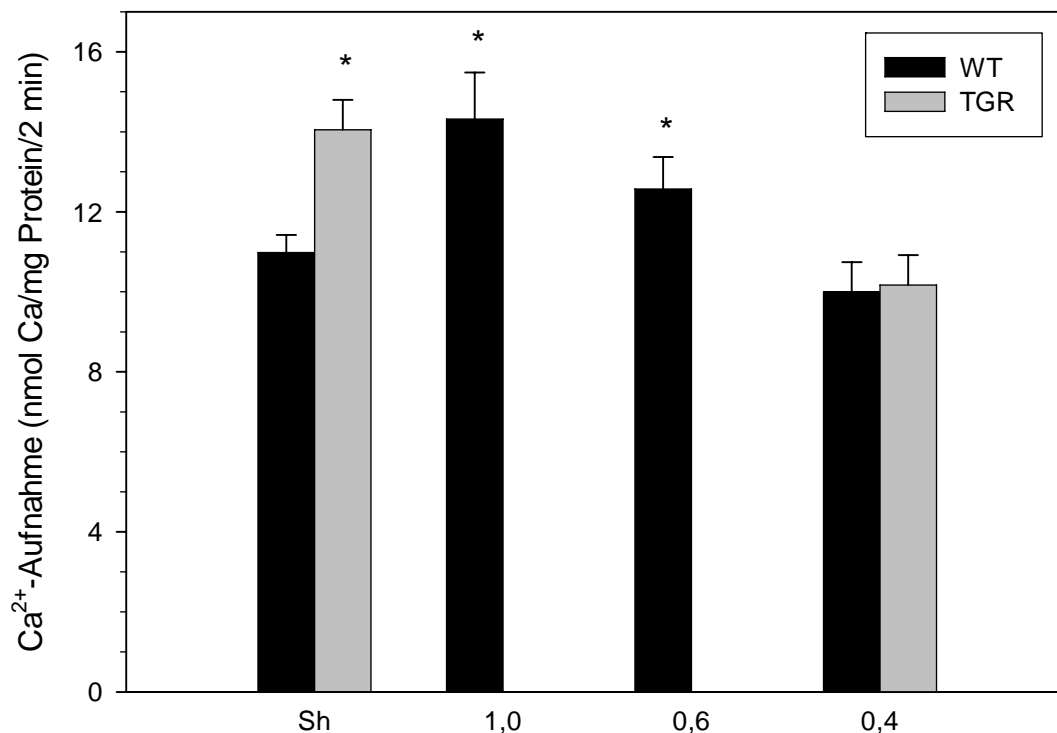
Sh – scheinoperierte Tiere ohne Hemoclip. AS – Tiere, deren ascendierende Aorta mit Hilfe eines Hemoclips eingengt wurde. Der Grad der Einengung der A. ascendens, gemessen als kleinste innere Diagonale des rautenförmigen Hemoclips, betrug 1 mm (AS 1.0), 0.6 mm (AS 0.6) oder 0.4 mm (AS 0.4). HF – Herzfrequenz, RR<sub>sys</sub> – systolischer Blutdruck, RR<sub>dia</sub> – diastolischer Blutdruck, LVP – linksventrikulärer Druck, +dP/dt<sub>max</sub> – maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit, -dP/dt<sub>max</sub> – maximale Druckabfallgeschwindigkeit. Mittelwerte ± SEM. \*p<0,05 versus WT- bzw. TGR-Sh, # p<0,05 versus WT AS 0.4



**Abb. 4.19 Normierte linksventrikuläre Hämodynamikparameter** SERCA2a-transgener (TGR) und nicht-transgener Wildtyp (WT) Ratten mit unterschiedlicher Einengung (1.0, 0.6, 0.4mm) der Aorta ascendens 6 Wochen postoperativ verglichen mit scheinoperierten (Sh) Tieren. Die Maße 1.0, 0.6 und 0.4 entsprechen der kürzeren Diagonale in mm des angelegten rhombenförmigen Hemoclips. LVP – linksventrikulärer systolischer Druck; LVEDP – linksventrikulärer enddiastolischer Druck; +dP/dt<sub>max</sub> – maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit der Systole; -dP/dt<sub>max</sub> – maximale Druckabfallsgeschwindigkeit der Diastole  
\*p<0,05, versus WT- und TGR-Sh. #p<0,05, versus WT-AS 0.4

#### 4.4.4 Kardialer $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das SR von Herzhomogenaten

Da die SERCA2a-katalysierte Rückbindung von zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$  den myokardialen Relaxationsprozess kontrolliert, wurde untersucht, welchen Einfluss die Entwicklung einer chronischen Drucküberlasthypertrophie auf dieses membranäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportsystem hat. Die *in vitro* Analysen wurden an linksventrikulären Homogenaten von WT und TGR sechs Wochen nach Aortenkonstriktion vorgenommen. Die Geschwindigkeit des Oxalat-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes von scheinoperierten SERCA2a-transgenen Ratten lag 28 % über der von scheinoperierten WT (Abb. 4.20). Bei Herzen von WT mit moderater LV-Hypertrophie (AS 1.0) war die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportgeschwindigkeit um 30 % erhöht. Die retikuläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität von WT- und TGR-Herzen mit ausgeprägter LV-Hypertrophie unterschied sich nicht von den gemessenen Werten nicht-transgener, scheinoperierter WT.



**Abb. 4.20 Oxalat-stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in Membranvesikeln des sarkoplasmatischen Retikulum.**

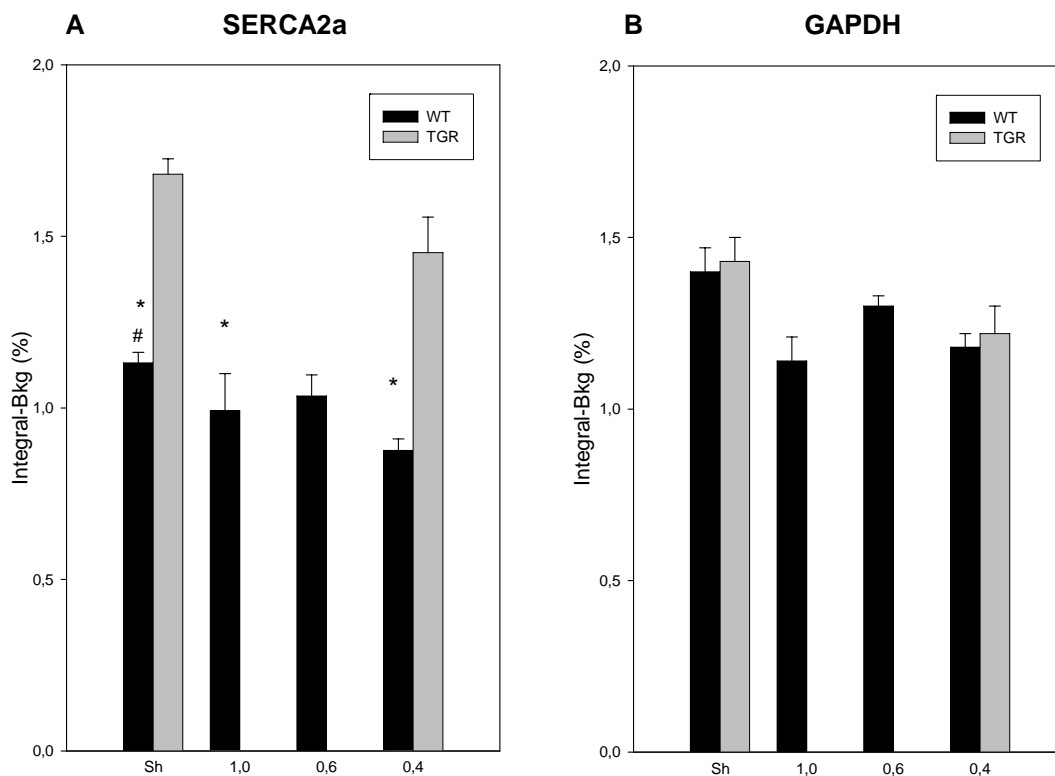
SERCA2a-transger (TGR) und nicht-transgener Wildtyp (WT) Ratten mit unterschiedlicher Einengung der Aorta ascendens (1,0, 0,6, 0,4mm) 6 Wochen postoperativ verglichen mit scheinoperierten (Sh) Tieren. Die kurze Diagonale des angelegten rhombenförmigen Hemoclips betrug 1,0, 0,6 und 0,4 mm. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme wurde in linksventrikulären Homogenaten bei einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $0,34 \mu\text{M}$  gemessen. WT – Wildtyp Ratte; TGR – SERCA2a-transgene Ratte; \*  $p < 0,003$  versus WT-Sh

#### 4.4.5 Dotplot-Analyse der SERCA2a-mRNA-Spiegel

Da die Ausstattung der Membran des SR u.a. von der Expression des SERCA2-Gens abhängt, wurden die Gleichgewichtspiegel von SERCA2a-mRNA mit Hilfe von Dotplot-Analysen quantifiziert. Wie Abb. 4.21 zeigt, lag der absolute SERCA2a-mRNA Spiegel von scheinoperierten



TGR 48 % über dem von scheineroperierten WT. Normiert auf GAPDH betrug dieser Unterschied 38 %. Mit zunehmender LV-Hypertrophie, gekennzeichnet durch einen graduellen Anstieg des Hypertrophiemarkers ANF-mRNA (Abb. 4.21 C), verringerten sich die SERCA2a-mRNA-Spiegel sowohl bei WT als auch bei TGR (Abb. 4.21 A). Bei stark ausgeprägter Drucküberlasthypertrophie lagen allerdings die SERCA-mRNA-Spiegel von TGR-AS 0.4 67% über den entsprechenden Werten von WT-AS 0.4. Auch bei den auf GAPDH-normierten SERCA2a-mRNA-Spiegeln war der Unterschied in den stark hypertrophierten linken Ventrikeln von TGR und WT größer als in nicht hypertrophierten Herzen (+54 % in TGR-AS 0.4 versus +38 % in TGR-Sh).

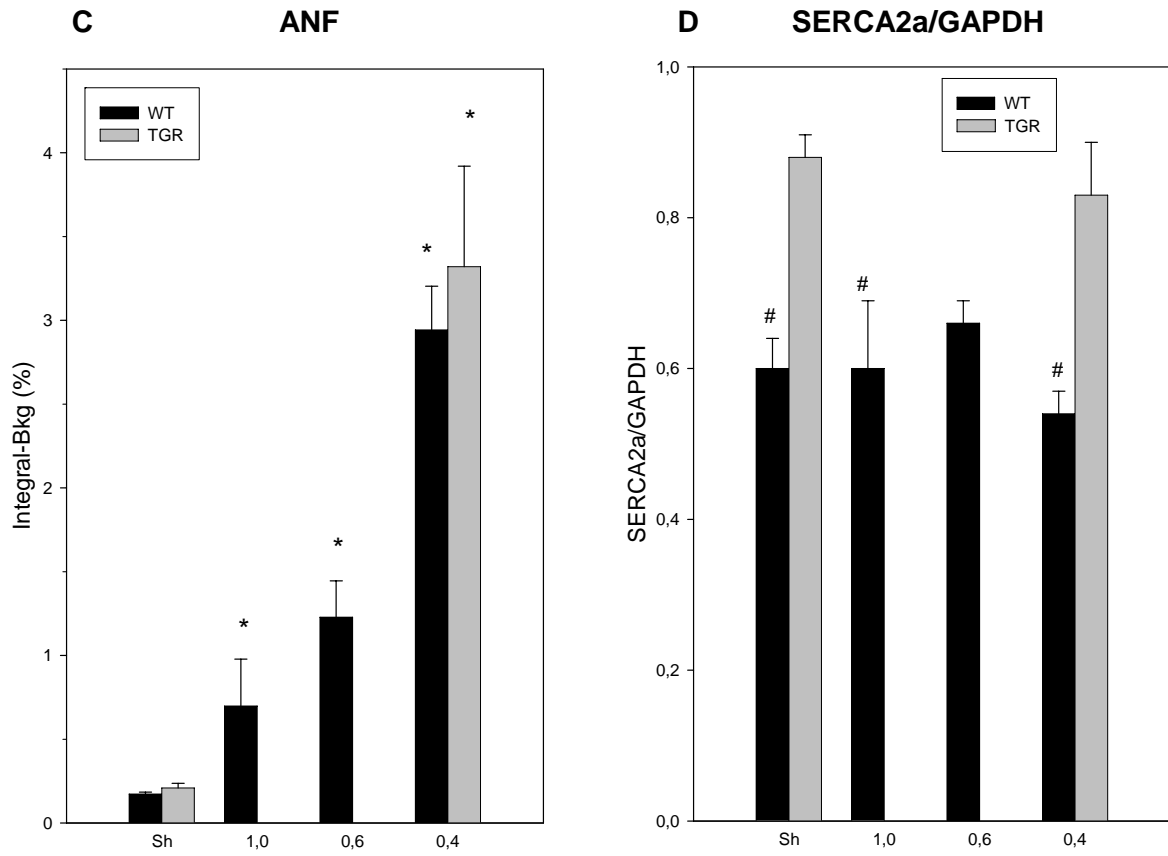


**Abb. 4.21 Die linksventrikulären Spiegel von SERCA2a-, GAPDH- und ANF-mRNA von SERCA2a-transgenen (TGR) und nicht-transgenen Ratten (WT) ohne (Sh) und mit Drucküberlasthypertrophie unterschiedlicher Ausprägung (1.0, 0.6, 0.4).** Die mRNA-Spiegel wurden mit Hilfe von Dot blot-Analysen quantifiziert. Pro Dot wurden 3µg Gesamt-RNA aufgetragen. Unterschiedliche LV-Hypertrophiegrade wurden durch unterschiedlich starke Stenosierung der Aorta ascendens für sechs Wochen erzielt. Die kurze Diagonale der an die Aorta ascendens angelegten Hemoclips betrug 1.0, 0.6 oder 0.4 mm.

A – SERCA2a; B – GAPDH, diente als Housekeeping-Gen;

C – ANF (s.S 70); D – Verhältnis SERCA2a/GAPDH (s.S 71)

N = 7 Tiere pro Gruppe; \* p<0,01 versus WT- und TGR-Sh; # p<0,01 versus TGR



Fortsetzung Abb. 4.21