

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

## DISSERTATION

Vergleichende Analysen der Expression kardialer Gene in einem doppelt  
transgenen SERCA2/Renin-Hypertoniemodell

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jaime-Jürgen Eulert-Grehn

aus Guadalajara (Spanien)

Gutachter:           1. Priv.-Doz. Dr. med. R. Vetter  
                          2. Prof. Dr. M. Bader  
                          3. Prof. Dr. med. J. Ennker

Datum der Promotion: 22.März 2013

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1 Herzinsuffizienz: Arterielle Hypertonie und Koronare Herzkrankheit.....	1
1.2 Ca <sup>2+</sup> - Homöostase des Kardiomyozyten .....	2
1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System .....	4
1.4 Die Ca <sup>2+</sup> -ATPase SERCA2a .....	5
1.5 Ren2-TG .....	7
1.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede kardiovaskulärer Pathologien .....	10
1.7 Gentechnische Beeinflussung kardialer Pathologien .....	10
1.8 Zielsetzung der Arbeit .....	12
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>14</b>
2.1 Gewebeproben .....	14
2.2 In vitro Methoden zur Genotypisierung .....	14
2.2.1 Genomische DNA-Isolierung .....	14
2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration.....	15
2.2.3 PCR.....	16
2.2.4 DNA-Elektrophorese.....	18
2.3 SR Ca <sup>2+</sup> -Transportaktivitätsmessung.....	19
2.3.1 Membranpräparation .....	19
2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	20
2.3.3 Oxalat-stimulierter Ca <sup>2+</sup> -Transport.....	20
2.4 Genexpressionsanalyse.....	21
2.4.1 RNA-Isolierung .....	21
2.4.2 Qualitätsprüfung .....	22
2.4.2.1 Gelelektrophorese.....	22
2.4.2.2 Mikrochip- Kapillarelektrophorese .....	23
2.4.3 Reverse Transkription .....	23
2.4.4 Primer Design und Standardreihe .....	24
2.4.5 Quantitative RT-PCR.....	28

---

2.4.6	Quantifizierung .....	31
2.5	Western Blot .....	31
2.5.1	SDS-PAGE nach Laemmli.....	31
2.5.2	Harnstoff-SDS-PAGE nach Swank und Munkres .....	32
2.5.3	Elektrotransfer mittels Tankblott .....	33
2.5.4	Immunchemischer Nachweis.....	33
2.6	Statistische Auswertung.....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Renin-transgene und SERCA2-Renin-doppelt-transgene Tiere.....	35
3.1.1	Genotypisierung .....	35
3.1.2	Qualität.....	36
3.1.3	Körper- und Herzgewichte männlicher einfach Renin- und SERCA2-Renin-doppelt-transgener Tiere .....	36
3.1.4	Biomarker der linksventrikulären Hypertrophie.....	37
3.1.5	Das kardiale SERCA2a/PLN-System .....	39
3.1.6	Vergleichende Untersuchung der Körper- und Herzgewichte und SR-Ca <sup>2+</sup> -Transportraten weiblicher und männlicher Renin- und SERCA-Renin-doppelt transgener Tiere .....	44
3.1.7	Kardiale Genexpressionsanalyse weiblicher und männlicher Renin- und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere .....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>48</b>
4.1	Diskussion der Ergebnisse.....	48
4.2	Limitierungen .....	59
4.3	Ausblick.....	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>63</b>
	<b>Schriftenverzeichnis .....</b>	<b>VII</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>XVII</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>XVIII</b>
	<b>Publikationsliste.....</b>	<b>XIX</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung .....</b>	<b>XX</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting Enzyme
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
β-MHC	β-Myosin Heavy Chain
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CMV	Cytomegalievirus
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N´N´-tetraessigsäure
FAM	6-Carboxyfluorescein
FU	Fluoreszenz Einheiten
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GTC	Guanidinthiocyanat
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl.Ribosyl-Transferase
KHK	Koronare Herzkrankheit
LV	Linker Ventrikel
LVEF	Linksventrikuläre Ejektionsfraktion
M-MuLV	Moloney Muriner Leukämie Virus
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
NTG	Nicht-Transgene Tiere
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Chain Reaction
PLN	Phospholamban
PMCA	Sarkolemmale Ca <sup>2+</sup> ATPase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
Ren2-TG	heterozygote Renin transgene Tiere des Rattenstammes TGR(mREN2)27
RT-PCR	Reverse Transkription- PCR
RT	Raumtemperatur
RV	Rechter Ventrikel

---

Ryr2	Ryanodin-Rezeptor 2 (Ca <sup>2+</sup> -Freisetzungprotein im SR)
SEM	mittlerer Standardfehler
SERCA2a	SR Ca <sup>2+</sup> Transport ATPase 2a
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SHR	Spontan Hypertensive Ratten
TAMRA	Tetramethylrodamin
TBS	Tris Puffer-Saline
TBS-T	Tris Puffer-Saline mit Tween 20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGR(mREN2)27	Rattenstamm mit murinem Transgen Renin-2
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween	Polyoxyethylen (20) sorbitmonolaurat

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Ca <sup>2+</sup> -Homöostase des Kardiomyozyten .....	3
Abb. 2.1: Primersequenzen für den Nachweis des SERCA2-Transgens und des murinen Renin-Transgen.....	17
Abb. 3.1: Ethidiumbromid gefärbtes 1,5% Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung von PCR-Produkten, die unter Verwendung SERCA2-transgen spezifischen Primer erhalten wurden.. .....	35
Abb.3.2: Elektropherogramm eines nicht-transgenen Tieres.....	36
Abb.3.3: Linksventrikuläre ANP mRNA –Spiegel nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG) .....	38
Abb. 3.4: Immunreaktive linksventrikuläre β-MHC- Signale männlicher nicht-transgener (NTG) , Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgene Tiere (SERen-dTG).....	39
Abb. 3.5: Retikulärer Oxalat-stimulierter Ca <sup>2+</sup> -Transport in abzentrifugierten linksventrikulären Membranpräparaten von männlichen nicht-transgenen (NTG), Renin-transgenen (Ren2-TG) und SERCA2-Renin doppelt transgenen Tieren (SERen-dTG). .....	40
Abb.3.6: SERCA2a mRNA des linken Ventrikels nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG). .....	41
Abb.3.7: Immunreaktive linksventrikuläre SERCA2a- Spiegel nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG). .....	42
Abb.3.8: A) PLN-mRNA des linken Ventrikels B) Immunreaktive linksventrikuläre PLN- Spiegel nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin doppelt transgener Tiere (SERen-dTG) .....	42
Abb.3.9: Immunreaktives linksventrikuläres SERCA2a/PLN-Verhältnis nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin doppelt transgener Tiere (SERen-dTG) .....	43
Abb.3.10: A) NCX1-mRNA des linken Ventrikels B) Immunreaktive linksventrikuläre NCX1- Spiegel nichttransgener (NTG) ,Renin-transgener (Ren2-TG) und Renin-SERCA2-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG) .....	44
Abb.3.11: Oxalat-stimulierter Ca <sup>2+</sup> -Transport in linksventrikulären Membranpräparaten männlicher Renin-transgener (M- Ren2-TG) und SERCA2-Renin- doppelt transgener Ratten (M- SERen- dTG), weiblicher Renin-transgener (W-Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (W- SEREN-dTG).....	46

---

## Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1: Oligonukleotidsequenzen der für die quantitative RT-PCR genutzten Forward-Primer, Reverse-Primer und TaqMan-Sonden.....	31
Tab. 3.1: Körper- und Herzgewichte männlicher 30 Wochen alter nicht-transgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG) .....	37
Tab. 3.2: 18S und HPRT mRNA-Spiegel .....	38
Tab. 3.3: Körper und Herzgewichte weiblicher nicht-transgener (NTG), Renin-transgener (W-Ren2-TG) sowie Renin- und SERCA2- doppelt transgener (W-SEREN-dTG) Tiere.....	45
Tab. 3.4: HPRT, PLN, SERCA2a, NCX1 und ANP mRNA des linken Ventrikels männlicher und weiblicher Tiere mittels Standardreihenmethode .....	47



# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz: Arterielle Hypertonie und Koronare Herzkrankheit

Weltweit sind jährlich 7,6 Millionen vorzeitige Todesfälle auf hohen Blutdruck (höher als 115 mmHg systolisch) zurückzuführen; das sind 13,5 % aller Todesfälle. 54% der Schlaganfälle und 47 % der Fälle von Koronarer Herzkrankheit (KHK) werden auf die arterielle Hypertonie zurückgeführt<sup>1</sup>. In der überwiegenden Zahl der Fälle führen eine KHK und/oder eine vorbestehende arterielle Hypertonie zur chronischen Herzinsuffizienz<sup>2,3</sup>. Die genauen Pathomechanismen der Entstehung der Hypertonie sind zwar nicht bekannt. Eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) trägt zur Entwicklung der Endorganschäden bei<sup>4</sup>.

Ein bis zwei Prozent der Bevölkerung in Europa und den USA leidet an chronischer Herzinsuffizienz. Die Hälfte der Patienten stirbt innerhalb der ersten vier Jahre nach Diagnosestellung. Herzinsuffizienz ist definiert als ein Syndrom, bei dem der Patient Symptome wie Dyspnoe, Müdigkeit, und Schwäche sowie klinische Zeichen wie Tachykardie, pulmonale Rasselgeräusche, Ödeme und Jugularvenenstauung aufweist, denen eine kardiale Funktionsstörung zugrunde liegt. Die Inzidenz hat in den letzten zwei Jahrzehnten um 150% zugenommen und wird aufgrund der sich stetig verbessernden Therapie des akuten Myokardinfarkts und des damit verbundenen erhöhten Langzeitüberlebens in den nächsten Jahren und Jahrzehnten weiterhin ansteigen. Ungefähr die Hälfte der Patienten leiden an einer systolischen Dysfunktion mit verminderter linksventrikulärer Ejektionsfraktion (LVEF). Bei einer LVEF über 45-50% spricht man von Herzinsuffizienz mit erhaltener linksventrikulärer Funktion. Ob dieses mit einer diastolischen Dysfunktion gleichzusetzen ist, ist Gegenstand aktueller Forschung. Pathophysiologisch gehen diese beiden Formen mit einer Störung der myozytären Regulation der Kalzium( $\text{Ca}^{2+}$ )-Homöostase im Herzen einher. Insbesondere die diastolische Relaxation ist davon betroffen. Diese wiederum hängt auf subzellulärer Ebene maßgeblich vom ATP-abhängigen Rücktransport von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) ab, der von der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase SERCA2a katalysiert wird.

## 1.2 $\text{Ca}^{2+}$ - Homöostase des Kardiomyozyten

In der Herzmuskelzelle führt die durch  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom während des Aktionspotentials getriggerte  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR zur Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und somit zur Kontraktion in der Systole<sup>5</sup>. Um die zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Diastole auf unter 150 nM zu senken, muss das in der Systole aus dem Extrazellulärraum und den intrazellulären Speichern freigesetzte  $\text{Ca}^{2+}$  wieder aus dem Zytosol der Herzmuskelzelle transportiert werden. Vier membranäre  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter sind daran beteiligt:

1. SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase (SERCA2a)
2. sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX1)
3. sarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA)
4. mitochondrialer  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporter<sup>6</sup>.

Quantitativ gesehen nehmen SERCA2a und NCX1 eine zentrale Stellung ein. SERCA2a transportiert  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR. Mittels NCX1 wird  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol in den Extrazellulärraum transportiert.  $\text{Ca}^{2+}$  strömt bei jedem Aktionspotential über spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in das Zytosol der Herzmuskelzelle. Es werden fünf verschiedene Typen der spannungsabhängigen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle unterschieden: L, N, P/Q, R und der T-Typ  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal<sup>7</sup>. In ventrikulären Myozyten ist der L-Typ Kanal am bedeutendsten, der T-Typ Kanal spielt in Zellen des Erregungsleitungsystems eine wichtige Rolle<sup>8,9</sup>. Dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom aus dem Extrazellulärraum führt durch Aktivierung von Ryanodinrezeptoren im terminalem SR zu einer Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus dem SR in das Zytosol.

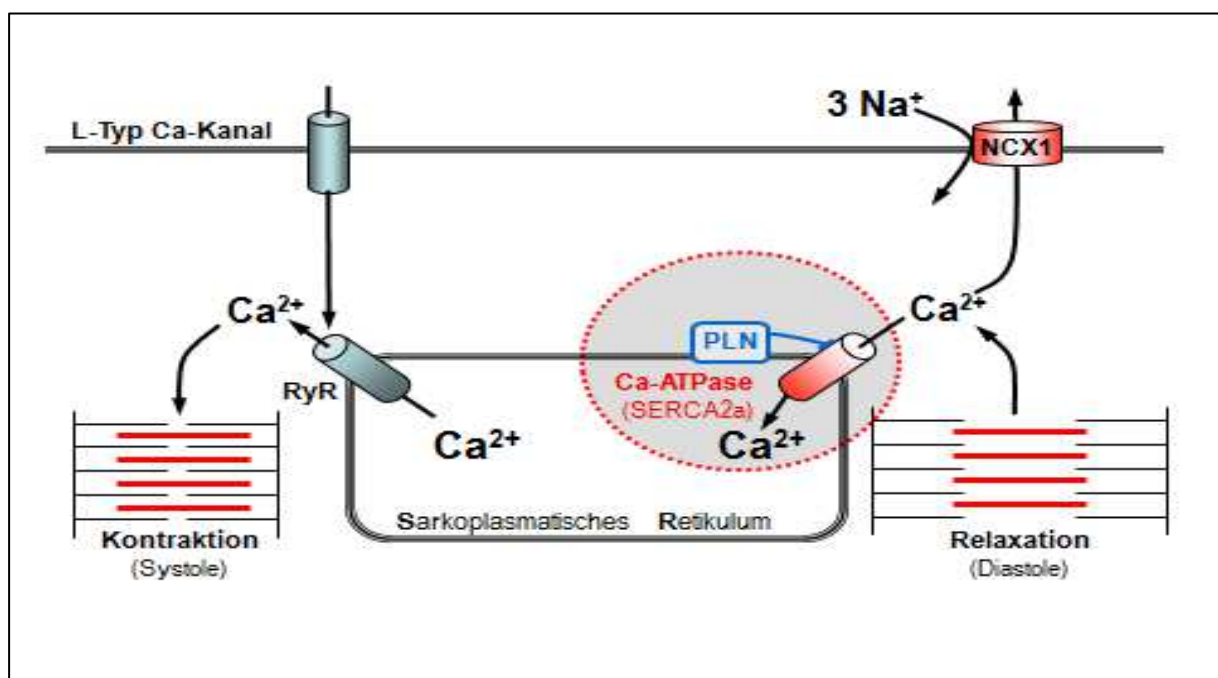
Zwei Faktoren bestimmen maßgeblich die Menge an  $\text{Ca}^{2+}$ , die aus dem SR freigesetzt wird: der transsarkolemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom und die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im SR<sup>10</sup>.

Zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  wird aktiv in das SR durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase SERCA2a gepumpt und verlässt diese  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherorganelle vornehmlich über den  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzungskanal Ryanodinrezeptor 2 (RyR2).

Die SERCA2a-Aktivität hängt vor allem von drei Faktoren ab:

1. der zytoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration
2. vom SERCA2a-Inhibitor Phospholamban (Menge sowie Phosphorylierungsstatus)
3. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR<sup>10</sup>.

Bei Patienten mit Herzinsuffizienz hat man mehrere Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase nachgewiesen. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung des SR insuffizienter Herzen ist meist verringert<sup>9</sup>, der Phosphorylierungsstatus des Ryanodinrezeptors ist verändert<sup>11</sup>. Des weiteren konnten Shannon et al. eine reverse SERCA2-Aktivität, die an der  $\text{Ca}^{2+}$ -Depletion des SR beteiligt ist, nachweisen<sup>12</sup>. Die folgende Abbildung zeigt schematisch die Hauptkomponenten der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase des Kardiomyozyten.



**Abb. 1.1:  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase des Kardiomyozyten**

(Abbildung freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Roland Vetter)

Die Abbildung zeigt, dass  $\text{Ca}^{2+}$ , die in die Herzmuskelzelle über spannungsabhängige L-Typ-Kanäle gelangen, zu einem  $\text{Ca}^{2+}$  induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux aus dem SR führen. Hierdurch kommt es zur Aktivierung der Aktin/Myosin-Interaktion über die Bindung von

$\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C.  $\text{Ca}^{2+}$  verlässt das Zytosol in den Extrazellulärraum über das NCX1-Protein. Dieser Prozess macht etwa 10-30 % des gesamten  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux aus. Die verbleibenden 70-90 % der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen werden über das SERCA2-Protein ATP abhängig in das SR transportiert. PLN hemmt im nicht phosphorylierten Zustand die SERCA2a-Transportaktivität. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationsabnahme führt zur Inaktivierung des Kontraktionsprozesses und zur Relaxation in der Diastole. Die Zu- und Abnahmen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration spiegeln die Phase der Systole und Diastole wieder.

### 1.3 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Ende des 19. Jahrhunderts injizierten Tigerstedt und Bergmann Nierenextrakte in Kaninchen. Diese führten zu einem kurzfristigen Abfall mit anschließend langanhaltender Erhöhung des arteriellen Blutdrucks. Sie nannten diese aus dem Nierenkortex stammende Substanz Renin<sup>13,14</sup>. Fast 100 Jahre später konnte 1981 erstmals ein cDNA-Fragment des Renin-Gens der Maus aus der Glandula submaxillaris kloniert werden<sup>15</sup>. Dieses diente als Grundlage für das fast zehn Jahre später entwickelte erste relevante transgene Tiermodell der Hypertonieforschung: der Maus-Renin-transgene Rattenstamm mREN2(27)<sup>16</sup>.

Renin spaltet das aus der Leber stammende Angiotensinogen zu Angiotensin I, welches durch die Aktivität der Zink-Metalloprotease ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme) durch Abspaltung zweier C-terminaler Aminosäuren zu Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II bindet sowohl an den  $\text{AT}_1$ -Rezeptor als auch an den  $\text{AT}_2$ -Rezeptor. Beide gehören zur Gruppe der G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Durch die Bindung an den  $\text{AT}_1$ -Rezeptor in verschiedenen Zielgeweben kommt es u.a. zur Aldosteron-Freisetzung aus der Zona Glomerulosa der Nebennierenrinde, Vasokonstriktion, Salzretention im proximalen Tubulus und zu einer Stimulation des sympathischen Nervensystems<sup>17</sup>.

In den letzten Jahren sind nicht nur zu diesen sogenannten klassischen Komponenten des RAAS neue an der Kaskade beteiligte Enzyme wie beispielsweise das ACE2 - Enzym entdeckt worden, das Augenmerk ist auch auf das lokale RAAS gelenkt worden<sup>18,19</sup>. So lässt sich beispielsweise mit dem klassischen Konzept des RAAS als endokrines System nicht erklären, welche Rolle die Expression des Reningens im Gehirn

hat<sup>20,21</sup>. ACE2-vermittelt entsteht aus Angiotensin I nicht Angiotensin II, sondern Ang(1-7), welches an den Mas-Rezeptor bindet. Dessen Aktivierung führt nicht zu den oben genannten AT<sub>1</sub>-Rezeptor vermittelten Effekten, sondern ganz im Gegenteil zur Vasodilatation und zu anti-proliferativen Effekten. Seine Aktivierung ähnelt den Effekten der AT<sub>2</sub>-Rezeptor-Aktivierung<sup>22</sup>. Auch ist mit dem ACE2-Enzym der funktionale Rezeptor für das Coronavirus SARS, welches das „severe acute respiratory syndrome“ auslöst, identifiziert worden<sup>23</sup>. Ein weiterer entscheidender Wechsel im Verständnis der Wirkung des RAAS, war die Entdeckung eines funktionalen Renin-Rezeptors auf Mesangiumzellen<sup>24</sup>. Die Bindung von Renin an seinen Rezeptor führt nicht nur zu einer Verstärkung seiner katalytischen Aktivität bezüglich der Konversion von Angiotensinogen zu Angiotensin I, sondern unter anderem auch direkt zur Aktivierung von Mitogen aktivierten Protein-Kinasen<sup>25</sup>. Wäre Renin für einen erhöhten Blutdruck mitverantwortlich, sei es bei primärer oder sekundärer Hypertonie, würde man Polymorphismen im Gen erwarten, die mit der Entwicklung eines Hypertonus korrelieren. Die meisten genetischen Studien zeigen keinerlei Zusammenhänge zwischen Unterschieden in der Sequenz des Renin-Gens und arteriellem Bluthochdruck. Kürzlich hat eine Studie an zwei großen Studienpopulationen gezeigt, dass einige der 14 untersuchten Genpolymorphismen ein erhöhtes Risiko für Hypertonie bei postmenopausalen Frauen aufweisen<sup>26,27</sup>. Dass diese neuen Erkenntnisse jetzt schon helfen die Hypertonie besser zu verstehen, zeigt die Arbeit von Penninger et al., die auf definierten QTLs auf dem X Chromosom dreier Hypertonie-Rattenmodelle das ACE2-Enzym fanden und in allen drei Modellen eine verminderte Expression dieses Enzyms nachweisen konnten. QTL steht für die Ausprägung eines quantitativen phänotypischen Merkmals<sup>28</sup>.

#### 1.4 Die Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA2a

Die SR Ca<sup>2+</sup>-ATPasen sind rund 110 kD schwere Proteine, die zur Gruppe der ATPasen vom Typ E1-E2 gehören. Es handelt sich um eine Untergruppe der P-Typ ATPasen dar. Diese ATPasen zeichnen sich durch Phosphorylierung des Aspartat-Rests des zytoplasmatischen Teils der jeweiligen P-Typ-ATPase aus<sup>29</sup>. Pro hydrolysiertes Phosphat werden zwei Ca<sup>2+</sup>-Ionen aus dem Zytosol mit Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen zwischen 100 nM und 10 µM in das SR transportiert. Die Konzentration an freiem Ca<sup>2+</sup> im SR beträgt ca. 1 mM<sup>30,31</sup>. Die Struktur des SERCA-Proteins kann man in einen großen zytoplasmati-

schen Anteil, eine sogenannte Stalk-Domäne und eine transmembranäre Domäne mit kurzen Anteilen, die in das Lumen des SR reichen, unterteilen<sup>32</sup>. Drei Gene kodieren die elf bekannten SERCA-Transkripte. Das ATP2A1- Gen liegt beim Menschen auf Chromosom 16p12. Durch alternatives Spleißen entstehen das im schnell zuckenden Muskel exprimierte SERCA1a und das im Muskel des Neonaten vorhandene SERCA1b<sup>33</sup>. Durch alternatives Spleißen kodiert das ATP2A2-Gen (Chromosom 12) vier Isoformen. Die Isoform SERCA2a wird im Herzen, im langsam zuckenden Muskel und im neonatalen Skelettmuskel exprimiert. Die Isoform SERCA2b ist in der glatten Muskulatur und in verschiedenen anderen Geweben zu finden. Von dieser Verteilung weicht die SERCA2c-Gewebeexpression ab. SERCA2c wurde in epithelialen, mesenchymalen sowie in Zellen der hämatopoetischen Reihe nachgewiesen. Durch Reverse Transkriptions PCR wurde 2003 von Gelebart et al. in humanen Monocyten und im fötalen Herzen diese neue Isoform SERCA2c entdeckt, die durch Inklusion einer kurzen Intron-Sequenz entsteht<sup>34</sup>. Die 6 Isoformen SERCA3a-f (Chromosom 17p13) findet man unter anderem in Thrombozyten, in Zellen der lymphatischen Reihen und in Endothelzellen<sup>35,36</sup>. Das Augenmerk dieser Arbeit wird auf SERCA2a gelegt, da es sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte die dominierende Rolle bezüglich des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts in Kardiomyozyten spielt. Dieses unterscheidet sich von seiner Spleißvariante SERCA2b durch ein kürzeres C-terminales Ende. Dieser Unterschied in der Länge der Aminosäuresequenz spiegelt sich in der Bindungsaffinität und der Transportkinetik. In Arbeiten an HEK-293-Zellen beobachtet man für das SERCA2b-Protein eine doppelt so hohe  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität, aber eine halb so starke maximale Transportgeschwindigkeit verglichen mit SERCA2a-exprimierenden HEK-293-Zellen<sup>37</sup>. Hypothesen zur Kristallstruktur dieser  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasen kommen vor allem aus Arbeiten am SERCA1a-Protein, welches vorwiegend in der Skelettmuskulatur exprimiert wird<sup>32</sup>. Biomechanische Studien hatten vor der Identifizierung der Struktur zu einem Funktionsmodell geführt. Es entstanden erste Struktur-Funktionsmodelle. Während eines Transportzyklus sind vier Konformationszustände identifiziert worden. Bei hoher zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt es zur Bindung von zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die hoch affinen  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen. Anschließend kommt es zur Autophosphorylierung des SERCA-Proteins, wobei das  $\text{Ca}^{2+}$  im Inneren des Proteins nun eingeschlossen ist. Es entsteht ein energiereiches Intermediat. Die sich anschließende Konformationsänderung stellt den geschwindigkeitsbestimmen-

den Schritt dar und entlässt die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen in das Lumen des SR. Es kommt daraufhin zur Hydrolyse des phosphorylierten Aspartatrestes. Die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase kann nun wieder ATP binden und steht für den nächsten Zyklus zur Verfügung<sup>38</sup>.

## 1.5 Ren2-TG

Aus der Erkenntnis heraus, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Hypertonie entscheidend ist, entstand die Hypothese, durch eine induzierte Aktivierung bzw. Heraufregulation dieses Systems ein Tiermodell der Hypertonie zu entwickeln. Wie oben erwähnt war mit der Klonierung des Renin-Gens der Maus der Grundstein für ein hypertensives transgenes Rattenmodell gelegt<sup>15</sup>. Des Weiteren war es 1981 durch die Arbeiten von Ruddle und seinen Mitarbeitern zum ersten Mal gelungen, DNA langfristig in ein Genom zu integrieren. Diese zusätzliche DNA wurde vererbt. Der erste transgene Tierstamm war entstanden<sup>39</sup>. Durch Mikroinjektion eines genomischen Konstrukts des Ren-2 Gens der Maus in Oocyten normotensiver Ratten gelang es den ersten transgenen Rattenstamm der Hypertonieforschung zu entwickeln<sup>15</sup>. Manche Mäuse besitzen ein Reningen, genannt Ren-1<sup>c</sup>, wobei andere Mäuse zwei verschiedene Reningene besitzen: genannt Ren-1<sup>d</sup> und Ren-2<sup>d</sup>. Diese Gene unterscheiden sich in ihrer gewebsspezifischen Expression. Erstaunlicherweise entwickeln Mäuse, denen man das Ren-2<sup>d</sup>-Gen in ein Ren-1<sup>c</sup>-Hintergrund integriert, keine Hypertonie. Integriert man dieses Ren-2<sup>d</sup>-Gen in das Rattengenom, entwickeln diese Ratten einen arteriellen Hypertonus<sup>15,40,41</sup>.

Während homozygote Ren2-TG Ratten systolische Blutdruckwerte bis zu 300 mmHg entwickeln und ohne antihypertensive Therapie eine hohe Mortalität aufweisen, entwickeln heterozygote Ratten ab der fünften Lebenswoche hypertone Werte und erreichen in der zehnten Lebenswoche Werte bis zu 240 mmHg<sup>42</sup>. Normalerweise liegt die höchste Expressionsrate des Reningens in der Niere vor. Bei diesem transgenen Rattenmodell waren die Expressionsraten in der Niere niedriger. Die höchsten Renin-Expressionswerte lagen in der Nebenniere vor. Man führt die Herunterregulation auf einen negativen Feedback-Mechanismus durch die hohen Spiegel in der Nebenniere zurück<sup>43</sup>. Die Plasmaspiegel für Renin, Angiotensin I, Angiotensin II und Angiotensinogen entsprechen denen normotensiver Ratten oder sind niedriger<sup>42,44</sup>. Die Komponen-

ten des RAAS, die in diesem Modell im Plasma erhöht sind, sind das Prorenin und in den ersten Wochen auch das Mineralokortikoid Aldosteron<sup>15</sup>. Untersuchungen der kardialen Genexpression fanden erhöhte Renin-mRNA-Spiegel<sup>45</sup>. Die pro-Renin-Spiegel im Blutplasma sind erhöht. Das Gewebe-RAAS scheint hier eine entscheidende Rolle zu spielen und weniger das sogenannte zirkulierende RAAS.

Die Herzen dieser hypertensiven Ratten zeigen eine Hypertrophie des Herzens mit vermehrter Fibrose auf. Letztere ist nicht nur auf den arteriellen Hypertonus, sondern auch auf davon unabhängige Effekte des RAAS zurückzuführen<sup>46</sup>. Für eine vom Blutdruck unabhängige Rolle spricht die viel stärkere kardiale Dysfunktion der Ren2-TG im Vergleich zu den spontan hypertensiven Ratten (SHR), die ähnlich hohe Blutdruckwerte aufweisen<sup>47</sup>. So führen ACE-Hemmer in geringer Dosierung zu einer Regression der Hypertrophie bei nur geringer Blutdrucksenkung, wobei andere Antihypertensiva auch bei stärkerer Blutdrucksenkung nicht zu diesen kardioprotektiven Effekten führen<sup>42,48</sup>.

In der Arbeit von Zolk et al. konnte in Herzen von Ren2-TG eine reduzierte Phospholamban- und SERCA2a- Expression nachgewiesen werden. Diese führt zusammen mit einer Herunterregulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskaden zu einer verminderten cAMP-vermittelten Phosphorylierung des SERCA2a-Modulatorproteins Phospholamban und damit zu einer stärkeren Hemmung des SERCA2a-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportes<sup>49</sup>. Das ging nicht nur mit einer verminderten SERCA2a-Proteinexpression einher, sondern auch mit einer Erhöhung der Proteinspiegel des sarkolemmalen NCX. In diesen Ratten kommt es zu einer diastolischen Dysfunktion, die mit einer gestörten  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase einhergeht. Durch die Gabe von Eprosartan, einem  $\text{AT}_1$ -Rezeptor-Antagonisten, verbessert sich die diastolische Dysfunktion durch Normalisierung der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Kardiomyozyten unabhängig von den durch  $\text{AT}_1$ -Blockade vermittelten Effekten auf den Blutdruck und die kardiale Fibrose<sup>50</sup>.

An Ren2-TG erhobene Befunde weisen auf eine gestörte kardiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase hin, welche an einer linksventrikulären Dysfunktion beteiligt ist. Anzumerken ist allerdings, dass die bei Ren2-TG nachgewiesenen Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in der Literatur nicht einheitlich beschrieben sind. Zobel et.al konnten entgegen ihren eigenen Erwartungen keinen Unterschied der SERCA2a-Aktivität bei Ren2-TG im Vergleich zur Kontrollgruppe normotensiver Sprague-Dawley Ratten nachweisen<sup>51</sup>.



1997 konnte zum ersten Mal ein SERCA2-transgenes Tiermodell erzeugt werden. Es wurde das SERCA2a-Gen der Ratte in das Mausgenom der Linie CJ5 integriert. Die Arbeitsgruppe um Dillmann zeigte, dass bei SERCA2-heterozygot-transgenen Mäusen im Vergleich zur nicht transgenen Kontrollgruppe die SERCA2a-mRNA-Spiegel um das 2,6-fache und die Proteinspiegel um das 1,2-fache erhöht sind. Dieses ging mit verstärkten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten, einer verbesserten Kontraktilität und Relaxation einher. Die Expression des Transgens wurde durch den humanen Cytomegalovirus immediate early enhancer (hCMV-enhancer) geleitet. Dieser wiederum ist an den beta-Actin Promoter des Huhns (cBA) gekoppelt. Auf diese Sequenzen folgt die SERCA2-cDNA. Das mRNA-Transkript des Transgens besteht demzufolge aus dem ersten Exon des beta-Actin des Huhns, welches transkribiert aber nicht translatiert wird, und den SERCA2a-Exons. Das Intron des beta-Actins des Huhns und die zwei SERCA2a-Introns wurden in das Transgen integriert, da die Inklusion von Introns in Transgenen deren Expression erhöht. Im Gegensatz zur Mauslinie CJ5 wies die Mauslinie CJ2 allerdings nur 1,5-fache Erhöhungen der SERCA2a-mRNA auf und wurde unter anderem aus diesem Grund nicht in weitere Untersuchungen einbezogen.

In der CJ5-Linie wurden 20%-ige Erhöhungen des SERCA2a-Proteins beobachtet. Es kam zu einer um 43% erhöhten PLN Expression und zu einer um 83% erhöhten NCX Expression<sup>52</sup>. Vetter et al. entwickelten mit Hilfe dieses in der Maus approbierten SERCA2a-Konstrukts die erste CMV-enhancer-SERCA2-transgene Ratte.

Die 6.3-kb SERCA2a-Expressions-Einheit wurde für die pronukleäre Mikroinjektion in fertilen Eizellen von Sprague-Dawley-Ratten verwendet, um transgene Ratten zu erhalten. In allen vier Herzkammern fand man erhöhte SERCA2a-mRNA-Spiegel. Des Weiteren war die Expressionsrate auch in anderen Muskelgeweben wie beispielsweise im Skelettmuskel, im Zwerchfell und der Speiseröhre erhöht. Die SERCA2a-mRNA Spiegel des linken Ventrikels SERCA2-heterozygoter transgener Ratten waren statistisch signifikant um das 1,5-fache erhöht. Die Proteinspiegel waren um 26% erhöht<sup>53</sup>. Die beneficialen Effekte des SERCA2-Transgens auf die kardiale Funktion bei Ratten konnten bisher sowohl bei Hypothyreose als auch bei Diabetes Mellitus gezeigt werden<sup>54,55</sup>.

## 1.6 Geschlechtsspezifische Unterschiede kardiovaskulärer Pathologien

Nicht nur bezüglich der Inzidenz und Prävalenz der Hypertonie wie auch der Herzinsuffizienz bestehen Unterschiede zwischen den Geschlechtern, sondern auch bezüglich der Ausprägung der Endorganschäden und Formen der Herzinsuffizienz. Beispielsweise entwickeln Frauen mit Aortenklappenstenose bei gleicher mechanischer Belastung eine gering gradigere Herzinsuffizienz als Männer<sup>56,57</sup>.

Trotz der hohen Prävalenz der diastolischen Dysfunktion in der weiblichen Bevölkerung, wird dieser Form der Herzinsuffizienz weniger Aufmerksamkeit zuteil als der bei Männern mittleren Alters vorherrschenden systolischen Dysfunktion<sup>58</sup>. Derzeit existieren nur wenige Arbeiten, die die zellulären Mechanismen der Herzinsuffizienz im Geschlechtervergleich herausgearbeitet haben. Aus Arbeiten an Herzen herzinsuffizienter Patienten, die nach der Explantation vor einer Herztransplantation untersucht wurden sowie deren Spenderherzen geht hervor, dass sowohl bei Frauen als auch bei Männern die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Vergleich zu Gesunden beeinträchtigt ist. Auf molekularer Ebene konnten Unterschiede im Grad der Phosphorylierung des Phospholambans (PLN) nachgewiesen werden. In beiden Gruppen kam es zu einer reduzierten SERCA2a-Proteinexpression, die wiederum mit einer verminderten  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR einherging<sup>59</sup>.

## 1.7 Gentechnische Beeinflussung kardialer Pathologien

Durch die fortschreitenden Kenntnisse über die Physiologie des Herzens und die Regulation der in Signalkaskaden, bei der Aktionspotentialgenerierung und der Kontraktion und Relaxation beteiligten Proteine bei tierexperimenteller aber auch humaner Herzinsuffizienz, haben sich in den letzten Jahren drei große Angriffspunkte zur gentechnischen Beeinflussung herauskristallisiert: die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade, die kardialen Ionenkanäle und die bei der elektro-mechanischen Kopplung beteiligten Proteine.

Diese Veränderungen können zu einer Hochregulation aber auch zu einer Herunterregulation der Expression eines entsprechenden Proteins führen. In Zellen insuffizienter Herzen konnte ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Leck aus dem SR nachgewiesen werden, welches auf eine

verminderte Interaktion zwischen dem Ryanodinrezeptor und dem FK-506 bindenden Protein FKBP12.6 zurückgeführt wird<sup>60</sup>. Durch eine Überexpression des FKBP12.6 mittels eines adenoviralen Vektors kam es zu einer stärkeren Kontraktion isolierter Myozyten und erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transienten<sup>61</sup>. Die Frage, ob diese auf den ersten Blick günstigen Effekte auch im Hinblick auf den Langzeitverlauf und potentielle Nebenwirkungen wie die Entwicklung von Arrhythmien Bestand haben, ist derzeit nicht zu beantworten.

Nachdem 1994 durch die Arbeiten von Milano eine verbesserte kardiale Funktion  $\beta_2$ -transgener Mäuse festgestellt wurde, konnte acht Jahre später durch virale Vektoren eine verbesserte Regeneration ischämisch geschädigter Herzen gezeigt werden<sup>62,63</sup>. Auf welchem schmalen Grat man sich bei dieser Überexpression bewegt, zeigt die Arbeit von Liggett, der in einem viel höheren Maße das Gen des  $\beta$ -adrenergen Rezeptors in Mäusen exprimieren ließ. Diese Überexpression führte gehäuft zur Herzinsuffizienz<sup>64</sup>. Bei einer Überexpression des SERCA2a-Gens, sei es als Transgen oder mit Hilfe viraler Vektoren, würde man einen gesteigerten bathmotropen wie auch einen gesteigerten lusitropen Effekt erwarten. So konnte nach viralem Transfer nicht nur eine erhöhte SERCA2a-Aktivität nachgewiesen werden, sondern sowohl eine Erhöhung des aus dem SR freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  als auch wie eine Relaxationsbeschleunigung und eine damit einhergehende Verringerung des diastolischen Kalziumgehalts beobachtet werden<sup>65,66</sup>. Die erste Phase-II-Studie, welche eine sichere SERCA2-Gentherapie bei Patienten mit fortgeschrittener Herzinsuffizienz aufzeigte, wurde 2011 abgeschlossen<sup>67</sup>. Einem anderen Ansatz sind Suckau et al. gefolgt. Sie konnten an einem Tiermodell der Herzinsuffizienz die benefitäten Effekte auf die kardiale Funktion mittels Herunterregulierung der Genexpression des SERCA2-Inhibitors PLN aufzeigen<sup>68</sup>.

## 1.8 Zielsetzung der Arbeit

Zwei bis drei Prozent der Bevölkerung leiden an chronischer Herzinsuffizienz. Die Hälfte der Patienten stirbt innerhalb der ersten vier Jahre nach Diagnosestellung. In der überwiegenden Zahl der Fälle führen koronare Herzkrankheit und/oder arterielle Hypertonie zur chronischen Herzinsuffizienz. Die arterielle Hypertonie stellt mit einer Prävalenz von 20% ein häufiges Krankheitsbild dar. Störungen der kardiomyozytären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase spielen bei der durch die arterielle Hypertonie bedingten Drucküberlasthypertrophie und der sich daraus entwickelnden Herzinsuffizienz eine zentrale Rolle. An der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation der Herzmuskelzelle ist maßgeblich die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) beteiligt, welches die zentrale Organelle für die Speicherung und Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  in der Herzmuskelzelle ist. Eine reduzierte bzw. ungenügend angepasste SERCA2a-Expression und/oder ein unzureichender SERCA2a-katalysierter Rücktransport von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol in das Lumen des SR sind funktionell bedeutsam für die Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz. Daher scheinen Interventionen zur Verbesserung der SERCA2a-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des SR geeignet zu sein, wichtige Prozesse wie Kontraktilität, Relaxation, elektromechanische Koppelung und Genregulation in chronisch drucküberlasteten Herzen langfristig positiv zu beeinflussen<sup>69,70</sup>. Potentiell präventive und therapeutische Ansätze in die gestörte kardiale  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase bei sich entwickelnder bzw. terminaler Herzinsuffizienz einzugreifen, sind bisher nicht hinreichend erforscht.

Deshalb war es Ziel dieser experimentellen Arbeit zu untersuchen, ob die zusätzliche kardiale Expression eines SERCA2-Transgens in hypertensiven, Renin-transgenen Ratten Einfluss auf die linksventrikuläre Hypertrophie, die kardiale Expression von Hypertrophie-Biomarkern sowie die Expression und Funktion des SERCA2/Phospholamban-Systems des SR hat. Entsprechend wurden vergleichende Untersuchungen an linksventrikulären Herzmuskelproben von 30 bis 34 Wochen alten männlichen heterozygoten Renin-transgenen Ratten (Ren2-TG) und entsprechenden Proben doppelt transgener SERCA2/Ren2-Tiere (SERen-dTG) durchgeführt. Als Kontrollgruppe dienten linksventrikuläre Proben von normotensiven nicht-transgenen Ratten gleichen Alters und Geschlechts. Um zusätzliche Daten zu möglichen geschlechtsspezifischen Einflüssen in den untersuchten Tiermodellen zu gewinnen, wurden ausgewählte Untersuchun-

gen auch an linksventrikulären Proben von gleichaltrigen weiblichen Ren2-TG und SE-Ren-dTG vorgenommen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Gewebeproben

Die Untersuchungen wurden an asservierten und bei -80 °C bzw. -20 °C gelagerten Gewebeproben (Herz und Schwanzspitze) durchgeführt. Diese Proben stammten aus früheren Versuchsvorhaben der Arbeitsgruppe. Bei Entnahme waren die Tiere 30 bis 34 Wochen alt. Die Ratten wurden im Tierhaus der Charité Berlin, Campus Benjamin Franklin, gehalten. Es wurden vom Landesamt für Landesschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin die Versuche (T0066-98,00139/05) genehmigt. Die Tiere erhielten eine Standardrattendiät Altromin C1000 (Fa. Altromin, Lage/ Lippe, Deutschland) sowie Wasser ad libitum und wurden in Käfigen aus Makrolon (Maße 590 x 380 mm, 200 mm Höhe, einem Standarddeckel von EBECO) gehalten. In den klimatisierten Räumen mit künstlichem Tag-Nacht-Beleuchtungszyklus (Licht von 9-21 Uhr) und relativer Luftfeuchtigkeit von 25% betrug die Raumtemperatur 20 °C. Die Hypertonie der homozygoten Ren2-TG-Zuchtböcke wurde mit ACE-Hemmern (Ramipril 3,5 µg/Liter ) behandelt. Die Entnahme der Gewebeproben erfolgte an narkotisierten Tieren.

### 2.2 In vitro Methoden zur Genotypisierung

Die Genotypisierung erfolgte in vier Schritten: Isolierung der DNA aus Rattenschwanzbiopsien, Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Photometrie und im Anschluss erfolgten PCR und Gelelektrophorese. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte erläutert.

#### 2.2.1 Genomische DNA-Isolierung

Um genomische DNA aus eukaryontischen Zellen des Rattenschwanzbiopsats zu gewinnen, erfolgte die Trennung der Nukleinsäuren von den Proteinen durch die Ausfällung eines unlöslichen DNA-Niederschlags. Die Ausfällung der DNA erreicht man durch die Präsenz monovalenter Kationen und einer Alkohollösung. Das entsprechende DNA-Pellet wurde im Anschluß durch Zentrifugation gewonnen. Im Einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: Die Rattenschwanzspitzen wurden über Nacht mit 700 µl Lysepuffer (400 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2% SDS und 20 mM Tris pH 8,0) und 35 µl Proteinase K- Lö-

sung 10 mg/ml (Boehringer, Mannheim) bei 55 °C inkubiert. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) bindet als Chelatkomplex di- und höhervalente Kationen. Hierdurch werden divalente Kationen-abhängige Enzyme wie DNasen inaktiviert. Das ionische Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert Proteine. Mit einer Spaltspezifität C-terminal von hydrophoben, aliphatischen und aromatischen Aminosäuren werden Proteine mittels der zugesetzten Proteinase K bei langer Inkubationszeit bis hin zu freien Aminosäuren gespalten. Zum oben genannten Ansatz mit verdauten Proteinen wurden 500 µl Phenol/Chloroform hinzugegeben, die Lösung wurde mehrfach über Kopf geschüttelt, anschließend bei 4 °C und 13.000 rpm (Biofuge fresco Rotor #3328, Fa. Heraeus Instruments) 25 Minuten lang zentrifugiert.

Phenol inaktiviert die Proteinase K und denaturiert die restlichen Proteine. Auch Chloroform hat eine denaturierende Wirkung auf Proteine, stabilisiert aber auch die instabile Phasengrenze zwischen der Phenolphase und der Nukleinsäure-Lösung. Der resultierende DNA-Überstand wurde entnommen und mit 700 µl Isopropanol (-20 °C) und 70 µl Natriumacetat 3 M pH 7,0 vermischt. Dieses Gemisch wurde eine Stunde lang bei – 20 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 15 min lang bei 4 °C und 10.000 rpm (Biofuge fresco Rotor #3328, Fa. Heraeus Instruments) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig mit Vakuum abgesaugt und 500 µl eiskaltes 70%iges Ethanol zum Pellet pipettiert. Nach einer weiteren Zentrifugation bei 4 °C und 13000 rpm wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet luftgetrocknet. Da wasserlösliche Substanzen im Überstand gelöst bleiben, findet neben der Konzentrierung eine Reinigung statt. Die nun isolierte, gereinigt vorliegende DNA wurde in 50 µl TE-Puffer (10mM Tris/HCl, 1mM EDTA, pH 7,6) gelöst und bei 4 °C gelagert.

### **2.2.2 Bestimmung der DNA-Konzentration**

Für die Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der Nukleinsäuren bei 260 nm in einer Quarzküvette (UV-VIS Spektrophotometer UV-1202, Fa. Shimadzu) gemessen. Eine 50µg/mL doppelsträngige DNA enthaltende Lösung weist bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke eine optische Dichte (OD) von 1 auf.

Dieser Wert und die gemessene optische Dichte der Proben wurde für die DNA-Konzentrationsbestimmung herangezogen. Da Proteine ein OD-Maximum von 280 nm

haben, ist der OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub>-Quotient ein Maß für die Reinheit der DNA-Lösung. Für die photometrische Messung bei 260 und 280 nm wurde die DNA-Probe 1:50 in TE-Puffer verdünnt. Für die Berechnung der DNA-Konzentration wurde folgende Formel verwendet:

$$c [\mu\text{g/ml}] = \text{OD} \times V \times F$$

(F: Multiplikationsfaktor für dsDNA:50, V: Verdünnungsfaktor, OD : Absorption bei 260 nm, c: Konzentration der Ausgangslösung).

### 2.2.3 PCR

Für die PCR-Ansätze wurden die DNA-Proben verwendet, welche 5 µg DNA enthielten. Abhängig von der jeweiligen DNA-Konzentration wurden 2 µl bis 5 µl DNA-Lösung auf 100 µl mit Aqua dest. verdünnt, sodass sich eine DNA Konzentration von 50 ng/µl ergab. Von o.g. Lösung wurden 25 µl für einen PCR-Ansatz eingesetzt.

Darüber hinaus enthielt ein PCR-Ansatz die Positiv-Kontrolle, ein weiterer die Negativ-Kontrolle. Für die PCR wurden Puffer, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Sense-Primer, Antisense-Primer und die Taq- Polymerase verwendet. Abb. 2.1 zeigt die Primersequenzen.



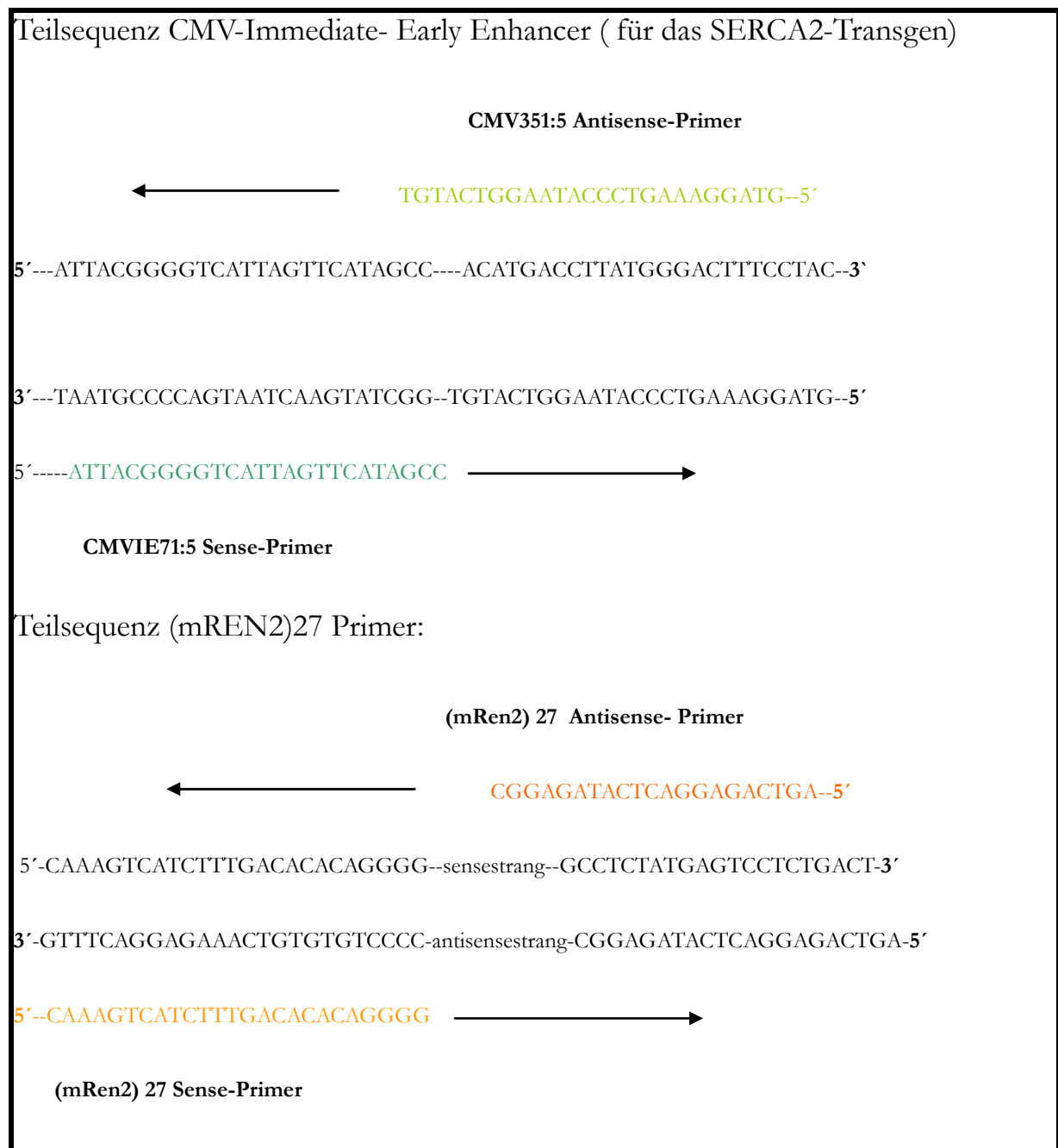


Abb. 2.1: **Primersequenzen für den Nachweis des SERCA2-Transgens und des murinen Renin-Transgen.**

Die Abbildung zeigt die Sequenzen des Sense und Antisense Primer des zu amplifizierenden Abschnitts (Teilsequenz des humanen CMV-Immediate Early Enhancer zwischen den Basenpaaren 119 und 422 auf dem SERCA2-Transgen) sowie die Sequenzen des Sense und Antisense Primer des zu amplifizierenden Abschnitts des Renin-Transgens (mREN2)27.

Jeder PCR- Ansatz enthielt:

Komponenten	µl pro Ansatz
10x Puffer (160 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; 0,1% Tween 20, 670 mM Tris-HCl, pH 8,8 bei 25°C)	2,500
dNTPs (je 10 mM dATP, dTTP, dCTp, dGTP)	0,250
50 mM MgCl <sub>2</sub>	0,750
10 µM Primer Sense	0,625
10 µM Primer Antisense	0,625
Taq Polymerase ( 5U/µl)	0,100
Aqua dest.	20,100
DNA	1,000
Gesamtvolumen	50,000

Ein Zyklus lief folgendermaßen ab.

Vordenaturierung	94 °C	2 min
Denaturierung	95 °C	30 sec
Annealing: SERCA2a/mREN2-Primer	63,5/60 °C	1 min
Elongation	72 °C	30 sec.

Die Annealingtemperatur richtet sich nach dem Primer, daher wurden bei den verschiedenen Primern unterschiedliche Temperaturen verwendet. Die terminale Elongation dauerte 6 min bei 72 °C. Nach Beendigung der PCR wurden die Proben bis zur Elektrophorese bei 4 °C gelagert.

Denaturierung, Annealing sowie die Elongation werden als ein Zyklus betrachtet. Pro Zyklus wird die Anzahl an DNA-Molekülen um das 1,6 bis 1,7-fache erhöht.

#### 2.2.4 DNA-Elektrophorese

Für die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurde ein 1,5%-iges Mini-Agarosegel benutzt. Für die Herstellung wurden 0,75 g Agarose, 50 ml 1x TAE- Puffer (40 mM Tris; 0,11% v/v Eisessig; 1mM EDTA; pH 8,0) gelöst. Zur vollständigen Lösung der Agarosepartikel wurde die Lösung 3x 1 min bei 600 Watt in einer Mikrowelle (Micromat; Fa. AEG, Frankfurt) erhitzt. Nach Abkühlung der Lösung auf ca. 60 °C wurden 2,5 µl Ethidiumbromid zur Lösung hinzugefügt und in den 6-8 mm dicken Gelschlit-

ten der Elektrophoresekammer (BIO-RAD Mini Sub Cell GT, Hercules California, USA) gegossen. Das Ethidiumbromid lagert sich als Interkalator zwischen die Basen der doppelsträngigen DNA. Der entstehende Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex emittiert nach UV-Anregung rot-oranges Licht. Die DNA erscheint als leuchtende Bande. Hierdurch ist eine Detektion von bis zu 5 ng doppelsträngiger DNA (dsDNA) möglich. Im Gelstand wurde das Gel gegossen, in die Kammer (BIO-RAD Mini Sub Cell GT, Hercules California, USA) eingesetzt. Durch Einsetzen des Kammes (12 zahnig, 1 mm) hatte das nun feste Gel 12 Taschen für je 40 µl Volumen, welche dann mit TAE-Puffer gefüllt wurden. Zu 25 µl DNA-Probe aus der PCR wurden 5 µl 6x TE- DNA- Ladepuffer (60 mM Tris- HCl, 6mM EDTA, pH 7,4; 40% w/v Saccharose; 0,25 % w/v Bromphenolblau) pipettiert. Aus der erhaltenen Lösung wurden je 10 µl in eine Geltasche pipettiert. Je eine Geltasche eines Gels enthielt außerdem 4 µl 100bp DNA- Leiter, 8 µl Plasmid DNA, 10 µl der positiven Kontrolle und 10 µl der negativen Kontrolle. Die elektrophoretische DNA-Auftrennung erfolgte in 5 min bei 55 Volt und anschließend 45 min bei 75 Volt.

## **2.3 SR Ca<sup>2+</sup>-Transportaktivitätsmessung**

### **2.3.1 Membranpräparation**

Die Membranfragmente wurden bei 4 °C aus 50-100 mg pulverisiertem ventrikulärem Gewebe isoliert. Die Homogenisierung erfolgte drei Mal für je 10 s bei 21.000 U/min in 1,5 ml hypertonem Homogenisationspuffer (0,75 M KCl, 1 mM EDTA, 0,2 mM Dithiothreitol (DTT), 15 mM NaF, 0,1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 5 mM Histidine-HCl pH 7,4) mittels eines Brinkmann Polytron PT 3000 Homogenisators (Kinematica, Littau/Luzern, Schweiz). Das Homogenat wurde 20 min bei 2 °C und 150.000 g (Beckmann OPTIMA Ultracentrifuge, Rotor TI 100.3) zentrifugiert. Das Pellet wurde rehomogenisiert und wie vorher zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde anschließend in einem Glas-Teflon-Potter in hypotoner Lösung (10 mM Histidin pH 7,4 und 0,1 mM PMSF) homogenisiert und erneut wie vorher zentrifugiert. Das Pellet wurde in 250 mM Sucrose und 10 mM Histidine-HCl resuspendiert und bei -80 °C gelagert. Die Probenkonzentration betrug 3-6 mg/ml.

### 2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Lowry Methode. Je 0,1 ml der Membranpräparate wurden zusammen mit je 0,1 ml 2 N NaOH bei 100 °C 10 min lang hydrolisiert und dann weitere 10 min lang bei Raumtemperatur gekühlt. Zu den 0,2 ml wurde 1 ml sogenanntes Complex-Forming-Reagent Gemisch pipettiert. Dieses wurde frisch angesetzt, indem man 2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1% (w/v) CuSO<sub>4</sub> und 2% Na-K-Tartrat im Volumenverhältnis 100:1:1 mischte. Dann wurde 0,1 ml Folin-Reagenz(Fa.) hinzu pipettiert, alles durchmischt und 40 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. 230 µl jeder Probe wurden pro Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte (Mikroplattenreader iMark, Fa. Bio-Rad) pipettiert und die Extinktion bei 750 nm gemessen. Die Eichkurve wurde mittels Reihenverdünnung einer Rinderserumalbumin-Eichlösung (0,125-3 mg Protein/ml) ermittelt. Anhand der Eichkurve und der gemessenen Extinktionswerte der Proben wurde die entsprechende Proteinkonzentration ermittelt.

### 2.3.3 Oxalat-stimulierter Ca<sup>2+</sup>-Transport

Die Messung des SERCA2a-katalysierten, oxalat-stimulierten <sup>45</sup>Ca<sup>2+</sup>-Transports in Membranpräparaten erfolgte mittels der sogenannten Millipore-Vakuumfiltrationsmethode unter Nutzung radioaktiv-markiertem <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> wie unter Vetter et al. im Detail beschrieben<sup>71</sup>. Das Reaktionsmedium (250 µl) setzte sich wie folgt zusammen: 40 mM Imidazol (pH 7,0), 100 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM Tris-ATP, 6 mM Phosphokreatinin, 10 mM NaN<sub>3</sub>, 0,2 mM EGTA, 0,25 mM <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub>, 10 mM K-Oxalat mit oder ohne 20 µM Ruthenium Rot. Dieses Gemisch wurde 2 min bei 37 °C inkubiert. Durch die Zugabe von 10 µl Membransuspension (3 mg Protein/ml) zum Reaktionsmedium wurde die Reaktion gestartet. Nach 1 und 3 min wurde die Reaktion durch Vakuumfiltration von je 75 µl Reaktionsgemisch beendet. Durch die Vakuumfiltration wird das Reaktionsmedium von den Membranvesikeln getrennt, die auf den Membranfiltern (ME 25 Membranfilter, Zellulosemischester, 0,45 µm Porengröße, Fa. Whatman GmbH) verbleiben. Zur Entfernung von extravasikulär befindlichen <sup>45</sup>CaCl<sub>2</sub> wurden die Filter sofort zweimal mit 3 ml eiskalter Stöplösung (100 mM KCl, 2 mM EGTA, 40 mM Imidazol pH 7,0) gewaschen. Die Filter wurden mit einer Flachpinzette in Szintillatortröhrchen gegeben und bei 60 °C eine Stunde getrocknet. Anschließend wurden 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Liquid Scintillator Irgasafe Plus, Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) zuge-

geben, verschlossen und die Radioaktivität der Proben in einem Flüssigkeits-Szintillationszähler (TRI-CARB 2200 CA, Fa. Packard BioScience GmbH, Dreieich) gemessen. Um die spezifische  $^{45}\text{Ca}$ -Radioaktivität zu ermitteln, wurde die totale  $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Radioaktivität in 5  $\mu\text{l}$  Reaktionsgemisch zusätzlich 3-fach gemessen.

## 2.4 Genexpressionsanalyse

### 2.4.1 RNA-Isolierung

Aus circa 100 mg in  $\text{N}_2$  schockgefrorenen und bei  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  gelagerten Gewebeproben des linken Ventrikels wurde die RNA mit der sogenannten Einschrittmethode nach Chomczynski und Sacchi isoliert<sup>72</sup>. Dazu wurde die monophasische Lösung TRIzol (Fa. InVitrogen, Karlsruhe) benutzt. Diese Lösung besteht aus Chloroform und Phenol im Verhältnis 1:1 und Guanidinisothiocyanat (GTC). Letzteres ist ein chaotropes Salz, welches Proteine denaturiert und daher auch RNAsen inaktiviert. Es entstehen zwei Phasen. Durch das im TRIzol enthaltene Phenol und Chloroform entsteht eine Proteine und Lipide enthaltende untere Phase und eine obere die RNA enthaltende wässrige Phase. Die größeren DNA-Fragmente sammeln sich nach der Zentrifugation in der nun entstandenen Interphase. Für das Homogenisieren wurden in einem sterilen Polypropylen-Röhrchen (Durchmesser 18 mm, Länge 95 mm; Fa. Greiner) die Proben in 1 ml TRIzol mit dem Polytron-Homogenisator (Polytron PT 10/35 mit Schaft PT-DA 3007/2; Fa. Kinematica AG, Littau-Luzern, Schweiz) homogenisiert. Es wurde 3 x 30 sec bei ca. 19.000 U/min homogenisiert. Zwischen den einzelnen Homogenisationsschritten wurden die Proben 30 sec auf Eis gestellt.

Die fertigen Proben wurden in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und zwecks Phasentrennung kurz auf Eis gestellt. Um eine vollständige Lyse der Proben zu erreichen, wurde anschließend 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde pro Röhrchen 0,2 ml Chloroform (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) hinzugegeben. Nach kurzer Durchmischung wurden die Proben 15 min bei 12.000 U/min bei  $4\text{ }^\circ\text{C}$  zentrifugiert (Bio fuge Rotor #3328, Fa. Heraeus Instruments). Die obere wässrige RNA-haltige Phase wurde abpipettiert und in ein neues 2 ml Eppendorf-Gefäß überführt. In dieses Röhrchen wurden je 0,5 ml eiskaltes ( $-20\text{ }^\circ\text{C}$ ) Isopropanol pipettiert. Nach kurzem Durchmischen wurden die Proben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluß erneut 10 min

bei 120.000 U/min und 4 °C zentrifugiert, um das Pellet der ausgefallenen RNA zu gewinnen.

Der resultierende Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1,5 ml eiskaltem (-20 °C) 75% Ethanol gewaschen. Es wurde bei 12000 U/min bei 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, und die Eppendorffgefäße anschließend zum Trocknen für ca. 10 min bei Raumtemperatur offen stehen gelassen. Das Pellet wurde in 40 µl Aqua dest. aufgenommen. Um eine vollständige Lösung der RNA zu erreichen wurden die Röhrchen danach für 10 min bei 55° C inkubiert und im Anschluss kurz auf Eis gestellt. Die RNA-Proben wurden bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Um die RNA-Konzentration zu messen, wurden 2 µl der RNA-Lösung 1:50 in H<sub>2</sub>O verdünnt. Die optische Dichte der verdünnten Lösung wurde spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 und 280 nm gegen einen H<sub>2</sub>O-Leerwert gemessen (UV-VIS Spektrophotometer UV 1202, Fa. Shimadzu, Duisburg, Deutschland).

Die Berechnung der RNA-Konzentration der Proben erfolgte mit Hilfe folgender Formel :  
$$\text{RNA } (\mu\text{g/ml}) = \text{OD}_{260} * 40 * \text{VF}$$
  
(OD 260: Extinktion bei 260 nm; VF: Verdünnungsfaktor; Multiplikationsfaktor 40: Die Extinktion einer RNA-Lösung mit 40 µg RNA/ml beträgt 1 (40 µg/ml entspricht einer Extinktion von 1)).

## **2.4.2 Qualitätsprüfung**

### **2.4.2.1 Gelelektrophorese**

Bei der Überprüfung der RNA-Qualität ist insbesondere auf eine mögliche Degradation der isolierten RNA zu achten. Diese erkennt man leicht nach elektrophoretischer Auftrennung der RNA in Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen in Form von sogenannten Abbaubanden. Hat keine Degradation der RNA stattgefunden, sieht man nach abgelaufener Elektrophorese nur Banden ribosomaler 18S und 28S RNA, welche den Hauptteil der zellulären RNA ausmachen. Alle anderen Bande sind in der Regel Abbaubanden. Prinzipiell wurde die Agarosegelelektrophorese wie unter 2.2.4 für die DNA-Elektrophorese beschrieben durchgeführt. Für die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurde ein 1%-iges Agarosegel verwendet, für dessen Herstellung 1,5 g Agarose,

108 ml Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltes autoklaviertes H<sub>2</sub>O, 15 ml 10x MOPS-Puffer und 27 ml Formaldehyd benutzt wurden. Der Probenpuffer enthielt 10x MOPS-Puffer, 37%-iges Formaldehyd und Formamid im Verhältnis 2:3:10. Hierin wurde die RNA im Verhältnis 1:5 verdünnt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 65 V für 4-6 Stunden.

#### **2.4.2.2 Mikrochip- Kapillarelektrophorese**

Zusätzlich wurde die RNA-Qualität mit Hilfe der Mikrochip-Kapillargelelektrophorese geprüft. Die Mikrochip-Kapillargelelektrophorese beruht auf demselben Prinzip wie die konventionelle Gelelektrophorese. Dieser Mikrochip enthält einen Verbund von Mikrokapillaren durch die während der Elektrophorese die RNA-Fragmente laufen. Durch die größere Oberfläche im Verhältnis zum Gelvolumen kann die bei der Elektrophorese entstandene Energie besser abgeführt werden. Daher können höhere Spannungen angelegt werden, wodurch sich die Laufzeit reduziert. Diese Chips werden an einen Rechner angeschlossenes Kapillar-Elektrophoresegerät gegeben, welches mittels Laser die farbstoffmarkierte RNA detektiert und auf Grund der Laufzeit die Größe berechnet. Das erhaltene Kapillarelektrophoreseprofil der Proben kann vom PC-Programm als Elektropherogramm dargestellt und mit der dazugehörigen Software bearbeitet werden, sodass auch das Bild eines konventionellen Agarose-Elektrophorese-Gels erhalten wurde. Für diese Untersuchungen wurden RNA LabChip und RNA 6000 Nano Assay und Agilent 2100 Bioanalyzer (Fa. Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA) benutzt. Proben und Reagenzien wurden in die Glaskanäle des Chips pipettiert. Grundsätzlich wurde mit den Materialien und nach den Angaben des RNA 6000 Nano Assay Protocol (Edition November 2003) gearbeitet.

#### **2.4.3 Reverse Transkription**

Das sogenannte „Umschreiben“ von RNA in DNA, also die Reverse Transkription, stellt den ersten der drei Schritte einer „Real-Time ReverseTranskriptase PCR“, auch als „quantitative RT-PCR“ bezeichnet, dar. Als cDNA bezeichnet man die zur RNA einer Zelle komplementäre DNA, die mittels eines Enzyms mit reverser Transkriptase-Aktivität synthetisiert wird. In dieser Arbeit wurde eine rekombinant hergestellte M-MuLV (Moloney Maus Leukämie Virus) Reverse Transkriptase verwendet. Der Vorteil dieses Enzyms im Gegensatz zur früher viel verwendeten AMV-reversen Transkriptase ist ihre

geringere RNase H-Aktivität. Da es hierdurch zu einem geringeren RNA-Abbau durch das M-MuLV-Enzym kommt, können bis zu 9 kb große RNA-Fragmente umgeschrieben werden. Die Reverse-Transkriptase Reaktion wurde mittels des sogenannten First Strand cDNA Synthesis Kit (Fa. Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Im einzelnen wurde wie folgt vorgegangen: 2 µg der gewonnenen und gereinigten RNA sowie 1 µl oligo (dT)-18 Primer (0,5 µg/µl) wurden mit DEPC-Wasser auf ein Endvolumen von 11 µl aufgefüllt. Die Proben wurden zunächst 5 min bei 70 °C inkubiert. Sodann wurden zu diesem Gemisch 4 µl 5x „Reaction buffer“, 1 µl RiboLock™ Ribonuklease Hemmer und 2 µl 10mM dNTP-Mix und 2µl M-MuLV (20µl/µl) Reverse Transkriptase pipettiert. Das Cyclerprogramm der PCR- Maschine für diese Proben sah folgendermaßen aus:

PCR-Maschinen (Cylcler) Programm:

Schritt 1: 25 °C 10 min

Schritt 2: 37 °C 1 Stunde

Schritt 3: 70 °C 10 min

Schritt 4: 4 °C 5 min.

Nach dem Umschreiben wurden die Proben sofort weiter verwendet oder bei -20 °C zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.4.4 Primer Design und Standardreihe**

Zur Quantifizierung der mRNA nach erfolgter quantitativer RT-PCR wurden zwei Methoden verwendet: sog. Standardreihen-Methode und die  $-Ct$ -Methode. Es mussten pro untersuchtes Gen fünf verschiedene Primer generiert werden. Zwei Primer dienen der Herstellung der Standardreihe. Diese mussten DNA-Fragmente per PCR produzieren, an die die nachfolgenden drei Primer binden konnten. Dementsprechend waren diese ersten DNA-Fragmente länger als die zu untersuchenden cDNA Abschnitte. Die letzteren drei Primer sind für die eigentliche RT<sup>2</sup>-PCR notwendig. Für die  $-Ct$ -Methode, die ohne Standardreihe auskommt, wurden nur diese drei Primer verwendet. Das Prinzip des Primereinsatzes bei quantitativer PCR wird im Folgenden beschrieben.



Ein Primer ist fluoreszenzmarkiert und liegt inmitten des zu amplifizierenden cDNA-Abschnitts. Dieser Primer wird als Sonde bezeichnet. Die anderen beiden Primer sind für die Amplifikation eben dieses cDNA-Abschnitts notwendig. Mit Hilfe der Suchmaschine der Seite <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/> wurde die entsprechende NM Nummer für das entsprechende Gen für Ratus norvegicus (z.B. Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase HPRT: NM\_012583) herausgesucht. Mit dem Programm BLAST, einem Vergleichsprogramm, wurden die Abschnitte auf dem gesamten Genom gesucht, die zur Gen-Sequenz komplementär sind. Mit Hilfe des PC-Programms „Primer Express“ unter der Option TaqMan Probe Primer Design, wurden die geeigneten Primer gesucht und von der Firma TIB-MOLBIOL (Berlin) bezogen. Die gewählten Primer erfüllten folgende Kriterien:

1. Schmelztemperatur von 58-60 °C
2. 15-30 Basenpaare lang
3. Guanodin- und Cytosinanteil zwischen 30% und 80 %
4. Vermeidung gleicher Basenabfolge. Vier hintereinander folgende Guaninbasen galten als unzulässig.
5. 3'-Ende enthielten die letzten fünf Basen weniger als drei Guanin und/oder Cytosinbasen.
6. Das Amplifikat überschreitet die Länge von 400 Basenpaaren nicht und lag in der Regel zwischen 50 und 150 Basenpaaren.
7. Es lagen mehr Cytosin-Basen als Guanodin-Basen vor.
8. Keine Guanodin-Base am 5'-Ende
9. Die Primer lagen auf Exon-Exon-Grenzen (Vermeidung der Amplifikation von DNA)

Die Sonde sollte folgende Kriterien erfüllen: 23-24 Basenpaare, mehr Cytosin als Guanodin-Basen, keine Guanodin-Base am 5'-Ende, nicht vier gleiche Basen hintereinander.

der, Schmelztemperatur sollte 10 °C höher sein als die der Primer. Die Primer sollten möglichst wenig Guanin-Basen enthalten, da diese mit dem Fluoreszenzsignal interferieren und es abschwächen. Diese Kriterien konnten bei allen Primern eingehalten werden.

Will man die RT<sup>2</sup>-PCR mit der Standardreihen-Methode auswerten, ist die Herstellung einer Standardreihe Voraussetzung.

Die von der Firma TIBMOLBIOL gelieferten Primer wurden direkt nach Lieferung auf eine Konzentration von 100 µM verdünnt. Da die Grundzüge der PCR schon im Abschnitt 2.2.3 erklärt wurden, soll hier nur das etwas modifizierte Vorgehen kurz dargestellt werden. Die vorverdünnten Primer wurden für den PCR-Ansatz in einem Verhältnis von 1:10 verdünnt, indem zu 2 µl Primerlösung 18 µl DEPC-Wasser hinzugefügt wurden. Ferner musste der dNTP-Mix hergestellt werden. Hierfür wurden je 10 µl der vier NTPs (100 mM) mit 360µl DEPC-Wasser verdünnt, um eine Endkonzentration von 2,5 mM zu erhalten.

Das 40 µl Endvolumen setzte sich wie folgt zusammen:

<u>Komponente</u>	<u>µl pro Ansatz</u>
Puffer	5,0
Primer F (10µM)	1,0
Primer R (10µM)	1,0
dNTP- Mix (2,5mM)	5,0
MgCl <sub>2</sub>	1,5
H <sub>2</sub> O	35,0
template cDNA	1,0
Taq-Polymerase	0,5

Nach einer kurzen Zentrifugation wurde die PCR gestartet. Der Cycler war wie folgt programmiert:

- Schritt 1: 95 °C 2 min
- Schritt 2: 95°C 30 sec
- Schritt 3: 65°C 30 sec

Pro Lauf (cycle) wurde die Temperatur um 0,5 K gesenkt.

Schritt 4: 72°C 40 sec.

Schritt 5: Schritt 2 bis 4 wurden 29 mal wiederholt.

Schritt 6: 94°C 30 sec

Schritt 7: 55°C 30 sec

Schritt 8: 72°C 40 sec.

Schritt 9: Schritt 6 bis 8 wurden 9 mal wiederholt.

Schritt 10: 72°C 3 min.

Danach wurden die Proben entweder direkt weiter verwendet oder bei -20 °C gelagert. Mittels des „QIA quick PCR Purification Kit“ (QIAGEN, Hilden, Deutschland) und anhand des entsprechenden Protokolls wurden die PCR Produkte aufgereinigt. Durch diesen Schritt erlangt man eine Trennung der 100 Basenpaare bis 10 Kilobasenpaare langen DNA-Fragmente von den anderen Komponenten des PCR-Ansatzes wie Primer, Nukleotiden, Polymerasen und Salzen, die potentiell mit der anschließenden RT<sup>2</sup>-PCR störend interferieren können. Das Prinzip basiert auf der hohen DNA-Bindung an Silica-Membranen in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze, die mittels der zugegebenen Puffer erreicht werden. Dieser Schritt ist stark pH abhängig mit einem pH-Optimum zwischen 7 und 8,5. Bei höherem pH-Wert sinkt die Ausbeute, da beispielsweise bei einem pH-Wert von 9 die Adsorption der DNA an die Silica-Membran auf unter 10 % des Wertes bei optimalem pH-Wert sinkt.

Bei der Isolierung amplifizierter DNA-Fragmente wurde folgendermaßen vorgegangen: Puffer PB (vom Hersteller) und PCR-Ansatzvolumen wurden im Volumenverhältnis 5:1 gemischt. Dieses Gemisch wurde auf eine sich in einem 2-ml-Röhrchen befindliche Spin-Column-Säule pipettiert und bei 13.000 rpm in einer Tischzentrifuge (Bio Fuge Rotor #3328, Fa. Heraeus Instruments) 30 bis 60 sec lang zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen, die DNA war an das Säulenmaterial gebunden. Die Säule wurde mit 0,75 ml PE (vom Hersteller so bezeichnet) gewaschen. Es wurde erneut bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Im Anschluß wurde die Säule in ein neues 1,5ml Röhrchen gestellt. Die DNA wurde sodann aus der Säule mittels 10 mM Tris-HCl, pH 8,5 eluiert. Der Elutionsschritt ist wie oben erwähnt pH-abhängig und bei pH 8,5 optimal. Mit den gereinigten DNA-Proben konnte durch entsprechende Verdünnung

die Standardreihe für die qRT-PCR hergestellt werden. Insgesamt wurden 8 Verdünnungen im Verhältnis von 1:10 vorgenommen.

#### **2.4.5 Quantitative RT-PCR**

Bei der in diesem Falle verwendeten quantitativen Real-Time-Reverse-Transkriptase-PCR (qRT-PCR) wird anhand der Messung einer bestimmten cDNA mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Primer auf die Konzentration der ihr korrespondierenden mRNA geschlossen<sup>73</sup>.

Die Quantifizierung besteht aus drei Schritten. Sie beginnt mit der unter 2.4.3 beschriebenen Reverse-Transkriptase-Reaktion, gefolgt von der Amplifizierung der erhaltenen cDNA und endet mit der Detektion und Quantifizierung der Produkte in Echtzeit (real time).

Die Amplifizierung der cDNA und die Detektion ihrer Produkte erfolgte in einem Ablauf im PCR-und Detektorsystem ABI Prism 7000 (Fa. Applied Biosystems).

Das Prinzip basiert auf einem ansteigenden Fluoreszenzsignal mit steigender Menge an PCR-Produkten. Ab einem bestimmten Fluoreszenzgrad hebt sich dieses Signal von der Hintergrundfluoreszenz ab. Der PCR Zyklus, an dem dieser Schwellenwert überschritten wird, bezeichnet man als „threshold cycle“ (Ct). Je mehr von der jeweiligen cDNA in der untersuchten Probe vorhanden ist, desto geringer ist der Ct-Wert. Um diesen Ct-Wert quantitativ interpretieren zu können, gilt es sowohl die Reaktionsbedingungen als auch die physiologischen bzw. pathologischen Charakteristika des Gewebes zu berücksichtigen. In dieser Arbeit wurden für die Quantifizierung von mRNA-Spiegeln folgende Auswertungsmethoden verwendet:

- - Ct-Methode
- Standardkurven- Methode<sup>74</sup>.

Beide Auswertungsmethoden werden unter 2.4.6 näher erläutert. Will man die Werte der einzelnen Gruppen mit ihren unterschiedlichen physiologischen Bedingungen miteinander vergleichen, so muss eine einheitliche Bezugsgröße gewählt werden. Die erhobenen Werte wurden zwecks Normierung in Bezug zur Expression eines sog. Hous-

ekeeping-Gen gesetzt. Für die Standardisierung werden möglichst mehrere konstant exprimierte Gene genutzt. Als Bezugsgröße wird oft die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. In diesen Untersuchungen konnte letztere nicht genutzt werden, da das GAPDH-Gen bei Hypertrophie und Herzinsuffizienz einer ausgeprägten Regulierung unterliegt.

Deshalb musste zuerst nach einem unter den gegebenen Versuchsbedingungen nachweislich in allen Versuchsgruppen konstant exprimierten Gen gesucht werden.

Im Einzelnen wurde bei der qRT-PCR folgendermaßen vorgegangen:

Ansatz:

Parameter:

- |                                |        |
|--------------------------------|--------|
| – Anzahl der Reaktionen        | 100    |
| – Reaktionsvolumen             | 25 µl  |
| – Konzentration Forward-Primer | 100 µM |
| – Konzentration Reverse-Primer | 100 µM |
| – Konzentration Sondestock     | 1 µM.  |

Für die qRT-PCR wurden Forward-Primer, Reverse-Primer und der Sondestock nochmals verdünnt auf:

- |  |        |
|--|--------|
| – finale Konzentration des Forward-Primers : | 500 nM |
| – finale Konzentration des Reverse-Primers:  | 500 nM |
| – finale Sondenkonzentration:                | 200nM  |

Zu jeder Probe jeweils eines Versuchstiers wurden drei Replikate angefertigt, sodass bei 100 Reaktionen pro qRT-PCR Lauf maximal 32 Proben und ein Wasserabgleich gemessen werden konnten.

Mastermix für einen Reaktionsansatz:

	Ansatz für 1 Probe	für 100 Proben
Reagenz	µl	µl
2x fach MM Puffer*	12,5	1250
Forward Primer	0,125	12,5
Reverse Primer	0,125	12,5
Sonde	0,05	5,0
Wasser (H <sub>2</sub> O)	11,2	1120
Gesamtvolumen:	24,00	2400

\*TaqMan 2x Universal PCR Mastermix der Fa. Applied Biosystems

Je 3 µl cDNA und 72 µl Mastermix wurden in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß gegeben. Diese 75 µl werden als Submastermix bezeichnet. Je 23 µl dieses Submastermixes wurden in je ein Well der 96-well Optical Reaction Plate (Fa. Applied Biosystems) pipettiert. Nachdem alle Proben pipettiert worden waren, wurde eine Schutzfolie auf die 96-Well-Platte angebracht und im Modus „quickrun“ kurz bei 200 rpm (Eppendorf Centrifuge 5810R Rotor A-4-81) zentrifugiert. Danach erfolgte die PCR mit gleichzeitiger Messung der Fluoreszenz des Reporters im Abi Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Bei diesen Versuchen wurden als Reporter 6-Carboxyfluorescein (FAM) und als Quencher 6-Carboxytetramethylrhodamin (TAMRA) verwendet .

Die Ergebnisauswertung erfolgte mit der ABI Prism 7000 SDS Software. Der Vorteil dieser Methode gegenüber der s.g. SYBRgreen-Methode ist ihre höhere Spezifität. Dieses als „TAQMAN-Methode“ bekannte Verfahren basiert auf der Erkennung von zwei Primern und einer spezifischen Sonde, so dass die Zahl falsch positiver Ergebnisse minimiert werden kann. Bei der SYBRgreen Methode wird auf die fluoreszenzmarkierte Sonde verzichtet, man benötigt also nur den Forward- und den Reverse-Primer. Nachfolgend sind die für die Detektion der jeweiligen mRNA entsprechenden cDNA benötigten 3 Primer aufgelistet.

**Tab. 2.1: Oligonukleotidsequenzen der für die quantitative RT-PCR benutzten Forward-Primer, Reverse-Primer und TaqMan-Sonden**

Gen	Forward-Primer	TaqMan-Sonde	Reverse-Primer
18S	GGAGCCTGCGGCTT AATTT	GGAGCCTGCGGCTTA ATTT	CAACTAAGAAC- GGCCATGCA
HPRT	TGACTATAATGAG- CACTTCAGGGATT	TCCAC- TTTCGCTGATGACAC AACARGA	CAACAGGACTCTT- GTAGATTCAACTTG
ANP	CCTCCGATA- GATCTGCCCTCTT	CTCTGCTCGCTGGCC CTCGGA	CCGCTCTGGGCTCCAAT
SERCA2a	GACCGGCACACTTA- CCACAA	TCCGTCTGCAGGAT- GTTTATTCTGGA	GGTAAACTCATTAAAGG- GAACAAGTATCA
PLN	GATATGCATCATT- GTGATGCTTCTG	CAAGCTGTCCGAC- CGCAGACC	GGAGGGCCAGGTT- GTAAGTCTG
NCX1	CGGAAGCAAC- GCTGTGAA	CTGG- GAATCGGCGTGGCCT G	TGGTAGATGGCAG- CAATGGA

### 2.4.6 Quantifizierung

Die Auswertung erfolgte zum einen nach der  $\Delta\Delta$ -Ct-Methode und zum anderen nach der Absoluten Standardkurven-Methode. Bei letzterer wird der Ct-Wert der Proben in Relation zu einer Standardkurve gesetzt. Diese Standardkurve erhält man, indem man cDNA verdünnt (hier 1:10) und die Verdünnungsstufen bei jeder TAQMAN-PCR mitlaufen lässt. Bei der  $\Delta\Delta$ -Ct-Methode wird auf eine Standardkurve verzichtet. Zur Normierung wird der Ct-Wert einer Probe genommen, auf den sich alle anderen Werte beziehen. Die so erhaltenen Werte wurden in Relation zu den Werten der Normierungsgröße gesetzt, den internen Standards, sog. Housekeeping-Genen, 18S und HPRT.

## 2.5 Western Blot

### 2.5.1 SDS-PAGE nach Laemmli

Natriumdodecylsulfat, kurz SDS, überdeckt die Eigenladung des Proteins und führt zu einer konstant verteilten negativen Ladung, sodass eine Auftrennung der Proteine während der Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) nach Molekulargewicht erfolgen kann.

Für die SDS-PAGE wurden die Proteine in einem 1,5 mm dicken SDS-Polyacrylamidgel (T=12%, C= 2,67 %) in einer vertikalen Elektrophoreseapparatur (MiniProtean II Bzw. Protean II Maxi; Fa. BioRad, München) elektrophoretisch getrennt. Für ein Trenngel wurden 4 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid-Stammlösung (30%T/2,67% C), 3,35 ml Aqua dest, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCL pH 8,8, 0,1 ml 10% SDS, 0,1 ml 10 % frisch angesetztes Ammoniumpersulfat (APS) und 12.5 µl Tetramethylethyldiamin (TEMED) als Polymerisationskatalysator gemischt. Für das Sammelgel (0,125 M Tris; pH 6,8) wurden 1,3 ml Acrylamid/Bis-Acrylamid ( 30% T; 2,67 % C), 6 ml Aqua dest., 2,5 ml 0,5 M Tris HCl, pH6,8, 100 µl 10% (w/v) SDS, 50 ml APS und 10 µl TEMED gemischt. Der Probenpuffer bestand aus 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 10 % Glycerin, 2% SDS, 0,01% Bromphenolblau, 5% β-Mercaptoethanol. Je 10 µg Protein in 10-20 µl Probenpuffer wurden pro Bahn pipettiert. Der Laufpuffer bestand aus 25 mM Tris, 192 mM Glycerin, 1% SDS pH 8,3. Die Elektrophorese lief bei konstanter Spannung zunächst 20 min bei 70 Volt und anschließend 1,5 h bei 100 Volt.

### **2.5.2 Harnstoff-SDS-PAGE nach Swank und Munkres**

Die modifizierte SDS-PAGE-Methode nach Swank und Munkres eignet sich durch den Zusatz von Harnstoff besonders zur Auftrennung niedermolekularer Proteine wie z.B. Phospholamban geeignet. Hierbei wurden die solubilisierten Proteine in einem 1,5 mm dicken Harnstoff-SDS-Polyacrylamidgel (T=13,8%, C=3,2%) in einer vertikalen Elektrophoresesapparatur (MiniProtean II bzw. Protean II Maxi; Fa. BioRad, München) elektrophoretisch getrennt. Dieses Trenngel enthielt zusätzlich zum Acrylamid/Bis-Acrylamid (Stammlösung 30%T/2,67% C) 0,1% SDS, 6 M Harnstoff, 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/Tris, pH 6,8. Das Sammelgel (T=5,2%, C=0,7%) enthielt 0,1% SDS und 123mM Tris, pH 6,8. Wie unter 2.5 wurde die Acrylamidpolymerisation durch Zugabe von TEMED und APS initiiert. Der Laufpuffer für die SDS-PAGE nach Swank und Munkres unterscheidet sich ebenfalls von dem nach Laemmli. Der hier verwandte Elektrophoresepuffer enthielt 0,1 % SDS und 0,1 M H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/ Tris pH 6,8. Der Probenpuffer für die Solubilisierung der Proben hatte folgende Zusammensetzung: 200 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; 20 mM EDTA; 8% w/v SDS; 40% v/v Glycerin; 0,01% Bromphenolblau; 0,001 % Pyronin; 4% 2- Mercaptoethanol; pH 6,8. Membranpräparate wurden im Verhältnis 1:4 mit 4-fach Probenpuffer gemischt und die Proben zwecks Solubilisierung bei 25 °C 20 min inkubiert und anschließend aufge-



tragen. Die Elektrophorese lief bei konstanter Spannung zuerst 30 min bei 50 Volt und dann 1- 1,5 h bei 100 V in der auf 4 °C gekühlten Elektrophoresekammer. Die Gelelektrophorese wurde beendet, sobald die Pyronin/Bromphenolblau gefärbte Lauffront am Gelende angekommen war.

### **2.5.3 Elektrotransfer mittels Tankblott**

Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Tanknaßblotprozedur in der Westernblot-Kammer (Mini TransBlot-Cell, Fa. Bio-Rad, München, Deutschland) bei 100 Volt über 1,5 h vom Trenngel auf eine PVDF-Membran transferiert. Als Transferpuffer wurde eine Lösung aus 25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20 % v/v Methanol und 0,01 % w/v SDS verwendet. Nach Beendigung des Elektrotransfers wurde die Membran in Wasser gespült. Sofern sich daran nicht direkt der antikörperbasierte Nachweis der Proteine anschloß, wurden die PVDF-Membranen in Saran-Folie verpackt und konnten bei -20 °C gelagert werden. Mittels unspezifischer BlueStain-Färbung (Fa. Pierce, Bonn, Deutschland) des Gels und Ponceau-Färbung der Membran wurde der Proteintransfer überprüft.

### **2.5.4 Immunchemischer Nachweis**

Da nach der elektrophoretischen Auftrennung die Proteine für eine Antikörper-Bindung zugänglich sind, wird die PVDF-Membran 5 min mit TBS-Puffer (150 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 8,0) gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu minimieren, wurde die Membran 60 min bei Raumtemperatur in einem 50 ml Zellkulturröhrchen in TBS-T-Blockierlösung (150 mM NaCl; 10 mM Tris; 5% w/v Blockmilch; 0,1% v/v Tween-20; pH 8,0) auf einem Roller (RM 5; Fa. Karl Hecht, Sondheim, Deutschland) inkubiert. Danach wurde die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS mit Tween 20 (150 mM NaCl; 10 mM Tris; pH 8,0; 0,05% Tween 20) gewaschen. Es folgte eine einstündige Inkubation mit primären monoklonalen von der Maus stammenden  $\beta$ -MHC-, SERCA2-, PLN- und NCX-Antikörpern. Diese Antikörper wurden vorher in 3 ml TBS mit 5% Blockmilch verdünnt (Anti-SERCA2 1:1000; Anti-PLN 1:2000; Anti- $\beta$ -MHC 1:10000; Anti-NCX1 1:2000).

Nach diesen 90 Minuten wurde die Membran bei RT zweimal jeweils 10 min und 5 min in TBS-T gewaschen. So wurde der nicht membrangebundene Antikörperanteil entfernt. Anschließend wurde die Membran 1h mit sekundärem Antikörper bei RT inkubiert. Der

sekundäre Antikörper ist mit dem Enzym Peroxidase konjugiert. Durch die enzymatische Reaktion der Peroxidase wird die Chemilumineszenz ermöglicht. Die sekundären Antikörper wurden zuvor 1:5000 in TBS mit 1% Blockmilch verdünnt. Nach der Inkubation erfolgte wieder ein Waschschrift mit TBS-T, um die nichtgebundenen Antikörper zu entfernen. Um die Protein-Antikörper-Antikörper/Enzym-Komplexe nachzuweisen, wurde die Membran 10 min in 4 ml Chemilumineszenzlösung (SuperSignal West DURA L oder SuperSignal West Pico, Fa. Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) inkubiert. Die Chemilumineszenz der entsprechenden immunreaktiven Banden wurde mit Hilfe des Imaging-Gerätes Fusion FX7 (Fa. Vilber Lourmat Deutschland) gemessen und anschließend die Intensität der Banden mit der Software Bio-1D 12.12 derselben Firma quantifiziert.

## **2.6 Statistische Auswertung**

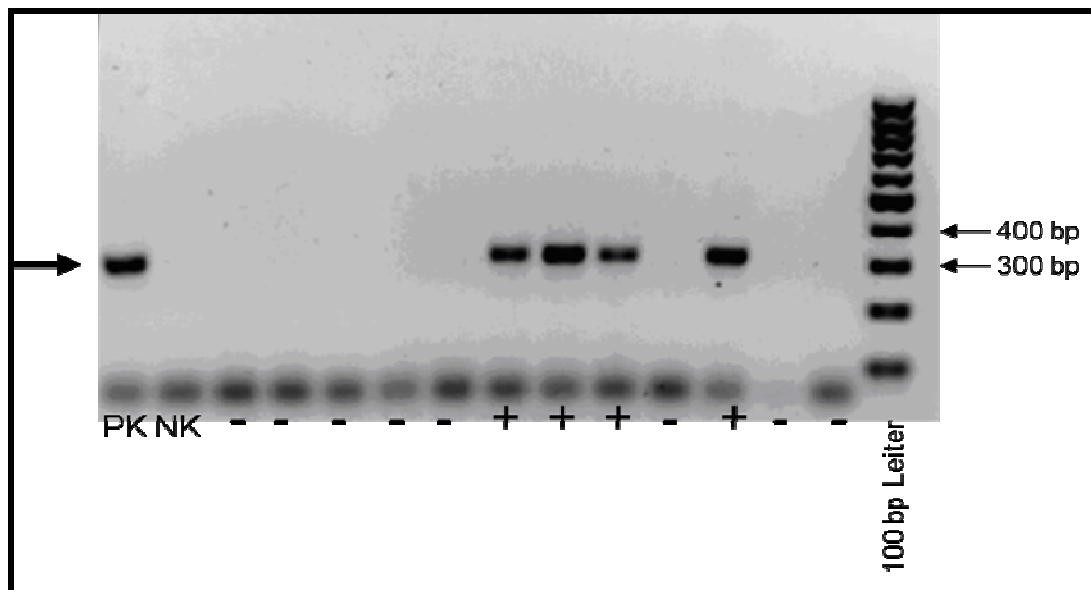
Die statistische Auswertung erfolgte mittels des Softwareprogramms SigmaStat 3.2 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) mit den nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test und Kruskal-Wallis-Test sowie den post-Hoc Dunn's im Falle ungleicher Gruppengröße. Bei Varianzhomogenität wurde der t-test nach ANOVA mit Korrektur nach Bonferroni verwendet. Eine statistische Signifikanz wurde bei  $p < 0,05$  angenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Renin-transgene und SERCA2-Renin-doppelt-transgene Tiere

##### 3.1.1 Genotypisierung

Heterozygote SERCA2-transgene Weibchen wurden mit homozygoten Ren2-TG Rattenböcken verpaart. Die Nachkommen wurden mittels PCR unter Nutzung SERCA2a-transgenspezifischer Primer auf das SERCA2-Transgen geprüft. Das SERCA2-Transgen wurde, wie nach den Mendelschen Regel zu erwarten, bei ca. der Hälfte der Nachkommen nachgewiesen. Abbildung 3.1 zeigt exemplarisch das Ergebnis einer Agarosegelelektrophorese von SERCA2-transgen spezifischen PCR-Produkten genomischer DNA SERCA2-transgener Tiere. Da bei den Nachkommen homozygoter Ren2-TG-Böcke grundsätzlich heterozygote Ren2-TG-Nachkommen zu erwarten sind, wurden letztere zur Kontrolle nur stichprobenartig auf das mREN2-Transgen geprüft. Alle geprüften Nachkommen waren mREN2-positiv (Ergebnisse nicht gezeigt).

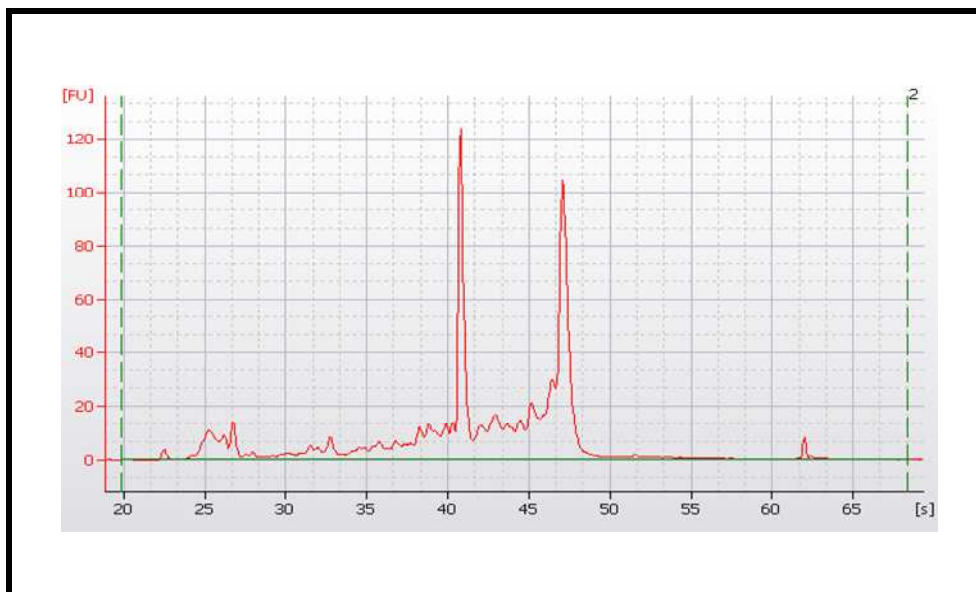


**Abb. 3.1:** Ethidiumbromid gefärbtes 1,5% Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung von PCR-Produkten, die unter Verwendung SERCA2-transgen spezifischen Primer erhalten wurden.

Das UV-Fluoreszenzbild zeigt das Ergebnis der Gelelektrophorese von vier SERCA2-transgen positiven Tieren (+) und 8 SERCA2-transgen negativen Ren2-TG (-); PK-Positivkontrolle, NK-Negativkontrolle. Die mit dickem schwarzen Pfeil markierte SERCA2-Transgen spezifische Bande liegt bei 320 bp.

### 3.1.2 Qualität

Die RNA-Qualität der isolierten kardialen RNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese geprüft und in einigen Fällen durch das Bioanalyser-Verfahren ergänzt. Diese Methode erlaubt eine gleichzeitige Messung der RNA-Konzentration. Sind nach Ethidiumbromid-Markierung des Gels keine sogenannten Abbaubanden zu erkennen, darf von einer für die qRT-PCR ausreichenden Qualität der isolierten RNA ausgegangen werden. Nur RNA, die diese Qualitätskriterien erfüllt, wurde für die Genexpressionsanalyse weiterverwendet. Wurde die Qualität mittels Bioanalyser getestet, so erhielt man ein Elektropherogramm mit zwei großen RNA-Banden (18S und 28S RNA). Abb.3.2 zeigt exemplarisch das Ergebnis eines Elektropherogramms und die auf eine einwandfreie Qualität deutenden zwei großen RNA-Peaks.



**Abb.3.2: Elektropherogramm eines nicht-transgenen Tieres.**

Die Spitzen nach ca. 40 Sekunden und nach ca. 48 Sekunden zeigen die FU-Werte (Fluorescence Units) der 28S- und 18S-RNA.

### 3.1.3 Körper- und Herzgewichte männlicher einfach Renin- und SERCA2-Renin-doppelt-transgener Tiere

Tabelle 3.1 zeigt die Körper- und Herzfeuchtgewichte von nicht-transgenen (NTG), heterozygot Renin-transgenen (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgenen Tieren (SERen-dTG), die jeweils für das SERCA2-und Ren2-Transgen heterozygot waren. Die Körpergewichte der einzelnen Gruppen unterscheiden sich nicht. Heterozygote Ren2-transgene Tiere wiesen im Vergleich zu NTG ein ca. 20% höheres absolutes und relati-

ves linksventrikuläres Feuchtgewicht auf. Diese linksventrikuläre kardiale Massenzunahme war bei SERen-dTG deutlich geringer (siehe Tabelle 3.1). Allerdings unterschieden sich die Werte zwischen Ren2-TG und SERen-dTG nicht signifikant.

**Tab. 3.1: Körper- und Herzgewichte männlicher 30 Wochen alter nicht-transgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG)**

Parameter	NTG (n=7)	Ren2-TG (n=7)	SERen-dTG (n=7)
KG, g	525 ± 11	540 ± 27	540 ± 19
HG, mg	1615 ± 23	1993 ± 16 *#	1808 ± 78 *
LV FG, mg	1167 ± 18	1439 ± 86*	1289 ± 35
RV FG, mg	307 ± 4	326 ± 47	297 ± 28
LV/KG, mg/g	2,22 ± 0,06	2,70 ± 0,20	2,40 ± 0,08
RV/KG in mg/g	0,58 ± 0,18	0,61 ± 0,09	0,55 ± 0,05

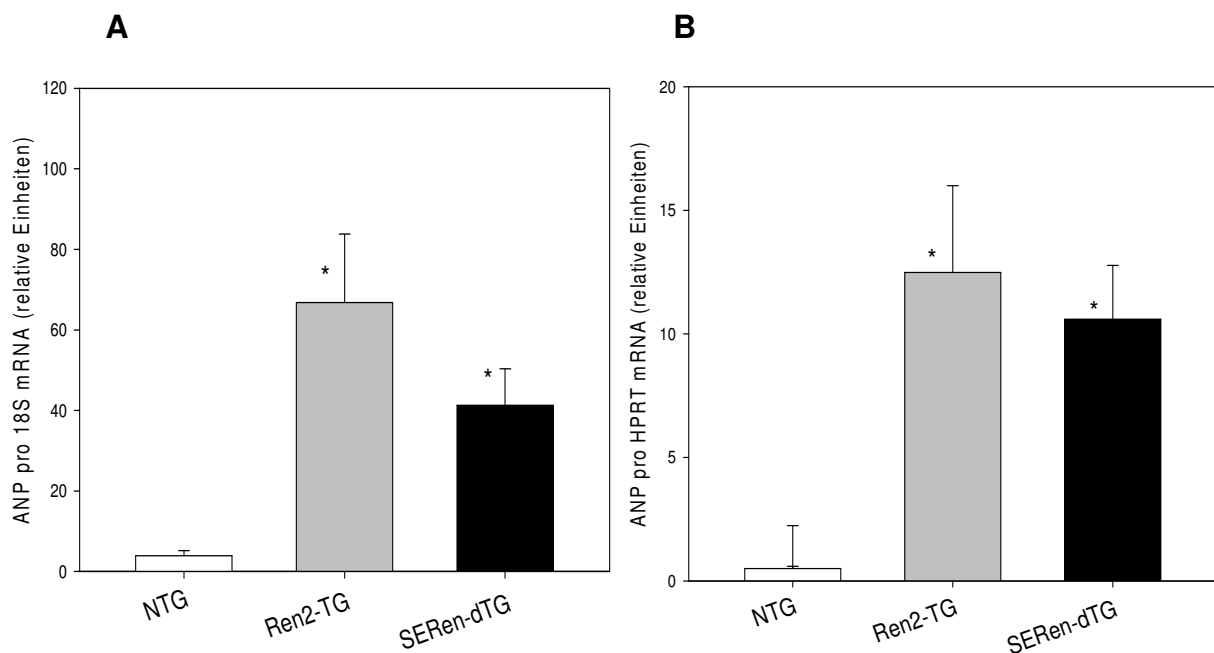
Mittelwerte ± SEM, NTG, nicht-transgene Tiere; Ren2-TG, heterozygot Renin-transgene Tiere; SERen-dTG, SERCA2-Renin- doppelt transgene Tiere; KG: Körpergewicht, HG- Herzfeuchtgewicht, LV- linker Ventrikel; RV – rechter Ventrikel; FG- Feuchtgewicht; \*p< 0,05 vs. NTG; #p< 0,05 vs. SERen-dTG;

Diese Ergebnisse zeigen, dass die heterozygoten Ren2-TG eine moderate LV-Hypertrophie aufweisen, die bei zusätzlichem Vorhandensein des SERCA2-Transgens abgeschwächt war.

### 3.1.4 Biomarker der linksventrikulären Hypertrophie

Zwecks Verifizierung einer LV-Hypertrophie wurden typische kardiale Hypertrophiemarker auf mRNA-Ebene und auf Proteinebene untersucht. Abbildung 3.3A zeigt bei Ren2-TG im Vergleich zu NTG eine Zunahme der linksventrikulären ANP-mRNA-Spiegel bei Normierung auf 18S um das 17-fache. Der Anstieg bei den doppelt-transgenen Tieren

fällt geringer aus (11-fach), jedoch ist der im Vergleich zu Ren2-TG mit 37% niedrigere ANP-mRNA-Spiegel nicht vom entsprechenden Ren2-TG Wert statistisch signifikant verändert. Vergleichbare Unterschiede zwischen den Gruppen wurden auch mit der Standardreihenmethode und Normierung auf HPRT beobachtet (Abb. 3.3B). Hierbei sind die ANP-mRNA-Spiegel bei Ren2-TG im Vergleich zu NTG 9,9-fach höher. Bei doppelt transgenen Tieren lagen die ANP-mRNA-Spiegel 8,2-fach höher als bei NTG.



**Abb.3.3: Linksventrikuläre ANP mRNA –Spiegel nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG)**  
Mittelwerte  $\pm$  SEM für 8 Tiere pro Gruppe (A) und 16-19 Tiere pro Gruppe (B), \* $p < 0,05$  vs. NTG

Um sicherzustellen, dass für dieses Tiermodell und für das hier untersuchte Organ Herz 18S und HPRT geeignete Referenz-RNAs waren, wurden die 18S-RNA- und die HPRT-mRNA -Spiegel in linksventrikulären Proben mittels qRT-PCR gemessen (s.Tabelle 3.2). Die RNA-Spiegel unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

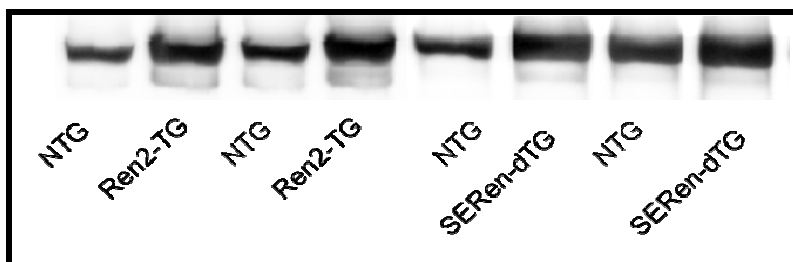
**Tab. 3.2: 18S und HPRT mRNA-Spiegel**

Parameter	NTG	Ren2-TG	SERen-dTG
18S	19,82 $\pm$ 1,00 n=8	18,35 $\pm$ 0,71 n=8	19,39 $\pm$ 2,57 n=8
HPRT	0,0017 $\pm$ 0,0002 n=17	0,0016 $\pm$ 0,0001 n=20	0,0017 $\pm$ 0,0001 n=18

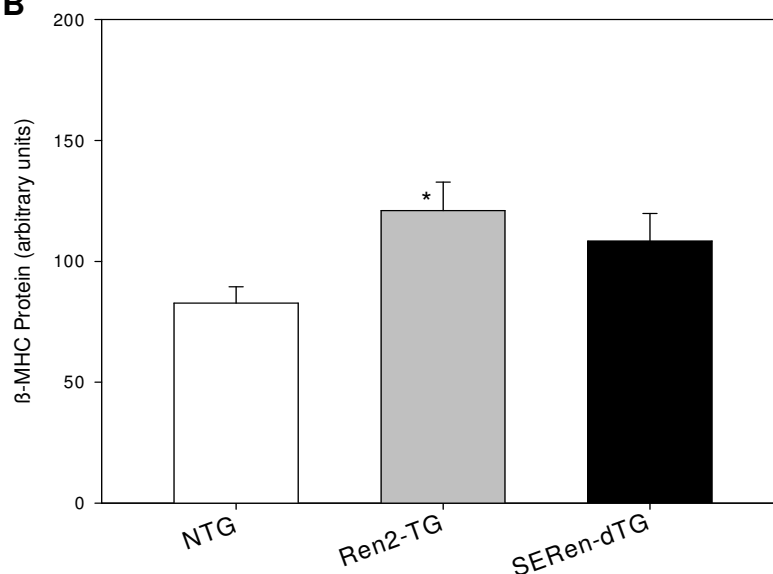
NTG(nicht-transgen), Ren2-TG (Renin-transgen), SERen-dTG (SERCA2-Renin-doppelt transgen). Angaben in relativen Einheiten.

Da bekannt war, dass die Expression von schweren  $\beta$ -Myosinketten ( $\beta$ -MHC) im hypertrophierten Rattenmyokard zunimmt, wurden zusätzlich auf Proteinebene  $\beta$ -MHC mittels semiquantitativer Western Blot-Technik untersucht. In Abbildung 3.4 sind die immunoreaktiven Signale für einen exemplarischen Immunoblot dieses zusätzlichen Hypertrophie markers gezeigt. Die relative Zunahme der  $\beta$ -MHC-Proteinspiegel betrug bei Ren2-TG 40% ( $p < 0,05$  vs. NTG). Bei doppelt transgenen Tieren fiel die Zunahme mit 35% geringer aus. Der Unterschied war im Vergleich zu NTG nicht signifikant.

**A**



**B**

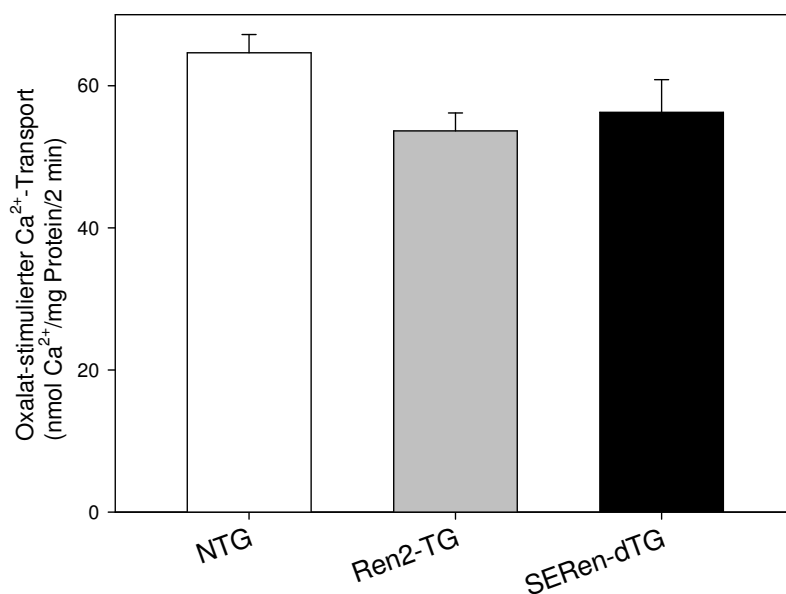


**Abb. 3.4: Immunreaktive linksventrikuläre  $\beta$ -MHC- Signale männlicher nicht-transgener (NTG) , Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgene Tiere (SERen-dTG)**  
A: exemplarische Westernblots; B: Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n=7$  \* $p < 0,05$  vs. NTG

### 3.1.5 Das kardiale SERCA2a/PLN-System

Eine kardiale Hypertrophieentwicklung kann mit Störungen der kardiomyozytären  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase einhergehen. Hierbei ist häufig der SERCA2a-vermittelte Rücktransport von zytosolischem  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR betroffen. Deshalb wurden die an diesen Transpor-

ten beteiligten Proteine sowie der  $\text{Ca}^{2+}$ -Austauschtransport über die SR  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase SERCA2 genauer untersucht. Abbildung 3.5 zeigt die oxalat-stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des SR in linksventrikulären Membranpräparaten für NTG, Ren2-TG und SERen-dTG. Quantitative isolierte Membranpräparate von Ren2-TG mit moderater linksventrikulärer Hypertrophie weisen 17% niedrigere SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten auf als NTG. Bei doppelt transgenen SERen-dTG betrug die Abnahme 13%. Die Unterschiede zwischen Ren2-TG und SERen-dTG waren nicht signifikant.

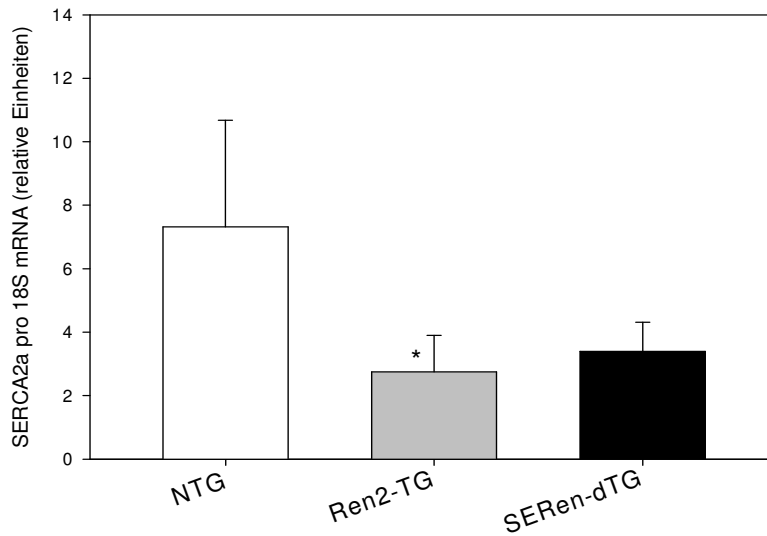


**Abb. 3.5: Retikulärer Oxalat-stimulierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in abzentrifugierten linksventrikulären Membranpräparaten von männlichen nicht-transgenen (NTG), Renin-transgenen (Ren2-TG) und SERCA2-Renin doppelt transgenen Tieren (SERen-dTG)**

Die freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Reaktionsgemisch betrug  $3,68 \mu\text{mol/l}$ . Der Ansatz enthielt  $20 \mu\text{M}$  Ruthenium Rot zwecks Minimierung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Effluxes aus SR-Vesikeln. Mittelwerte  $\pm$  SEM  $n=11-14$  pro Gruppe.

Um zu überprüfen, ob die gemessenen SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivitäten auf einer veränderten Genexpression basieren, wurden die kardiomyozytären SERCA2a- und PLN-mRNA-Spiegel gemessen. Die SERCA2a-mRNA-Spiegel von Ren2-TG waren im Vergleich zu NTG statistisch signifikant um 62% gesenkt, wobei SERen-dTG um 56% niedrigere SERCA2a-mRNA-Spiegel aufwies als NTG. Bei der mRNA-Analyse fielen bei den doppelt transgenen Tieren tendenziell 15% höhere SERCA2a-mRNA Spiegel im Vergleich zu Ren2-TG auf. Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant (Abb. 3.6).

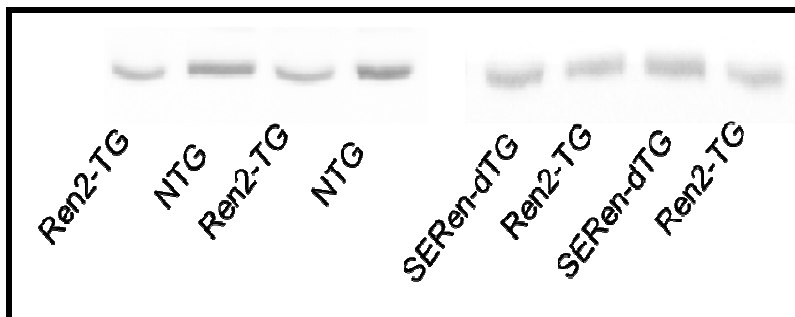


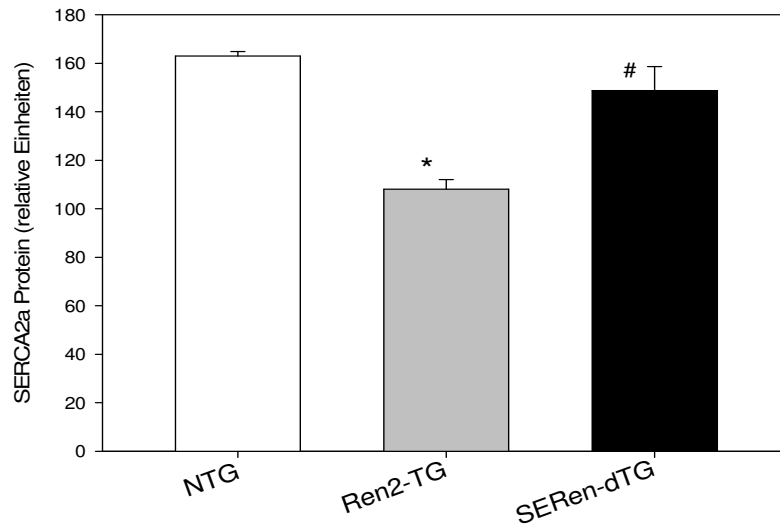


**Abb.3.6: SERCA2a mRNA des linken Ventrikels nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG).**  
Die Werte wurden auf 18 S bezogen. Mittelwerte  $\pm$  SEM mit 6 Tieren pro Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. NTG

Um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse der Genexpression nach der Translation widerspiegeln, wurden die Proteinspiegel mittels Western Blot untersucht. Die linksventrikulären SERCA2a-Proteinspiegel erreichen bei Ren2-TG ca. 66% des Wertes von NTG-Kontrollen. Zwischen SERen-dTG und NTG bestand kein signifikanter Unterschied. SERen-dTG wiesen 37 % höhere SERCA2a-Proteinspiegel auf als Ren2-TG (Abb. 3.7). Es lässt sich somit ein quantitativer Unterschied zwischen Genexpression im Vergleich zu den Proteinspiegeln bei Ren2-TG und SERen-dTG nachweisen.

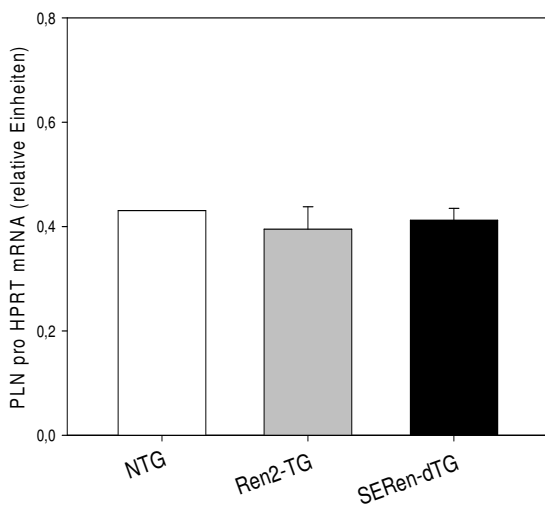
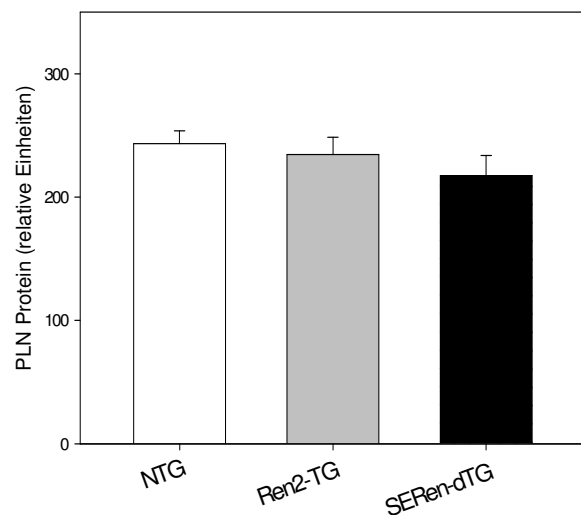
**A**



**B**

**Abb.3.7: Immunreaktive linksventrikuläre SERCA2a- Spiegel nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG).** Mittelwerte  $\pm$  SEM mit 7 Tieren pro Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. NTG, # $p < 0,05$  vs. Ren2-TG

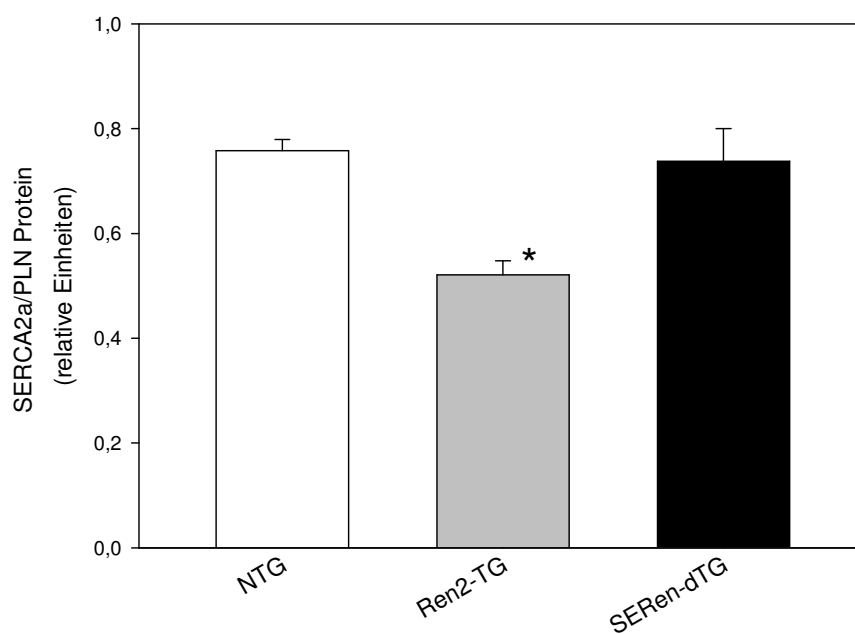
Im Gegensatz dazu finden sich weder auf mRNA noch auf Proteinebene quantitative Veränderungen des SERCA2a-Inhibitor Phospholamban (Abbildung 3.8).

**A****B**

**Abb.3.8: A) PLN-mRNA des linken Ventrikels B) Immunreaktive linksventrikuläre PLN- Spiegel nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin doppelt transgener Tiere (SERen-dTG)** A)  $n=16-22$  und B)  $n=7$ ; Mittelwerte  $\pm$  SEM

Phospholamban stellt den wichtigsten funktionellen SERCA2-Inhibitor dar. Bezieht man die SERCA2a-Proteinspiegel auf Phospholamban, so zeigt sich zwischen den Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied. Dieser Befund korreliert mit den Ergebnissen der SR-Ca<sup>2+</sup>-Transportraten.

Betrachtet man das Protein-Verhältnis SERCA2a/PLN, zeigen sich bei Ren2-TG im Vergleich zu NTG und SERen-dTG um mehr als 20% geringere Werte.

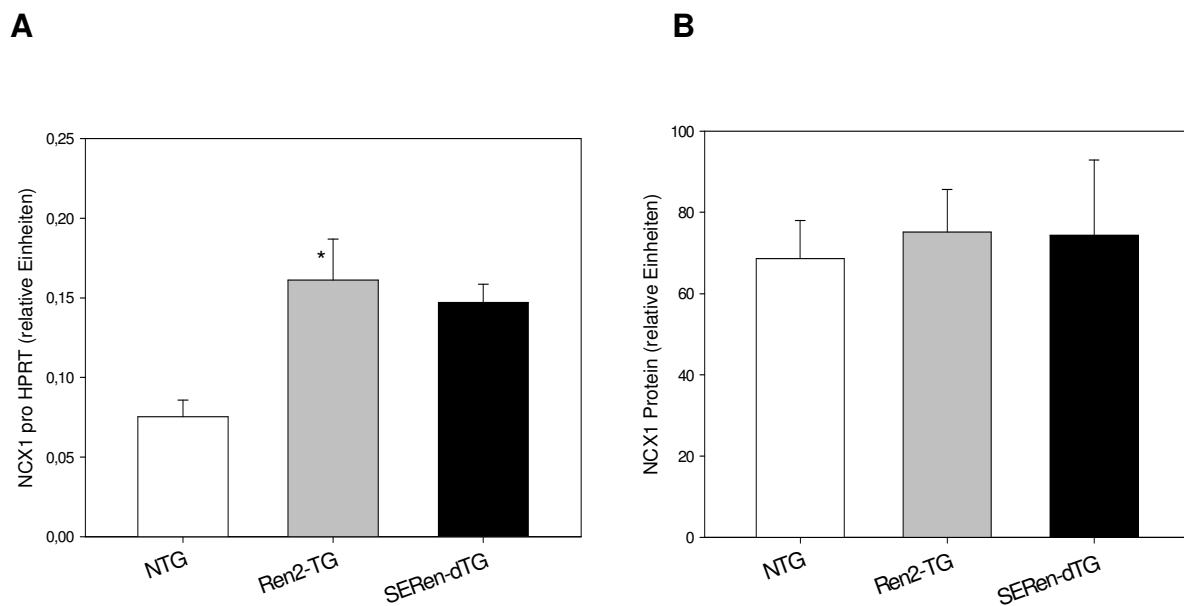


**Abb.3.9: Immunreaktives linksventrikuläres SERCA2a/PLN-Verhältnis nichttransgener (NTG), Renin-transgener (Ren2-TG) und SERCA2-Renin doppelt transgener Tiere (SERen-dTG)**  
Mittelwerte  $\pm$  SEM mit n=5, \* $<0.05$  Vs. NTG und SERen-dTG mittels Bonferroni t-Test nach ANOVA

Während der Ca<sup>2+</sup>-Rücktransport in das SR durch das SERCA2a/PLN-System vermittelt wird, spielt der Ryanodin-Rezeptor bei der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus dem SR eine entscheidende Rolle. Ähnlich wie bei PLN fanden sich keinerlei Unterschiede bzgl. der immunreaktiven Signale für das Ca<sup>2+</sup> freisetzende Protein RyR2 (Ergebnisse nicht gezeigt).

Bei der Senkung der zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegel konkurriert der Ca<sup>2+</sup>-Rücktransport in das SR mit dem Ca<sup>2+</sup>-Auswärtstransport aus dem Kardiomyozyten über den sarkolem-malen Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>-Austauscher NCX1. Da letzterer im hypertrophierten Myokard häufig

hochreguliert ist, wurden sowohl die NCX1-mRNA-Spiegel als auch der relative Proteingehalt der drei Gruppen vergleichend untersucht. Abbildung 3.10 zeigt die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Im Vergleich zu NTG wiesen Ren2-TG statistisch signifikant 2,14-fach höhere NCX1-mRNA-Spiegel auf, wobei die Erhöhung bei SERen-dTG das 1,95-fache betrug. Auf Proteinebene fanden sich allerdings keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen.



**Abb.3.10:A) NCX1-mRNA des linken Ventrikels B) Immunreaktive linksventrikuläre NCX1- Spiegel nichttransgener (NTG) ,Renin-transgener (Ren2-TG) und Renin-SERCA2-doppelt transgener Tiere (SERen-dTG)**

A) je n=6-8 B) je n = 7, Mittelwerte+/- SEM. \*p< 0,05 Vs. NTG

### 3.1.6 Vergleichende Untersuchung der Körper- und Herzgewichte und SR-Ca<sup>2+</sup>-Transportraten weiblicher und männlicher Renin- und SERCA-Renin-doppelt transgener Tiere

Tabelle 3.3 zeigt die Körpergewichte und Herzgewichte weiblicher nicht-transgener, Renin-transgener und SERCA-Renin-doppelt-transgener Tiere als auch ihr Verhältnis zu den unter 3.1 aufgezeigten Werten der männlichen Tiere. Im Vergleich zu nicht transgenen Tieren wiesen weibliche Renin- sowie SERCA2-Renin-doppelt transgene Tiere keinerlei Unterschiede bezüglich der auf das Körpergewicht bezogenen linksventrikulären Feuchtgewichte auf.

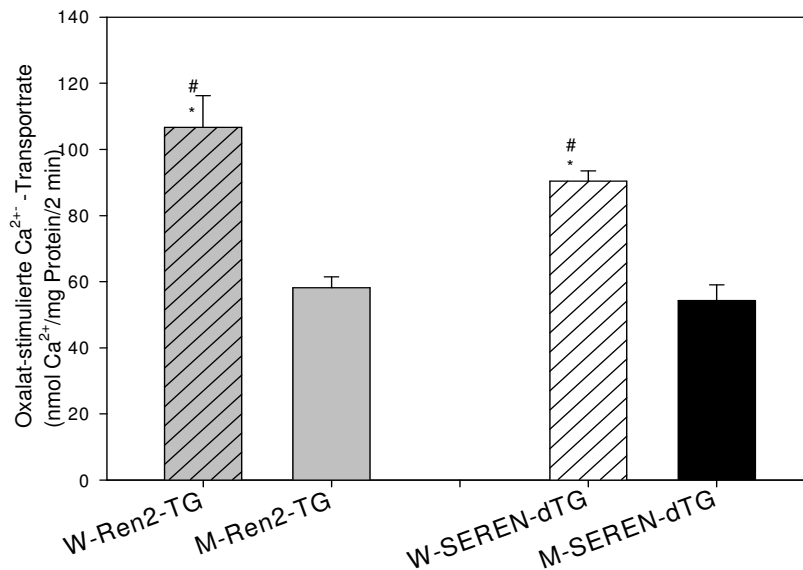
Im Vergleich zu männlichen Tieren wiesen weibliche Tiere ein statistisch signifikant niedrigeres Körpergewicht und linksventrikuläres Feuchtgewicht auf als die jeweilige männliche Gruppe. Die auf das Körpergewicht bezogenen linksventrikulären Feuchtgewichte wiesen jedoch keine statistisch signifikanten Unterschiede auf.

**Tab. 3.3: Körper und Herzgewichte weiblicher nicht-transgener (NTG), Renin-transgener (W-Ren2-TG) sowie Renin- und SERCA2- doppelt transgener (W-SEREN-dTG) Tiere**

Parameter	NTG (n=9)	W-Ren2-TG (n=9)	W-SEREN-dTG (n=12)
KG, g	293 ± 7	328 ± 7 *	312 ± 4
LV FG, mg	663 ± 14	748 ± 29	736 ± 43
LV/KG in mg/g	2,27 ± 0,02	2,3 ± 0,10	2,3 ± 0,10
RV/KG in mg/g	0,71 ± 0,02	0,52 ± 0,03 #	0,48 ± 0,02 #

Tabelle 3.3. Mittelwerte ± SEM, W-Ren2-TG- weibliche heterozygot Renin-transgene Tiere; M-Ren2-TG- weibliche heterozygot Renin-transgene Tiere; W-SERen-dTG- Renin- und SERCA2- doppelt transgene Tiere; M-SERen-dTG- Renin- und SERCA2- doppelt transgene Tiere; KG: Körpergewicht, HG- Herzgewicht, LV- linker Ventrikel; RV – rechter Ventrikel; FG- Feuchtgewicht; \*p<0,05 vs. NTG, #p< 0,05 Vs. M-SEREN-dTG

Da W-Ren2-TG und W-SEREN-dTG eine geringere linksventrikuläre Hypertrophie aufweisen als die jeweilige männliche Gruppe, wurden die SR-Ca<sup>2+</sup>-Transportrate sowie eine Genexpressionsanalyse ausgewählter Gene durchgeführt. W-Ren2-TG und W-SEREN-dTG wiesen signifikant um 88 % bzw. 66 % höhere SR Ca<sup>2+</sup>-Transportraten auf als die jeweilige männliche Vergleichsgruppe.



**Abb.3.11: Oxalat-stimulierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in linksventrikulären Membranpräparaten männlicher Renin-transgener (M- Ren2-TG) und SERCA2-Renin- doppelt transgener Ratten (M- SE- Ren- dTG), weiblicher Renin-transgener (W-Ren2-TG) und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere (W- SEREN-dTG)**

Die Messungen fanden bei einer freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von  $3,68 \mu\text{mol/l}$  und in Gegenwart von  $20 \mu\text{M}$  Ruthenium Rot statt. Mittelwerte  $\pm$  SEM mit  $n=6-14$ . \* $p<0,05$  vs. M-Ren2-TG; #  $p<0,05$  vs. M-SEREN-dTG. Daten für M-Ren2-TG und M-SEREN-dTG in Abb. 3.5 gezeigt.

### 3.1.7 Kardiale Genexpressionsanalyse weiblicher und männlicher Renin- und SERCA2-Renin-doppelt transgener Tiere

Tabelle 3.4 zeigt, dass HPRT auch bei weiblichen Tieren als Referenz-RNA verwendet werden kann. Die PLN-mRNA-Spiegel von einfach Renin-transgenen Tieren unterschieden sich nur unwesentlich von doppelt transgenen Tieren. Weibliche SERCA2-Renin- doppelt-transgene Tiere wiesen statistisch signifikant 1,69-fach höhere SERCA2a-mRNA-Spiegel auf als weibliche Ren2-Tiere bzw. doppelt so hohe SERCA2a-mRNA-Spiegel als männliche Ren2-TG. Männliche Ren2-TG wiesen 14% niedrigere SERCA2a-mRNA-Spiegel auf als W-Ren2-TG. M-SEREN-dTG wiesen 30% niedrigere Werte auf als W-SEREN-dTG. Um zu überprüfen, ob die bei weiblichen Tieren höheren SERCA2a-mRNA Spiegel mit Veränderungen in der Expression des wichtigsten  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Antiporters der Plasmamembran einhergingen, wurde die NCX1-Genexpression untersucht. Sowohl W-SEREN-dTG als auch M-SEREN-dTG wiesen ca. um 20% niedrigere Werte auf als die entsprechenden Renin- transgenen Tiere.

**Tab. 3.4: HPRT, PLN, SERCA2a, NCX1 und ANP mRNA des linken Ventrikels männlicher und weiblicher Tiere mittels Standardreihenmethode**

mRNA-Spiegel	W-Ren2-TG	W-SEREN-dTG
HPRT	0,00125 ± 0,00006	0,00138 ± 0,00006
SERCA2a / HPRT	1,36 ± 0,17	2,06 ± 0,13 §*
NCX1 / HPRT	0,185 ± 0,009	0,146 ± 0,008
PLN / HPRT	0,629 ± 0,050	0,652 ± 0,038
ANP / HPRT	3,74 ± 1,52	3,61 ± 1,35

Weibliche Renin-transgene (W-Ren2-TG) und SERCA2-Renin- doppelt transgene Tiere (W- SEREN-dTG) die Mittelwerte+/- SEM. § p< 0,05 vs.W-Ren2-TG, \*p< 0,05 Vs. M-Ren2-TG, n=8-14

M-Ren2 wiesen im Vergleich zur weiblichen Referenzgruppe W-Ren2 4,7-fach höhere ANP-Werte auf. Der Unterschied zwischen den doppelt-transgenen Gruppen war stärker ausgeprägt. M-SEREN-dTG wiesen im Vergleich zur weiblichen Referenzgruppe W-SEREN-dTG 7,3-fach höhere mRNA-Spiegel des Hypertrophiemarkers ANP auf.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Ergebnisse

Eine reduzierte SERCA2a Expression und SERCA2a-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des sarkoplasmatischen Retikulums spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. Mehrere Studien haben die benefitären Effekte einer kurzfristigen SERCA2a-Überexpression nachweisen können. Bis dato ist aber nur wenig über die Effekte der Langzeitüberexpression auf gesunde Kardiomyozyten und Kardiomyozyten insuffizienter Herzen bekannt<sup>74</sup>. Ziel der Arbeit war es zu untersuchen, ob die zusätzliche Expression des SERCA2-Transgens im neuen SERCA-Renin-doppelt transgenen Tiermodell der Hypertonie Einfluss hat auf die linksventrikuläre Hypertrophie, die kardiiale Expression von Biomarkern der linksventrikulären Hypertrophie sowie die Expression und Funktion des SERCA2/PLN-Systems. Diese Untersuchungen wurden durch einen Geschlechtervergleich ergänzt.

Bei den Untersuchungen wurden folgende Befunde erhoben:

1. Linksventrikuläre Hypertrophie bei hypertensiven doppelt transgenen SERen-dTG wie auch bei einfach transgenen Ren2-TG mit arterieller Hypertonie sind vergleichbar.
2. Die Unterschiede der SERCA2a-katalysierten- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des SR zwischen SERen-dTG und Ren2-TG sind nicht signifikant.
3. Die SERCA2a-Protein- Spiegel als auch das SERCA2a/PLN-Verhältnis sind bei männlichen SERen-dTG im Vergleich zu Ren2-TG höher.
4. Die mRNA SERCA2a-Expression ist bei weiblichen doppelt transgenen Ratten W-SERen-dTG im Vergleich zu W-Ren2-TG mit linksventrikulärer Hypertrophie höher.
5. Höhere SERCA2-Expression führt zu keiner Abnahme kardialer Biomarker der linksventrikulären Hypertrophie in dem untersuchten Tiermodell.



6. HPRT ist als Referenzgröße der Genexpression bei Tiermodellen der Herzinsuffizienz einsetzbar.

Auf zellulärer Ebene sind eine Verlängerung der Aktionspotentialdauer, eine verminderte Kontraktilität und eine verlangsamte Relaxation die typischen Charakteristika von Kardiomyozyten humaner Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz<sup>75</sup>. In-vitro-Studien an insuffizienten und nicht-insuffizienten Kardiomyozyten haben gezeigt, dass bei niedrigen Frequenzen (unter 30 Schlägen pro Minute) sich die maximal entwickelte Kraft nicht unterscheidet. Erhöht man die Frequenz, so kommt es in gesunden Kardiomyozyten zu einer Kraftzunahme im Sinne einer positiven Kraft-Frequenz-Beziehung, in Kardiomyozyten insuffizienter Herzen aber zu keiner Steigerung. Diese negative Beziehung ist ein für die humane Herzinsuffizienz charakteristisches Merkmal<sup>76</sup>. Auf zellulärer Ebene gehen diese Veränderungen mit Störungen im kardiomyozytären  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt einher<sup>77,30</sup>. Für die Aufrechterhaltung niedriger zytosolischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegel in der Diastole ist maßgeblich die in der Membran des SR befindliche  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a verantwortlich.

In dieser Arbeit wurden die Auswirkungen eines zusätzlichen SERCA2-Transgens unter den pathologischen Bedingungen einer Renin-induzierten arteriellen Hypertonie auf die linksventrikuläre Hypertrophie, die kardiale Expression von Biomarkern der linksventrikulären Hypertrophie sowie die Expression und Funktion des SERCA2/PLN-Systems untersucht. Daher wurden einfach-transgene Ren2-TG, doppelt transgene SERen-dTG und normotensive nicht-transgene Tiere (NTG) vergleichend untersucht. Alle Nachkommen wurden auf das SERCA2-Transgen überprüft. Den Mendelschen Regeln entsprechend sind alle Nachkommen der aus der Verpaarung homozygoter mREN2-Böcke und SERCA2a-transgener Weibchen heterozygot für das Ren2-Transgen. 50% der Nachkommen trugen das SERCA2-Transgen. Bei der Kontrollgenotypisierung für das Renin-Gen wurden einzelne zufällig ausgewählte Tiere auf das Renin-Transgen überprüft.

In Ren2-heterozygoten Ratten steigt der Blutdruck ab der 5. Lebenswoche. In der zehnten Lebenswoche werden maximale systolische Blutdruckwerte von 240 mmHg erreicht. In diesen Ratten ist die arterielle Hypertonie nach acht Wochen mit Blutdruckwerten um die 230/180 mmHg völlig ausgebildet. In homozygoten Renin-transgenen Ratten errei-

chen die systolischen Werte bis zu 300 mmHg<sup>78</sup>. Doppelt transgene SERen-dTG wiesen ähnlich hohe Blutdruckwerte auf wie heterozygote Ren2-TG (unveröffentlichte Werte).

Unter der monogenetisch bedingten Drucküberlast kam es zu einer Erhöhung der Gesamtherzmasse und linksventrikulären Masse. Eine länger bestehende arterielle Hypertonie ist maßgeblich an der Ausbildung einer linksventrikulären Hypertrophie und damit der Entwicklung eines erhöhten Gesamterzgewichts beteiligt. Aus Vorarbeiten ist die Entwicklung höherer linksventrikulärer Herzgewichte bei Renin-transgenen Tieren bekannt<sup>79,80,81</sup>.

Die Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie geht einher mit Veränderungen auf zellulärer, subzellulärer und molekularer Ebene. Diese pathologischen Veränderungen können das Gefäßsystem, die extrazelluläre Matrix und/oder den Myozyten betreffen. Insbesondere im Kardiomyozyten kommt es zu Störungen der Ca<sup>2+</sup>-Homöostase. An letzterer ist die SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase SERCA2 maßgeblich beteiligt. Auf zellulärer und molekularer Ebene wurden diese Störungen auch an Ratten mit operativ-induzierter Drucküberlast mittels Konstriktion der Aorta ascendens nachgewiesen<sup>31,82</sup>.

Einen etablierten Marker der linksventrikulären Hypertrophie stellt das natriuretische Peptid ANP dar. Die Genexpression wurde mittels qRT-PCR quantifiziert. In dieser Arbeit konnte ein Anstieg der ANP-mRNA-Spiegel um das 11-fache bei Ren2-TG im Vergleich zu NTG gezeigt werden. Auch SERen-dTG wiesen statistisch signifikant höhere ANP-mRNA Spiegel im Vergleich zu NTG auf. Die im Vergleich zu Ren2-TG beobachtete Abnahme der ANP-mRNA-Spiegel um 18% bei SERen-dTG war nicht statistisch signifikant. In einer anderen Arbeit wurden die ANP-mRNA-Spiegel mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Auch hier waren die ANP-Spiegel Renin-transgener Tiere erhöht<sup>83</sup>. Flesch et al. wiesen mittels Northernblot-Technik bei Renin-transgenen Tieren ca. 40-fach höhere ANP-Spiegel im Vergleich zur Kontrollgruppe auf<sup>49</sup>.

Diese Ergebnisse bestätigen die durch die Renin bedingte arterielle Hypertonie induzierte linksventrikuläre Hypertrophie der Ren2-TG und SERen-dTG, die mit einer verstärkten ANP-Expression einhergeht. Diese Befunde entsprechen der gut untersuchten Korrelation zwischen der kardialen Expression natriuretischer Peptide und der links-

ventrikulären Hypertrophie<sup>84</sup>. Bei Ratten mit experimentell induzierter supra-avalvulärer Aortenstenose wurden neben den erhöhten ANP-Spiegeln auch eine verstärkte  $\beta$ -MHC Expression beobachtet<sup>84,85</sup>. Da beide als sogenannte Marker der linksventrikulären Hypertrophie gelten, wurde in dieser Arbeit neben ANP auch  $\beta$ -MHC als Marker untersucht. Die  $\beta$ -MHC-Proteinspiegel von Ren2-TG im Vergleich zu NTG waren statistisch signifikant erhöht. Die  $\beta$ -MHC-Proteinspiegel von SERen-dTG waren im Vergleich zu NTG nicht erhöht. Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass ANP auf mRNA Ebene bei der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie früher ansteigt als kardiale  $\beta$ -MHC-Proteinspiegel.

Eine andere Arbeitsgruppe untersuchte sowohl die kardiale ANP wie auch BNP Expression Renin-transgener Ratten und wiesen für ANP, nicht aber für BNP statistisch signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe auf<sup>45</sup>. Bezüglich der HPRT-mRNA-Spiegel gab es zwischen den Versuchsgruppen keinerlei Unterschiede. HPRT-mRNA diene als Normierungsgröße und konnte somit an diesem Tiermodell als Referenzgröße etabliert werden. Grundsätzlich wird geschätzt, dass sich in einer Säugerzelle nur ein bis zehn Moleküle HPRT befinden<sup>86</sup>. Daher eignet sich HPRT als sensitivere Normierungsgröße im Gegensatz zur abundanten 18S RNA.

Aus Vorarbeiten ist bekannt, dass normotensive SERCA2-transgene Tiere um 35-40% höhere SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivitäten aufweisen als nicht-transgene Kontrolltiere<sup>53</sup>. Bei Renin-transgenen Tieren hingegen ist bekannt, dass sie geringere SERCA2a-mRNA- und Proteinspiegel aufweisen<sup>49,87</sup>.

Um zu überprüfen, ob die linksventrikuläre Hypertrophie in diesem Tiermodell mit einer reduzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität einhergeht, wurde in vitro die SERCA2-katalysierte oxalat-stimulierte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate gemessen. Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht darauf, dass Oxalat-Anionen mit den  $\text{Ca}^{2+}$ -Kationen in SR Vesikeln schwer lösliches  $\text{Ca}^{2+}$ -Oxalat bilden. Die freie intravesikuläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bleibt dadurch niedrig, was den  $\text{Ca}^{2+}$ -Efflux vermindert und die Messung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportgeschwindigkeit verbessert. Außerdem ist die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportgeschwindigkeit in den ersten 4-5 min nach Reaktionsstart linear, was die Bestimmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität durch Messung in diesem linearen Zeitbereich ermöglicht. Um spezifisch nur den durch SERCA2 vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport zu messen, wurde die mito-

chondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport-ATPase-Aktivität mittels  $\text{NaN}_3$  unterdrückt. Die beobachtete linksventrikuläre Hypertrophie ging nicht mit einer statistisch signifikanten Abnahme der in vitro bestimmten oxalat-stimulierten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten einher. Dieser Befund entspricht Beobachtungen der Arbeit von Feldman et al., die bei Ratten eine Drucküberlast mittels Konstriktion der Aorta ascendens operativ induzierten. Kam es bei diesen Ratten zur linksventrikulären Hypertrophie, so fanden sich keine Veränderungen der SERCA2a-Expression. Einige Ratten entwickelten unter diesen Bedingungen nicht nur eine linksventrikuläre Hypertrophie, sondern auch Zeichen der Herzinsuffizienz. Eine verminderte SERCA2a-Genexpression beobachtete man nur bei Tieren mit Zeichen der Herzinsuffizienz<sup>84</sup>. In dieser Arbeit hingegen wurden alle Tiere unter Drucküberlast in die Auswertung einbezogen. Zobel et al. beobachteten ebenfalls keine Veränderungen der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität bei hypertensiven Renin-transgenen Tieren<sup>51</sup>.

In dieser Arbeit konnte bei Renin-transgenen Tieren auf mRNA-Ebene eine statistisch signifikante verminderte SERCA2a-Genexpression nachgewiesen werden. Flesch et al. zeigten bei 16 Wochen alten Renin-transgenen Tieren ebenfalls niedrigere SERCA2a-mRNA Spiegel<sup>87</sup>. Ein Vergleich mit der Feldman Arbeit zeigt, dass zwar auf molekularer Ebene die Herzen Zeichen der Insuffizienz aufwiesen, funktionell aber diese Veränderungen noch kompensiert werden konnten.

Die Arbeitsgruppe um Kranias untersuchte den Unterschied der SERCA2a-Proteinspiegel in Hamstern mit operativ induzierter Stenose der Aorta descendens. Es kam zu einer Abnahme der SERCA2a-Proteinspiegel in den Hamsterherzen mit Zeichen der Herzinsuffizienz, nicht jedoch in Hamsterherzen mit Stenose der Aorta descendens ohne jegliche Zeichen der Herzinsuffizienz<sup>88,89</sup>.

Cerutti et al. fanden in Microarray-Analysen keine Abnahme der SERCA2a-Expression in Renin-transgenen Tieren. Wurde die Genexpressionanalyse mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt wie in dieser Arbeit, so wurde allerdings eine statistisch signifikante Herunterregulierung beobachtet<sup>90</sup>. In 12 Wochen alten Renin-transgenen Tieren wurde eine 77%-ige Reduktion der SERCA2a-mRNA-Spiegel mittels Northern Blot nachgewiesen<sup>91</sup>. Diese Ergebnisse konnten bei 16 Wochen alten Renin-transgenen Tieren bestätigt werden<sup>92</sup>. Die hier nachgewiesene Abnahme der SERCA2a-mRNA-Spiegel bei 30 bis 34 Wochen alten Ren2-TG betrug 62%.

Neben Spezies, Dauer und Schwere der Drucküberlast sowie Zeitpunkt in der Entwicklungsphase spielt auch die Art und Weise, wie der pathophysiologische Phänotyp experimentell induziert wird, eine entscheidende Rolle und kann in verschiedenen Arbeiten zu Diskrepanzen bezüglich der Genexpression und der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase führen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Ratten entwickeln eine monogenetisch bedingte Hypertonie (unveröffentlichte Werte). Ein weiteres gut untersuchtes Tiermodell der Hypertonieforschung stellt die spontan hypertensive Ratte (SHR) dar<sup>93</sup>.

Die Herzen dieser Ratten weisen im ersten Jahr eine normale kardiale Funktion auf. Nach 18 bis 24 Monaten entwickeln die Tiere eine Herzinsuffizienz<sup>94,95</sup>. Auch in diesem Tiermodell kommt es zu Störungen des  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalts, es ist jedoch keine Abnahme der SERCA2a-Expression festzustellen<sup>95</sup>. Lammerich et al. stellten erhöhte oxalat-stimulierte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivitäten bei SHR im Vergleich zu nicht hypertensiven Kontrolltieren fest<sup>96</sup>.

Aber auch bei Gleichheit von Spezies, Tierstamm, und somit vermeintlichen gleichem genetischen Hintergrund, Geschlecht, Zeitpunkt und pathophysiologischem Hintergrund reagieren nicht alle Tiere auf dieselbe Art und Weise.

Nach 20 Wochen Drucküberlast, hervorgerufen durch eine operativ induzierte Stenose der Aorta ascendens, kristallisieren sich zwei verschiedene Gruppen heraus: Ratten mit Verringerung des linksventrikulären systolischen Drucks und Ratten ohne jegliche Veränderungen. Erstere entwickelten ebenfalls erhöhte linksventrikuläre Füllungsdrücke, eine reduzierte Ejektionsfraktion sowie klinische Zeichen der Herzinsuffizienz. Die linksventrikuläre Hypertrophie und Herzinsuffizienz in diesen Ratten ging mit einer verstärkten Expression des  $\beta$ -MHC Gens und des ANP-Gens einher. Eine verminderte SERCA2a-Expression beobachtete man nur bei Tieren mit Zeichen der Herzinsuffizienz<sup>97</sup>.

Diese Arbeiten zeigen, dass neben dem verwendeten Tiermodell der Zeitpunkt der Untersuchung, die Schwere der Drucküberlast, die Untersuchungsmethode sowie die Referenzgröße bei der Bestimmung der mRNA- und Proteinspiegel von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der Veränderungen von Expression und/oder Funktion der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase sind.

SERen-dTG wiesen statistisch signifikant höhere SERCA2a-Proteinspiegel auf als Ren2-TG. Dies führte jedoch funktionell nicht zu einer verbesserten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportrate. Diese deutet auf eine funktionelle Adaptation der zellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulation trotz eines verminderten SERCA2a-Gehalts hin. Dabei ist zu beachten, dass die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität nicht nur von der absoluten Menge an SERCA2a-Molekülen abhängt, sondern vor allem vom funktionellen Status der SR- $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase.

Der wichtigste Regulator der  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität und Aktivität der SERCA2a ist das pentamere Protein Phospholamban (PLN). Im nicht phosphorylierten Zustand vermindert es sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -Affinität als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität. Einschränkend ist zu erwähnen, dass in dieser Arbeit keine Messung des PLN-Phosphorylierungszustandes stattfand. Daher sind Untersuchungen der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität in Kenntnis der aktuellen PLN-Konzentration und PLN-Phosphorylierung zu bewerten. Überdies ist einschränkend zu erwähnen, dass bei sättigenden  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (in vitro) die SERCA2-Transportaktivität von PLN unabhängig ist. Auf mRNA wie auch auf Proteinebene fanden sich keine Veränderungen des SERCA2a-Inhibitors PLN zwischen Ren2-TG, SERen-dTG und NTG. Wie oben gezeigt eignet sich somit PLN unter diesen Versuchsbedingungen als Referenzgröße für SERCA2a. Diese Befunde bestätigen die derzeitigen Kenntnisse aus der Literatur<sup>98,99,100,101</sup>. Eine Herunterregulation der PLN-Expression wurde in humanen Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz beschrieben<sup>102</sup>. In Rattenherzen mit chronischer Drucküberlast wird jedoch keinerlei Veränderung der PLN-Expression beobachtet, weder während einer kompensierten Hypertrophie noch bei beginnender Herzinsuffizienz<sup>84</sup>. Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Es kam zu keiner statistisch signifikanten Reduktion der PLN-mRNA und Proteinspiegel unter Drucküberlast bei Ren2-TG und SERen-dTG im Vergleich zu NTG. Andere Arbeiten zeigten jedoch eine veränderte PLN-Expression unter Renin-vermittelter arterieller Hypertonie. In 12 Wochen alten Renin-transgenen Ratten stellten Flesch et al. um 67% niedrigere Phospholamban-mRNA Spiegel mittels Northernblot im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren fest<sup>49</sup>. In 12 bis 14 Wochen alten Renin-transgenen Ratten wurde ebenfalls eine Herunterregulation beobachtet<sup>83</sup>.

Bei der Beurteilung der mRNA- oder Proteinspiegel  $\text{Ca}^{2+}$ -modulierender Enzyme muss auch das Verhältnis vom Inhibitor oder auch Aktivator zum Transportenzym berücksich-

tigt werden. In verschiedenen Arbeiten konnte die Bedeutung der Stöchiometrie von SERCA2a zu PLN im kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt gezeigt werden<sup>103</sup>. Danach führt eine reduzierte SERCA2a-Expression bei gleichbleibender PLN-Expression zu einem verminderten molaren Verhältnis SERCA2a/PLN<sup>101</sup>.

Wurden die SERCA2a-Proteinspiegel auf PLN bezogen, so spiegelten diese die Verhältnisse der SERCA2a-Proteinbestimmungen bei männlichen Ren2-TG, SERen-dTG und NTG wieder. Auf funktioneller Ebene wurde der Oxalat-stimulierte SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transport untersucht. Das in der Abbildung 3.9 gezeigte höhere SERCA2a/PLN-Verhältnis bei SERen-dTG im Vergleich zu Ren2-TG ist statistisch signifikant. Wie Luo et al. und Kadambi et al. zeigen konnten, ist dieses Verhältnis für die Beladung des SR mit  $\text{Ca}^{2+}$  und damit für die SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität bestimmend<sup>104, 105, 106</sup>. Die in dieser Arbeit beobachtete Steigerung des SERCA2a/PLN Verhältnisses ging nicht mit einer erhöhten SR- $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität einher. Die Vergleichbarkeit der Messungen der oxalat-stimulierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität der isolierten SR-Vesikel setzt eine gleichmäßige Verteilung intakter Vesikel voraus, da nur der Netto- $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in die Vesikel gemessen wurde. Neben der gleichmäßigen Verteilung intakter Vesikel mit vergleichbarer Durchlässigkeit für Elektrolyte ist auch eine gleichmäßige Verteilung sog. Inside-Out-Vesikel und Right-side-Out-Vesikel zu berücksichtigen. Inside-Out-Vesikel stellen Vesikel dar, bei denen sich nach erfolgter Homogenisation und Zentrifugation und Re-Aggregation die Innenseite die Außenseite des Vesikel bildet und die Außenseite die Innenseite darstellt.

Als einem der wesentlichen der Herzinsuffizienz zugrunde liegenden Mechanismen, geht man von einer gestörten elektromechanischen Kopplung aus. Diese kann mit einer verminderten SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Beladung bei erhöhten diastolischen zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegeln einhergehen. Um den  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das SR zu erhöhen, kann man entweder die Anzahl an SERCA2-Molekülen erhöhen oder die Anzahl an SERCA2a-Inhibitoren senken. Mehrere Arbeiten konnten die benefitären Effekte einer am Tiermodell durch Gen-Knockout oder RNA-Interferenz experimentell hervorgerufenen PLN-Inhibition auf die kardiale Funktion zeigen<sup>107,108,109</sup>.

Unter Gleichgewichtsbedingungen entspricht die Menge an  $\text{Ca}^{2+}$ , die mittels NCX1 aus dem Zytosol transportiert wird, der Menge  $\text{Ca}^{2+}$ , die durch L-Typ- $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle in das Zy-

tosol des Kardiomyozyten gelangt. Neben der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase SERCA2a transportiert der sarkolemmale  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher NCX1  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem Zytosol. Dieser Transport in den Extrazellulärraum erfolgt im Austausch mit  $\text{Na}^+$  in einem Verhältnis von 3  $\text{Na}^+$  pro 1  $\text{Ca}^{2+}$ -Ion<sup>110</sup>. Von den drei in Säugetieren isolierten Isoformen (NCX1, NCX2 und NCX3) wird NCX1 in hohem Maße im Herzen exprimiert<sup>111</sup>. Die NCX1-Expression im linken Ventrikel variiert je nach Alter, Spezies und pathologischem Hintergrund. Hyperthyroidismus führt zu verminderten NCX1-mRNA-Spiegeln, Hypothyroidismus zu erhöhten NCX1-mRNA-Spiegeln in Rattenherzen<sup>110</sup>. Bei terminaler humaner Herzinsuffizienz wurde eine erhöhte NCX1-Genexpression und NCX1-Aktivität beobachtet. Es gibt allerdings auch Arbeiten, die dies nicht bestätigen<sup>112,113,114</sup>. Bei diesen Untersuchungen wurde die Northern-Blot-Technik angewandt. In der vorliegenden Arbeit fanden sich in allen drei Gruppen ähnlich hohe NCX1-mRNA-Spiegel. Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine erhöhte NCX1-Genexpression bei Ren2-TG im Vergleich zu NTG. Auf Proteinebene wurde keinerlei Unterschied zwischen Ren2-TG, SERen-dTG und NTG festgestellt.

Es kam weder zur NCX1 Herauf- noch zu einer Herunterregulierung bei der Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie. In einer anderen Arbeit am Drucküberlast-Tiermodell wurden hingegen erhöhte NCX-Spiegel beobachtet. Es handelte sich um eine experimentell induzierte Druckbelastung auf den rechten und nicht den linken Ventrikel<sup>69</sup>. Hierbei wurden die Veränderungen der NCX1-Genexpression bei akuter Drucküberlast auf den rechten Ventrikel bei Katzen untersucht. In dieser Arbeit handelt es sich hingegen um eine Form der chronischen Drucküberlast auf den linken Ventrikel bei Ratten<sup>115</sup>. Lammerich et al. wiesen bei Spontan Hypertensiven Ratten um 65% erhöhte NCX1-Aktivitäten nach. Dieser Anstieg der NCX-Aktivität ging jedoch mit einer 24%igen Steigerung der SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme-Aktivität einher.<sup>116</sup>

Es ist zu sagen, dass bei Drucküberlast durch Renin-vermittelte arterielle Hypertonie keinerlei Verbesserung auf makroskopischer, molekularer oder funktionaler Ebene durch ein zusätzliches SERCA2-Transgen nachgewiesen werden konnte. Es ist zu vermuten, dass die Effekte eines zusätzlichen SERCA2-Transgens erst bei manifester Herzinsuffizienz deutlich werden, wenn die gesenkten SERCA2a-mRNA Spiegel nicht mehr durch posttranslationale und funktionelle Veränderungen kompensiert werden



können. Ob diese Hypothese insbesondere bei der humanen Herzinsuffizienz zutrifft, stellt einen Gegenstand zukünftiger Forschungsvorhaben dar.

Es ist seit längerem bekannt, dass die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bei Frauen und Männern Unterschiede aufweist. Nicht nur bezüglich Inzidenz und Prävalenz der Hypertonie und der Herzinsuffizienz bestehen Unterschiede zwischen den Geschlechtern, sondern auch bezüglich der Ausprägung der Endorganschäden sowie der Formen der Herzinsuffizienz. Beispielsweise entwickeln Frauen mit Aortenklappenstenose eine geringgradigere Herzinsuffizienz bei gleicher mechanischer Belastung als Männer<sup>58,117</sup>. Trotz der hohen Prävalenz der diastolischen Dysfunktion in der weiblichen Bevölkerung wird dieser Form der Herzinsuffizienz weniger Aufmerksamkeit geschenkt als der bei Männern mittleren Alters vorherrschenden systolischen Dysfunktion<sup>118</sup>.

Wie oben erwähnt entwickeln Renin-transgene Tiere in der zehnten Lebenswoche maximale systolische Blutdruckwerte von 240 mmHg. Sowohl homozygote als auch heterozygote Tiere weisen einen sexuellen Dimorphismus auf. Kastration führt zu einer Reduktion des Blutdrucks männlicher Ratten auf Werte weiblicher Ratten. Gibt man weiblichen transgenen Ratten Androgene, so steigen deren Werte auf das Niveau ihrer männlichen Vergleichsgruppe<sup>119,120</sup>. Die linksventrikuläre Hypertrophie der Renin-transgenen Tiere korreliert mit dem Alter und dem Geschlecht, wobei weibliche transgene Tiere eine geringere linksventrikuläre Hypertrophie aufweisen<sup>121</sup>. In verschiedenen anderen transgenen Tiermodellen der linksventrikulären Hypertrophie wiesen weibliche Tiere Zeichen der Herzinsuffizienz zu einem späteren Zeitpunkt auf und verstarben zu einem späteren Zeitpunkt als die männliche Vergleichsgruppe<sup>122,123</sup>. Daher wurden in dieser Arbeit die Effekte eines zusätzlichen SERCA2-Transgens auf ausgewählte Marker der kardialen  $Ca^{2+}$ -Homöostase bei weiblichen und männlichen Tiere mit arterieller Hypertonie untersucht.

Zu welchem Zeitpunkt die geschlechtsabhängigen Unterschiede anfangen eine Rolle zu spielen, ist derzeit noch nicht hinreichend erforscht. Auch ist noch unklar unter welchen experimentellen Bedingungen ein Vorteil weiblicher Ratten erhalten bleibt und inwieweit zwischen den einzelnen Tierspezies und den verschiedenen Tierstämmen Unterschiede bestehen. Mittels Konstriktion des Aortenbogens induzierter moderater Drucküberlast, entwickeln männliche Ratten eine stärker ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie

und weisen eine verminderte kontraktile Reserve im Vergleich zu weiblichen Ratten auf<sup>122,123</sup>. Dieser Effekt wird auch bei Mäusen mit schwerwiegender linksventrikulärer Drucküberlast beobachtet<sup>124</sup>. Die bei Renintransgenen- Ratten beobachteten geschlechtsabhängigen Unterschiede in Hypertonie und Proteinurie wurden auch in anderen Tiermodellen der Hypertonie beobachtet<sup>125</sup>. Der Verlust ovarieller Hormone nach der Menopause oder nach Oophrektomie stellt einen wesentlichen Risikofaktor für die Entwicklung einer diastolischen Dysfunktion als Vorläufer der diastolischen Herzinsuffizienz dar<sup>105</sup>. An weiblichen Renin-transgenen Ratten wurden nach Oophrektomie bei normaler Salzdiät eine eingeschränkte Relaxation und erhöhte linksventrikuläre Füllungsdrücke beobachtet. Die höhergradige diastolische Dysfunktion ging mit verstärkter Fibrose wie auch verstärkter Aldosteronsekretion einher<sup>126</sup>. Diese Arbeiten fanden an den mRen(2).Lewis-Ratten statt, die durch Verpaarung der ursprünglichen mRen(2)-Ratten des Tierstamms Sprague Dawley mit Lewis Ratten über neun Generation entstanden sind. Im Unterschied zu den mRen(2) Sprague Dawley Ratten entwickeln die Renin-transgenen Lewis Ratten eine geringere renale Schädigung und keine maligne Hypertonie<sup>127</sup>.

Es liegen demzufolge nicht nur im Hinblick auf Prävalenz und Altersverteilung der Hypertonie, linksventrikulären Hypertrophie sowie der Herzinsuffizienz geschlechtsabhängige Unterschiede vor. Auch die sich hinter den Symptomen und Krankheitsbildern verborgene Pathophysiologie und damit auch das Ansprechen auf die entsprechende Therapie weist Gemeinsamkeiten aber auch Diskrepanzen zwischen den Geschlechtern auf<sup>128</sup>. Weibliche Ren2-transgene Ratten wiesen eine weniger ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie auf, was ältere Befunde bestätigen<sup>121</sup>. Auf molekularer Ebene zeigte sich bei weiblichen Tieren eine erhöhte SERCA2a-Expression. Dies ging mit einer höheren  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportgeschwindigkeit einher, was auf eine erhöhte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportreserve schließen lässt.

Diese im Vergleich zu männlichen Ren2 und SERen-dTG bessere Funktion ist zum Teil durch den niedrigeren Blutdruck bei weiblichen Tieren zu erklären. Die Veränderungen der am  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt des Kardiomyozyten beteiligten Komponenten gehen mit niedrigeren mRNA-Spiegeln des Hypertrophie Markers ANP einher. Die Frage, ob weibliche Ren2-transgene Tiere über eine bessere Blutdruckregulation hinaus weitere adaptive

Mechanismen entwickeln, die in der Lage sind, die durch die arterielle Hypertonie hervorgerufenen Endorganschäden am Herzen zu modifizieren, bleibt offen.

Ähnliche Beobachtungen wurden auch an Mausmodellen gemacht<sup>129</sup>. Diese Arbeitsgruppe untersuchte vor allem die zeitabhängigen Unterschiede zwischen den Geschlechtern bezüglich der kardialen Dysfunktion. In diesem Mausmodell mit Drucküberlasthypertrophie zeigten sich nach zwei Wochen keine geschlechtsabhängigen Unterschiede. Nach neun Wochen jedoch traten kardiale Funktionsunterschiede auf. Die Drucküberlast wurde mittels operativer Konstriktion des Aortenbogens erreicht. Der klassische Marker der Hypertrophie ANP war bei beiden Geschlechtern vergleichbar erhöht<sup>129</sup>. Allerdings fanden die Messungen der mRNA-Spiegel nach zwei Wochen der Drucküberlast statt, zu einem Zeitpunkt also zu dem noch keine geschlechtsabhängigen Unterschiede bezüglich der Hämodynamik bestanden.

## 4.2 Limitierungen

Bei der Interpretation der hier erhobenen Daten sind Vorteile und Nachteile des Tiermodells "Ratte" für Untersuchungen der Herzinsuffizienz zu berücksichtigen. Dies gilt umso mehr, will man die Ergebnisse mit anderen Tierspezies vergleichen oder sogar auf den Menschen übertragen. Die Ratte als Tiermodell kardiovaskulärer Erkrankungen weist einige Vorteile gegenüber anderen Tierarten auf. Tierversuche an Ratten sind relativ kostengünstig, Ratten weisen eine kurze Generationsdauer auf und demzufolge kann kurzer Zeit eine relativ große Studienpopulation generiert werden. Allerdings bestehen einige grundlegende Unterschiede zwischen der humanen Herzfunktion und der der Ratte.

Ratten weisen im Gegensatz zum Menschen ein kurzes Aktionspotential auf, welches meist ohne Plateauphase verläuft. Der SERCA2a-vermittelte  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport in das Lumen des SR spielt bei jeder Herzaktion die herausragende Rolle für die Absenkung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen auf diastolische Werte. Nach Schätzungen gelangen bei Ratten 90% des transportierten  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR und beim Menschen ca.70%<sup>6</sup>.

SERCA2a ist das meist abundante Protein im SR und macht 40% des gesamten SR Proteingehalts aus. NCX1 spielt quantitativ in der Ratte eine untergeordnete Rolle für

die zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase<sup>130,131</sup>. Allerdings bestehen zwischen einzelnen Herzkompartimenten Unterschiede<sup>132</sup>. In Nagetieren findet man doppelt so hohe SERCA2-Spiegel im Atrium im Vergleich zum Ventrikel, während die atrialen PLN-Spiegel 20 bis 25% des Ventrikelgehalts betragen<sup>133</sup>.

Dies geht mit einer kürzeren Kontraktion und schnelleren Relaxation in den Vorhöfen im Vergleich zu den Kammern einher. So basieren beispielsweise die Unterschiede der atrialen und ventrikulären Reaktion auf beta-adrenerge Stimulation auf diesen unterschiedlichen SERCA2a- und PLN- Proteinspiegeln<sup>133</sup>.

Im gesunden Rattenherzen wird vor allem die  $\alpha$ -myosin heavy chain ( $\alpha$ -MHC) Isoform exprimiert. Unter hämodynamischer Last oder bei humoralen Veränderungen kommt es zu einer Verschiebung in Richtung  $\beta$ -Isoform. Die Ruheherzfrequenz ist ungefähr fünfmal höher als die des Menschen und in den meisten Untersuchungen wurde eine inverse Kraft-Frequenz Beziehung nachgewiesen. Es lässt sich sagen, dass trotz vieler Übereinstimmungen auch wichtige Unterschiede in der kardialen Physiologie der Ratte und des Menschen vorliegen<sup>85,130</sup>.

Einen weiteren entscheidenden Faktor neben der Spezies stellt der Zeitpunkt dar, an dem die Genexpressionsanalyse im Verlauf der Erkrankung bzw. des pathophysiologischen Kontinuums stattfindet. An einem Herzinfarkt-Tiermodell beobachtet man eine kontinuierliche Abnahme der SERCA2a-mRNA-Spiegel mit Zunahme des Zeitintervalls nach der Ligatur des Ramus interventricularis anterior<sup>134</sup>.

Zwar wurde in einigen Arbeiten ein verminderter SERCA2a-Gehalt in Herzen beobachtet, die wegen einer terminalen Herzinsuffizienz bei der Herztransplantation entnommen wurden, jedoch ist durch die langjährige Multimedikation der Einfluss anderer Faktoren groß. Auch bleibt damit die Frage offen, ob die SERCA2a-Herunterregulation eine deletäre Folge der Herzinsuffizienz ist, oder ob eine verminderte SERCA2a-Expression zur Herzinsuffizienz beigetragen hat oder die verminderte SERCA2a-Expression ein Kompensationsmechanismus des Kardiomyozyten darstellt.

Dieser Frage ging kürzlich Schultz et al. nach. Sie wiesen nach, dass SERCA2 +/- Knockout-Mäuse mit vermindertem SERCA2a-Gehalt zu einem früheren Zeitpunkt Zei-

chen der Herzinsuffizienz bei chronischer Drucküberlast entwickeln als die Wildtyp-Kontrollgruppe<sup>135</sup>.

Bei der Erforschung der Pathophysiologie des Übergangs von der linksventrikulären Hypertrophie hin zur Herzinsuffizienz bietet die Ratte auf Grund oben genannter Charakteristika Vorteile. Es sei an dieser Stelle nur auf die kurze Generationsdauer hingewiesen. Allerdings weisen Tiermodelle der Herzinsuffizienz auch entscheidende Unterschiede zur Entwicklung der humanen Herzinsuffizienz auf.

Erstens kommt es meist zu einem abrupten Beginn der pathophysiologischen Bedingungen, beispielsweise infolge eines experimentell-chirurgischen Eingriffs. Zweitens entwickelt sich im Tiermodell die Herzinsuffizienz meist bei jungen erwachsenen Tieren und nicht erst im fortgeschrittenen Alter wie beim Menschen. Die Prävalenz kardiovaskulärer Erkrankungen nimmt beim Menschen mit dem Alter zu und ist vor dem 50. Lebensjahr eher selten anzutreffen.

Der überwiegende Teil der Tiermodelle der Herzinsuffizienz weist meist nicht die unter anderem durch die Framingham-Studien nachgewiesenen Risikofaktoren wie Atherosklerosis, Adipositas, Diabetes Mellitus oder arterielle Hypertonie auf<sup>136</sup>.

Laut Muders und Elsner sind für ein Tiermodell der Herzinsuffizienz folgende Bedingungen zu erfüllen:

1. Das Tiermodell sollte so weit wie möglich der humanen Herzinsuffizienz ähneln.
2. Die Gründe sollten sich ähneln.
3. Es sollte Studien in einem chronisch stabilen Zustand zulassen.
4. Das Modell sollte es erlauben, Symptome hervorzurufen, die vorhersehbar und kontrollierbar sind.
5. Relevante kardiovaskuläre, biochemische und hämodynamische Parameter sollten messbar sein.
6. Es sollte finanziell und technisch machbar sein.

7. Das Modell muss mit den Richtlinien des Tierschutzes konform gehen..

Die in dieser Arbeit verwendeten Modelle der Drucküberlast, systemisch wie auch lokal, erfüllen die letzten fünf Kriterien. Bezüglich des zweiten Kriteriums lässt sich folgendes sagen: Das transgene Modell der Hypertonie mRen2 ist ein mit einem zusätzlichen Renin-Gen der Maus einhergehendes monogenetisches Tiermodell der Ratte<sup>16</sup>. Allerdings weist nur ca. ein Zehntel der Patienten einen sekundären Hypertonus auf. Die primäre Hypertonie, welche den Großteil ausmacht, kann auch in Niedrig- und Hoch-Renin- Hypertonie untergliedert werden. So ist mit diesem Modell nur eine dieser zwei Entitäten repräsentiert.

### 4.3 Ausblick

Auf Grund der oben erläuterten herausragenden Rolle der Störungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in Kardiomyozyten insuffizienter Herzen sind auf experimenteller Ebene mehrere Ansätze der therapeutischen Verbesserung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase entstanden. In dieser Arbeit wurden Tiere mit einem von Geburt an vorhandenem Transgen untersucht. Es wurden keine deletären Effekte beobachtet. In einer anderen Arbeit wurde bei SERCA2-transgenen Tieren ein durch Streptozocin induzierter Diabetes Mellitus hervorgerufen. Hierbei konnte bei SERCA2-transgenen Tieren eine partielle Normalisierung der kardialen  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase im Vergleich zu nicht-transgenen Tieren mit Diabetes Mellitus nachgewiesen werden<sup>53</sup>. Erste therapeutische Interventionen zu Erhöhung der kardialen SERCA2a-Spiegel zeigten im Tierversuch erfolgversprechende Ergebnisse, u.a. auch im Hinblick auf das Überleben. Dies lässt sich beispielsweise durch den Adenovirus-assoziierten Virus Typ I, der das SERCA2a-Gen trägt, erreichen. Daher wurde die erste Phase I- und I -Studie mit SERCA2a-tragenden Adenovirus-assoziierten Viren begonnen<sup>109</sup>.

## 5 Zusammenfassung

Die arterielle Hypertonie und die koronare Herzkrankheit stellen in Europa die am häufigsten zur Herzinsuffizienz führenden Krankheitsbilder dar<sup>2,3</sup>. Auch wenn die Herzinsuffizienz ein Syndrom darstellt und sich in unterschiedlichen Formen präsentiert, so sind doch in den letzten Jahren Gemeinsamkeiten in der pathophysiologischen Endstrecke erarbeitet worden. Hierunter kommt den Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase des Myokards eine Schlüsselrolle zu, da sie direkten Einfluss auf die Kontraktion und Relaxation und somit auf die systolische und diastolische Funktion haben<sup>9,11,12</sup>. Auf molekularer Ebene beobachtet man Umstellungen in der kardialen Expression funktionell wichtiger Gene. Eine Abnahme von SERCA2a-Expression und SERCA2a-vermittelter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese der chronischen Herzinsuffizienz. Daher sollten geeignete präventive bzw. therapeutische Interventionen zur Verbesserung der SERCA2a-vermittelten  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität funktionell wichtige Prozesse wie Kontraktilität, Relaxation, elektromechanische Kopplung und Genregulation langfristig positiv beeinflussen können<sup>69,70</sup>. Hiervon ausgehend wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die zusätzliche Expression eines SERCA2-Transgens in hypertensiven Renin-transgenen Ratten Einfluss auf die linksventrikuläre (LV) Hypertrophie, die kardiale Expression von Biomarkern der LV Hypertrophie sowie die Expression und Funktion des SERCA2/Phospholamban (PLN)-Systems hat. Die vergleichenden Untersuchungen an LV Proben von 30-34 Wochen alten männlichen heterozygoten Renin-transgenen Ratten (Ren2-TG) und doppelt transgenen SERCA2/Ren2-Tieren (SERen-dTG) wurden durch ausgewählte Analysen entsprechenden Proben weiblicher Tiere ergänzt. Als Kontrollgruppen dienten LV Proben normotensiver nicht-transgener Ratten (NTG) gleichen Alters und Geschlechts.

Bei männlichen Tieren hatte die Expression des SERCA2a-Transgens keinen Einfluß auf die Hypertonie-bedingte linksventrikuläre Hypertrophie. So betrug die signifikante Zunahme der LV Masse im Vergleich zu normotensiven NTG bei Ren2-TG 23%. Zwischen Ren2-TG und SERen-dTG bestand kein signifikanter Unterschied. Auf molekularer Ebene war das assoziiert mit vergleichbar erhöhten mRNA-Spiegeln des Hypertrophie-Biomarkers Atriales Natriuretisches Peptid (ANP) bei Ren2-TG (+990% vs. NTG,  $p < 0.05$ ) und SERen-dTG (+820% vs. NTG,  $p < 0.05$ ). Funktionell unterschieden sich die

in vitro in LV Membranpräparaten gemessenen SERCA2a-vermittelte SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportraten zwischen SERen-dTG (-13% vs NTG) und Ren2-TG (-17% vs NTG) nicht. Allerdings wurde eine Abnahme der immunreaktiven SERCA2a-Proteinspiegel in Ren2-TG um 34% ( $p < 0.05$  vs. NTG) durch die Expression des SERCA2a-Transgens in SERen-dTG kompensiert, so dass NTG und SERen-dTG vergleichbare SERCA2a-Spiegel aufwiesen. Für den zusätzlich bestimmten SERCA2a/PLN-Proteinquotienten ergaben sich vergleichbare Gruppenunterschiede. Im Vergleich zu NTG war dieser Quotient in Ren2-TG um mehr als 20% vermindert ( $p < 0,05$ ), während sich die entsprechenden Werte von NTG und SERen-dTG nicht signifikant unterschieden. Wie bei männlichen Tiere, hatte die zusätzliche Expression der SERCA2-Transgens bei weiblichen SERen-dTG weder Einfluß auf die LV-Masse noch auf die SR  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportaktivität.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass bei chronischer Drucküberlast im untersuchten Rattenmodell mit Renin-vermittelter arterieller Hypertonie die beobachtete Abnahme der kardialen SERCA2a-Proteinspiegel in Ren2-TG durch zusätzliche Expression eines SERCA2a-Transgens kompensiert werden kann. Entsprechende zu erwartende günstige funktionelle Konsequenzen bezüglich des SERCA2a-vermittelten Transportes von  $\text{Ca}^{2+}$  in das SR konnten nicht nachgewiesen werden.



## Schriftenverzeichnis

- 1 Lawes CMM, Vander Hoorn S, Rodgers A. Global burden of blood-pressure-related disease, 2001. *Lancet* 2008; **371**: 1513–8.
- 2 Liew C-C, Dzau VJ. Molecular genetics and genomics of heart failure. *Nat Rev Genet* 2004; **5**: 811–25.
- 3 Hoppe UC, Böhm M, Dietz R, *et al.* [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z Kardiol* 2005; **94**: 488–509.
- 4 Müller DN, Luft FC. Direct renin inhibition with aliskiren in hypertension and target organ damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 2006; **1**: 221–8.
- 5 Pogwizd SM, Schlotthauer K, Li L, Yuan W, Bers DM. Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ Res* 2001; **88**: 1159–67.
- 6 Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 2002; **415**: 198–205.
- 7 Gomperts B, Kramer I, Tatham P. Calcium and signal transduction. In: *Signal Transduction*, 1st ed. London, Elsevier Academic Press, 2003.
- 8 Roden DM, Balsler JR, George AL Jr, Anderson ME. Cardiac ion channels. *Annu Rev Physiol* 2002; **64**: 431–75.
- 9 Zühlke RD, Pitt GS, Deisseroth K, Tsien RW, Reuter H. Calmodulin supports both inactivation and facilitation of L-type calcium channels. *Nature* 1999; **399**: 159–62.
- 10 Díaz ME, Graham HK, O'Neill SC, Trafford AW, Eisner DA. The control of sarcoplasmic reticulum Ca content in cardiac muscle. *Cell Calcium* 2005; **38**: 391–6.
- 11 Gill DL, Spassova MA, Soboloff J. Signal transduction. Calcium entry signals--trickles and torrents. *Science* 2006; **313**: 183–4.
- 12 Shannon TR, Ginsburg KS, Bers DM. Reverse mode of the sarcoplasmic reticulum calcium pump and load-dependent cytosolic calcium decline in voltage-clamped cardiac ventricular myocytes. *Biophys J* 2000; **78**: 322–33.
- 13 Tigerstedt R, Bergmann P. Niere und Kreislauf. *Skand Arch Physiol* 1898; **8**: 223–71.
- 14 Luft FC. A brief history of renin. *J Mol Med* 2008; **86**: 611–3.
- 15 Rougeon F, Chambraud B, Foote S, Panthier JJ, Nageotte R, Corvol P. Molecular cloning of a mouse submaxillary gland renin cDNA fragment. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981; **78**: 6367–71.

- 16 Mullins JJ, Peters J, Ganten D. Fulminant hypertension in transgenic rats harbouring the mouse Ren-2 gene. *Nature* 1990; **344**: 541–4.
- 17 Bader M, Ganten D. Update on tissue renin-angiotensin systems. *J Mol Med* 2008; **86**: 615–21.
- 18 Tipnis SR, Hooper NM, Hyde R, Karran E, Christie G, Turner AJ. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 2000; **275**: 33238–43.
- 19 Donoghue M, Hsieh F, Baronas E, *et al.* A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. *Circ Res* 2000; **87**: E1–9.
- 20 Ganten D, Marquez-Julio A, Granger P, *et al.* Renin in dog brain. *Am J Physiol* 1971; **221**: 1733–7.
- 21 Paul M, Poyan Mehr A, Kreutz R. Physiology of local renin-angiotensin systems. *Physiol Rev* 2006; **86**: 747–803.
- 22 Warner FJ, Smith AI, Hooper NM, Turner AJ. Angiotensin-converting enzyme-2: a molecular and cellular perspective. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 2704–13.
- 23 Li W, Moore MJ, Vasilieva N, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature* 2003; **426**: 450–4.
- 24 Nguyen G, Delarue F, Berrou J, Rondeau E, Sraer JD. Specific receptor binding of renin on human mesangial cells in culture increases plasminogen activator inhibitor-1 antigen. *Kidney Int* 1996; **50**: 1897–903.
- 25 Nguyen G, Burckle C, Sraer J-D. The renin receptor: the facts, the promise and the hope. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2003; **12**: 51–5.
- 26 Jeunemaitre X. Genetics of the human renin angiotensin system. *J Mol Med* 2008; **86**: 637–41.
- 27 Mansego ML, Redon J, Marin R, *et al.* Renin polymorphisms and haplotypes are associated with blood pressure levels and hypertension risk in postmenopausal women. *J Hypertens* 2008; **26**: 230–7.
- 28 Crackower MA, Sarao R, Oudit GY, *et al.* Angiotensin-converting enzyme 2 is an essential regulator of heart function. *Nature* 2002; **417**: 822–8.
- 29 Apell H-J. Structure-function relationship in P-type ATPases--a biophysical approach. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 2003; **150**: 1–35.
- 30 Hasenfuss G. Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc Res* 1998; **37**: 279–89.

- 31 Delbridge LM, Satoh H, Yuan W, *et al.* Cardiac myocyte volume, Ca<sup>2+</sup> fluxes, and sarcoplasmic reticulum loading in pressure-overload hypertrophy. *Am J Physiol* 1997; **272**: H2425–2435.
- 32 Toyoshima C, Nakasako M, Nomura H, Ogawa H. Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution. *Nature* 2000; **405**: 647–55.
- 33 Rossi AE, Dirksen RT. Sarcoplasmic reticulum: the dynamic calcium governor of muscle. *Muscle Nerve* 2006; **33**: 715–31.
- 34 Gélébart P, Martin V, Enouf J, Papp B. Identification of a new SERCA2 splice variant regulated during monocytic differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **303**: 676–84.
- 35 Dode L, Wuytack F, Kools PF, *et al.* cDNA cloning, expression and chromosomal localization of the human sarco/endoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase 3 gene. *Biochem J* 1996; **318 ( Pt 2)**: 689–99.
- 36 Gianni D, Chan J, Gwathmey JK, del Monte F, Hajjar RJ. SERCA2a in heart failure: role and therapeutic prospects. *J Bioenerg Biomembr* 2005; **37**: 375–80.
- 37 Verboomen H, Wuytack F, De Smedt H, Himpens B, Casteels R. Functional difference between SERCA2a and SERCA2b Ca<sup>2+</sup> pumps and their modulation by phospholamban. *Biochem J* 1992; **286 ( Pt 2)**: 591–5.
- 38 MacLennan DH, Green NM. Structural biology. Pumping ions. *Nature* 2000; **405**: 633–4.
- 39 Gordon JW, Ruddle FH. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* 1981; **214**: 1244–6.
- 40 Fabian JR, Field LJ, McGowan RA, Mullins JJ, Sigmund CD, Gross KW. Allele-specific expression of the murine Ren-1 genes. *J Biol Chem* 1989; **264**: 17589–94.
- 41 Mullins JJ, Sigmund CD, Kane-Haas C, Gross KW, McGowan RA. Expression of the DBA/2J Ren-2 gene in the adrenal gland of transgenic mice. *EMBO J* 1989; **8**: 4065–72.
- 42 Bader M, Zhao Y, Sander M, *et al.* Role of tissue renin in the pathophysiology of hypertension in TGR(mREN2)<sup>27</sup> rats. *Hypertension* 1992; **19**: 681–6.
- 43 Peters J, Münter K, Bader M, Hackenthal E, Mullins JJ, Ganten D. Increased adrenal renin in transgenic hypertensive rats, TGR(mREN2)<sup>27</sup>, and its regulation by cAMP, angiotensin II, and calcium. *J Clin Invest* 1993; **91**: 742–7.
- 44 Sander M, Bader M, Djavidani B, *et al.* The role of the adrenal gland in hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)<sup>27</sup>. *Endocrinology* 1992; **131**: 807–14.
- 45 Cerutti C, Kurdi M, Bricca G, *et al.* Transcriptional alterations in the left ventricle of three hypertensive rat models. *Physiol Genomics* 2006; **27**: 295–308.

- 46 Bachmann S, Peters J, Engler E, Ganten D, Mullins J. Transgenic rats carrying the mouse renin gene--morphological characterization of a low-renin hypertension model. *Kidney Int* 1992; **41**: 24–36.
- 47 Paul M, Pinto YM, Schunkert H, Ganten D, Böhm M. Activation of the renin-angiotensin system in heart failure and hypertrophy--studies in human hearts and transgenic rats. *Eur Heart J* 1994; **15 Suppl D**: 63–7.
- 48 Böhm M, Lee M, Kreutz R, *et al.* Angiotensin II receptor blockade in TGR(mREN2)27: effects of renin-angiotensin-system gene expression and cardiovascular functions. *J Hypertens* 1995; **13**: 891–9.
- 49 Flesch M, Schiffer F, Zolk O, *et al.* Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* 1997; **30**: 383–91.
- 50 Rothermund L, Pinto YM, Vetter R, *et al.* Effects of angiotensin II subtype 1 receptor blockade on cardiac fibrosis and sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling in hypertensive transgenic rats overexpressing the Ren2 gene. *J Hypertens* 2001; **19**: 1465–72.
- 51 Zobel C, Brixius K, Pietsch M, Münch G, Böck B, Schwinger RH. Unchanged sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase activity, reduced Ca<sup>2+</sup> sensitivity, and negative force-frequency relationship in transgenic rats overexpressing the mouse renin gene. *J Mol Med* 1998; **76**: 533–44.
- 52 He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, *et al.* Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J Clin Invest* 1997; **100**: 380–9.
- 53 Vetter R, Rehfeld U, Reissfelder C, *et al.* Transgenic overexpression of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase improves reticular Ca<sup>2+</sup> handling in normal and diabetic rat hearts. *FASEB J* 2002; **16**: 1657–9.
- 54 Vetter R, Rehfeld U, Reissfelder C, Fechner H, Seppet E, Kreutz R. Decreased cardiac SERCA2 expression, SR Ca uptake, and contractile function in hypothyroidism are attenuated in SERCA2 overexpressing transgenic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; **300**: H943–950.
- 55 Tschöpe C, Spillmann F, Rehfeld U, *et al.* Improvement of defective sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> transport in diabetic heart of transgenic rats expressing the human kallikrein-1 gene. *FASEB J* 2004; **18**: 1967–9.
- 56 Aurigemma GP, Gaasch WH. Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle. *Cardiology* 1995; **86**: 310–7.
- 57 Villari B, Campbell SE, Schneider J, Vassalli G, Chiariello M, Hess OM. Sex-dependent differences in left ventricular function and structure in chronic pressure overload. *Eur Heart J* 1995; **16**: 1410–9.

- 
- 58 Kitzman DW, Little WC, Brubaker PH, *et al.* Pathophysiological characterization of isolated diastolic heart failure in comparison to systolic heart failure. *JAMA* 2002; **288**: 2144–50.
- 59 Dash R, Frank KF, Carr AN, Moravec CS, Kranias EG. Gender influences on sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-handling in failing human myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2001; **33**: 1345–53.
- 60 Reiken S, Wehrens XHT, Vest JA, *et al.* Beta-blockers restore calcium release channel function and improve cardiac muscle performance in human heart failure. *Circulation* 2003; **107**: 2459–66.
- 61 Loughrey CM, Seidler T, Miller SLW, *et al.* Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation-contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes. *J Physiol (Lond)* 2004; **556**: 919–34.
- 62 Milano CA, Allen LF, Rockman HA, *et al.* Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science* 1994; **264**: 582–6.
- 63 Tevæearai HT, Eckhart AD, Walton GB, Keys JR, Wilson K, Koch WJ. Myocardial gene transfer and overexpression of beta2-adrenergic receptors potentiates the functional recovery of unloaded failing hearts. *Circulation* 2002; **106**: 124–9.
- 64 Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, *et al.* Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation* 2000; **101**: 1707–14.
- 65 Hajjar RJ, Kang JX, Gwathmey JK, Rosenzweig A. Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation* 1997; **95**: 423–9.
- 66 del Monte F, Harding SE, Schmidt U, *et al.* Restoration of contractile function in isolated cardiomyocytes from failing human hearts by gene transfer of SERCA2a. *Circulation* 1999; **100**: 2308–11.
- 67 Jessup M, Greenberg B, Mancini D, *et al.* Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): a phase 2 trial of intracoronary gene therapy of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase in patients with advanced heart failure. *Circulation* 2011; **124**: 304–13.
- 68 Suckau L, Fechner H, Chemaly E, *et al.* Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy. *Circulation* 2009; **119**: 1241–52.
- 69 Kent RL, Rozich JD, McCollam PL, *et al.* Rapid expression of the Na(+)-Ca<sup>2+</sup> exchanger in response to cardiac pressure overload. *Am J Physiol* 1993; **265**: H1024–1029.

- 
- 70 del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, *et al.* Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 5622–7.
- 71 Vetter R, Studer R, Reinecke H, Kolár F, Ostádalová I, Drexler H. Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-exchanger and SERCA2 in rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; **27**: 1689–701.
- 72 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; **162**: 156–9.
- 73 Wong ML, Medrano JF. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques* 2005; **39**: 75–85.
- 74 Kawase Y, Ly HQ, Prunier F, *et al.* Reversal of cardiac dysfunction after long-term expression of SERCA2a by gene transfer in a pre-clinical model of heart failure. *J Am Coll Cardiol* 2008; **51**: 1112–9.
- 75 Beuckelmann DJ, Näbauer M, Erdmann E. Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation* 1992; **85**: 1046–55.
- 76 Houser SR, Piacentino V 3rd, Weisser J. Abnormalities of calcium cycling in the hypertrophied and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 2000; **32**: 1595–607.
- 77 Takimoto E, Yao A, Toko H, *et al.* Sodium calcium exchanger plays a key role in alteration of cardiac function in response to pressure overload. *FASEB J* 2002; **16**: 373–8.
- 78 Pinto YM, Buikema H, van Gilst WH, *et al.* Cardiovascular end-organ damage in Ren-2 transgenic rats compared to spontaneously hypertensive rats. *J Mol Med* 1997; **75**: 371–7.
- 79 Böhm M, Moll M, Schmid B, *et al.* Beta-adrenergic neuroeffector mechanisms in cardiac hypertrophy of renin transgenic rats. *Hypertension* 1994; **24**: 653–62.
- 80 Lee MA, Böhm M, Paul M, Bader M, Ganten U, Ganten D. Physiological characterization of the hypertensive transgenic rat TGR(mREN2)<sup>27</sup>. *Am J Physiol* 1996; **270**: E919–929.
- 81 Zolk O, Flesch M, Nickenig G, Schnabel P, Böhm M. Alteration of intracellular Ca<sup>2+</sup>-handling and receptor regulation in hypertensive cardiac hypertrophy: insights from Ren2-transgenic rats. *Cardiovasc Res* 1998; **39**: 242–56.
- 82 Szymanska G, Strömer H, Kim DH, Lorell BH, Morgan JP. Dynamic changes in sarcoplasmic reticulum function in cardiac hypertrophy and failure. *Pflugers Arch* 2000; **439**: 339–48.

- 83 Holtz J, Studer R, Reinecke H, Just H, Drexler H. Modulation of myocardial sarcoplasmic reticulum Ca(++)-ATPase in cardiac hypertrophy by angiotensin converting enzyme? *Basic Res Cardiol* 1992; **87 Suppl 2**: 191–204.
- 84 Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, Lorell BH. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* 1993; **73**: 184–92.
- 85 Hasenfuss G. Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 1998; **39**: 60–76.
- 86 Steen AM, Luthman H, Hellgren D, Lambert B. Levels of hypoxanthine phosphoribosyltransferase RNA in human cells. *Exp Cell Res* 1990; **186**: 236–44.
- 87 Flesch M, Schiffer F, Zolk O, *et al.* Angiotensin receptor antagonism and angiotensin converting enzyme inhibition improve diastolic dysfunction and Ca(2+)-ATPase expression in the sarcoplasmic reticulum in hypertensive cardiomyopathy. *J Hypertens* 1997; **15**: 1001–9.
- 88 Kiss E, Ball NA, Kranias EG, Walsh RA. Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase protein levels. Effects on Ca<sup>2+</sup> transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ Res* 1995; **77**: 759–64.
- 89 Wellner M, Dechend R, Park J-K, *et al.* Cardiac gene expression profile in rats with terminal heart failure and cachexia. *Physiol Genomics* 2005; **20**: 256–67.
- 90 Cerutti C, Kurdi M, Bricca G, *et al.* Transcriptional alterations in the left ventricle of three hypertensive rat models. *Physiol Genomics* 2006; **27**: 295–308.
- 91 Flesch M, Schiffer F, Zolk O, *et al.* Contractile systolic and diastolic dysfunction in renin-induced hypertensive cardiomyopathy. *Hypertension* 1997; **30**: 383–91.
- 92 Villarreal FJ, MacKenna DA, Omens JH, Dillmann WH. Myocardial remodeling in hypertensive Ren-2 transgenic rats. *Hypertension* 1995; **25**: 98–104.
- 93 OKAMOTO K, AOKI K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 1963; **27**: 282–93.
- 94 Samani NJ, Swales JD, Jeffreys AJ, *et al.* DNA fingerprinting of spontaneously hypertensive and Wistar-Kyoto rats: implications for hypertension research. *J Hypertens* 1989; **7**: 809–16.
- 95 Bing OH, Brooks WW, Conrad CH, Sen S, Perreault CL, Morgan JP. Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during the transition to heart failure. *Circ Res* 1991; **68**: 1390–400.
- 96 Lammerich A, Günther J, Pfitzer G, Storch E, Vetter R. Alterations of cardiac contractile function are related to changes in membrane calcium transport in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1995; **13**: 1313–24.

- 97 Weinberg EO, Schoen FJ, George D, *et al.* Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aortic stenosis. *Circulation* 1994; **90**: 1410–22.
- 98 de la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, *et al.* Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* 1990; **66**: 554–64.
- 99 Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, *et al.* Altered sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 1990; **85**: 305–9.
- 100 Levitsky DO, Clergue M, Lambert F, *et al.* Sarcoplasmic reticulum calcium transport and Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase gene expression in thoracic and abdominal aortas of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Biol Chem* 1993; **268**: 8325–31.
- 101 Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, *et al.* Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res* 1994; **75**: 434–42.
- 102 Linck B, Bokník P, Eschenhagen T, *et al.* Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR-Ca<sup>2+</sup>(+)-ATPase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 1996; **31**: 625–32.
- 103 Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, *et al.* Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell* 1999; **99**: 313–22.
- 104 Luo W, Grupp IL, Harrer J, *et al.* Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ Res* 1994; **75**: 401–9.
- 105 Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, *et al.* Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; **288**: H469–476.
- 106 Ji Y, Lalli MJ, Babu GJ, *et al.* Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca<sup>2+</sup> homeostasis and cardiomyocyte function. *J Biol Chem* 2000; **275**: 38073–80.
- 107 Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, *et al.* Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**: 793–8.
- 108 Janczewski AM, Zahid M, Lemster BH, *et al.* Phospholamban gene ablation improves calcium transients but not cardiac function in a heart failure model. *Cardiovasc Res* 2004; **62**: 468–80.



- 109 Kawase Y, Hajjar RJ. The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2008; **5**: 554–65.
- 110 Cernohorský J, Kolár F, Pelouch V, Korecky B, Vetter R. Thyroid control of sarcolemmal Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and SR Ca<sup>2+</sup>-ATPase in developing rat heart. *Am J Physiol* 1998; **275**: H264–273.
- 111 Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Science* 1990; **250**: 562–5.
- 112 Studer R, Reinecke H, Bilger J, *et al.* Gene expression of the cardiac Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger in end-stage human heart failure. *Circ Res* 1994; **75**: 443–53.
- 113 Komuro I, Wenninger KE, Philipson KD, Izumo S. Molecular cloning and characterization of the human cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; **89**: 4769–73.
- 114 Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H. Cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc Res* 1996; **31**: 48–54.
- 115 Langheinrich M, Lee MA, Böhm M, Pinto YM, Ganten D, Paul M. The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)<sup>27</sup> in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens* 1996; **9**: 506–12.
- 116 Lammerich A, Günther J, Pfitzer G, Storch E, Vetter R. Alterations of cardiac contractile function are related to changes in membrane calcium transport in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 1995; **13**: 1313–24.
- 117 Regitz-Zagrosek V, Brokat S, Tschope C. Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis* 2007; **49**: 241–51.
- 118 Hogg K, Swedberg K, McMurray J. Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. *J Am Coll Cardiol* 2004; **43**: 317–27.
- 119 Bachmann J, Ganten U, Stock G, Ganten D. Sexueller Dimorphismus des Blutdrucks bei TGR(mREN2)<sup>27</sup>: Einfluss von Androgenen. 1992.<http://edoc.mdc-berlin.de/589/> (accessed 26 Aug2011).
- 120 Langheinrich M, Lee MA, Böhm M, Pinto YM, Ganten D, Paul M. The hypertensive Ren-2 transgenic rat TGR (mREN2)<sup>27</sup> in hypertension research. Characteristics and functional aspects. *Am J Hypertens* 1996; **9**: 506–12.
- 121 Brosnan MJ, Devlin AM, Clark JS, Mullins JJ, Dominiczak AF. Different effects of antihypertensive agents on cardiac and vascular hypertrophy in the transgenic rat line TGR(mRen2)<sup>27</sup>. *Am J Hypertens* 1999; **12**: 724–31.
- 122 Du X-J. Gender modulates cardiac phenotype development in genetically modified mice. *Cardiovasc Res* 2004; **63**: 510–9.

- 123 Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest* 2003; **112**: 302–7.
- 124 Weinberg EO, Thienelt CD, Katz SE, *et al.* Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol* 1999; **34**: 264–73.
- 125 Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, Chen MH, Bishop SP, Lorell BH. Hypertrophic remodeling: gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol* 1998; **32**: 1118–25.
- 126 Chappell MC, Yamaleyeva LM, Westwood BM. Estrogen and salt sensitivity in the female mRen(2). Lewis rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2006; **291**: R1557–1563.
- 127 Groban L, Yamaleyeva LM, Westwood BM, *et al.* Progressive diastolic dysfunction in the female mRen(2). Lewis rat: influence of salt and ovarian hormones. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2008; **63**: 3–11.
- 128 Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov* 2006; **5**: 425–38.
- 129 Witt H, Schubert C, Jaekel J, *et al.* Sex-specific pathways in early cardiac response to pressure overload in mice. *J Mol Med* 2008; **86**: 1013–24.
- 130 Langer GA. Interspecies variation in myocardial physiology: the anomalous rat. *Environ Health Perspect* 1978; **26**: 175–9.
- 131 Studer R, Reinecke H, Vetter R, Holtz J, Drexler H. Expression and function of the cardiac Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger in postnatal development of the rat, in experimental-induced cardiac hypertrophy and in the failing human heart. *Basic Res Cardiol* 1997; **92 Suppl 1**: 53–8.
- 132 Kaasik A, Paju K, Vetter R, Seppet EK. Thyroid hormones increase the contractility but suppress the effects of beta-adrenergic agonist by decreasing phospholamban expression in rat atria. *Cardiovasc Res* 1997; **35**: 106–12.
- 133 Freestone NS, Ribaric S, Scheuermann M, Mauser U, Paul M, Vetter R. Differential lusitropic responsiveness to beta-adrenergic stimulation in rat atrial and ventricular cardiac myocytes. *Pflugers Arch* 2000; **441**: 78–87.
- 134 Zarain-Herzberg A, Afzal N, Elimban V, Dhalla NS. Decreased expression of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca(2<sup>+</sup>)-pump ATPase in congestive heart failure due to myocardial infarction. *Mol Cell Biochem* 1996; **163-164**: 285–90.
- 135 Schultz JEJ, Glascock BJ, Witt SA, *et al.* Accelerated onset of heart failure in mice during pressure overload with chronically decreased SERCA2 calcium pump activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; **286**: H1146–1153.
- 136 Muders F, Elsner D. Animal models of chronic heart failure. *Pharmacol Res* 2000; **41**: 605–12.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité Universitätsmedizin Berlin durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Roland Vetter für die Betreuung dieser Arbeit. Bedanken möchte ich mich auch für die Hilfestellung bei Herrn Prof. Dr. Reinhold Kreutz, Dr. Marcus Wehland-von-Trebra und Ursula Jakob-Müller.

## **Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## Publikationsliste

Trinks S, Kluge M, **Eulert-Grehn JJ**, Hütter J, Kreutz R, Paul M, Vetter R. Lack of functional benefit of SERCA2 overexpression in hypertrophied hearts of rats with renin-dependent hypertension. *J Hypertens* 26 (Suppl 1): S267, 2008 (Abstract)

Kamkin, A, Kiseleva, I, Theres, H, **Eulert-Grehn JJ**, Wagner, KD, Scholz, H, Vetter, R. Enhanced L-type calcium currents in cardiomyocytes from SERCA2a overexpressing transgenic rats. *Exp Clin Cardiol* 15(4): e109-e150, 2010

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich, Jaime-Jürgen Eulert-Grehn, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: [Vergleichende Analysen der Expression kardialer Gene in einem doppelt transgenen SERCA2/Renin-Hypertoniemodell] selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.