

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen

Bedeutung der Myosin-Leichtketten-Kinase für den alpha1-adrenergen positiv inotropen Effekt im Herzmuskel

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Nina Mahnecke

Hamburg, Mai 2008

1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Michael Korth
2. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen

Tag der Disputation: 24. Oktober 2008

Friederike, der besten Mitdotorandin der Welt

On average, the human heart beats 100,000 times a day and it is in a person's best interest to have the heart move blood as efficiently as possible. For example, imagine a wet rag: squeezing the rag in your fist does not remove as much water as wringing the same rag between two hands. Thus, in hearts as in rags, torsional wringing, as opposed to squeezing, more thoroughly empties the heart of blood. Recent reports indicate that the activity and the distribution of myosin light chain kinase (MLCK) in the myocardium is key to this process. MLCK-dependent phosphorylation of the regulatory light chain (R-LC), a subunit of the myosin molecule, may lead to increased force and power of contraction. It is the asymmetric distribution of MLCK in the myocardium that allows for torsional wringing rather than squeezing. Specifically targeting MLCK expression in the heart might, in the future, lead to promising therapies that counteract cardiomyopathy.

(entnommen aus: Vandenboom und Metzger, 2002)

1 Einleitung.....	1
1.1 Kardiale α_1 -Adrenozeptoren.....	4
1.2 Die α_1 -adrenerge Signalkaskade	5
1.3 Myosinketten.....	6
1.4 Myosin-Leichtketten-Kinase.....	7
1.5 MLCK-vermittelte MLC2 Phosphorylierung im Kontext mit dem α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt.....	11
1.6 Calcium und MLCK.....	12
1.7 RNA-Interferenz.....	13
1.7.1 Mechanismus.....	13
1.7.2 Experimentelle Voraussetzungen.....	14
1.7.3 Transiente Expression	15
1.8 Lentivirale Vektoren	16
1.9 Zielsetzung der Arbeit.....	18
1.9.1 Versuchskonzeption.....	20
2 Methoden	21
2.1 Tierexperimentelle Arbeiten: Erwachsene Mäuse	21
2.1.1 Tierhaltung und Genehmigung.....	21
2.1.2 Organentnahme.....	21
2.1.3 Erfassung der Kontraktionsparameter.....	22
2.1.3.1 Kontraktionsmessung.....	22
2.1.3.2 Das Erstellen von Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven	22
2.1.3.3 Das Erstellen von Endothelin-1-Konzentrations-Wirkungs-Kurven	23
2.1.3.4 Das Erstellen von Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven.....	23
2.1.3.5 Interventionen	23
2.1.3.6 Datenerfassung und -verarbeitung.....	24
2.2 Adenovirale shRNA-Expression.....	24
2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	27
2.2.2 Transformation.....	28
2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschersäule	29
2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration	30
2.2.5 Restriktionsverdau von DNA.....	31
2.2.6 Agarosegelelektrophorese von DNA-Proben	32
2.2.7 Gelextraktion von DNA-Fragmenten	33
2.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion.....	33

2.2.9 Fällung von DNA.....	34
2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase.....	34
2.2.11 DNA-Sequenzierung	35
2.2.12 shRNA-Klonierung	36
2.2.12.1 Auswahl von shRNA-Sequenzen für einen adenoviralen Gentransfer	36
2.2.12.2 Herstellung der shRNA-Oligodeoxynukleotide.....	36
2.2.12.3 Klonierung der Transfervektoren	37
2.2.12.3.1 pALsh Vektor	37
2.2.12.3.1.1 Klonierung der Konstrukte in den pALsh Vektor	38
2.2.12.3.2 pAdTrack-CMV Vektor.....	39
2.2.12.3.2.1 Homologe Rekombination in Bakterienzellen von pAdTrack-CMV-DNAs und pAdEasy-DNAs	40
2.2.13 QBI-HEK 293A-Zellkultur	42
2.2.13.1 Einfrieren und Auftauen von QBI-HEK 293A-Zellen	42
2.2.13.2 Liposomen-vermittelte Transfektion von QBI-HEK 293A-Zellen	43
2.2.13.3 Ernte von adenoviralen Zellkulturüberständen	43
2.2.13.4 Präparation einer hochtitrigen Virussuspension	44
2.2.13.5 CsCl-Gradient zur Adenovirusaufreinigung und -konzentration	45
2.2.13.6 Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren	46
2.3 Lentivirale shRNA-Expression	47
2.3.1 Auswahl von shRNA-Sequenzen für einen lentiviralen Gentransfer	47
2.3.2 HEK 293T-Zellkultur.....	51
2.3.2.1 Einfrieren und Auftauen von HEK 293T-Zellen.....	52
2.3.3 Lentivirusproduktion in HEK 293T-Zellen.....	52
2.3.4 Liposomen-vermittelte Transfektion von HEK 293T-Zellen.....	53
2.3.5 Lentivirustiterbestimmung mittels p24-Antigen ELISA	54
2.3.6 Überprüfung der shRNA-Sequenz in den Lentiviren	56
2.3.7 Generation von stabilen lentiviralen shRNA-exprimierenden Zelllinien	57
2.4 NIH3T3-Zellkultur.....	57
2.5 Tierexperimentelle Arbeiten: Neugeborene Mäuse	58
2.5.1 Tierhaltung und Genehmigung.....	58
2.5.2 Organentnahme.....	58
2.5.3 Vorverdau über Nacht.....	58
2.5.4 Collagenasebehandlung	59
2.5.5 Aufreinigung von Kardiomyozyten.....	59
2.5.6 Kultivierung und Intervention.....	60
2.6 Tierexperimentelle Arbeiten: Neugeborene Ratten	60

2.6.1 Tierhaltung und Genehmigung.....	60
2.6.2 Organentnahme.....	61
2.6.3 Trypsinverdau	61
2.6.3.1 Aufreinigung von Kardiomyozyten	62
2.6.4 Herstellung von rekonstituiertem Herzgewebe der neugeborenen Ratte (<i>Engineered Heart Tissue</i> , EHT)	63
2.6.4.1 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt	63
2.6.4.2 Herstellung und Gehaltsbestimmung von Collagen Typ I	63
2.6.4.3 Herstellung der Gussformen	64
2.6.4.4 Lentivirusinfektion der Zellen für EHTs.....	65
2.6.4.5 Herstellung von EHTs	65
2.6.5 Kultivierung und Intervention.....	67
2.6.5.1 EHTs.....	67
2.6.5.2 Adenovirale Infektion von Standard-EHTs.....	67
2.6.5.3 NRCM	68
2.6.6 Erfassung der Kontraktionsparameter von EHTs	68
2.6.6.1 Kontraktionsmessung.....	68
2.6.6.2 Das Erstellen von Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Inter- ventionssubstanzen	69
2.6.6.3 Das Erstellen von Phenylephrin- und Calcium-Konzentrations-Wirkungs- Kurven	70
2.6.6.4 Datenerfassung und -verarbeitung	70
2.7 Glatte Muskelzellen-Zellkultur	70
2.7.1 Tierhaltung, Genehmigung und Organentnahme	70
2.7.2 Zellisolierung und Kultivierung	71
2.7.2.1 Einfrieren und Auftauen von SMC	72
2.7.3 Herstellung von SMC-Pseudo-EHTs.....	72
2.7.4 Kultivierung und Intervention.....	72
2.7.5 Erfassung der Kontraktionsparameter.....	73
2.7.5.1 Kontraktionsmessung.....	73
2.7.5.2 Das Erstellen von Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Inter- ventionssubstanzen	73
2.7.5.3 Datenerfassung und -verarbeitung	73
2.8 Erfassung der Proteinexpression	74
2.8.1 Proteinextraktion: Gewebe.....	74
2.8.2 Proteinextraktion: EHTs	74
2.8.3 Proteinextraktion: Monolayer-Zellen.....	74

2.8.4 Proteinbestimmung nach Bradford.....	75
2.8.5 Probenvorbereitung	76
2.8.6 Gelelektrophorese	76
2.8.7 Immunoblot.....	76
2.8.7.1 Datenerfassung und -verarbeitung.....	78
2.9 Erfassung der mRNA-Expression	79
2.9.1 RNA-Extraktion	79
2.9.1.1 RNA-Extraktion: Gewebe	79
2.9.1.2 RNA-Extraktion: EHTs	80
2.9.1.3 RNA-Extraktion: Monolayer-Zellen	80
2.9.1.4 RNA-Agarosegel	80
2.9.2 Reverse Transkription.....	81
2.9.3 Design und Optimierung von Primern	82
2.9.4 Nicht-quantitative RT-PCR.....	84
2.9.5 Quantitative RT-PCR	86
2.9.5.1 Versuchsbedingungen	87
2.9.5.2 Auswertung von quantitativen RT-PCR Daten.....	89
2.10 Immunhistochemie/Immunzytochemie	90
2.10.1 EHTs	90
2.10.2 Datenerfassung mittels konfokaler Lasermikroskopie	91
2.10.2.1 Quantitative Bestimmung morphologischer Parameter.....	92
2.11 Statistik.....	92
3 Ergebnisse.....	93
3.1 Charakterisierung des Modells: Erwachsene Mäuse.....	93
3.1.1 Kontraktionsexperimente der Maus: Der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt.....	93
3.1.1.1 Prazosin als α_1 -Adrenozeptor-Antagonist: Effekt von Phenylephrin.....	93
3.1.2 Kontraktionsexperimente der Maus: Die MLCK-Inhibition	96
3.1.2.1 MLCK-Inhibition durch Wortmannin: Effekt von Phenylephrin	96
3.1.2.2 MLCK-Inhibition durch Wortmannin: Effekt von Phenylephrin in Kombination mit Endothelin-1	99
3.1.2.3 MLCK-Inhibition durch Wortmannin: Effekt von Isoprenalin.....	102
3.1.2.4 MLCK-Inhibition durch ML-7: Effekt von Phenylephrin	104
3.1.2.5 MLCK-Inhibition durch ML-7: Effekt von Phenylephrin in Kombination mit Endothelin-1.....	106
3.1.2.6 MLCK-Inhibition durch ML-7: Effekt von Endothelin-1	109

3.1.2.7 MLCK-Inhibition durch ML-7: Effekt von Isoprenalin.....	111
3.1.2.8 MLCK-Inhibition durch ML-9: Effekt von Phenylephrin in Kombination mit Isoprenalin	112
3.1.3 Kontraktionsexperimente der Maus: Die IP ₃ -vermittelte Calciumfreisetzung	113
3.1.4 MLCK-Expression.....	117
3.1.4.1 MLCK-Isoformen der Maus: mRNA-Ebene	117
3.1.4.1.1 RNA-Qualität	117
3.1.4.1.2 Ergebnisse mittels nicht-quantitativer RT-PCR	118
3.1.4.1.3 Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR.....	120
3.1.4.2 Gewebeverteilung der MLCK-Isoformen der Maus: Protein-Ebene	124
3.1.4.3 Gewebeverteilung der MLCK-Isoformen der Ratte: Protein-Ebene	125
3.2 Adenovirale shRNA-Expression.....	127
3.2.1 Klonierung der shRNA-Sequenzen in verschiedene Transfervektoren.....	127
3.2.1.1 pALsh Vektor	127
3.2.1.2 pAdTrack-CMV Vektor	128
3.2.1.3 pAdEasy-1 Vektor	129
3.2.1.4 Sequenzierung der shRNA-Konstrukte im pAdEasy-1 Vektor	131
3.2.1.5 Liposomen-vermittelte Transfektion der pAdEasy-1-Konstrukte in QBI-HEK 293A-Zellen	133
3.2.1.6 Titerbestimmung der Adenoviren Ad-shRNA-smMLCK220 und Ad-shRNA-NS.....	134
3.3 Verwendung des Ad-shRNA-smMLCK220 in NMCM.....	135
3.3.1 Infektionsverlauf der adenoviral-infizierten NMCM	135
3.3.2 Adenoviraler smMLCK <i>Knockdown</i> auf Protein-Ebene in NMCM.....	136
3.3.3 Adenoviraler smMLCK <i>Knockdown</i> auf mRNA-Ebene in NMCM.....	137
3.4 Verwendung des Ad-shRNA-smMLCK220 in NRCM	139
3.4.1 Infektionsverlauf der adenoviral-infizierten NRCM	140
3.4.2 Adenoviraler smMLCK <i>Knockdown</i> auf Protein-Ebene in NRCM	141
3.4.3 Adenoviraler smMLCK <i>Knockdown</i> auf mRNA-Ebene in NRCM.....	146
3.5 Charakterisierung des Modells: EHTs.....	147
3.5.1 Kontraktionsexperimente der EHTs: Der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt....	147
3.5.2 Kontraktionsexperimente der EHTs: Die MLCK-Inhibition	148
3.5.3 Einfluss der MLCK-Inhibition mittels ML-7 auf Protein-Ebene in EHTs.....	150
3.5.4 Adenovirale shRNA-Expression in EHTs	152
3.5.5 Infektionsverlauf der adenoviral-infizierten EHTs	152
3.5.5.1 Adenoviraler smMLCK <i>Knockdown</i> auf Protein-Ebene in EHTs	153
3.6 Lentivirale shRNA-Expression	155

4.2 Funktioneller MLCK <i>Knockdown</i> mithilfe der RNA-Interferenz	192
4.2.1 Untersuchung der MLCK-Isoformen.....	193
4.2.2 Virale Systeme.....	193
4.2.2.1 Adenovirale shRNA-Expression	194
4.2.2.2 Lentivirale shRNA-Expression.....	197
4.2.3 Unspezifische Effekte von si/shRNA	197
4.2.4 Das EHT-Modell	198
4.2.4.1 Lentiviral-vermittelter smMLCK <i>Knockdown</i> in EHTs.....	199
4.2.4.2 Immunfluoreszenz von lentiviral-infizierten EHTs	202
4.2.4.3 Lentiviral-vermittelter smMLCK <i>Knockdown</i> in SMC-Pseudo-EHTs	202
4.3 Einschränkungen und offene Fragen	204
5 Zusammenfassung.....	207
5.1 Summary.....	209
6 Abkürzungsverzeichnis	211
6.1 Fachsprachliche Abkürzungen und Bezeichnungen.....	211
6.2 Weitere Abkürzungen	219
6.3 Präfixe.....	219
7 Literaturverzeichnis	220
7.1 Veröffentlichungen.....	236
8 Anhang.....	237
8.1 Chemikalien.....	237
8.2 Lösungen und Puffer	245
8.3 Kits.....	268
8.4 Hilfsmittel und Geräte	269
8.5 Software.....	274
8.6 Ergebnistabellen.....	275
8.7 Vektoren.....	289
8.8 Molekulargewichtsmarker	292
8.9 Weitere Abbildungen	294

Inhaltsverzeichnis

8.10 Abbildungsverzeichnis	296
8.10.1 Liste der in der Arbeit dargestellten Abbildungen	296
8.10.2 Liste der im Anhang dargestellten Abbildungen	301
8.11 Verzeichnis der Tabellen	301
8.11.1 Liste der in der Arbeit dargestellten Tabellen	301
8.11.2 Liste der im Anhang dargestellten Tabellen	302
9 Lebenslauf	303
10 Danksagung.....	305
11 Erklärung	306

1 Einleitung

Eine der grundlegenden Eigenschaften lebender Organismen ist die Fähigkeit zur aktiven Fortbewegung. Sie wird über ein kontraktiles System der beiden Proteine Aktin und Myosin vermittelt. Dass sich die zwei Proteine unter Adenosin-5'-triphosphat- (ATP-) Verbrauch durch Konformationsänderung im Myosin-S1-Kopfbereich gegeneinander verschieben, erneut binden und so die Muskelzelle verkürzen, wurde schon 1953-1954 von Huxley (2000) in der noch heute gültigen Gleitfilamenttheorie beschrieben (s. Abb. 1).

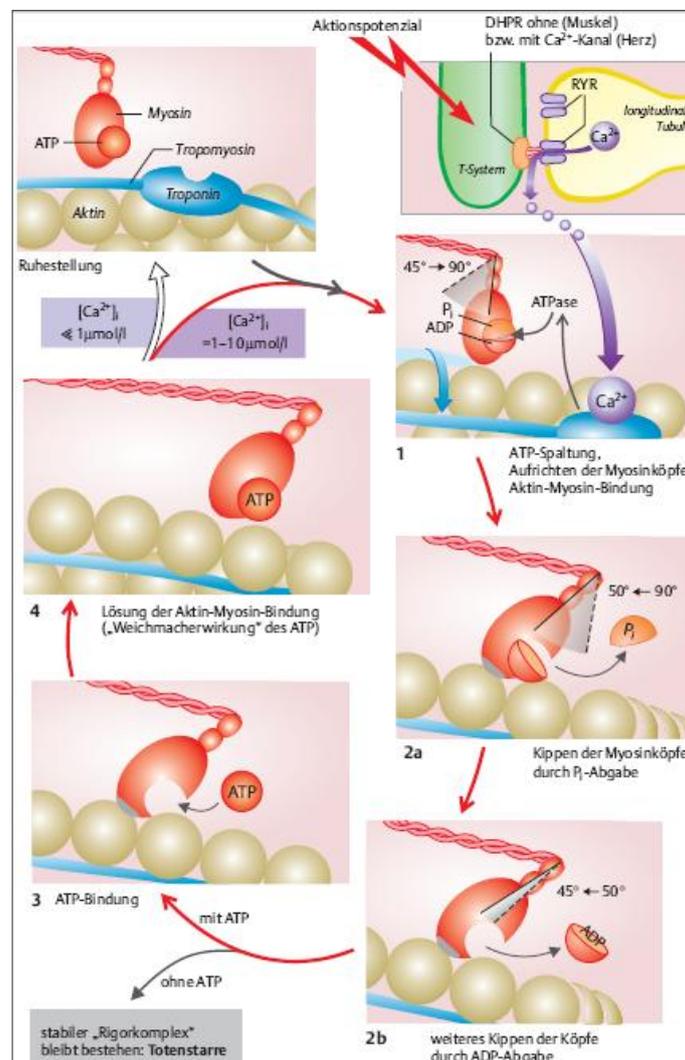


Abbildung 1: Arbeitszyklus beim Filamentgleiten in quer gestreifter Muskulatur

(isotone Kontraktion; entnommen aus: Taschenatlas der Physiologie, Silbernagl S. und Despopoulos A., 7. Auflage 2007, Kapitel 2, S. 65)

DHPR = Dihydropyridinrezeptor, RYR = Ryanodinrezeptor, T-System = Transversal-System

Die beiden Myosinköpfchen eines Myosin-II-Moleküls binden unter Mitwirkung von Magnesium je ein ATP-Molekül. Sie bilden in dieser Form mit dem Rest des Myosinfilaments einen Winkel von ca. \perp

45 Grad. Zum Aktin besteht in diesem Zustand nur eine sehr schwache Bindung. Der Einfluss des Calciums auf den Troponin/Tropomyosin-Komplex bewirkt nun, dass Aktin die ATPase des Myosins aktiviert, sodass das an Myosin gebundene ATP gespalten wird ($\text{ATP} \rightarrow \text{ADP} + \text{P}_i$). Es entsteht ein Aktin-Myosin-ADP- P_i -Komplex, was dazu führt, dass sich die Myosin-II-Köpfe wieder aufrichten (1). Jetzt löst sich P_i (anorganisches Phosphat) aus diesem Komplex, was die Myosinköpfe um ca. 40 Grad kippen lässt (2a). Dies hat zur Folge, dass die Aktin- und Myosinfilamente aneinander vorbeigleiten. Die nachfolgende Abgabe von Adenosin-5'-diphosphat (ADP) löst den zweiten Teil des Kraftschlags aus, der die Myosinköpfe in ihre Endstellung bringt (2b). Der übrig gebliebene Aktin-Myosinkomplex ist stabil und kann nur durch erneute Bindung von ATP an die Myosinköpfe wieder in eine sehr viel schwächere Bindung überführt werden (4). Ist die Calciumkonzentration ausreichend hoch ($>10^{-6}$ mol/l), so beginnt der Zyklus erneut. Dabei sind nicht alle an einem Aktinfilament ziehenden Myosinköpfe gleichzeitig im Einsatz, was auch eine ruckweise Kontraktion verhindert.

Aufgrund von Form, Fasern, histologischer Struktur, Mechanismus der Kontraktion und funktionellen Aspekten gibt es für Säugetiere, einschließlich des Menschen, folgende Einteilung von Muskelarten:

1. Glatte Muskulatur

Die rein vegetativ innervierte Muskulatur findet sich in den Bronchien, den Gefäßen, im gesamten Magen-Darm-Trakt und im Urogenitaltrakt (u. a. α_1 -, β_2 -, muscarinerge Acetylcholin-, dopaminergere D_1 - und D_2 -, histaminergere H_1 - und H_2 - sowie serotinerge Rezeptoren). Glatte Muskelzellen haben keine Sarkomere, und der Gleitfilamentmechanismus verläuft wesentlich langsamer als in quer gestreifter Muskulatur, verbraucht aber auch weniger Sauerstoff-Energie in Form von ATP.

2. Quer gestreifte Muskulatur

Nochmals unterteilt in

- a. Skelettmuskulatur

Die Erregung der willkürlich steuerbaren Skelettmuskulatur (z. B. Kaumuskeln) erfolgt durch motorische Nervenfasern und nicotinerge Acetylcholinrezeptoren.

- b. Herzmuskel

Als quer gestreifte Muskulatur eines Hohlorganes nimmt der Herzmuskel eine Sonderstellung ein, denn er ist nicht willkürlich zu beeinflussen. Die rhythmischen Kontraktionen werden über einen internen Taktgeber, den Sinusknoten, generiert und vom vegetativen Nervensystem moduliert (u. a. α_1 -, β_1 - und muscarinergere Acetylcholinrezeptoren).

Das eigenständig schlagende Herz unterliegt einer Vielzahl von Regulationsmechanismen, welche die Kontraktionskraft und die Schlagfrequenz des Herzens den jeweiligen Bedürfnissen anpassen. Hierzu gehört beispielsweise der Frank-Starling-Mechanismus (Kraft-Wandspannungs-Beziehung; Starling und Visscher, 1927). Über eine zunehmende Vorlast (enddiastolisches Ventrikelvolumen) erhöht sich die diastolische Vordehnung, infolgedessen (in physiologischen Grenzen) das Schlagvolumen zunimmt. Die Kontraktilität kann auch durch den Bowditch-Effekt (Kraft-Frequenz-Beziehung; Bowditch, 1871) gesteigert werden. Am menschlichen gesunden Herzen kommt es mit zunehmender Schlagfrequenz auch zu einer Zunahme der Kontraktionskraft. Die lokale und systemische Freisetzung endogener Peptide, wie Angiotensin II und Endothelin-1, spielt ebenfalls eine Rolle bei der Adaptation des Herzens an verschiedene Situationen. Die sympathoadrenerge Aktivierung hat den wichtigsten regulatorischen Einfluss auf das Herz. Dieses geschieht über das sympathische Nervensystem und wird über die Katecholamine Adrenalin und Noradrenalin und deren Bindung an α - und β -Adrenozeptoren, die in der Zellmembran der Kardiomyozyten lokalisiert sind, vermittelt.

Die β_1 -Adrenozeptoren sind für den größten Teil der Kontraktilitätszunahme verantwortlich und gehören aufgrund ihrer großen Bedeutung zu den am besten untersuchten Rezeptoren am Herzen. Sowohl über ihre Funktion als auch über ihre nachgeschalteten Signaltransduktionsmechanismen herrscht weitgehende Einigkeit. Neben den β_1 - werden auch β_2 -Adrenozeptoren im Herzen exprimiert (Brodde, 1991; Bristow, 1993). Das Verhältnis von β_1 - zu β_2 -Adrenozeptoren in den Vorhöfen beträgt 60-70% : 40-30% und in den Herzkammern 70-80% : 30-20% (Brodde, 1991). Trotz fast ebenso langjähriger Forschung sind jedoch nach wie vor die Rolle der kardialen α_1 -Adrenozeptoren und der genaue Mechanismus für den α_1 -adrenergen inotropen Effekt umstritten (Brodde und Michel, 1999). α_1 -Adrenozeptoren werden im menschlichen Herzen in einer wesentlich geringeren Menge exprimiert als β -Adrenozeptoren. In der Herzkammer des Menschen beträgt das Verhältnis von α_1 - zu β -Adrenozeptoren etwa eins zu acht (Brodde und Michel, 1999). Im menschlichen Vorhof ist die α_1 -Adrenozeptordichte sogar noch etwas niedriger als in der Herzkammer (Steinfath et al., 1992); trotzdem spielen die α_1 -Adrenozeptor-vermittelten Effekte im Vorhof eine größere Rolle als in der Herzkammer (Opie, 2001). Bisher sind drei verschiedene α_1 -Adrenozeptoren identifiziert worden: α_{1A} , α_{1B} und α_{1D} (Michel et al., 1995). Im menschlichen Herzen scheint überwiegend der α_{1A} -Adrenozeptor-Subtyp exprimiert zu werden (Price et al., 1994; Weinberg et al., 1994). In der Ratte hingegen dominiert der α_{1B} -Subtyp ($\alpha_{1A} : \alpha_{1B} \approx 20 : 80\%$; Michel et al., 1994; Wolff et al., 1998; Brodde und Michel, 1999). Des Weiteren wurde gezeigt, dass die α_1 -Adrenozeptordichte im Rattenherzen um den Faktor fünf bis acht höher liegt als im Menschenherzen. Darin unterscheidet sich die Ratte nicht nur vom

Menschen, sondern auch von anderen Säugetieren wie Maus, Meerschweinchen, Schaf oder Schwein, welche dem Menschen eine ähnliche α_1 -Adrenozeptordichte aufweisen (Steinfath et al., 1992). Die Stimulation von α_1 -Adrenozeptoren führt am Herzen vieler Spezies zu einer akuten Steigerung der Kontraktilität (Brückner et al., 1985). Verglichen mit dem β -adrenergen Effekt ist die α_1 -adrenerg-vermittelte Kontraktionskraftzunahme allerdings nur gering ausgeprägt (Skomedal et al., 1985; Brodde und Michel, 1999). Zudem haben endogene Katecholamine in Konzentrationen, die bereits den maximalen β -adrenergen positiv inotropen Effekt auslösen, noch keine Wirkung am α_1 -Adrenozeptor (Jahnel et al., 1992). Hinzu kommt die hohe Variabilität in verschiedenen Spezies und unter unterschiedlichen experimentellen Bedingungen.

In der vorliegenden Arbeit sollte die α_1 -adrenerge Signalkaskade untersucht werden, um die Rolle und Bedeutung der α_1 -Adrenozeptoren für die Kontraktilität des Herzens besser beschreiben zu können. Dabei sollte gezielt die Myosin-Leichtketten-Kinase betrachtet werden, ein Effektorprotein der α_1 -adrenergen Signalkaskade.

1.1 Kardiale α_1 -Adrenozeptoren

α - und β -Adrenozeptoren gehören zur Familie der G-Protein- (Guaninnukleotidbindende Proteine) gekoppelten Rezeptoren. Sie bestehen aus einer einzigen Peptidkette, welche siebenmal durch die Zellmembran verläuft und bei der das Carboxy- (C-) terminale Ende auf der zytoplasmatischen Seite bzw. der Amino- (N-) terminale Bereich auf der extrazellulären Seite liegt. Durch die sterische Anordnung der Peptidkette formt sich eine Tasche, an die Liganden wie z. B. Noradrenalin oder Phenylephrin binden und so den Rezeptor aktivieren können. Die meisten bisher bekannten G-Proteine sind Heterotrimere aus einer α -Untereinheit, sowie der β - und γ -Untereinheit, die einen stabilen $\beta\gamma$ -Komplex bilden. Je nach dem Verwandtschaftsgrad der α -Untereinheiten unterteilt man die G-Proteine in Familien: G_i , G_q und G_s , welche die wichtigsten im Herzen exprimierten G-Proteine sind. Sie unterscheiden sich in der Aminosäuresequenz und in der Art, wie sie den intrazellulären Signaltransduktionsweg beeinflussen. Sie sind an der Regulation der Kontraktion beteiligt und vermitteln Effekte, die zur Hypertrophie führen können. Im Gegensatz zu β_1 -Adrenozeptoren, deren Signalkaskade an ein G_s -Protein gekoppelt und nachgeschaltet von zyklischem Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP) abhängig ist, erfolgt die Signaltransduktion kardialer α_1 -Adrenozeptoren, wie auch bei Endothelin- und Angiotensinrezeptoren, über ein heterotrimeres G_q -Protein (Graham et al., 1996). Dauerhafte kardiale α_1 -Adrenozeptorstimulation im Herzen führt zu einer hypertrophen Antwort, die sich in Zunahme der Zellgröße, Neubildung von kontraktilen Einheiten sowie einer veränderten Genexpression,

ähnlich der fetalen Phase, ausdrückt (Simpson, 1983; Molkentin und Dorn, 2001). Mit erhöhten Plasmaspiegeln von u. a. Angiotensin II, Endothelin-1 und Noradrenalin als Folge der neurohumoralen Aktivierung tritt eine Herzmuskelhypertrophie auf. Diese dient im Rahmen einer Herzinsuffizienz zunächst als Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung einer ausreichenden Pumpfunktion des Herzens. Im weiteren Verlauf geht diese positive Angleichung in eine „pathologische“ Hypertrophie mit verschlechterter kontraktile Funktion und deren Folgeerscheinung, eine chronische Herzinsuffizienz über. Unter dem Begriff der Herzinsuffizienz versteht man ein klinisches Syndrom unterschiedlicher Ätiologie. Es definiert das Unvermögen des Herzens, das für zirkulatorische und metabolische Anforderungen des Organismus benötigte Herzzeitvolumen bei normalem enddiastolischem Ventrikeldruck zu fördern. Die Definition der Herzinsuffizienz der Weltgesundheitsorganisation (WHO) lautet: verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung. In der Klinik hat sich die vierstufige Stadieneinteilung nach Empfehlungen der *New York Heart Association* (NYHA), welche die Leistungsfähigkeit und Beschwerden bei verschiedenen Tätigkeiten berücksichtigt, durchgesetzt.

Die Identifizierung der α_1 -adrenergen Signaltransduktionsmechanismen ist der Gegenstand langjähriger Forschung (Endoh und Schümann, 1975; Scholz et al., 1986; Terzic et al., 1993; Ruffolo und Hieble, 1994). Auch wenn die Konsequenzen einer chronischen Überaktivierung von α_1 -Adrenozeptoren auf das menschliche Herz und das kardiale Remodeling (Umbauprozess) bisher noch nicht vollständig geklärt sind, so lassen Ergebnisse aus einer großen klinischen Studie (ALLHAT, 2000) und einem doppelten $\alpha_{1A/C}$ - und α_{1B} -*Knockout*-Modell der Maus (O'Connell et al., 2003) vermuten, dass α_1 -Adrenozeptor-vermittelte Signale für die Aufrechterhaltung einer normalen Herzfunktion wichtiger sind, als bisher angenommen wurde.

1.2 Die α_1 -adrenerge Signalkaskade

Die Bindung eines Agonisten an den α_1 -Adrenozeptor führt G_q -vermittelt zu einer Aktivierung von Phospholipase C (PLC). Diese katalysiert die hydrolytische Spaltung von dem Membran-Phospholipid Phosphatidylinositoldiphosphat (PIP_2). Dabei werden die beiden *second messenger* Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG; Kohl et al., 1990; Michel et al., 1995) generiert. Anders als bei der β -Adrenozeptor Stimulation bleiben hier die cAMP-Spiegel unverändert (Osnes und Oye, 1975; Scholz et al., 1986). IP_3 setzt in der glatten Muskulatur und in vielen anderen Zellen nach Aktivierung von IP_3 -Rezeptoren am sarkoplasmatischen Retikulum (SR) Calcium in das Zytosol der Zelle frei (Berridge, 1993).

Im Herzen findet - wenn überhaupt - die Calciumfreisetzung nur in einem sehr begrenzten Ausmaß statt (Vites und Pappano, 1990). DAG verbleibt als potenter Aktivator der Protein Kinase C (PKC; Rhee, 2001; Alberts et al. 2002) in der Membran. Die PKC gehört zur Gruppe der Serin/Threonin-Kinasen und phosphoryliert eine Vielzahl zytosolischer und nukleärer Proteine. Damit stellt sie eine zentrale Schaltstelle in zellulären Signalübermittlungsprozessen dar (Puceat et al., 1994; Puceat und Vassort, 1996). Von der PKC sind zwölf Isoformen bekannt: Es gibt klassische, Calcium-abhängige (α , β I, β II, γ), Calcium-unabhängige (δ , ϵ , η , θ) und weitere, „atypische“ Isoformen (ζ , λ , τ ; Mackay und Mochly-Rosen, 2001). Die Expression der PKC im Herzen ist variabel und ändert sich während der Entwicklung. Im menschlichen Vorhof dominieren die α -, δ - und ϵ -Isoformen (Erdbrugger et al., 1997), in der Herzkammer des Menschen sind nahezu alle Isoformen nachgewiesen worden (Shin et al., 2000). Es ist umstritten, ob die PKC einen direkten Beitrag zum akuten Effekt positiv inotroper Substanzen leistet (Endou et al., 1991; Endoh et al., 1993; Mittmann et al., 1998; Grimm et al., 2006).

1.3 Myosinketten

Wie bereits einleitend beschrieben, bedarf die Muskelkontraktion u. a. einem Zusammenspiel von zwei Filamenten, dem sogenannten dünnen Filament Aktin und dem dicken Filament Myosin. In Muskelfasern vorkommendes Myosin gehört mit einigen anderen Nicht-Muskel-Myosinen zu den Klasse II-Myosinen, welche auch als konventionelle Myosine bezeichnet werden. Dieses ist ein hexamerer Komplex aus zwei miteinander verwobenen schweren Myosinketten (*myosin heavy chain*, MHC, ~220 kDa) und zwei an deren globulären Kopfteilen sitzenden leichten Myosinketten-Paaren (~20 kDa). Die leichten Myosinketten (*myosin light chain*, MLC) sind wiederum in essenzielle (ELC = MLC1) und regulatorische Leichtketten (RLC = MLC2) zu differenzieren. Die regulatorische MLC kann weiterhin nach ihrem Expressionsort, d. h. Vorhof (MLC2a, a = atrial) und Herzkammer (MLC2v, v = ventrikulär) unterschieden werden. Die MHC dimerisieren und formen ein doppelköpfiges Molekül mit Kopf-, Hals- und Schwanzregion. Am N-terminalen Ende befinden sich die zwei katalytisch-aktiven globulären Köpfe, jeder mit einer ATP- und Aktinbindungsstelle. An der Halsregion bzw. im Übergang zur Kopfregion sitzen die MLC2 und MLC1 (s. Abb. 2).

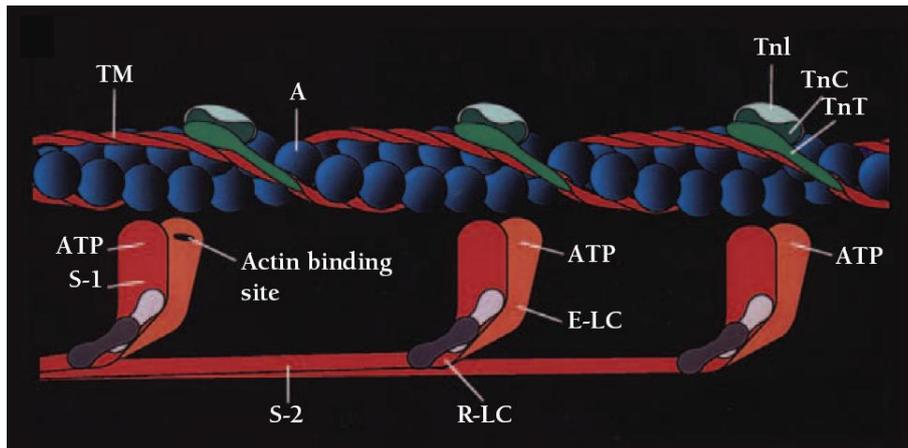


Abbildung 2: Schematische Darstellung der kontraktilen und regulatorischen Proteine der dicken und dünnen Filamente eines kardialen Sarkomers

(nach Vandenboom und Metzger, 2002)

Dargestellt sind die Aktinmonomere (A) des dünnen Filaments (blaue Kugeln), die kabelartigen Tropomyosinmoleküle (TM, rot) und der regulatorische Proteinkomplex, bestehend aus Troponin I (TnI, hellblau), Troponin C (TnC, dunkelgrün) und Troponin T (TnT, grün). Die S-1-Abschnitte oder Motorkopfdomänen des Myosins (rot und orange) enthalten die essenzielle Leichtkette (hier E-LC abgekürzt) und die regulatorische Leichtkette (hier R-LC abgekürzt). Der S-2-Bereich, ein Teil der Schwanzdomäne, verankert den S-1-Bereich im dicken Filament.

1.4 Myosin-Leichtketten-Kinase

Die Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK, *Myosin Light Chain Kinase*) ist eine Calcium/Calmodulin-abhängige Protein Kinase mit einer ausgesprochenen Substratspezifität und -exklusivität. Sie hat nur ein bislang bekanntes Zielprotein, und zwar die MLC2, welche am Serinrest 19/Threoninrest 18 (Ikebe et al., 1986; Gallagher et al., 1997) phosphoryliert wird. Die regulatorische Domäne setzt sich aus zwei partiell überlappenden Domänen, einer autoinhibitorischen und einer Calmodulin-bindenden, zusammen. Erstgenannte wird vom aktiven Zentrum des Enzyms gebunden und inaktiviert es somit (Kobe und Kemp, 1999). Durch Anlagerung des Calcium/Calmodulin-Komplexes erfolgt eine Konformationsänderung und Aktivierung der MLCK (Kemp und Pearson, 1991; Kemp et al., 1994). Eine zusätzliche Aktivitätssteigerung erfährt die MLCK durch Dephosphorylierung eines Serinrestes am C-Terminus der Calcium/Calmodulin-bindenden Sequenz (Stull et al., 1990; Kasturi et al., 1993). Die Assoziation von Calcium/Calmodulin mit der MLCK verläuft mit $2,8 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die glattmuskuläre MLCK (smMLCK) bzw. $4,6 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ für die skelettale MLCK (skMLCK) äußerst schnell, während die Dissoziationsrate mit $0,031 \text{ s}^{-1}$ ($K_d = 1,1 \text{ nM}$, für die smMLCK, skMLCK wurde nicht untersucht) vergleichsweise niedrig ist (Johnson et al., 1981; Bowman et al., 1992; Kasturi et al., 1993). Trotz der bisher unbekanntenen Dissoziationsrate der

skMLCK dürfte dieses Zusammenspiel für die posttetanische Potenzierung der Muskelkontraktion in Skelettmuskeln verantwortlich sein, wo der Calciumstrom nur 50 ms andauert. Die MLCK kann durch Protein Kinase A (PKA) phosphoryliert und nach Abdissoziation von Calmodulin inaktiviert werden, infolgedessen eine Abnahme der Kontraktion von glatten Muskelzellen eintritt (Conti und Adelstein, 1981). Die physiologische Relevanz dieses Prozesses ist jedoch fraglich (Kamm und Stull, 1985).

Bisher sind zwei MLCK-Gene in Wirbeltieren bekannt (Gallagher et al., 1997; Herring et al., 2006). Das MYLK2-Gen codiert für die skMLCK und das MLYK1-Gen für die smMLCK. Letztere verfügt über vier alternative Promotoren, welche die Entstehung von mindestens vier unterschiedlichen Proteinen zur Folge haben (Herring et al., 2006): eine kurze (~130 kDa) und zwei lange (~220 kDa) smMLCKs sowie Telokin, ein C-terminales, Kinaseverwandtes Protein (Ito et al., 1989; Gallagher und Herring, 1991; Kamm und Stull, 2001). Telokin, das ausschließlich in glatten Muskelzellen zu finden ist, verfügt weder über die Kinaseaktivität noch über die regulatorische Domäne.

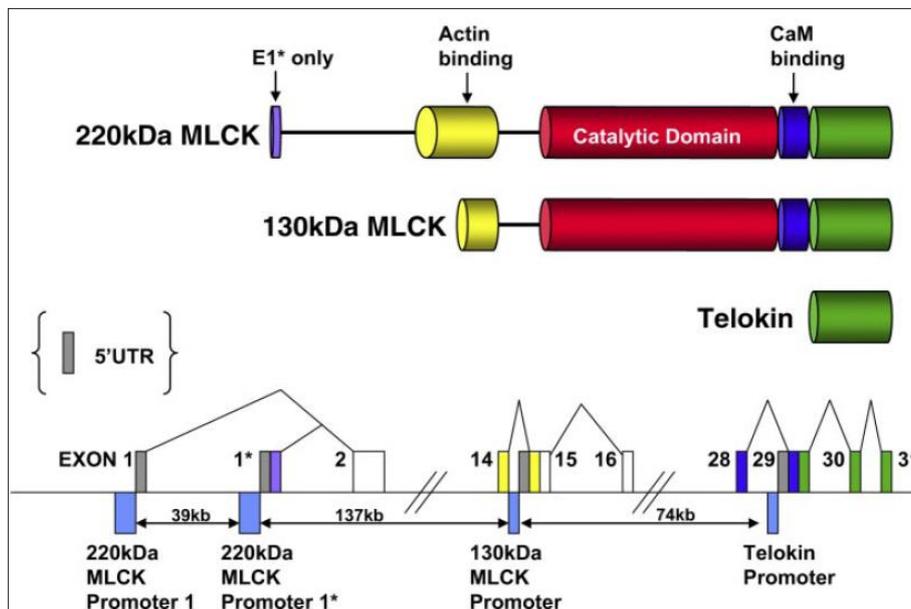


Abbildung 3: Struktur des MYLK1-Gens der Maus

(übernommen aus: Herring et al., 2006), CaM = Calmodulin

Im oberen Teil der Abbildung ist die Domänenstruktur der Proteinprodukte des MYLK1-Gens der Maus schematisch dargestellt. Die Aminosäuresequenz des Telokins ist identisch mit dem C-terminalen Abschnitt der MLCKs. Gleichermäßen ist die Aminosäuresequenz der smMLCK 130 kDa identisch mit dem C-terminalen Bereich der smMLCK 220 kDa. Ein Teil des MYLK1-Gens der Maus ist im unteren Teil schematisch dargestellt. Die Exons sind als Kästchen farblich auf die obere Darstellung abgestimmt. Die dunkelgrauen Kästchen stellen jeweils die 5'-untranslated region (UTR)-Abschnitte ↴

von jedem Transkript dar. Die Promoterregionen sind durch blaue Kästchen unterhalb der Linie gekennzeichnet. Zwei verschiedene 5'-Promotoren sollen zur Expression der zwei Isoformen der smMLCK 220 kDa führen. Dabei unterscheiden sich die Sequenzen nur in dem Abschnitt, der von dem Exon 1* codiert wird. Die daraus resultierende smMLCK 220 kDa E1* Sequenz soll um neun Aminosäuren länger sein als die Sequenz, die von Exon 1 codiert wird. Zwei weitere interne Promotoren bringen die Expression der smMLCK 130 kDa und des Telokins hervor.

Die 1990 von Shoemaker et al. (1990) beschriebene nichtmuskuläre MLCK konnte mittels Western Blot nie als Protein entsprechender Größe (>165 kDa) in Nicht-Muskelzellen nachgewiesen werden und wurde später als identisch zu der glattmuskulären MLCK identifiziert (Gallagher et al., 1991; Gibson und Higgins, 1993). Darüber hinaus wurde von Potier et al. (1995) eine nur im Hippocampus exprimierte humane MLCK gefunden. Die von Silveira et al. (1998) beschriebene MLCK-A ist eine unkonventionelle MLCK, die über den zyklischen Guanosinmonophosphat- (cGMP-) abhängigen Signaltransduktionsweg aktiviert wird. Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen involvierten konventionellen Myosin II wird hier das Dictyostelium Myosin II, ein unkonventionelles Myosin, durch die Calcium/Calmodulin-unabhängige MLCK-A aktiviert.

Da die molekularen Massen (Walsh et al., 1979; Wolf und Hofmann, 1980) und die Aminosäuresequenzen der aufgereinigten skMLCK und der kardialen MLCK ähnlich sind, nahm man an, dass die kardiale MLCK der skMLCK entspricht oder sehr ähnlich ist. Dieses konnte jedoch weder durch Northern Blot noch mittels RNase-Protektionsanalyse bestätigt werden (Roush et al., 1988; Herring et al., 1989). Trotz einer großen Variabilität bezüglich ihrer molekularen Masse (82-150 kDa) verfügen alle skMLCKs von den Tieren Huhn, Kaninchen und Ratte über die gleiche Domänenstruktur (Herring et al., 2000). Die Gruppe um Davis et al. (2001) zeigte überraschend mittels Klonierung einer MLCK-Isoform aus menschlichem Herzwert, dass diese anscheinend der skMLCK entspricht. Interessanterweise wurde hier für die skelettmuskelartige MLCK im Herzen ein Gradient sowohl für die Expression als auch für die Aktivität gefunden: Die MLCK-Menge und die MLC2 Phosphorylierung durch diese nehmen von der Herzspitze zur Herzmitte genauso hin ab wie vom Epikard zum Endokard. Dieser Befund konnte jedoch bisher von keiner Arbeitsgruppe bestätigt werden, stattdessen weisen neueste Ergebnisse von Zhi et al. (2005) daraufhin, dass die skMLCK offenbar nur im Skelettmuskel und nicht im Herzen exprimiert wird.

Die smMLCK 130 kDa (auch mit glattmuskulärer oder kurzer Form bezeichnet; Gallagher et al., 1991; Kamm und Stull, 2001) ist ubiquitär zu finden und auch die dominierende MLCK-Isoform in allen reifen glatten Muskel- und Nicht-Muskelzellen. Von Gallagher et al. (1991)

konnte eine 83%ige Sequenzhomologie und >97%ige Sequenzähnlichkeit zwischen verschiedenen Spezies nachgewiesen werden. Weiterhin wurde speziesübergreifend ein ähnliches Molekulargewicht zwischen 130-155 kDa gezeigt. Nach Herring et al. (2000) ist die einzig detektierbare klassische MLCK im Herzgewebe, aufgereinigten Herzmuskelzellen und einer Herzmuskelzelllinie (AT1) die smMLCK 130 kDa bzw. nicht von dieser zu unterscheiden. Die Sequenz der smMLCK 220 kDa ist identisch mit der smMLCK 130 kDa-Sequenz, sie verfügt jedoch über eine Verlängerung am N-terminalen Abschnitt. Das Vorkommen der smMLCK 220 kDa (auch embryonale, endotheliale, lange oder nichtmuskuläre Form genannt; Gallagher et al., 1995; Garcia et al., 1997; Kamm und Stull, 2001; Wainwright et al., 2003) verändert sich im Lebensalter. Sie scheint eine embryonale und neugeborene Form zu sein und wird im Erwachsenenalter zwar zugunsten der smMLCK 130 kDa verschoben, aber weiterhin exprimiert, wie z. B. in Gebärmutter, Lunge und Leber (Gallagher et al., 1995). Beide Enzyme haben identische katalytische Domänen und werden über Calcium/Calmodulin reguliert. Es konnte von Blue et al. (2002) gezeigt werden, dass sich die intrazelluläre Lokalisierung jedoch unterscheidet. Es wurde eine Assoziation der smMLCK 130 kDa mit Nicht-Muskel Myosin IIA festgestellt, wohingegen die smMLCK 220 kDa mit Aktinfilamenten kolokalisierte. Unklar ist, ob jede der MLCK-Isoformen verschiedene Aufgaben erfüllt oder ob sich diese überlappen.

Die ungleiche Expression der MLCK-Isoformen in unterschiedlichen Arten von Muskel- und Nicht-Muskel-Zellen in embryonalem und erwachsenem Gewebe lässt annehmen, dass die MLCK mannigfaltige Funktionen und Regulationen im Zytoskelett und in der Zellbewegung erfüllt. Die Rolle der skMLCK ist unklar, ihr wird lediglich eine modulatorische Funktion zugeordnet (Sweeney et al., 1993). In quer gestreifter Muskulatur erhöht die MLCK-vermittelte Phosphorylierung der MLC die isometrische Muskelspannung bei halbmaximaler Calciumkonzentration (Morano et al., 1985). In ausgereifter quer gestreifter Muskulatur spielt die Phosphorylierung der MLC zwar eine wichtige Rolle, ist jedoch nicht obligatorisch für eine Muskelkontraktion, die hier über das Troponin-System reguliert wird. Die Bedeutung der smMLCK für die glatte Muskulatur ist mittlerweile in die Lehrbücher aufgenommen worden. Durch Phosphorylierung der MLC2 steigt die ATPase-Aktivität des Myosins und initiiert so den kontraktile Prozess (Kamm und Stull, 1985). Darüber hinaus seien hier beispielhaft als vorgeschlagene Regulationsmechanismen für die MLCK die Stressfaserbildung und die Zellwanderung von Nicht-Muskel-Zellen genannt, aber auch Funktionen wie Apoptose und Exozytose (Mills et al., 1998). Die smMLCK 130 kDa wird im ungeborenen, neugeborenen und erwachsenen Herzen exprimiert. Sie vermag die Motoraktivität des Nicht-Muskel Myosins II zu regulieren und könnte eine kritische Rolle in der kardialen Entwicklung spielen (Somlyo et al., 2004). Telokin wird eine Rolle in der Myosinbindung und in der Anordnung

von Myofilamenten zugeschrieben (Shirinsky et al., 1993). Durch die Fähigkeit, die Myosin-Leichtketten-Phosphatase (MLCP) zu aktivieren, konnte weiterhin eine modulatorische Funktion auf die Kontraktion von glatten Muskelzellen gezeigt werden.

1.5 MLCK-vermittelte MLC2 Phosphorylierung im Kontext mit dem α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt

Die Gruppe um Andersen et al. (2002) konnte an der Herzkammer der Ratte und des Menschen eine Abhängigkeit zwischen dem inotropen Effekt nach α_1 -adrenerger Stimulation und MLCK-vermittelter MLC2 Phosphorylierung feststellen. Die Ergebnisse werden von anderen Hinweisen gestützt, dass G_q -gekoppelte Rezeptoragonisten wie Phenylephrin, Angiotensin II (Aoki et al., 2000) oder Endothelin-1 (Rossmanith et al., 1997) zu einer Zunahme der MLC2 Phosphorylierung führen. Es gibt jedoch auch Ergebnisse, wo eine α_1 -adrenerge Stimulation zu keiner Änderung des Phosphorylierungsstatus der MLC2v (Morano et al., 1987) oder nur zu einer moderaten Zunahme der MLC2v Phosphorylierung führte (Fitzsimons et al., 1990). Transgene Mäuse, bei denen die MLC durch eine nicht-phosphorylierbare MLC-Form ersetzt wurde, zeigten im Phänotyp eine Vorhofhypertrophie und eine Herzkammervergrößerung (Sanbe et al., 1999). Die Effekte an den Vorhöfen waren auffallend schwerwiegender als an den Herzkammern, was auf eine wichtigere Rolle des Regulationsweges in den Vorhöfen als in den Herzkammern schließen lässt. Die Daten stehen in Einklang mit dem Lehrbuchwissen (Opie, 2001), dass α_1 -Adrenozeptor-vermittelte positiv inotrope Effekte in verschiedenen Spezies, wie auch dem Menschen, im Vorhof ausgeprägter erscheinen als in der Herzkammer. Dass es nach α_1 -adrenerger Rezeptorstimulation im menschlichen Vorhof sowohl zu einem MLCK-vermittelten Anstieg der Kontraktionskraft als auch einer MLCK-abhängigen Zunahme der Phosphorylierung der MLC2a kommt, konnte erstmals von unserer Arbeitsgruppe (Grimm et al., 2005) gezeigt werden.

Insgesamt führen die vorliegenden Daten zu der Annahme, dass die quantitativen Unterschiede der Effekte nicht nur speziesabhängig sind (z. B. Ratte vs. Mensch), sondern auch von den untersuchten Proben (z. B. isolierte Kardiomyozyten vs. Herzkammer *in vivo*, Vorhof vs. Herzkammer) und von den jeweiligen Versuchsbedingungen abhängen.

Nach der derzeitigen Datenlage ist nur eine MLCK-Inhibition in der Lage, den Phenylephrineffekt nahezu aufzuheben. Andere pharmakologische Inhibitoren der Protein Kinase C (PKC), des Natrium-Calcium-Austauschers (NCX), des Natrium-Protonen-Austauschers (NHE) oder der Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK) konnten am

menschlichen Vorhof bzw. an Papillarmuskeln der Ratte keine oder nur moderate Effekte hervorrufen (Andersen et al., 2002). Die MLC2 kann sowohl durch die MLCK als auch durch die PKC phosphoryliert werden, jedoch scheinen die PKC-vermittelten Effekte eher eine untergeordnete Rolle zu spielen. Möglicherweise interagiert die PKC als Kofaktor, um die MLCK-vermittelte MLC2 Phosphorylierung zu verstärken (Noland und Kuo, 1993; Venema et al., 1993). Rho-Kinase, ein Effektor des kleinen G-Proteins RhoA, phosphoryliert und inhibiert infolgedessen die Myosin-Untereinheit der MLCP, welche die MLC2 dephosphoryliert (Kimura et al., 1996). Daher können sowohl die MLCK als auch die Rho-Kinase den Phosphorylierungsstatus der MLC2 beeinflussen.

1.6 Calcium und MLCK

Nach α_1 -adrenerger Stimulation im Herzmuskel kommt es zu einem verhältnismäßig geringen intrazellulären Calciumtransienten in Bezug auf den Anstieg der Kontraktionskraft (Endoh und Blinks, 1988). Dieses spricht für eine Calciumsensitivierung der Myofilamente. Im Gegensatz dazu führt eine β -adrenerge Stimulation zu einem größeren Anstieg des Calciumtransienten, was auf eine Calciumdesensitivierung schließen lässt.

Durch die MLC2 Phosphorylierung kommt es zu einer negativen Ladung an der Myosin-Leichtkette. Dieses veranlasst eine Annäherung an das Aktinfilament und/oder erhöht die Phosphatfreisetzung während eines Querbrückenzyklus. Dieses resultiert in einer höheren Wahrscheinlichkeit der Anlagerung und Kraftentwicklung (Sweeney et al., 1994). Da durch die MLC2 Phosphorylierung die Kontraktionskraft bei einer gegebenen Calciumkonzentration steigt, bedeutet das, dass die Calciumsensitivität der Myofilamente erhöht wird (Morano, 1999; Davis et al., 2002). Die Calciumsensitivität wiederum nimmt mit der Zahl von Querbrückenzyklen im Krafterzeugungsstadium zu.

Da der Calciumtransient verhältnismäßig klein ist, konnte bisher nicht geklärt werden, woher das Calcium für die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen MLCK stammt. Verschiedene Möglichkeiten wurden diskutiert, wie z. B. die IP_3 -vermittelte Calciumfreisetzung aus dem SR, Erhöhung von L-Typ Calciumströmen (Brückner und Scholz, 1984; Liu und Kennedy, 1998; Woo und Lee, 1999), sowie über die Aktivierung von NHE1 könnte ein Einstrom von Natriumionen durch den NCX gegen Calciumionen wieder ausgetauscht und somit die Calciumkonzentration erhöht werden (Terzic et al., 1992; Alvarez et al., 1999). Auch wenn die Frage, woher und über welchen Mechanismus das Calcium kommt, bisher ungeklärt ist, wird jedoch allgemein akzeptiert, dass die Zunahme des Calciumtransienten nicht ausreicht, um dem α_1 -adrenergen Effekt Rechnung zu tragen (Endoh, 1996). Der

Erhöhung des intrazellulären Calciums kommt möglicherweise eine Schlüsselrolle als Trigger für die Regulation der MLCK und damit der Kontraktionskraft zu.

1.7 RNA-Interferenz

Die RNA-Interferenz (RNAi) wurde als Methode für einige Experimente dieser Arbeit verwendet. Daher werden die Grundlagen der RNAi an dieser Stelle kurz beschrieben. Das in dieser Arbeit entwickelte System wird in Kapitel 2.2 und 2.3 dargestellt sowie später diskutiert. Mithilfe dieser Methode kann man ein *in vivo Knockout*-System auf *in vitro*-Ebene nachahmen (*Knockdown*).

1.7.1 Mechanismus

Die RNA-Interferenz ist ein Mechanismus, der zur posttranskriptionalen Inhibition der Genexpression durch doppelsträngige (ds) RNA führt (Fire et al., 1998). Er wurde erstmals in Pflanzen beobachtet, ist hoch konserviert und lässt sich heute mit einigen Detailunterschieden bei einem breiten Spektrum an Organismen finden. Dass das Einbringen einer zusätzlichen Kopie eines Genes entgegen der Erwartung sowohl zur Unterdrückung der Transgen- als auch der endogenen Expression führte, wurde Co-Suppression bei Pflanzen bzw. *quelling* bei Pilzen genannt (Napoli et al., 1990; Cogoni und Macino, 1999). Der Auslöser für die Inhibition der Genexpression ist hierbei eine 21 Basenpaare (bp) bis 28 bp lange dsRNA mit einem 2 bp-Überhang am 3'-Ende, die als *short* oder *small interfering* RNA (siRNA) bezeichnet wird (Elbashir et al., 2001b; Meister und Tuschl, 2004). Diese entsteht bei der Prozessierung langer dsRNA durch eine ATP-abhängige Ribonuklease namens Dicer (Zamore et al., 2000; Bernstein et al., 2001). Die siRNA wird von einem Proteinkomplex gebunden, welcher als *RNA induced silencing complex* (RISC) bezeichnet wird. Nach Abspaltung des *Sense*-Stranges bindet der Proteinkomplex an die *messenger* RNA (mRNA), die komplementär zum *Antisense*-Strang im RISC ist. Die zum Komplex gehörende Nuklease schneidet die gebundene mRNA zehn Nukleotide vom 5'-Ende, und somit ist die Translation des betreffenden Proteins unterbunden (Elbashir et al., 2001c; s. Abb. 4).

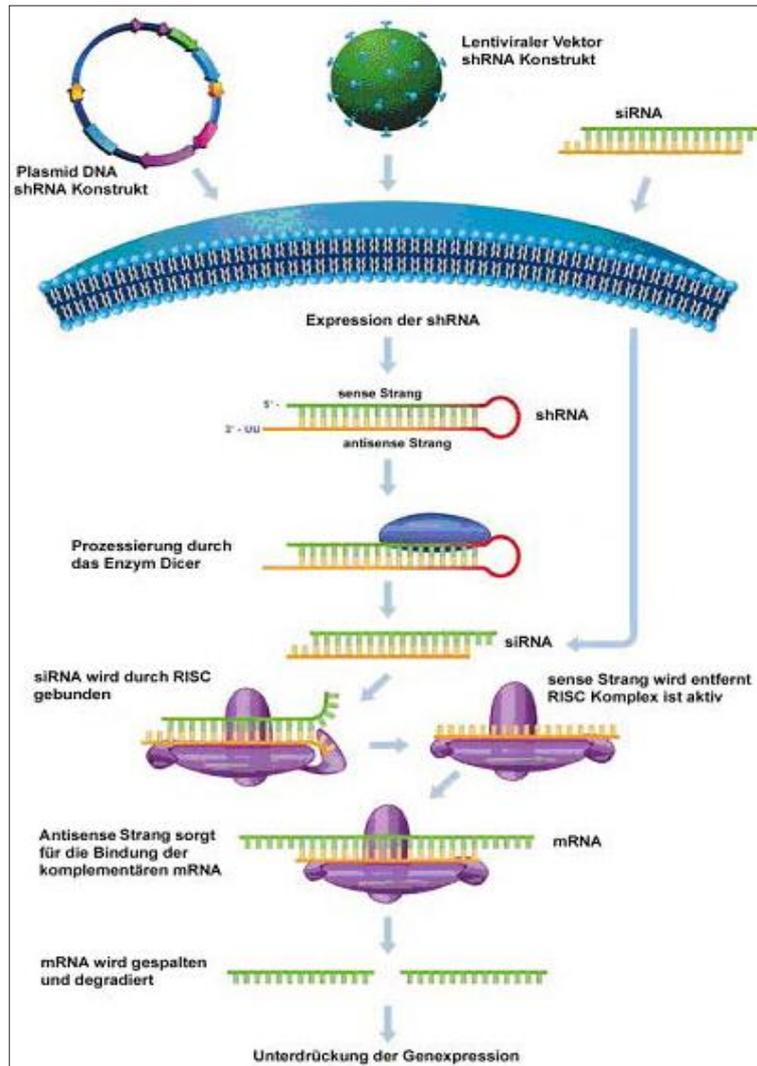


Abbildung 4: Mechanismus der RNA-Interferenz

(geändert nach: <http://www.sigma-aldrich.com>)

1.7.2 Experimentelle Voraussetzungen

Der Einsatz von RNAi war in Säugetierzellen anfangs nicht erfolgreich, da es nach Gabe von dsRNA zu einer Interferonantwort kam, die zu einer generellen Unterdrückung der Proteinexpression und zum Zelltod führte (Manche et al., 1992; Stark et al., 1998; Sen und Sarkar, 2005). Versuche von Elbashir et al. (2001a) zeigten jedoch, dass diese Immunreaktion umgangen werden kann, wenn dsRNA verwendet wird, die kleiner als 30 bp ist (Bantounas et al., 2004). Weitere Untersuchungen ergaben, dass nicht jede siRNA, die vollständig komplementär zum Ziel-Gen ist, die Expression gleichermaßen inhibiert. Daher wurden Kriterien für die Wahl effektiver siRNA-Sequenzen vorgeschlagen. Danach sollte die Sequenz mit zwei Adenosinbasen beginnen, 19 bp lang sein und der Guanin/Cytosin- (G/C-) Anteil zwischen 45%-55% liegen. Die siRNA Sequenz sollte zwischen 50 bp *downstream*

vom Start-Codon und 50-100 bp *upstream* des Termination-Codons liegen. Um eine Agglomeratbildung zu vermeiden, sollten mehr als drei Guaninbasen oder Cytosinbasen in Folge vermieden werden. Ein unabdingbarer Vergleich mit den Gensequenzen des Zielorganismus stellt sicher, dass die siRNA keine anderen Gene beeinflusst. Dabei sollten Homologien von mehr als 17 bp ausgeschlossen werden (Elbashir et al., 2001c). Die Möglichkeit, effektive siRNA auf unterschiedliche Weise in Zellen einführen zu können, führte schnell zu einer weiten Verbreitung dieser Technik und zu einer Vielzahl von Studien zur funktionellen Genomanalyse (Dykxhoorn et al., 2003; Kittler et al., 2004; Huesken et al., 2005).

1.7.3 Transiente Expression

Gegenüber anderen Methoden zur transienten Transfektion, wie *Antisense* Oligonukleotide (ASO) und Ribosomen, zeichnet sich die RNAi bei ihrer Anwendung durch eine höhere intrazelluläre Stabilität aus (Bertrand et al., 2002). Von Clayton (2004) wurde bei einer transienten Transfektion der siRNA je nach Zellteilungsrate eine Aktivität von drei bis sieben Tagen beschrieben. Durch Modifikationen an den 2'-Positionen des Zuckers der siRNA erreichte man eine verlängerte Aktivität der siRNA, ohne Spezifität und Wirkung einzuschränken (Chiu und Rana, 2003). Ein Austausch der 2'-Hydroxylgruppen (2'-OH-Gruppen) gegen 2'-Fluoro- (2'-F-) Pyrimidingruppen zeigte einen Schutz vor Abbau durch Nukleasen (Layzer et al., 2004). Zur Transfektion von siRNA werden häufig kationische Lipide eingesetzt, die von vielen Firmen als optimierte Präparate für siRNA angeboten werden und in Zelllinien gute Transferraten erreichen (Dalby et al., 2004). Die Methode der Elektroporation zeigte für primäre und nichtproliferierende Zellen einen effizienten siRNA-Transport in diese (Ovcharenko et al., 2005). Für bestimmte experimentelle Fragestellungen oder therapeutische Strategien sind diese Wege der siRNA-Applikation jedoch ungeeignet. Die Wirkungsdauer der siRNA ist zu kurz, vom Modell her untauglich oder nicht effizient genug. Eine Weiterentwicklung und Alternative gegenüber dem *Knockout*-Modell mittels homologer Rekombination sind die Expressionskonstrukte für siRNA in Zellen (Brummelkamp et al., 2002; Paddison et al., 2002). Die Expression wird hierbei von einem RNA-Polymerase III Promotor gesteuert. Für den Einsatz in menschlichen Zellen ist ein H1 Promotor geeignet, der auch in murinen Zellen funktionell aktiv ist. In der Regel wird in Mauszellen ein U6 Promotor verwendet (Sui et al., 2002; Tuschl, 2002; Yu et al., 2002). Dabei können der *Sense*- und *Antisense*-Strang von je einem Promotor exprimiert werden, wobei sich die beiden Stränge im Anschluss zur siRNA zusammenlagern. Ein anderer Ansatz ist die selbstkomplementäre *short hairpin* RNA (shRNA), wo der *Sense*- und *Antisense*-Strang von einem in der Regel drei bis neun Basen langem *Loop* verbunden sind.

Fünf Thymidinbasen stoppen als Terminationssequenz direkt hinter der shRNA-Sequenz die Expression. Die komplementären Stränge lagern sich nach der Expression zusammen, und das Enzym Dicer spaltet die *Loop*sequenz ab, was zur siRNA führt. Somit ergab sich die Möglichkeit durch den Einsatz von Expressionskassetten, bestehend aus shRNA und RNA-Polymerase III Promotor in viralen Vektoren, auch ruhende Zellen effizient transfizieren zu können. Lentivirale Vektoren stellen hierbei eine Besonderheit durch die Fähigkeit der stabilen Integration der Expressionskassetten in das Genom der Zielzelle dar (Wiznerowicz und Trono, 2003).

Eine Variabilität der RNAi ist die micro RNA (miRNA), welche sich durch eine nicht ganz vollständige Komplementarität zu 3'-UTR-Bereichen von Genen auszeichnet, die im Rahmen der Entwicklung des Organismus zeitlich reguliert sind. miRNAs führen im Gegensatz zu siRNAs nicht zum Abbau ihrer Ziel-mRNA, sondern aufgrund der nicht vollständigen Basenpaarung lediglich zu einer Inhibition der Translation (Hutvagner und Zamore, 2002).

In dieser vorliegenden Arbeit kamen adeno- und lentivirale shRNA-exprimierende Vektoren zur Anwendung. Der Haarnadel-Vorläufer, der die Zielsequenz enthält, wird von dem Enzym Dicer zu aktiver siRNA prozessiert, die anschließend über die beschriebenen Mechanismen zur Inhibition der Expression des Zielproteins führt.

1.8 Lentivirale Vektoren

Lentiviren (LV) gehören zur Klasse der Retroviren und können wie Adenoviren (AV) neben proliferierenden Zellen auch primäre und nicht-proliferierende Zellen infizieren (Naldini et al., 1996; Horejsh et al., 2002). Verschiedene Rezeptoren in der Virushülle entscheiden darüber, welche Zellen infiziert werden. So besitzt das bekannteste Lentivirus, das *Human Immunodeficiency Virus* (HIV; Barre-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1983; Alizon et al., 1984), einen Liganden für den CD4-Rezeptor, mit dem es humane T-Zellen effektiv infizieren kann. Retroviren enthalten RNA-Genome, welche in der Zielzelle revers in DNA transkribiert werden. Diese DNA wird anschließend ins Wirtsgenom integriert. Alle Retroviren besitzen die drei Gene *gag* (*groupspecific-antigen*), *pol* (polymerase) und *env* (*envelope*), welche für die Virusproduktion essenziell sind. Das *Gag*-Gen enthält die Information für die viralen Kernproteine, *pol* codiert für die Enzyme Reverse Transkriptase und Integrase und *env* codiert für die Rezeptorbindungsproteine. Für den Kontakt und die Fusion mit der Zelloberfläche der Wirtszelle ist somit *env* von ausschlaggebender Bedeutung. Zur Nutzung eines viralen Vektors können diese Gene, ähnlich wie bei AV, von Helferplasmiden in einer Produktionszelllinie zur Verfügung gestellt werden. Dieses bietet entscheidende Vorteile, wie

eine vergrößerte Kapazität des Vektors für das Transgen, und es verhindert die Replikation des Virus in den Zielzellen. Lediglich die Integrationssequenzen und das Packsignal müssen auf dem viralen Vektor vorhanden sein. Trotz des so erreichten Maßes an biologischer Sicherheit sind jedoch nicht alle Risiken, wie zum Beispiel eine Rekombination mit einem Wildtyp-HIV oder Mutationen durch die Integration der Virus-DNA ausgeräumt (Romano, 2005). Das HI-Virus ist in Abbildung 5 und der Replikationszyklus für dieses in Abbildung 6 dargestellt. Für die vorliegende Arbeit wurde ein vom Typ HIV-1 stammender lentiviraler Vektor verwendet, daher erfolgt im Weiteren die Beschreibung des HIV-1. Im elektronenmikroskopischen Bild sehen HIV-1 und HIV-2 zwar weitgehend gleich aus, sie unterscheiden sich aber hinsichtlich der Molekulargewichte ihrer Proteine und der Anordnung der Regulatorgene.

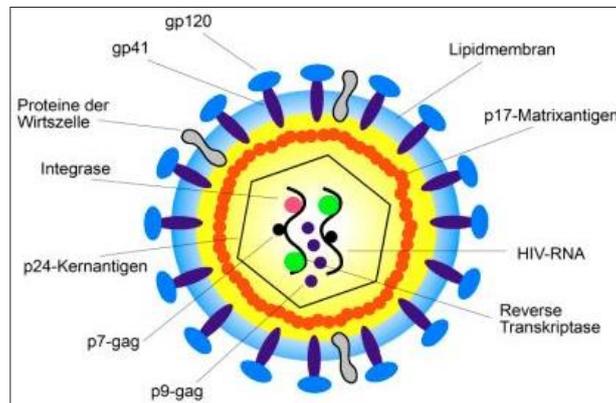


Abbildung 5: HIV und seine Gene

(nach: <http://www.HIV.net>)

HIV-1-Viruspartikel sind im Durchmesser ca. 100 nm groß und von einer Lipoproteinhülle umgeben. In diese Hülle eingebettet sind 72 etwa 10 nm große *env*-Glykoproteinkomplexe. Diese bestehen aus einem externen Anteil (gp120) und einem Transmembranprotein (gp41). Die Virushülle enthält außerdem verschiedene Proteine der Wirtszelle, die beim Abscheiden des Virus („*budding*“) aus der virusproduzierenden Zelle in dessen Membran inkorporiert werden. Das p17-Matrixprotein ist an der Innenseite der Virushülle verankert und für die Aufrechterhaltung von Struktur und Integrität des Virus wichtig. Das monomere p24-Kapsid-Antigen („*core antigen*“) ist von zylindrischer Gestalt und enthält zwei Kopien der HIV-RNA. Diese liegt ihrerseits als Protein-Nukleinsäurekomplex, gebunden an das Nukleoprotein p7 und die Reverse Transkriptase p66, vor. Außer der Reversen Transkriptase enthält das Viruspartikel auch andere Enzyme, die es für seine Vermehrung benötigt, die Integrase p32 und die Protease p11.

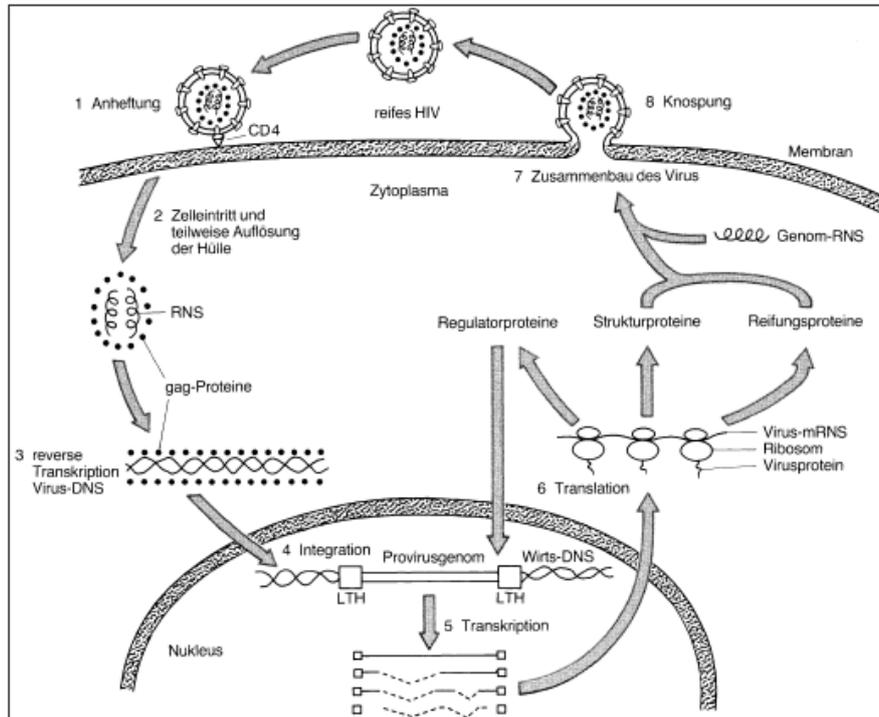


Abbildung 6: Replikationszyklus des HIV

(entnommen aus: Tropenmedizin in Klinik und Praxis, Langer W. und Löscher T., 2000, 3. Auflage, Kapitel 32, S. 416)

RNS = Ribonucleinsäure, DNS = Desoxyribonucleinsäure, mRNS = messenger Ribonucleinsäure

Nach Anheftung von Viruspartikel an das CD4-Rezeptormolekül tritt das Virus mittels eines pH-abhängigen Mechanismus und/oder Endozytose in die Wirtszelle ein (1). Die äußere Lipidmembran des Virus wird entfernt, wenn Partikel mit den Vakuolen des Zytoplasmas in wenigen Minuten bis wenigen Stunden fusionieren (2). Von der Virus-RNS wird mittels reverser Transkription DNS geformt (3). Nach Transport in den Zellkern erfolgt nach zwei bis zehn Stunden die Integration in die Wirtsgenom (4). Das integrierte Provirusgenom wird durch zelluläre RNS-Polymerase transkribiert. In schnell wachsenden Zellen beginnt die Transkription acht bis zwölf Stunden nach Infektion (5). 12 bis 24 Stunden nach Infektion entstehen durch Translation der Virus-mRNS Regulatorproteine, die die Synthese von Reifungs- und Strukturproteinen stimulieren (6). Eine Akkumulation der Strukturproteine an der Zellmembran ermöglicht den Zusammenbau von Viruspartikel (7). Die Reifung und Ausstoßung aus der Zelle beginnen 36 bis 48 Stunden nach Infektion. Die Zeitangaben sind Schätzungen und können je nach Zelltyp und metabolischer Situation der Zelle erheblich variieren.

1.9 Zielsetzung der Arbeit

Basierend auf den aus menschlichem Herzmuskelgewebe gewonnenen Daten von unserer Arbeitsgruppe (Haas, 2004) ließen sich für die α_1 -adrenerge Signalkaskade die in Abbildung 7 gezeigten Abläufe formulieren.

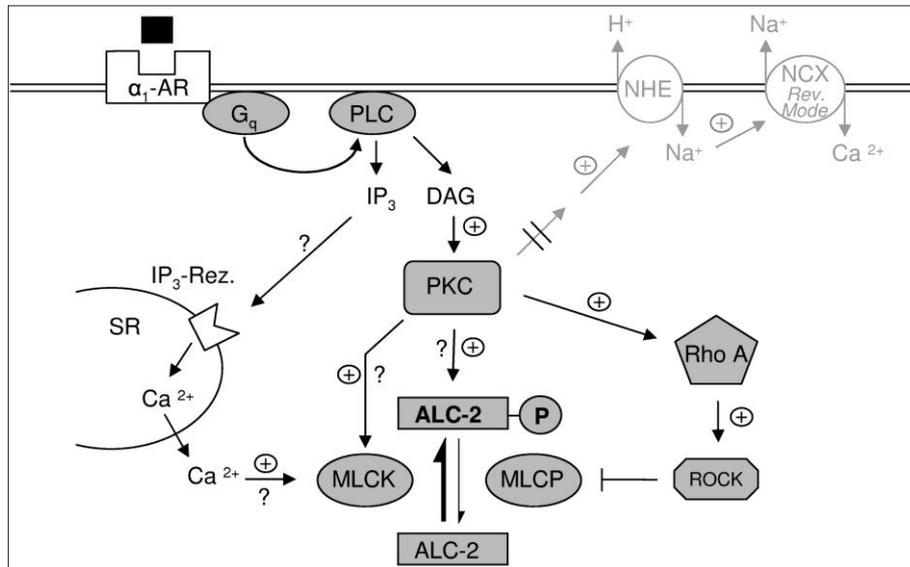


Abbildung 7: Im Rahmen einer Promotionsarbeit in unserer Arbeitsgruppe von Haas (2004) postulierte α_1 -adrenerge Signaltransduktionswege im menschlichen Vorhof

(entnommen aus: Haas, 2004)

Bisher noch nicht aufgeführte Abkürzungen: α_1 -AR = α_1 -Adrenozepator, H⁺ = Proton, Na⁺ = Natriumion, Ca²⁺ = Calciumion, Rev. Mode = *reverse mode*, IP₃-Rez. = IP₃-Rezeptor, ROCK = Rho-Kinase, ALC-2 = atriale MLC2, P = Phosphat

Phenylephrin führt nach Bindung an den α_1 -AR zu einer Freisetzung von IP₃ und DAG. Dem nachgeschaltet kommt es zu einer Aktivierung der PKC und der MLCK sowie zu einer Hemmung der MLCP. Daraus resultiert ein schneller Anstieg der ALC-2 Phosphorylierung und eine Kontraktionskraftzunahme. Über eine Hemmung der Rho-Kinase konnte eine Reduktion der ALC-2 Phosphorylierung und somit eine Kontraktionskraftabnahme beobachtet werden. Der NHE/NCX-Signalweg scheint keine Bedeutung im Zusammenhang mit der α_1 -adrenergen Signalkaskade im menschlichen Vorhof zu spielen.

Auf diesen Daten beruhend, ließen sich folgende Ziele für die vorliegende Promotionsarbeit formulieren:

1. Die Charakterisierung des Signalweges, der die α_1 -adrenergen Signale zur Aktivierung der MLCK vermittelt.
2. Die Identifizierung der MLCK-Isoform, die für den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt notwendig ist.
3. Die Untersuchung eines funktionellen MLCK *Knockdowns* mithilfe der RNA-Interferenz und dessen Auswirkung auf den α_1 -adrenergen Effekt.

1.9.1 Versuchskonzeption

Zur Charakterisierung des Signalweges, der die α_1 -adrenergen Signale zur Aktivierung der MLCK vermittelt, wurden funktionelle Messungen an isolierten linken Vorhöfen der Maus unter isometrischen Bedingungen im Organbad durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine stabile, gut reproduzierbare Messung kontraktile Parameter über mehrere Stunden. Durch die Inkubation der Präparate mit pharmakologischen Substanzen können in dieser Zeit gezielt einzelne Signaltransduktionskomponenten aktiviert bzw. ausgeschaltet werden. Dieselben Präparate können anschließend für biochemische Untersuchungen verwendet werden und eignen sich daher gut zur Aufklärung von Signaltransduktionsmechanismen.

Die Identifizierung der MLCK-Isoformen wurde anhand von biochemischen Methoden auf Protein- und mRNA-Ebene anhand von Western Blot, nicht-quantitativer Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und quantitativer RT-PCR durchgeführt.

Der funktionelle MLCK *Knockdown* wurde mittels adeno- und lentiviraler shRNA-Expression erzeugt. Die Auswirkung auf die kontraktile Funktion konnte anhand des in unserer Gruppe zur Verfügung stehenden Modells des *Engineered Heart Tissue* (EHT) untersucht werden, das 1997 erstmals publiziert (Eschenhagen et al., 1997) und inzwischen erfolgreich weiterentwickelt wurde (Zimmermann et al., 2002). Dieses Modell beruht auf isolierten Herzzellen neugeborener Ratten, die in einer ringförmigen dreidimensionalen Matrix aus Collagen rekonstituiert und in serumhaltigem Medium kultiviert werden. Im Verlauf der Kultur entwickelt sich ein Netzwerk von elektrisch verbundenen, kohärent schlagenden Kardiomyozyten, das über Tage bis Wochen stabil bleibt und damit längerfristige Interventionen möglich macht. EHTs erlauben aufgrund ihrer mechanischen Festigkeit und ihrer geometrischen Form relativ einfach durchzuführende Messungen ihrer kontraktile Parameter unter isometrischen Bedingungen im Organbad. Auch hier konnten die Präparate nach Messung der kontraktile Eigenschaften für biochemische Untersuchungen oder immunhistologische Aufnahmen herangezogen werden.

2 Methoden

Soweit nicht bereits im Text erwähnt, sind alle verwendeten Materialien und Geräte im Anhang unter Punkt 8.1 bis 8.5 tabellarisch aufgeführt. Alle Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders im Text angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt.

2.1 Tierexperimentelle Arbeiten: Erwachsene Mäuse

2.1.1 Tierhaltung und Genehmigung

Männliche FVB/N-Mäuse aus Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Ssniff[®]) und Leitungswasser nach Belieben gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden acht Wochen alte Tiere verwendet. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org #238 und Org #240).

2.1.2 Organentnahme

Die Tiere wurden nach leichter CO₂-Betäubung dekapitiert und thorakotomiert. Das Herz wurde entnommen und in eine Glasschale (Durchmesser: 19 cm) mit 200 ml Tyrode-Lösung (1,8 mM Calcium), welche zur pH-Einstellung (pH 7,4) permanent über einen Schlauch mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) begast wurde, gelegt. Hier wurde das Herz durch leichtes Schwenken und minimalen Druck mit einer Pinzette von überschüssigem Blut befreit. Die Präparation erfolgte in einer zweiten Glasschale mit einem Silikonboden (Durchmesser: 19 cm), die mit 150 ml Tyrode-Lösung befüllt und durch perforierte Kunststoffschläuche am Rand des Gefäßes kontinuierlich mit Carbogen begast wurde. Nach Fixierung des Herzens mit Stecknadeln am Boden wurde zuerst der rechte, anschließend der linke Vorhof mit mikrochirurgischen Scheren abgetrennt. Der linke Vorhof wurde an seiner Spitze mit einem Knoten aus chirurgischem Nahtmaterial (0,7 metric Seidenfaden) versehen und mittels einer Öse gleichzeitig an einen Metallhaken geknotet. An der gegenüberliegenden Seite wurde ebenfalls ein Knoten mit Öse angebracht, um so die Präparate zwischen den Elektroden im Organbad befestigen zu können (s. Abb. 8). Die rechten Vorhöfe wurden kurz auf einem Papiertuch abgetupft, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C für biochemische Experimente gelagert. Ebenfalls wurden bei Bedarf aus diesen Tieren auch Kontrollgewebe wie linke und rechte Herzkammer, Skelettmuskel und Harnblase entnommen und mit einem

Papiertuch abgetupft, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ für biochemische Experimente gelagert. Dieses erfolgte nur aus dem jeweils letzten präparierten Tier, da der zeitliche Vorrang den linken Vorhöfen und dem Kontraktionsexperiment galt. Die Scheren und Pinzetten wurden wegen der Kontaminationsgefahr zwischen den einzelnen Gewebeentnahmen besonders gründlich gereinigt.

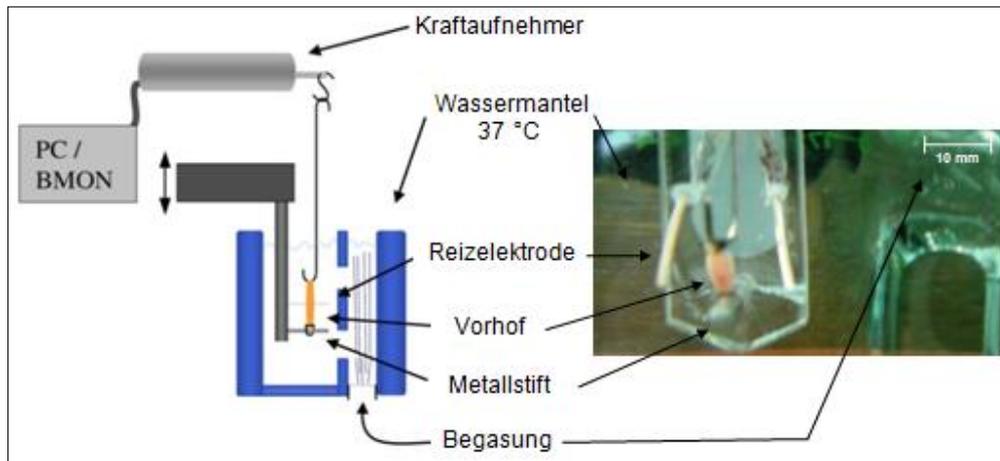


Abbildung 8: Darstellung eines Organbades mit einem linken Vorhof der Maus

2.1.3 Erfassung der Kontraktionsparameter

2.1.3.1 Kontraktionsmessung

Die Kontraktionsexperimente wurden in Tyrode-Lösung ($1,8\text{ mM}$ Calcium) in Standard-Organbädern unter elektrischer Stimulation (Frequenz 1 Hz , Pulsdauer 5 ms , Stromstärke 20% über Reizschwelle) bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen durchgeführt. Nachdem alle Vorhöfe aufgehängt waren, wurde die elektrische Stimulation eingeschaltet. Die Vorhöfe wurden in Schritten von $0,2\text{ mm}$ ca. alle 3 min bis zum Erreichen der maximalen Kontraktionskraft vorgedehnt. Anschließend wurde die Tyrode-Lösung während einer 45-minütigen Equilibrierungsphase dreimal gewechselt.

2.1.3.2 Das Erstellen von Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Als α_1 -Adrenozeptor-Agonist wurde Phenylephrin verwendet. Da Phenylephrin in höheren Konzentrationen auch an β -Adrenozeptoren bindet (Endoh et al., 1976), wurde zu Beginn der Experimente zur Vermeidung β -adrenerger Effekte $0,3\text{ }\mu\text{M}$ des β -Adrenozeptor-Antagonisten

Nadolol zugegeben und danach ca. 7 min bis zur erneuten Equilibrierung der Vorhöfe gewartet. Anschließend wurden die Vorhöfe während der in Tabelle 1 angegebenen Zeit mit den jeweiligen Interventionssubstanzen behandelt, daraufhin wurde Phenylephrin in steigenden Konzentrationen von 0,3-100 μM zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde gewartet, bis die Kontraktionskraft ein Plateau erreichte. Zur Bestimmung der Maximalkraft der Vorhöfe wurde anschließend 10 μM Isoprenalin (unselektiver β -Adrenozeptor-Agonist) hinzugefügt, d. h. in einer Konzentration, die die β -Blockade durch Nadolol überkommt (s. Abb. 27).

2.1.3.3 Das Erstellen von Endothelin-1-Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Um weitere Erkenntnisse über G_q -gekoppelte Rezeptoren zu gewinnen, wurde als Agonist Endothelin-1 in Konzentrationen von 0,3-100 nM analog zu dem unter 2.1.3.2 beschriebenen Protokoll verwendet.

2.1.3.4 Das Erstellen von Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Um die Effekte endogener Katecholamine zu blockieren, wurde vorab ebenfalls 0,3 μM des β -Adrenozeptor-Antagonisten Nadolol zugegeben und danach ca. 7 min bis zur erneuten Equilibrierung der Vorhöfe gewartet. Anschließend wurden die Vorhöfe während der in Tabelle 1 angegebenen Zeit mit den jeweiligen Interventionssubstanzen behandelt, daraufhin wurde Isoprenalin in steigenden Konzentrationen von 0,01-10 μM zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde gewartet, bis die Kontraktionskraft ein Plateau erreichte.

2.1.3.5 Interventionen

Die verwendeten Substanzen wurden, soweit möglich, in Aqua ad iniectabilia gelöst. Bei ungenügender Wasserlöslichkeit wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) als Lösungsmittel gewählt. In diesem Fall wurde die entsprechende Menge Lösungsmittel zu den Kontrollen gegeben. Die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen und deren Lösungsmittel sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Die maximale Konzentration von DMSO betrug 0,1% (V/V).

Tabelle 1: Liste der Interventionssubstanzen

Substanz	Eingesetzt als	Eingesetzte Konzentration	Inkubationszeit	Lösungsmittel
2-Aminoethoxy-diphenylborat (2-APB)	IP ₃ -Rezeptorblocker	2 und 20 µM	20 Minuten	DMSO
Chloroethylclonidin Dihydrochlorid (CEC)	α _{1B} -Adrenozeptor-Antagonist	1 µM	15 Minuten	H ₂ O
ML-7 Hydrochlorid	MLCK-Inhibitor	10 µM	15 Minuten	DMSO
ML-9 Hydrochlorid	MLCK-Inhibitor	10 µM	25 Minuten	H ₂ O
Prazosin Hydrochlorid	α ₁ -Adrenozeptor-Antagonist	1 µM	15 Minuten	H ₂ O
WB-4101 Hydrochlorid	α _{1A} -Adrenozeptor-Antagonist	100 nM	15 Minuten	H ₂ O
Wortmannin	MLCK-Inhibitor	10 µM	15 Minuten	DMSO
Y-27632 Dihydrochlorid Monohydrat	Rho-Kinase-Inhibitor	10 µM	15 Minuten	H ₂ O

2.1.3.6 Datenerfassung und -verarbeitung

Die Erfassung der Daten erfolgte mittels eines PC-gestützten Biomonitoring Systems (BMON). Die Messverstärker wurden vor jeder Messung mittels eines Gewichtes von 860 mg kalibriert. Die Ausgabe der minimalen und maximalen Kraft erfolgte durch die Messsoftware als Mittelwert einer Sekunde. Die Kontraktionskraft wurde aus der Differenz von maximaler Kraft und der Grundspannung errechnet. Die minimale Auflösung der Datenerfassung betrug 0,01 mN. Zur Erfassung der aufgezeichneten Daten wurden die Zeitpunkte, zu denen Daten zur Weiterverarbeitung mittels Tabellenkalkulation (Microsoft® Excel® 2007) gewonnen werden sollten, manuell festgelegt.

2.2 Adenovirale shRNA-Expression

Replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren (AV) stellen ein vielseitiges und schnelles virales Gentransportsystem (Transfektionssystem) für die funktionelle und therapeutische Genanalyse dar. Mit Adenoviren können unabhängig von der Zellteilung nahezu alle Arten

von Säugetierzellen infiziert werden. Gleichzeitig sind sie jedoch von geringer Pathogenität für den Menschen. Bisher sind 49 verschiedene Serotypen der menschlichen Adenoviren bekannt (Shenk, 2001). Adenoviren enthalten eine doppelsträngige lineare DNA als Genom mit einer Länge von 32-36 Kilobasenpaare (kb).

Die in dieser Arbeit generierten rekombinanten Adenoviren sind nicht onkogene (verbleiben extrachromosomal) Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5) und wurden nach der Methode von He et al. (1998) hergestellt. Das verwendete adenovirale Genom enthielt Deletionen in den Regionen E1 (E = *early gene*; $\Delta E1$, Ad5 Nukleotide 1-3533) und E3 ($\Delta E3$, Ad5 Nukleotide 28130-30820). Der produktive Infektionszyklus wird mit der Transkription des E1A-Gens eingeleitet, dessen Genprodukt transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Gene E1B, E2A, E3 und E4 wirkt. Darauf folgt die DNA-Replikation und mit der Aktivierung der späten viralen Gene die Bildung neuer Virionen. Die E3-Region codiert für Proteine, die für die Umgehung der Immunantwort des Wirtsorganismus wichtig sind; sie ist für die Virusreplikation in der Zellkultur nicht essenziell. Durch die beiden Deletionen wurde somit einerseits erreicht, dass das rekombinante Adenovirus replikationsdefizient war und andererseits das Virusgenom bis zu 7,5 kb an fremden DNA-Fragmenten aufnehmen konnte, ohne die Enkapsidation der Virus-DNA zu stören (Bett et al., 1993; Benihoud et al., 1999).

Die Fremd-DNA wurde zunächst in einen Transfervektor (pALsh; Laatsch et al., 2004) kloniert, um für die spätere shRNA-Expression einen RNA-Polymerase III Promotor, einen H1 Promotor, zur Verfügung zu haben. Anschließend wurde durch Klonierung in einen *Shuttle*-Vektor (pAdTrack-CMV) und homologe Rekombination mit dem viralen Genom (pAdEasy-1) in Bakterien das rekombinante adenovirale Genom erzeugt. Die exogene Expressionskassette wurde dabei in die E1-Region integriert. Die Generierung der Adenoviren erfolgte durch Transfektion der rekombinanten Plasmid-DNA in QBI-HEK 293A-Zellen. Die QBI-HEK 293A-Zelllinie ist eine kontinuierlich wachsende Zelllinie menschlicher embryonaler Nierenzellen, die mit gescherter menschlicher Ad5-DNA transformiert wurde. Diese Zelllinie enthält die viralen Gene E1A und E1B (Ad5 Nukleotide 1-4344), welche die Deletionen im rekombinanten Virusgenom komplementieren können und so die Generierung rekombinanter, selbst replikationsdefizienter Adenoviren ermöglichen (Graham et al., 1977; Louis et al., 1997). Die Abbildung 9 gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen Schritte der Virusherstellung.

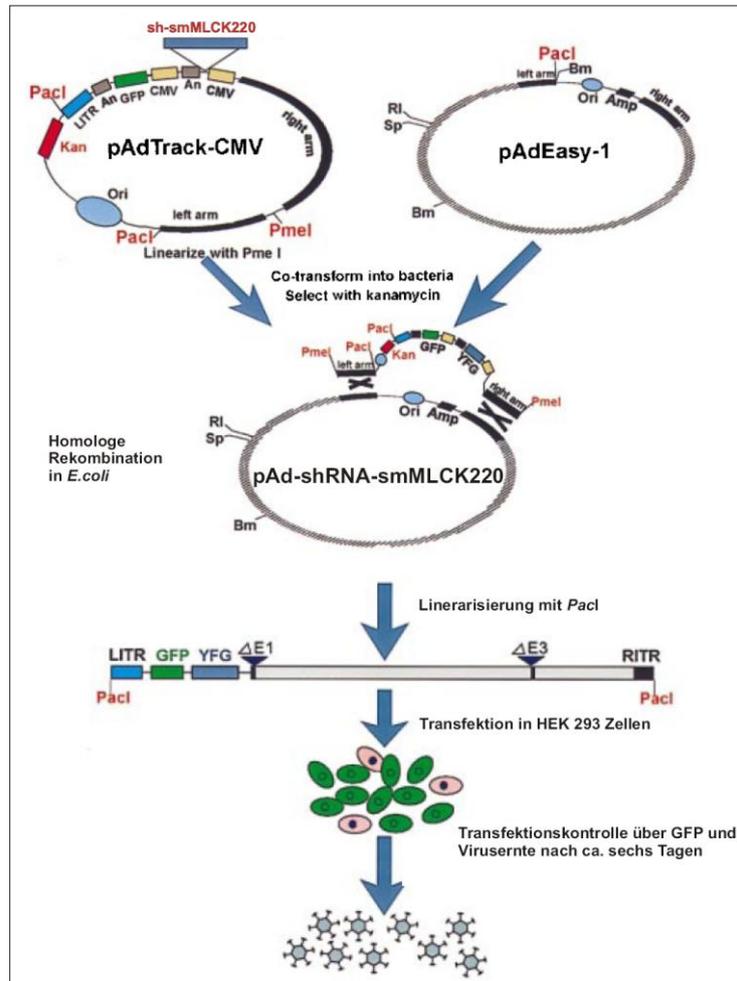


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung eines rekombinanten Adenovirus mithilfe des AdEasy-Systems

Modifizierte Grafik aus der Beschreibung des AdEasy-Systems aus der Veröffentlichung He et al. (1998). Die codierende Sequenz des Ziel-Gens, in diesem Fall eine shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 220 kDa der Maus bzw. eine Nonsense-shRNA-Sequenz, wurde über den shRNA-Expressionsvektor pALsh in den Shuttle-Vektor pAdTrack-CMV inkloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *PmeI* linearisiert und mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) durch Kotransformation in *Escherichia coli* (*E. coli*) BJ5183 zur homologen Rekombination gebracht. Über das Kanamycinresistenzgen (Kan) wurde auf rekombinante Plasmide selektioniert. Das mit der Restriktionsendonuklease *PacI* linearisierte rekombinante Virusgenom wurde in QBI-HEK 293A-Zellen transfiziert, welche die Fähigkeit besitzen, die Deletionen ($\Delta E1$, $\Delta E3$) im Virusgenom zu komplementieren und somit infektiöse, replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren zu bilden. Ad5 DNA: genomische DNA des menschlichen Adenovirus Serotyp 5, CMV: Zytomegalie-Virus Promotor, YFG: *Your Favourite Gene*, in diesem Fall shRNA-smMLCK220 oder shRNA-NS, An: Polyadenylierungsstelle, eGFP: *enhanced* (= verstärkt) grün fluoreszierendes Protein, LITR/RITR: linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz, Ori: *origin of replication* = Replikationsstart, Amp: Ampicillinresistenzgen, Bm: *Bam*HI, RI: *Eco*RI, Sp: *Spe*I, $\Delta E1$, $\Delta E3$: Deletionen in den frühen Genen E1 und E3 der adenoviralen Replikation.

In den folgenden Kapiteln werden die Methoden zur Herstellung eines rekombinanten Adenovirus mit einem shRNA-exprimierenden Vektor beschrieben. Für alle Arbeiten wurden ausschließlich sterilisierte Materialien, wie z. B. Pipettenspitzen und Plastikreaktionsgefäße, benutzt.

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Transformation von DNA in *E. coli* mussten die Bakterienzellen vorab kompetent, d. h. für DNA aufnahmefähig gemacht werden. Die chemische Behandlung mit Calciumchlorid (CaCl₂) kombiniert mit einer kurzzeitigen Erwärmung (Hitzeschockbehandlung) induziert in prokaryotischen Zellen einen vorübergehenden Zustand der Kompetenz, d. h., die Bakterien werden kurzzeitig in die Lage versetzt, DNA aus der umgebenden Lösung aufzunehmen (Cohen et al., 1972; Cosloy und Oishi, 1973; Hanahan, 1983). Als chemisch kompetente Zellen werden daher Bakterien bezeichnet, die nach der Behandlung mit CaCl₂ in der Lage sind, DNA während einer Hitzeschockbehandlung aufzunehmen. Plasmide größer als zehn Kilobasenpaare wurden durch Elektroporation in elektrokompente Bakterien transformiert. Diese Bakterien zeichnen sich dadurch aus, dass ihre Bakterienwand durch einen kurzen elektrischen Puls „porös“ wird und somit das Plasmid in das Bakterium gelangen kann. Die im Zuge dieser Arbeit verwendeten Bakterienzellen wurden nach einem modifizierten Protokoll von Sambrooke et al. (1989, *Chapter* 1.74) kompetent gemacht.

Folgende *E. coli*-Bakterienstämme wurden verwendet:

<i>E. coli</i> DH10B	F-mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara, leu) 7697, galU, galK, λ, rpsL, nupG
<i>E. coli</i> TOP10F'	(F-mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG)
<i>E. coli</i> BJ5183	andA, sbcBC, recBC, galK, met, thi-1, bioT, hsdR Prätransformiert mit dem pAdEasy-1 Vektor

E. coli wurden auf *Lysogeny Broth* (LB)-Agarplatten ausgestrichen. Einzelkolonien wurden nach Übernachtskultur bei 37 °C in 10 ml LB-Medium transferiert und 12 h bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation (Innova 4230 *Incubator Shaker*; 140 rpm) inkubiert. Anschließend wurden 500 ml LB-Medium mit 2 ml der 12 h-Kultur angeimpft und bei 37 °C unter kontinuierlicher Rotation (140 rpm) bis zu einer Zelldichte von $4 \cdot 10^7$ Zellen/ml (entsprechend einer OD 600 nm = 0,6) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien

pelletiert (Zentrifugenmodell *J2-21* mit Schwenkbecherrotor *JA-25.50*; 5000 rpm, 5 min, 4 °C).

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurde das Zellpellet in 60 ml kalter TFB (*Transformation Buffer*) 1-Lösung resuspendiert, zentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 4 °C) und in 8 ml kalter TFB 2-Lösung auf Eis erneut resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden als 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff (N₂) schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Für die Herstellung elektrokompenter Bakterien wurde das Zellpellet zweimal in 170 ml kaltem Aqua bidest. mit 10% (m/V) Glycerol resuspendiert und zentrifugiert (5000 rpm, 5 min, 4 °C), anschließend in 20 ml Aqua bidest. mit 10% (m/V) Glycerol resuspendiert, zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C) und erneut in 2,5 ml Aqua bidest. mit 10% (m/V) Glycerol resuspendiert. Die Bakteriensuspensionen wurden als 40 µl Aliquots in N₂ schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.2 Transformation

Zur Selektion von Bakterien mit Resistenzgenen enthaltenden Plasmiden wurde eines der folgenden Antibiotika zugegeben: Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml). Für die Kultivierung von Bakterien auf festem Medium wurde LB-Agar verwendet, der eines der beiden Antibiotika enthielt. Die LB-Agarplatten wurden vor Verwendung für 45 min bei leicht geöffnetem Deckel im Brutschrank angewärmt.

Chemische (oder auch Hitze-) Transformation

Kompetente Bakterien (100 µl) wurden auf Eis aufgetaut. Plasmid-DNA (1 µg) und kompetente Bakterien wurden kurz gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock für 30 s bei 42 °C (Thermoblock) wurden die Bakterien sofort wieder auf Eis gestellt. Die Zellsuspension wurde mit 250 µl SOC-Medium (37 °C) versetzt und vorsichtig in der Hand gemischt. Nach Inkubation für 1 h bei 37 °C unter Schütteln (Thermoblock; 300 rpm) wurde die Suspension auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten (entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen (50, 100 und 200 µl/Agarplatte) und über Kopf stehend 12-15 h bei 37 °C inkubiert. Bei erfolgreicher Transformation und Induktion der Antibiotikaresistenz wurden dann Einzelkolonien für die Präparation von Plasmid-DNA ausgewählt.

Elektrische Transformation

Kompetente Bakterien (40 µl) wurden auf Eis aufgetaut, umgehend mit 1 µg Plasmid-DNA gut gemischt und in einer vorgekühlten 0,2 cm-Elektroporationsküvette in der Elektrotransformationskammer einem elektrischen Feld ausgesetzt (Konstanten: 2,5 kV, 25 µF, 200 Ω). Die Bakterien wurden in 450 µl LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen, bei 37 °C für 30 min geschüttelt (Thermoblock; 300 rpm) und auf antibiotikahaltige Agarplatten (entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert (50, 100 und 200 µl/Agarplatte). Die Platten wurden ebenfalls über Kopf stehend 12-15 h bei 37 °C inkubiert, und bei erfolgreicher Transformation und Induktion der Antibiotikaresistenz wurden dann Einzelkolonien für die Präparation von Plasmid-DNA ausgewählt.

Unabhängig von der Art der Transformation wurden zur Amplifikation von Plasmid-DNA Einzelkolonien in 10 ml LB-Medium mit entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin transferiert und über Nacht bei 37 °C und Rotation (Innova 4230 *Incubator Shaker*; 200 rpm) kultiviert.

2.2.3 Präparation von Plasmid-DNA mittels Anionenaustauschersäule

Zum Erhalt reiner DNA hoher Qualität erfolgte die Aufarbeitung von amplifizierten Plasmid-DNA Einzelkolonien mithilfe des kommerziell erhältlichen Plasmid-DNA-Kits (*NucleoSpin® Plasmid*) nach Herstellerangaben. Die Präparation bestand aus drei Schritten. Im ersten Schritt wurden 6 ml einer über Nacht gewachsenen Bakteriensuspension zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Centrifuge 5415 C*; 14 000 rpm, 30 s, RT). Anschließend wurden die Bakterien mit einem alkalischen Puffer lysiert und das Lysat mit einem neutralisierenden Puffer mit hoher Salzkonzentration gemischt. Das Lysat wurde durch Zentrifugation von denaturierten und präzipitierten Zelltrümmern gereinigt. Im weiteren Schritt wurde das gereinigte Lysat auf eine Minisäule pipettiert. Im Inneren der Säule bindet die DNA an die Silikamembran. Im letzten Schritt wurden ungebundene Lysatbestandteile durch Waschen mit einem Waschpuffer herausgelöst, bevor die DNA mit 50 µl Aqua ad iniectabilia eluiert und bei -20 °C gelagert wurde.

Zur Gewinnung großer DNA-Mengen (*large scale preparation*) wurden 3 ml einer Übernachtskultur in 500 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum (entweder 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) transferiert und bei 37 °C unter Schütteln (Innova 4230 *Incubator Shaker*; 200 rpm) über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien per Zentrifugation (Zentrifugenmodell *J2-21* mit Schwenkbecherrotor JA-25.50; 5000 rpm, 15 min, 4 °C) pelletiert und die DNA mithilfe eines kommerziell erhältlichen DNA-

Isolierungs-Kits, ebenfalls mittels Anionenaustauschersilikasäule, nach Anweisung des Herstellers präpariert (*Nucleobond*[®] AX 500). Die Bakterien wurden, wie bei der analytischen Plasmidisolierung, alkalisch lysiert und genomische DNA, denaturierte Proteine sowie SDS wurden ausgefällt. Das über einen Faltenfilter geklärte Bakterienlysat wurde über eine Anionenaustauschersäule (*Nucleobond*[®] AX 500, equilibriert mit *Buffer N2*) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Bindung erfolgt bei niedrigem pH-Wert und niedriger Salzkonzentration aufgrund der Interaktion der negativ geladenen Phosphatreste der DNA mit den positiv geladenen Diethylaminomethanol-Gruppen auf der Oberfläche des Anionenaustauscherharzes. Die Anionenaustauschersäule wurde mit Waschpuffer (*Buffer N3*) mittlerer Salzkonzentration gewaschen und anschließend die DNA mit einem Normalsalzpuffer (*Buffer N5*) im schwach alkalischen Milieu eluiert. Durch Isopropanolfällung (Zentrifugenmodell Modell *J-6B* mit Schwenkbecherrotor *JS-5.2*; 5200 rpm, 1,5 h, 4 °C) wurde die DNA konzentriert und entsalzt. Das DNA-Sediment wurde, um Isopropanol- und Salzreste zu entfernen, mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen (4500 rpm, 10 min, RT). Nach vorsichtigem Abgießen des Ethanols wurde die DNA luftgetrocknet, in 100 µl Aqua ad iniectabilia aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

Herstellerangaben:

- Buffer S1:* 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A; pH 8,0; bei 4 °C gelagert
- Buffer S2:* 200 mM NaOH, 1% SDS
- Buffer S3:* 2,8 M K-Acetat; pH 5,1; bei 4 °C gelagert
- Buffer N2:* 100 mM Tris, 15% Ethanol, 900 mM KCl, 0,15% Triton X-100; pH 6,3 wurde mit H₃PO₄ eingestellt
- Buffer N3:* 100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,15 mM KCl; pH 6,3 wurde mit H₃PO₄ eingestellt
- Buffer N5:* 100 mM Tris, 15% Ethanol, 1,00 mM KCl; pH 8,5 wurde mit H₃PO₄ eingestellt

2.2.4 Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration isolierter DNA wurde fotometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Es wurden 100 µl einer 1:50-Verdünnung der Plasmid-DNA-Lösung in einer Quarz-Küvette vermessen. Eine Absorption (A) gleich eins entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wurde durch parallele Bestimmung der Absorption bei 280 nm und Berechnung der A₂₆₀:A₂₈₀-Ratio bestimmt. Eine reine DNA-Lösung besitzt eine Ratio A₂₆₀:A₂₈₀ von 1,8. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen (oder Phenol) verunreinigt, so ist der Wert signifikant kleiner. Die in dieser vorliegenden Arbeit gemessenen DNA-Konzentrationen wiesen alle eine Ratio A₂₆₀:A₂₈₀ von >1,8 auf.

2.2.5 Restriktionsverdau von DNA

Die Behandlung von DNA mit Restriktionsendonukleasen ist eine schnelle und einfache Methode zur Überprüfung oder Modifizierung von Plasmiden. Restriktionsendonukleasen erkennen spezifische, meist palindromische DNA-Sequenzen, an denen sie die DNA spalten.

Um Vektoren zu linearisieren oder Fragmente aus ihnen zu isolieren, wurde die Plasmid-DNA mit 1 U Restriktionsendonuklease pro 1 µg Plasmid-DNA im vom Hersteller NEB angegebenen Restriktionspuffer 1-4, gegebenenfalls unter Zusatz von Rinderserumalbumin (BSA, 0,1 µg/µl), bei der für die Enzyme optimalen Aktivitätstemperatur selektiv gespalten. Der Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 50 µl wurde bei 1-24 h im Thermoblock inkubiert. Anschließend wurden die Restriktionsenzyme dort bei 65 °C hitzeinaktiviert. Die mit 20% (V/V) eines kommerziell erhältlichen 6x DNA-Ladepuffer versetzten Restriktionsfragmente wurden auf einem Agarosegel analysiert.

Herstellerangaben:

(für die einfach konzentrierten Puffer in dem Reaktionsansatz)

NEBuffer 1: 10 mM Bis-Tris-Propan-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM 1,4-Dithiothreitol (DTT);
pH 7,0

NEBuffer 2: 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT; pH 7,9

NEBuffer 3: 100 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT; pH 7,9

NEBuffer 4: 50 mM K-Acetat, 20 mM Tris-Acetat, 10 mM Mg-Acetat, 1 mM DTT; pH 7,9

6x DNA-

Ladepuffer: 0,09% Bromphenolblau, 0,09 Xylencyanol FF, 60% Glycerol, 60 mM EDTA

Tabelle 2: Restriktionsendonukleasen mit den dazugehörigen Sequenzen

Restriktionsendonukleasen	Sequenz
<i>BseRI</i>	5'-GAGGAG(N) ₁₀ /-3' 3'-CTCCTC(N) ₈ /-5'
<i>BamHI</i>	5'-G/GATCC-3' 3'-CCTAG/G-5'
<i>KpnI</i>	5'-GGTAC/C-3' 3'-C/CATGG-5'
<i>NdeI</i>	5'-CA/TATG-3' 3'-GTAT/AC-5'
<i>PacI</i>	5'-TTAAT/TAA-3' 3'-AAT/TAATT-5'
<i>PmeI</i>	5'-GTTT/AAAC-3' 3'-CAAA/TTTG-5'
<i>XbaI</i>	5'-T/CTAGA-3' 3'-AGATC/T-5'

Restriktionsansatz:

x µg DNA
 1 U/µg DNA Enzym 1
 1 U/µg DNA Enzym 2
 1:10 Puffer
 1:100 BSA
 Aqua ad iniectabilia

2.2.6 Agarosegelelektrophorese von DNA-Proben

DNA-Moleküle wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt. In Abhängigkeit der zu trennenden Molekulargewichte wurden Agarosekonzentrationen im Bereich von 0,7%-3% (m/V) in TBE-Puffer gewählt. Nach dem Erstarren wurde der Gelträger in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt und der Taschenkamm unter Puffer aus dem Gel gezogen. Die DNA wurde mit 20% (V/V) eines kommerziell erhältlichen 6x DNA-Ladepuffers versehen (s. 2.2.5). Als Molekulargewichtsmarker zur Größenreferenz wurde mit *EcoRI* und *HindIII* verdaute (Lambda-) DNA verwendet (Fermentas). Nach Beladung der Geltaschen wurde an das Agarosegel in *Sub-Cell GT* Elektrophorese-Kammern eine elektrische Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt, bis die gewünschte Auftrennung erfolgte. Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen in ihrem Zucker-Phosphat-Rückgrat zur Anode. Dabei wird die Geschwindigkeit durch die Molekülgröße, die Konformation der DNA, die Agarosekonzentration und die Höhe der angelegten Spannung beeinflusst. Zum Anfärben von DNA-Banden wurde dem Agarosegel vor dem Gießen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugefügt. Das in die DNA interkalierte

Ethidiumbromid fluoreszierte unter UV-Licht (302 nm). Die Fluoreszenz wurde mithilfe eines *Bio Imaging Systems (Chemi Genius²)* elektronisch festgehalten.

2.2.7 Gelextraktion von DNA-Fragmenten

Zur Isolation der DNA aus Agarosegelen wurde ein Silika-Material verwendet. Silika-Material bindet DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Die DNA kann nach einem Waschschrift mit einem Salz-Ethanol-Puffer durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden (Vogelstein und Gillespie, 1979).

Die präparative Isolierung von durch Restriktionsverdau hergestellten DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mithilfe des *QIAquick[®] Gel Extraction Kits* nach Herstellerangaben. Auf einem UV-Lampen-Tisch wurde zügig (da die DNA sehr empfindlich auf UV-Licht reagiert und zu Depurinierungen, zur Bildung von Basendimeren und zu Strangbrüchen neigt) die gewünschte DNA-Bande mit einer Skalpellklinge ausgeschnitten und in ein Plastikreaktionsgefäß transferiert. Pro 100 mg Gel wurden 300 µl Puffer QG (Qiagen) zugegeben. Die Agarose wurde unter leichtem Schütteln gelöst (Thermoblock; 10 min, 50 °C). Die DNA-haltige Suspension wurde auf eine *NucleoSpin*-Säule gegeben und zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Centrifuge 5415 C*; 13 000 rpm, 1 min, RT). Die Silikasäule wurde mit 750 µl ethanolischem Puffer PE (Qiagen) gewaschen und zentrifugiert (13 000 rpm, 1 min, RT). Die Säule wurde erneut zentrifugiert (13 000 rpm, 1 min, RT), zur DNA-Eluation mit 30 µl Aqua ad iniectabilia für 1 min inkubiert und die DNA schließlich durch Zentrifugation (13 000 rpm, 1 min, RT) in einem Plastikreaktionsgefäß gesammelt. Der DNA-Gehalt der Proben wurde fotometrisch bei 260 nm (s. 2.2.4) bestimmt, und die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.8 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufkonzentrierung und Reinigung linearisierter DNA wurde diese mit einem Volumenteil Phenol-Chloroform-Isoamylalkohl-Gemisch (25:24:1, V/V/V; gesättigt mit 100 mM Tris, pH 8,0) unter Schütteln (Vortex) versetzt. Die Proben wurden für 15 min bei 4 °C inkubiert. Dabei kam es zum Ausfallen der Proteine, die anschließend in der phenolischen Interphase vorlagen. Durch Zentrifugation (Zentrifugenmodell *EBA 12 R*; 14 000 g, 10 min, 4 °C) wurde eine Phasentrennung herbeigeführt. Der Überstand wurde in ein neues Plastikreaktionsgefäß überführt, und anschließend konnte die DNA gefällt werden (s. 2.2.9).

2.2.9 Fällung von DNA

Eine DNA-Fällung wurde durchgeführt, wenn die DNA in einem zu großen Volumen vorlag oder Verunreinigungen durch Salze bzw. Proteine enthielt. Wässrigen DNA-Lösungen wurden 0,7 Volumenteile Isopropanol und 0,1 Volumenteile 3 M wässrige Natriumacetat-Lösung (pH 5,2) zugesetzt. Danach wurde die DNA für 30 min bei 14 000 g (Zentrifugenmodell *EBA 12 R*; 4 °C) pelletiert und der Überstand vorsichtig abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, nach Zentrifugation (15 000 g, 15 min, 4 °C) luftgetrocknet und in einer adäquaten Menge Aqua ad iniectabilia aufgenommen.

2.2.10 Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Durch die unterschiedlichen Restriktionsenzyme war die Orientierung des Inserts vorgegeben. Mithilfe der T4-DNA-Ligase wurde die freie 5'-Phosphatgruppe der zu insertierenden DNA-Fragmente mit der freien 3'-Hydroxylgruppe der Vektor-DNA unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung ligiert. 50-200 ng des linearisierten Vektors wurden mit dem dreifachen molaren Überschuss des zu ligierenden Inserts und mit 1-20 U T4-DNA-Ligase bei 16 °C für 12 h inkubiert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden zur Transformation von *E. coli* eingesetzt.

Reaktionsansatz:

Vektor-DNA	30 fmol
Insert-DNA	90 fmol
T4-DNA-Ligase	1 U
10x T4-DNA-Ligasepuffer	1 µl
Aqua ad iniectabilia	ad 10 µl

Herstellerangaben:

<u>T4-DNA-Ligase:</u>	400 000 U/ml
<u>10x T4-DNA-Ligasepuffer:</u>	500 mM Tris-HCl
	100 mM MgCl ₂
	10 mM ATP
	100 mM DTT
	250 µg/ml BSA

2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Nukleinsäuren (*Cycle DNA Sequencing*), die Bestimmung der Nukleotidabfolge innerhalb eines DNA-Moleküls, wurde in modifizierter Form nach der Kettenabbruchmethode (oder auch Didesoxymethode genannt) von Sanger et al. (1977) durchgeführt. Für die lineare Amplifizierung wurden neben dem gereinigten PCR-Produkt und dem jeweiligen Sequenzierungsprimer *BigDye*-Terminatoren™ verwendet. Diese enthalten neben der DNA-Polymerase und den Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTP) auch fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosid-Triphosphate (ddNTP).

Reaktionsansatz:

Plasmid-DNA	200-400 ng
Primer	1,5 µl (15 pmol)
2,5x <i>Sequencing Buffer</i>	8 µl
<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix</i>	2 µl
Aqua ad iniectabilia	ad 20 µl

Die DNA in diesem Reaktionsgemisch wurde unter folgenden Bedingungen amplifiziert (Hybaid PCR-Gerät *Sprint*):

Vordenaturierung	96 °C, 1 min	
Denaturierung	96 °C, 10 s	} 25 Zyklen
<i>Annealing</i>	50 °C, 5 s	
Elongation	60 °C, 4 min	

Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 50 µl Natriumacetat (0,3 M, pH 5,2, 4 °C) und 300 µl Ethanol (100%, -20 °C) gemischt sowie zentrifugiert (Zentrifugenmodell *EBA 12 R*; 13 000 rpm, 20 min, 4 °C). Der Überstand wurde abpipettiert, das Pellet über Nacht luftgetrocknet und im Servicelabor des Instituts für Zellbiochemie und Klinische Neurobiologie (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) analysiert. Die Detektion der vier unterschiedlich markierten *BigDye*-Terminatoren erfolgte dort auf einem *ABI PRISM® 377 DNA Sequencer* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

2.2.12 shRNA-Klonierung

2.2.12.1 Auswahl von shRNA-Sequenzen für einen adenoviralen Gentransfer

Es sollten zwei Adenoviren hergestellt werden. Ein spezifisches für das Ziel-Gen smMLCK und ein Kontrollvirus. Die Wahl der shRNA-Sequenzen wurde unter Zuhilfenahme der Internetseite des *Whitehead Institute* getroffen (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>). Die dort zur Verfügung gestellte Datenbank berücksichtigt bei der Auswahl die von der Arbeitsgruppe Tuschl publizierten Kriterien für wirksame siRNA (Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001c; zusammengefasst auf der Internetseite der Arbeitsgruppe Tuschl <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>). Es wurde eine shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 220 kDa der Maus gerichtet ausgewählt, im Weiteren als Ad-shRNA-smMLCK220 bezeichnet. Als Kontrolle wurde eine shRNA-Sequenz mit keinerlei Homologie zum Mausgenom ausgesucht (*scrambled*- oder *nonsense*-shRNA-Sequenz), nachfolgend als Ad-shRNA-NS bezeichnet (s. Tab. 3). Die Sequenzen wurden mithilfe des *BLAST*-Programms (*National Center for Biotechnology Information* = NCBI) mit den bekannten murinen Sequenzen abgeglichen, um eine Homologie zu anderen bekannten Genen auszuschließen.

Tabelle 3: Oligonukleotide für shRNA-Klonierung in den pALsh Vektor

Ad-shRNA-smMLCK220	Sequenz
<i>Sense</i> -Strang	5'-GAAGGAGCCACAGCCAAGTTCGAACTTGGCTGTGGCTCCTTCTT-3'
<i>Antisense</i> -Strang	5'-TTCTTCCTCGGTGTCGGTTCGAAGCTTGAACCGACACCGAGGAAG-3'
Ad-shRNA-NS	Sequenz
<i>Sense</i> -Strang	5'-GCTCGCGTATGGCGGATAGTACTAGTACTATCCGCCATACGCGAGCTT-3'
<i>Antisense</i> -Strang	5'-TTCGAGCGCATACCGCCTATCATGATCATGATAGGCGGTATGCGCTCG-3'

2.2.12.2 Herstellung der shRNA-Oligodeoxynukleotide

Die ausgewählten *Sense*- und *Antisense*-Sequenzen für die shRNA-Oligodeoxynukleotide wurden kommerziell synthetisiert und vor Verwendung mit Aqua ad iniectionis auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Je 1 µl *Sense* und *Antisense*-Strang wurden mit 10 µl 10x *Annealing*-Puffer und 88 µl Aqua ad iniectionis zusammengefügt und nach folgendem Thermoprofil in einem PCR-Gerät (*GeneAmp*[®] *PCR System 9700*) inkubiert.

Tabelle 4: Thermoprofil für das shRNA-Annealing

90 °C	5 min
89 °C	1 min } 70 Zyklen, jeweils -1 °C je Zyklus
20 °C	7 min

Dieses Thermoprofil gewährleistete eine korrekte Anlagerung der beiden Stränge. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Oligonukleotide bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.2.12.3 Klonierung der Transfervektoren

Eine allgemeine detaillierte Beschreibung der Arbeitsschritte findet sich unter Punkt 2.2. Hier werden nur Abweichungen von diesen bzw. Besonderheiten aufgeführt.

Verwendete Plasmide

pALsh	shRNA-Expressionsvektor zur Insertion der Zielsequenzen (Laatsch et al., 2004)
pAdTrack-CMV	<i>Shuttle</i> -Vektor zur Rekombination mit pAdEasy-1 (bicistronisches System mit eGFP-Expression unter CMV Promotor Kontrolle (He et al., 1998)
pAdEasy-1	Vektor mit Sequenz des Adenovirus Ad5 ($\Delta E1$, $\Delta E3$), zur Rekombination mit pAdTrack-CMV, 33441 bp

2.2.12.3.1 pALsh Vektor

Als shRNA-Expressionsvektor zur Insertion der Zielsequenzen für die Konstrukte Ad-shRNA-smMLCK220 und Ad-shRNA-NS diente das Expressionsplasmid pALsh, welches über einen H1 Promotor (ein RNA-Polymerase III Promotor) verfügt. Die shRNA-Sequenzen wurden als dsDNA (s. 2.2.12.2) *downstream* des H1 Promotors inkloniert.

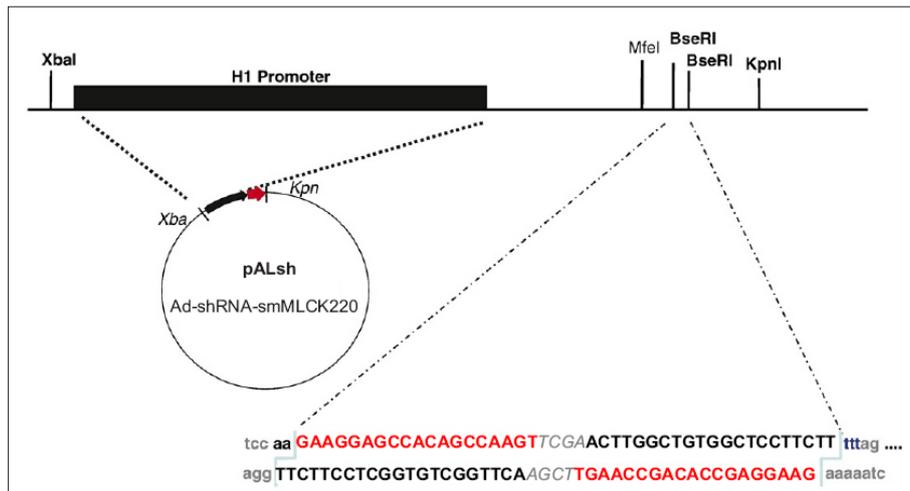


Abbildung 10: Klonierung von Zielsequenzen in den pALsh Vektor

(modifiziert nach: Laatsch et al., 2004)

Das Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *BseRI* geöffnet, dessen Erkennungssequenzen zweimal in entgegengesetzter Orientierung in dem pALsh vorkommen. Da *BseRI* außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, geht das Fragment mit den Erkennungssequenzen verloren, und durch eine entsprechende Wahl der flankierenden Sequenzen verbleiben am geöffneten Vektor zwei 3'-AA-Überhänge. Diese Enden verhindern eine Selbstligation des Vektors und senken somit die Gefahr von falsch-positiven Ligationsklonen. Weiterhin ermöglichen sie die Ligation mit einem palindromischen Oligodeoxynukleotid mit einem 3'-TT-Überhang. Die Ligation des dsDNA-Fragments komplettiert das in der Sequenz vom pALsh angelegte Terminationssignal von fünf Thymidinresten für die RNA-Polymerase III, die am H1 Promotor rekrutiert wird und die Transkription an der ersten Base der Sequenz des dsDNA-Fragments initiiert. In schwarz dargestellt ist die siRNA-Sequenz, wie sie an die mRNA der smMLCK 220 kDa der Maus bindet (oben *Sense*-, unten *Antisense*-Strang). Kursiv geschrieben die *Loop*-Sequenz.

2.2.12.3.1 Klonierung der Konstrukte in den pALsh Vektor

Es wurden 0,7 µg des pALsh Vektors mit 5 U *BseRI* für 2 h geschnitten. Dieser Ansatz wurde über eine Säule (*E.Z.N.A.*® *Cycle-Pure* Kit) nach Herstellerangaben aufgereinigt (Zentrifugenmodell *Centrifuge 5415 C*). Dabei wurden abweichend 10 µl des Vektoransatzes mit 40 µl CP-Puffer aus dem Kit vermengt. Die Elution erfolgte mit 40 µl Aqua ad iniectabilia. Dieses Fragment ist kurz genug, um auf einer üblichen Silikasäule nicht zu binden, sodass der geöffnete Vektor ohne vorherige Gelelektrophorese direkt aus dem *BseRI*-Reaktionsansatz aufgereinigt werden kann. Zur Ligation des geschnittenen Vektors und der unter 2.2.12.2 hergestellten shRNA-Oligodeoxynukleotide wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

Ligationansatz pALsh:

Mit <i>Bse</i> RI geschnittener pALsh	2 µl
shRNA-Oligodeoxynukleotid	1 µl
10x <i>NE</i> Buffer 2	1 µl
Aqua ad iniectabilia	4,5 µl

Dieser Ansatz wurde auf 75 °C erhitzt (PCR-Gerät *GeneAmp*[®]) und anschließend mit einer Rate von 0,05 °C/s auf 55 °C heruntergekühlt. Von 55 °C ausgehend folgte eine weitere Abkühlung auf 4 °C mit einer Rate von 0,25 °C/s.

Zu diesem Reaktionsgemisch wurde 1 µl einer 10 mM ATP-Lösung hinzugefügt und 0,5 µl der T4-DNA-Ligase. Anschließend folgte ein Ligationszyklus für 12 h bei 16 °C. Zur Enzyminaktivierung schloss sich eine 10-minütige Erhitzung auf 65 °C an. Anschließend wurde nochmals mit 1 U *Bse*RI für 1 h inkubiert, um mögliche fehlerhafte Klone aus selbstligierten Vektormolekülen erneut zu linearisieren. Das Enzym wurde ebenfalls bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Dieser Ansatz wurde in *E. coli* TOP10F' hitzetransformiert und auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Ausgewählte gewachsene Kolonien wurden nach Plasmid-DNA Isolation mit den Enzymen *Xba*I und *Kpn*I verdaut und auf einem 3%igen Agarosegel überprüft.

2.2.12.3.2 pAdTrack-CMV Vektor

Als *Shuttle*-Vektor zur Rekombination mit pAdEasy-1 für alle nachfolgend aufgeführten Konstrukte diente der pAdTrack-CMV-Transfervektor (He et al., 1998). Der Transfervektor beinhaltet eine doppelte Expressionskassette. Die erste Kassette dient der Integration eines Fremdgens und besteht aus einem CMV Promotor, einer multiplen Klonierungsstelle (MCS) und einem Polyadenylierungssignal (pA). Die zweite Kassette ist analog der ersten aufgebaut. Sie dient der Expression eines *enhanced* (verstärkt) grün fluoreszierenden Proteins (eGFP, im Weiteren nur noch als GFP bezeichnet; Zhang et al., 1996) zur visuellen Kontrolle des Infektionsverlaufs. Die Kassette besteht aus einem CMV Promotor, der die Transkription des GFPs kontrolliert, und einem pA. Durch die zwei CMV Promotoren verläuft die Expression von GFP und Fremdgen unabhängig voneinander, da es sich nicht um ein Fusionsprotein handelt, sondern um ein bicistronisches System. Die doppelte Expressionskassette ist von adenoviralen Sequenzen umgeben (linker und rechter Arm), die eine homologe Rekombination mit dem eigentlichen Virusgenom (pAdEasy-1) erlauben. Für die Amplifikation des Vektors in *E. coli* sind des Weiteren ein Kanamycinresistenzgen (Selektionsgen) und ein Replikationsstart (*Ori*) integriert (vgl. Abb. 9).

Die jeweils aus dem pALsh Vektor isolierten ~350 bp-Fragmente der kodierenden Sequenz des Ad-shRNA-smMLCK220 bzw. Ad-shRNA-NS wurden jeweilig in den Transfektor pAdTrack-CMV in die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Xba*I/*Kpn*I umkloniert.

2.2.12.3.2.1 Homologe Rekombination in Bakterienzellen von pAdTrack-CMV-DNAs und pAdEasy-DNAs

Die pAdTrack-CMV-Transfektoren wurden vor der homologen Rekombination mit der Restriktionsendonuklease *Pme*I linearisiert, wodurch der rechte und linke Arm für die homologe Rekombination freigelegt wurden. Im späteren Verlauf der Klonierung wurde über das Kanamycinresistenzgen des pAdTrack-CMV Vektors auf rekombinationspositive Klone selektiert. Daher wurde auf eine quantitative Spaltung der Transfektor-DNA geachtet, weil durch Reste von ungeschnittenem Transfektor in der Präparation der Hintergrund bei der Selektion größer wird. Bei der homologen Rekombination kommt es aufgrund identischer DNA-Sequenzen zum Austausch bzw. zur Integration von DNA-Abschnitten in einen Vektor. Im vorliegenden Fall wurde der shRNA-smMLCK220 und shRNA-NS-Insert tragende *Shuttle*-Vektor pAdTrack-CMV jeweils in das adenovirale Plasmid pAdEasy-1 kloniert. Dazu wurden jeweils 0,5 µl der mithilfe des Restriktionsenzym *Pme*I (s. 2.2.5) linearisierten Transfektoren pAdTrack-CMV-shRNA-smMLCK220 bzw. pAdTrack-CMV-shRNA-NS in mit pAdEasy-1 vortransformierte *E. coli* BJ5183 mittels Elektroporation eingebracht. Der Ansatz wurde, wie unter 2.2.2 beschrieben, elektroporiert, in LB-Medium (mit Kan) inkubiert, ausplattiert (LB-Agarplatten mit Kan) und über Nacht bebrütet. Am nächsten Tag wurden einige klein gewachsene Kolonien mit Pipettenspitzen zur Amplifikation (LB-Medium mit Kan) und Aufreinigung von Plasmid-DNA isoliert. Diese wurde anschließend mit dem Restriktionsenzym *Pac*I geschnitten. Die gewünschten erfolgreich rekombinierten Klone zeigten auf dem 0,8%igen Agarosegel eine 33 kb Bande des linearen AV-Genoms sowie eine ~3 kb (positiv) bzw. 4,5 kb (negativ) Bande des rekombinierten Transfektors. Die angestrebten 3 kb-großen Klone wurden anschließend mittels Elektroporation in *E. coli* DH10B retransformiert und amplifiziert (s. 2.2.2). Die DNA wurde mittels Ionenaustauscher-Säule präpariert (*Nucleobond*[®] AX 500) und die Konzentration fotometrisch bestimmt (s. 2.2.4). Nach erneuter Linearisierung mit *Pac*I und Gegenkontrolle auf einem 0,8%igen Agarosegel erfolgte bis zur weiteren Verwendung die Lagerung der DNA bei -20 °C. Die Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung der generierten rekombinanten Adenoviren Ad-shRNA-smMLCK220 und Ad-shRNA-NS.

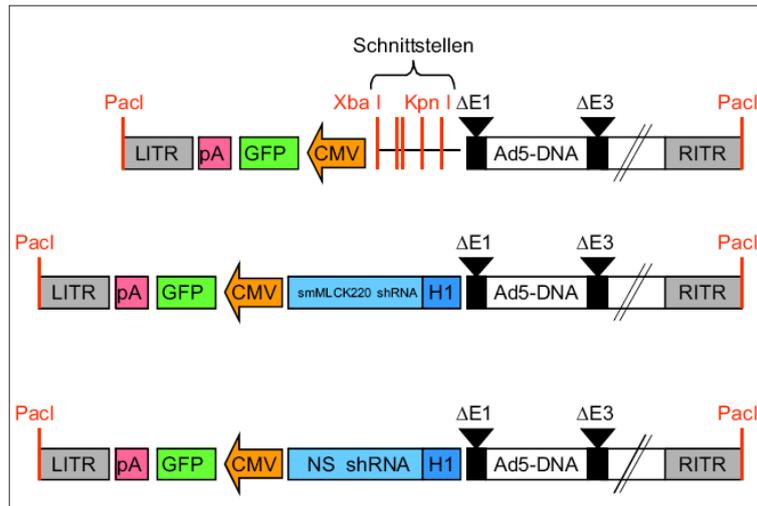


Abbildung 11: Schematische Darstellung der generierten rekombinanten Adenoviren

Dargestellt sind die DNA-Sequenzen der generierten rekombinanten Adenoviren, die durch homologe Rekombination des jeweiligen pAdTrack-CMV-Transfervektors mit pAdEasy-1 und anschließender Linearisierung durch die Restriktionsendonuklease *PacI* erhalten wurden. *PacI*, *XbaI* und *KpnI*: Restriktionsendonukleasen, LITR/RITR: linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz, pA: Polyadenylierungssignal, GFP: Grün fluoreszierendes Protein, CMV: Zytomegalie-Virus Promotor, smMLCK220 bzw. NS shRNA: jeweilige shRNA-Sequenz (vgl. Tab. 3), H1: H1 Promotor, $\Delta E1$, $\Delta E3$: Deletionen in den frühen Genen E1 und E3 der adenoviralen Replikation, Ad5 DNA: genomische DNA des menschlichen Adenovirus Serotyp 5.

Es wurde nach Linearisierung mit *PacI* mittels Sequenzierung (s. 2.2.11) die einklonierte shRNA-Sequenz in dem Vektor überprüft. Dazu wurde ein in dem H1 Promotor liegender Sequenzierungsprimer (s. Tab. 5) konstruiert (Softwareprogramm Primer3) und anschließend kommerziell synthetisiert.

Tabelle 5: shRNA-Sequenzierungsprimer

Primer	Sequenz
shRNA-Sequenzierungsprimer	5'-CCTGCAATATTTGCATGTCG-3'

Die Primer wurden lyophilisiert geliefert und vor der Verwendung auf eine Konzentration von 5 μ M mit Aqua ad iniectionem eingestellt. Die Lagerung der gelösten Primer erfolgte bei -20 °C.

2.2.13 QBI-HEK 293A-Zellkultur

Die biologischen Arbeiten wurden alle im Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Sämtliche Medien, Flüssigkeiten, Kulturgefäße und Arbeitsmaterialien wurden steril eingesetzt, und es wurde unter Laminarluftfluss gearbeitet. Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, vor Verwendung auf 37 °C angewärmt.

Die adhärenzte Zelllinie QBI-HEK 293A (menschliche embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert mit den Genen E1A und E1B des menschlichen Adenovirus Typ 5 = Ad5) wurde als Einschichtkultur in Zellkulturschalen (Durchmesser von 3,5 cm, 6 cm, 10 cm bzw. 15 cm) kultiviert. Die Kulturschalen, die für eine Virusinfektion vorgesehen waren, wurden mit Collagen Typ I-Lösung vorbeschichtet. Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert, wobei das Medium jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Um zu vermeiden, dass die Zelldichte zu hoch wurde, die Proliferationsrate dadurch abnahm und die Zellen schließlich abstarben, musste die Zelldichte durch Passagieren regelmäßig verringert werden. Dies war in der Regel alle vier bis fünf Tage notwendig. Bei einer Zelldichte >80% Konfluenz wurde in einem für die folgenden Versuche entsprechenden Verhältnis gesplittet. Die Zellen wurden hierfür einmal mit PBS gewaschen und durch 2-3-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wurde zum Abstoppen der Enzymwirkung mit DMEM (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃) auf das zehnfache Volumen aufgefüllt und bei 500 rpm (Zentrifugenmodell *Rotina 35 R*; 5 min, RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in QBI-HEK 293A-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung in Zellkulturschalen überführt.

2.2.13.1 Einfrieren und Auftauen von QBI-HEK 293A-Zellen

Zum Einfrieren wurden die QBI-HEK 293A-Zellen, wie unter 2.2.13 beschrieben, abgelöst. Die Zentrifugation wurde bei 1000 rpm (Zentrifugenmodell *Rotina 35 R*; 5 min, RT) durchgeführt. Das Zellpellet wurde in QBI-HEK 293A-Zell-Einfriermedium aufgenommen (pro konfluenter 15 cm-Ø-Kulturschale wurden 1,5 ml Einfriermedium verwendet), und die Zellen wurden durch Senkung der Temperatur um 1 °C/h im Isopropanol-Einfriergefäß bei -80 °C eingefroren. Anschließend folgte die Lagerung bis zur späteren Verwendung in flüssigem N₂.

Das Auftauen erfolgte durch Anwärmung in der Hand, bis nur noch ein kleines gefrorenes Stück vorhanden war. Dann wurde die Zellsuspension mit dem fünffachen Volumen an DMEM (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃) aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (500 rpm, 5 min, RT), das Pellet in QBI-HEK 293A-Medium resuspendiert und

die Zellen anschließend ausplattiert. Der erste Mediumwechsel wurde nach 24 h vorgenommen.

2.2.13.2 Liposomen-vermittelte Transfektion von QBI-HEK 293A-Zellen

Von der Behörde für Stadtentwicklung und Umwelt der Freien und Hansestadt Hamburg wurde eine S2-Genehmigung für die Anzucht von Adenoviren erteilt (IB 24-157/04).

Damit der Ad-shRNA-smMLCK220 und Ad-shRNA-NS in den QBI-HEK 293A-Zellen hergestellt und vermehrt werden konnte, mussten die Zellen mit dem durch homologe Rekombination hergestellten Vektorkonstrukt aus pAdEasy-1 und pAdTrack-CMV-sh-smMLCK220 bzw. pAdTrack-CMV-sh-NS Liposomen-vermittelt transfiziert werden. Dazu wurde jeweils eine zu 60-75% mit QBI-HEK 293A-Zellen bewachsene Kulturschale (Ø 6 cm) verwendet. Folgende Beschreibung (bis einschließlich 2.2.13.6) wurde für beide Viren gleichermaßen durchgeführt. Die mit *Pacl* linearisierte und mittels DNA-Fällung (s. 2.2.9) gereinigte Plasmid-DNA (4 µg) wurde mit DMEM (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃) auf 150 µl aufgefüllt. Anschließend wurden zu dieser DNA-Lösung 40 µl Polyfect® Transfektionsreagenz gegeben. Die Lösung wurde 5-10 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit bildete sich der DNA-Polyfect®-Komplex, der dafür sorgte, dass die DNA anschließend in die Zellen eingeschleust werden konnte. Während dieser Inkubationszeit wurde das Medium von den QBI-HEK 293A-Zellen gewechselt. Nachfolgend wurde der DNA-Polyfect®-Komplex in das Medium zu den QBI-HEK 293A-Zellen gegeben. Die Zellen wurden anschließend für 48 h im Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre inkubiert. Die gelungene Transfektion und die beginnende Virusproduktion konnte visuell über die Expression des GFPs unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Nach weiteren zwei Tagen wurde das Medium noch einmal gewechselt, dann bis zur Ernte der Zellen und des Virus nicht mehr, um die sich langsam abrundenden Zellen nicht zu stören. Der produktive Zyklus führte dann zur Lyse der Zelle, die zwar adhärenzfähige, aber vermehrungsdefiziente Viren freisetzte. Nach sechs bis sieben Tagen erfolgte die erste Ernte der Adenoviren aus dem Zellüberstand inklusive der lysierten Zellen.

2.2.13.3 Ernte von adenoviralen Zellkulturüberständen

Zur Ernte sollten bereits alle der transfizierten QBI-HEK 293A-Zellen gerundet und abgelöst sein. Dies war anfangs nach sechs bis sieben Tagen der Fall. Die Zellen und der Überstand wurden in ein Sammelgefäß gegeben. Die Zellsuspension wurde, um die Zellen

aufzubrechen und so das Virus freizusetzen, dreimal in flüssigem Stickstoff vollständig eingefroren und bei 37 °C wieder vollständig aufgetaut. Die Zellfragmente wurden abzentrifugiert (Zentrifugenmodell *Universal 30 RT*; 1500 rpm, 5 min, RT) und der virushaltige Überstand für die erste Infektion nach Anwärmung auf 37 °C verwendet (s. u.) bzw. bei -80 °C für spätere Verwendung gelagert.

2.2.13.4 Präparation einer hochtitrigen Virussuspension

Das Virus wurde in sechs weiteren Infektionszyklen mit steigenden Zellzahlen amplifiziert (von 1x 6cm-Ø-Kulturschale ausgehend auf: 1x 10 cm → 1x 15 cm → 3x 15 cm → 8 x 15 cm → 15x 15 cm → 30x 15 cm-Ø-Kulturschalen). Ein Infektionszyklus dauerte zwei bis drei Tage. Hierzu wurde von der jeweiligen 80-90% konfluenten QBI-HEK 293A-Zellkulturschale das Kulturmedium abgesaugt und der vorgewärmte Virusüberstand nach drei Frier-Tau-Zyklen (s. 2.2.13.3) vorsichtig hinzugegeben. Frisches QBI-HEK 293A-Medium wurde vorerst nur in der kleinstmöglichen Menge, sodass die Zellen gerade bedeckt waren, ergänzt. Wenn möglich, wurden die Zellen jedoch nur mit dem Virus für 1 h bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde frisches QBI-HEK 293A-Medium ergänzt, mindestens ein Drittel des Gesamtvolumens. Die Inkubation der Zellen mit dem Virusüberstand erfolgte ohne einen weiteren Mediumwechsel bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre bis zur vollständigen Zelllyse im Brutschrank. Die Zellen und der Überstand wurden dann jeweils wie unter 2.2.13.3 abgenommen und weiterbehandelt. Eine Besonderheit stellte der letzte Infektionszyklus dar. Hierzu wurden 30x15 cm-Ø-Kulturschalen mit je 8 ml des virushaltigen Überstandes des fünften Infektionszyklus infiziert. Es wurden je 4 ml QBI-HEK 293A-Medium-V, d. h. mit nur 2% FKS, hinzugefügt. Die Ernte erfolgte wenn ca. 30% der Zellen abgelöst waren. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Zellkulturschalenboden gelöst und mit dem Überstand in Sammelgefäßen zusammengefügt. Nach Zentrifugation (Zentrifugenmodell *Universal 30 RT*; 3000 rpm, 15 min, 4 °C) wurden die Überstände bis auf 1 ml über jedem Pellet abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden nach Resuspension in je 1 ml PBS in einem Sammelgefäß zusammengefügt und die leeren Sammelgefäße mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Diese Waschlösung wurde dem Pellet hinzugefügt, und es folgte eine erneute Zentrifugation (1000 rpm, 10 min, 4 °C). Nach Zentrifugation wurde der Überstand bis auf 3 ml über dem Pellet verworfen. Die Zellen wurden nach drei Frier-Tau-Zyklen aufgebrochen und das Virus freigesetzt. Zur Aufreinigung und Ankonzentrierung wurde eine Cäsiumchlorid-Gradienten (CsCl)-Ultrazentrifugation durchgeführt. Die Suspension konnte nach den drei Frier-Tau-Zyklen direkt weiterverwendet werden oder wurde einige Tage bei -80 °C gelagert.

2.2.13.5 CsCl-Gradient zur Adenovirusaufreinigung und -konzentration

Das aufgetaute Pellet wurde dreimal mit vorgekühltem 1,1,2-Trichlortrifluorethan zur Entfernung von überschüssigen Lipiden und Proteinen extrahiert. Dem Pellet wurde die gleiche Menge gekühltes 1,1,2-Trichlortrifluorethan hinzugefügt, anschließend wurde 30 s kräftig geschüttelt und zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Universal 30 RT*; 2000 rpm, 15 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde in ein neues Sammelgefäß überführt und die Extraktion zweimal auf gleiche Weise wiederholt.

Der CsCl-Gradient bestand aus einer schweren (42,2%) und einer leichten (22,4%) CsCl-Phase, von denen je 5 ml in den Ultrazentrifugationsröhrchen übereinandergeschichtet wurden. Zunächst wurde die leichte Phase in das Röhrchen gegeben, anschließend unter Zuhilfenahme einer Spritze mit langer Kanüle (0,9x0,70 mm) mit der schweren Phase vorsichtig unterschichtet. Der nach der Trichlortrifluorethan Extraktion gewonnene Überstand wurde vorsichtig in äquivalenter Menge auf die Gradienten geschichtet. Gewichtsunterschiede wurden auf 0,01 g genau mit PBS ausgeglichen. Nach 24 h Zentrifugation (Ultrazentrifuge Modell *Optima L-90K, SW40 Ti Rotator*, 27 000 rpm, 4 °C) waren zwei weiße Banden an der Interphase zwischen schwerer und leichter Phase sichtbar (s. Abb. 12). In der oberen Bande befinden sich Viruskapseln, in der dickeren unteren Bande komplette Viren. Die untere Bande wurde mit einer Insulinspritze und Kanüle (0,70x30 mm) abgenommen und in eine mit PBS vorgefeuchtete Dialysekassette überführt. Die Kassette wurde in einen Schwimmer aus Styropor gesteckt und bei 4 °C für 18 h gegen 2x *Virus Storage Buffer* (VSB) auf einem Magnetrührer rotierend dialysiert (großzügiges Volumen: in einem 3 l-Becherglas ca. 1,5 l 2x VSB). Nach 18 h wurde der 2x VSB durch frischen 2x VSB ersetzt und für weitere 6 h bei 4 °C auf einem Magnetrührer dialysiert. Das Dialysat wurde mit einer Insulinspritze und Kanüle (0,70x30 mm) aus der Kassette entnommen und mit der gleichen Menge Glycerol (aus einer nur für die Zellkultur verwendeten Flasche) verdünnt, gut gemischt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

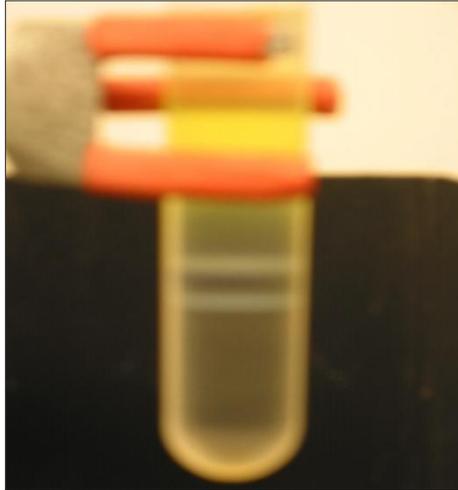


Abbildung 12: Ultrazentrifugationsröhrchen nach 24 h Zentrifugation mit sichtbarer Virusbande (untere)

2.2.13.6 Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren

Neugeborene Ratten-Kardiomyozyten (NRCM) wurden in einer errechneten Dichte von $6,25 \cdot 10^4$ Zellen/cm² auf Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm in 2 ml Kardiomyozyten (KM)-Medium ausgesät (s. 2.6.3.1 und 2.6.5.3). Zur Infektion wurden Verdünnungen von 5×10^{-1} bis 1×10^{-3} (in 0,5-Schritten) der Virusstammlösung in 500 µl KM-Medium hergestellt und die jeweilige Verdünnung auf die Zellkulturschalen gegeben. Pro Verdünnung wurden zwei Schalen infiziert. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung der Zellvitalität wurden zwei Schalen nicht infiziert. Die Zellkulturschalen wurden zunächst mit jeweils 500 µl KM-Medium inklusive Virus bzw. Negativkontrolle für 1 h in den Brutschrank bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 7%iger CO₂-Atmosphäre gestellt. Anschließend wurde pro Schale noch 1,5 ml auf 37 °C angewärmtes KM-Medium hinzugefügt. Die weitere Inkubation erfolgte ohne einen Mediumwechsel bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 7%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank. Der Infektionsverlauf wurde nach 48 h unter Zuhilfenahme eines Fluoreszenzmikroskopes ausgewertet. Für eine repräsentative Aussage wurden mindestens zehn Gesichtsfelder ausgewertet. Dabei wurde die höchste Verdünnung, in der noch 100% der Zellen eine GFP-Expression zeigten, als Multiplizität der Infektion pro Zelle (MOI) = 1 gesetzt. MOI ist ein gängiges Maß für die Quantifizierung einer Virusinfektion in Zellkulturen. Sie beschreibt die Anzahl der infektiösen Viruspartikel pro ausgesäte Zielzelle. Die MOI lässt sich aus der Prozentzahl der positiven Zellen wie folgt berechnen:

$$\text{MOI} = -2x \ln (1 - \% \text{pos.} / 100)$$

Diese Gleichung ist gültig für alle Zellen, die eine Zellteilung für eine erfolgreiche Infektion benötigen. Bei GFP-koexprimierenden Adenoviren in kultivierten neugeborenen Kardiomyozyten wurde angenommen, dass 48 h nach Infektion jede Zelle, die ein Viruspartikel inokuliert hat, gerade grün leuchten sollte. Dies bedeutet, dass die MOI 1 ist. Da die Angaben der MOI die gängigste Methode ist, wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit auf diese Berechnung zurückgegriffen.

2.3 Lentivirale shRNA-Expression

2.3.1 Auswahl von shRNA-Sequenzen für einen lentiviralen Gentransfer

Die Wahl der shRNA-Sequenzen wurde unter Nutzung der Internetseite der Firma Open Biosystems getroffen (<http://www.openbiosystems.com/RNAi/shRNALibraries/>). Die dort angebotene shRNA-Library basiert auf einer Entwicklung des *Broad Instituts* des MIT (MIT = Technische Hochschule Massachusetts) und der Harvard Universität. Das Ziel ist es, eine lentivirale shRNA-Library für derzeit jeweils 15 000 murine- und humane Gen-Ziele zu erstellen. Zusätzlich sollen RNAi-Anwendungen optimiert und RNAi-Methoden validiert werden.

Die gewünschten shRNA-Sequenzen konnten dort kommerziell in Form von fertig klonierten Bakterienkulturen (*E. coli* DH5 α in *low salt*-LB mit 8% Glycerol, 100 μ g/ml Carbenicillin) erworben werden. Die jeweiligen Kontrollen wurden als bereits aufgereinigte DNA käuflich erworben. Alle Sequenzen wurden mithilfe des *BLAST*-Programms (s. 8.5) mit den bekannten Sequenzen der Maus und Ratte abgeglichen, um eine Homologie zu anderen bekannten Genen auszuschließen.

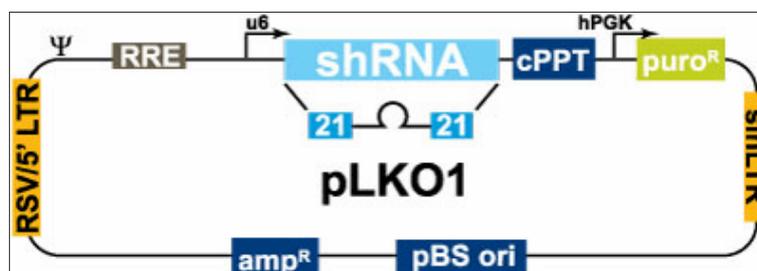


Abbildung 13: pLKO.1 Vektor

Der pLKO.1 Vektor ist ein HIV-1 basierter lentiviraler Vektor, welcher für transiente und stabile Transfektion von shRNA sowie für die Produktion von viralen Partikeln bei Verwendung von Ψ

lentiviralen Verpackungszelllinien geeignet ist. Stabile Zelllinien können anhand des Puromycin Selektionsmarker selektioniert werden.

Tabelle 6: Eigenschaften des pLKO.1 Vektors

(modifiziert nach: <http://www.openbiosystems.com/RNAi/shRNALibraries>)

Vektor Element	Aufgabe
Humaner U6 Promotor	Generiert RNA mit vier Uridin-Überhängen an jedem 3'-Ende
hPGK	Menschlicher Phosphoglycerat Kinase Promotor
PuroR	Puromycin, Selektionsmarker für Säugetierzellen
3' SIN LTR	3' Selbstinaktivierende lange terminale Wiederholungen
f1 ori	f1 <i>origin of replication</i> = Replikationsstart
AmpR	Ampicillin-Resistenz, Bakterien Selektionsmarker
5'LTR	5' lange terminale Wiederholungen
RRE	<i>Rev response element</i>
cPPT	Zentraler Polypurin Teil

Die shRNA-Konstrukte sind so entwickelt worden, dass mindestens ein 21 Basenpaare langer *Sense*- und *Antisense*-Stamm sowie ein 6 Basenpaare großer *hairpin-loop* enthalten waren. Jede shRNA-Sequenz war in den lentiviralen pLKO.1 Vektor einkloniert und anhand einer Sequenzierung bestätigt worden.

Das shRNA design:

Stamm: 21 Basen

Schleife: 6 Basen, *XhoI* Schnittstelle: CTCGAG

Flanking = 5'-CCGG Überhang für *AgeI*

3'-TTTTT Ende für Pol III und AATT-Überhang für *EcoRI*

Es wurden folgende lentivirale shRNA-exprimierende pLKO.1 Vektoren käuflich erworben:

Empty = enthält nur den pLKO.1 Vektor ohne eine shRNA-Sequenz

Non-Target = enthält den pLKO.1 Vektor mit einer shRNA-Sequenz, die keine Übereinstimmung mit den Gensequenzen der Maus, Ratte und des Menschen aufweist

E3 = enthält den pLKO.1 Vektor mit einer shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 130 kDa der Maus und Ratte gerichtet

E5 = enthält den pLKO.1 Vektor mit einer shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 130 kDa nur der Maus gerichtet

Die lentivirale shRNA-*Library* bietet keine spezifischen Sequenzen für das Rattengenom an, daher war die Wahl der E3-Sequenz mit einem *Mismatch* direkt vor dem *hairpin-loop* (die gewählte Sequenz enthält eine Base Thymin zu viel) ein Kompromiss. Da die smMLCK 130 kDa in ihrer Sequenz mit der smMLCK 220 kDa Sequenz übereinstimmt, lässt sich kein spezifischer *Knockdown* der smMLCK 130 kDa durchführen (vgl. 1.4 und Somlyo et al., 2004). Da aber die smMLCK 220 kDa im Herzen nicht exprimiert wird und auch in den anderen Geweben nur in geringer Menge vorkommt, wurde hier die Bezeichnung „gegen die smMLCK 130 kDa“ gewählt. Tatsächlich muss es aber aufgrund der Sequenzengleichheit zu einem *Knockdown* beider Isoformen kommen. Man könnte daher die Sequenzen in den E3- und E5-Lentiviren auch als Gesamt-smMLCK *Knockdown* shRNA-Sequenzen bezeichnen.

Tabelle 7: Sequenzen der lentiviralen shRNAs im pLKO.1 Vektor

Lentivirus-name	shRNA-Sequenz
Empty	Keine, enthält pLKO.1 Vektor ohne shRNA-Sequenz
Non-Target	5'-CCGG CAACAAGATGAAGAGCACCA CTCGAG- TTGGTCTTTCATCTTGTTGTTTTT-3'
E3	5'-CCGG GCTAGATTTGACTGCAAGATT CTCGAG- AATCTTGCAGTCAAATCTAGCTTTTTT-3'
E5	5'CCGG GCGGGAGTGTATCAAGTACAT CTCGAG- ATGTA CTTGATACACTCCCGCTTTTTT-3'

Zur Übersicht wurden hier nur die Einzelstränge aufgelistet, die palindromischen Doppelstränge wurden analog zu den adenoviralen shRNA-Sequenzen gebildet (vgl. Abb. 10). In rot ist der *Sense* und in hervorgehoben schwarz der *Antisense*-Strang dargestellt. Grau und kursiv zeigt die *Loop*-Sequenz.

Die Empty- und Non-Target-shRNA-Vektoren wurden als aufgereinigte DNA geliefert und wurden nur bei Bedarf nachproduziert. Das heißt sie wurden dann in Bakterien (*E. coli* TOP10F') hitzetransformiert, auf Carbenicillin-haltige *Low Salt* (LS)-LB-Agarplatten ausgestrichen, über Nacht bei 37 °C inkubiert, in Carbenicillin-haltigem LS-LB-Medium für 16 h amplifiziert und mittels Ionenaustauschersäule (*Nucleobond*[®] AX 500, s. 2.2.3) aufgereinigt. Dass Carbenicillin-haltige Medien und Agarplatten benutzt wurden, beruht auf einer Herstellerempfehlung, da mit Ampicillin nicht so hohe Plasmidausbeuten zu erzielen sind. Das Antibiotikum Carbenicillin ist dem Ampicillin sehr ähnlich. Die E3- und E5-shRNA-

Sequenzen wurden in Form von Bakterienkulturen geliefert und mussten zunächst selektiv isoliert, anschließend vermehrt und aufgereinigt werden (s. S. 49). Alle Plasmide wurden nach Restriktion auf einem 1%igen Agarosegel überprüft, dabei diente der zugehörige ungeschnittene pLKO.1 Vektor als Kontrolle.

Restriktionsansatz für pLKO.1 Vektoren

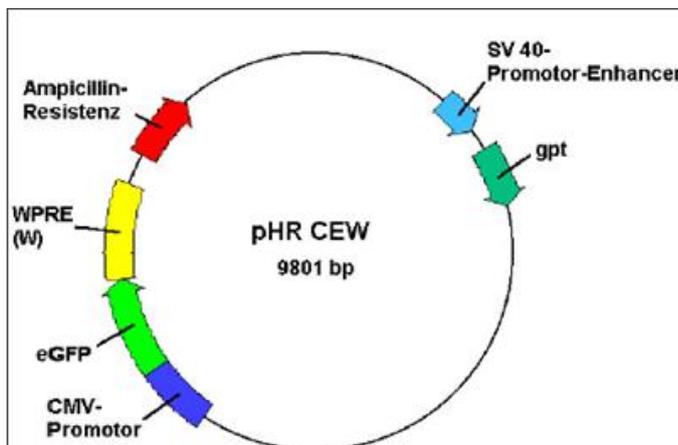
<i>Bam</i> HI	1 µl
10x <i>NE</i> Buffer 2	2 µl
BSA (10x, 10mg/ml)	0,2 µl
<i>Nde</i> I 20 U	1 µl
DNA Probe (1µg/µl)	1 µl
DEPC-H ₂ O	14,8 µl

Dieser Ansatz wurde für 2,5 h bei 37 °C inkubiert (Thermoblock) und zur Inaktivierung der Enzyme anschließend für 20 min auf 70 °C erhitzt. Zu dem Ansatz wurden 4 µl 6x DNA-Ladepuffer hinzugefügt und dieses auf ein 1%iges Gel aufgetragen (s. 2.2.5 und 2.2.6). 0,5 µl des ungeschnittenen Vektors wurden mit 16,5 µl Aqua ad iniectabilia und 3 µl 6x DNA-Ladepuffer vermischt und ebenfalls auf das Gel pipettiert.

Weiterhin wurde als Sichtkontrolle ein reines eGFP-Lentivirus hergestellt. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde hierzu freundlicherweise von der Arbeitsgruppe Herr Professor Dr. W.-H. Zimmermann (UKE) zur Verfügung gestellt und bei Bedarf erneut hergestellt (s. o., jedoch auf Ampicillin-haltigen LB-Agarplatten und in Ampicillin-haltigem LB-Medium). Die Helferplasmide pM2D.G und psPAX2 (s. 2.3.3) wurden analog zu dem eGFP-Plasmid vermehrt und aufgereinigt. Da die pLKO.1 Vektoren über keine Sichtkontrolle verfügen, musste aufgrund der Titerberechnung mittels p24-Antigen *Enzyme-linked-immunosorbent-assay* (ELISA, s. 2.3.5) davon ausgegangen werden, dass die Infektion gleichermaßen verläuft. Das heißt anhand von unterschiedlichen Konzentrationen des eGFP-Lentivirus wurde visuell unter dem Fluoreszenzmikroskop ermittelt, welcher Titer für eine effiziente Infektion von EHTs nötig ist. Davon ausgehend wurden die anderen Virusmengen für die Infektion berechnet.

pHR CEW Vektor:

Der Vektor pHR CEW (s. Abb. 14) ist ebenfalls ein lentiviraler *self inactivating* Vektor, bei dem ein großer Teil der U3-Region der 3'-LTR deletiert wurde, sodass die HIV Promotoraktivität praktisch restlos ausgeschaltet ist. Der Vektor trägt das Reportergen eGFP unter Kontrolle des starken eukaryotischen CMV Promotors. Der pHR CEW Vektor enthält wie der pLKO.1 Vektor eine cPPT-Sequenz, die einen effizienten Kernimport erlaubt.

**Abbildung 14: pHR CEW Vektor**

Amp = Ampicillinresistenz, SV40 P/E = Promotor/Enhancer vom Simianvirus Typ 40, gpt = Guaninphosphoryltransferase, CMV = CMV Promotor, eGFP = *enhanced* GFP, WPRE = posttranskriptionales Regulations-element des Woodchuck Hepatitis Virus

2.3.2 HEK 293T-Zellkultur

Die biologischen Arbeiten wurden alle im Labor der Sicherheitsstufe 2 durchgeführt. Sämtliche Medien, Flüssigkeiten, Kulturgefäße und Arbeitsmaterialien wurden steril eingesetzt, und es wurde unter Laminarluftfluss gearbeitet. Alle verwendeten Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, vor Verwendung auf 37 °C angewärmt.

Die adhärenente Zelllinie HEK 293T (menschliche embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert mit den Genen E1A und E1B des menschlichen Adenovirus Typ 5 = Ad5) enthält als besondere Variante der HEK 293-Zellen das „SV40 *large* T-Antigen“, welches die DNA-Replikation von episomalen Plasmiden mit dem „SV40 *origin of replication*“ ermöglicht. Somit lassen sich bestimmte Retroviren, wie beispielsweise Lentiviren, in HEK 293T-Zellen herstellen und gegebenenfalls vermehren.

Die HEK 293T-Zellen wurden als Einschichtkultur in Zellkulturschalen (Durchmesser von 3,5 cm, 6 cm, 10 cm bzw. 15 cm) kultiviert. Die Kulturschalen, die für eine Virusinfektion vorgesehen waren, wurden mit Collagen Typ I-Lösung vorbeschichtet. Die Zellen wurden im

Brutschrank bei 37 °C, wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre kultiviert, wobei das Medium jeden zweiten Tag gewechselt wurde. Um zu vermeiden, dass die Zelldichte zu hoch wurde, die Proliferationsrate dadurch abnahm und die Zellen schließlich abstarben, musste die Zelldichte durch Passagieren regelmäßig verringert werden. Dies war in der Regel alle vier bis fünf Tage notwendig. Bei einer Zelldichte >80% Konfluenz wurde in einem für die folgenden Versuche entsprechenden Verhältnis gesplittet. Die Zellen wurden hierfür mit Citrat-Salz-Lösung abgelöst. Nach Hinzugabe der Lösung wurden die Zellen durch zügiges Auf- und Abpipettieren mit einer 10 ml-Pipette vom Zellkulturschalenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit DMEM (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃) auf das fünffache Volumen aufgefüllt und 5 min bei Raumtemperatur, 500 rpm zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Rotina 35 R*). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in HEK 293T-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung in Zellkulturschalen überführt.

2.3.2.1 Einfrieren und Auftauen von HEK 293T-Zellen

Zum Einfrieren wurden die HEK 293T-Zellen, wie unter 2.3.2 beschrieben, abgelöst. Die Zentrifugation wurde bei 1000 rpm, 5 min und Raumtemperatur durchgeführt (Zentrifugenmodell *Rotina 35 R*). Das Zellpellet wurde in HEK 293T-Zell-Einfriermedium aufgenommen (pro konfluenter 15 cm-Ø-Kulturschale wurden 1,5 ml Einfriermedium verwendet), und die Zellen wurden durch Senkung der Temperatur um 1 °C/h im Isopropanol-Einfriergefäß bei -80 °C eingefroren. Anschließend folgte die Lagerung bis zur späteren Verwendung in flüssigem N₂.

Das Auftauen erfolgte durch Anwärmung in der Hand, bis nur noch ein kleines gefrorenes Stück vorhanden war. Dann wurde die Zellsuspension mit dem fünffachen Volumen an DMEM (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃) aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (500 rpm, 5 min, RT), das Pellet in HEK 293T-Medium resuspendiert und die Zellen anschließend ausplattiert. Der erste Mediumwechsel wurde nach 24 h vorgenommen.

2.3.3 Lentivirusproduktion in HEK 293T-Zellen

Wie unter 1.8 beschrieben, lassen sich Lentiviren mittels Helferplasmiden in einer Produktionszelllinie herstellen. Die Viren wurden in der vorliegenden Arbeit aus jeweils drei Plasmiden zusammengesetzt (s. Abb. 15). Die zwei Helferplasmide, eines für die Virushülle (pMD2.G) und eines für das Verpackungssystem wie die gruppenspezifischen Antigene und Polymerasen (psPAX2), waren für alle Lentiviren die gleichen. Das dritte Plasmid enthielt

das jeweils unterschiedliche Vektorkonstrukt mit der shRNA-Sequenz und dem RNA-Polymerase III Promotor, bzw. CMV Promotor bei dem eGFP Lentivirus (s. 2.3.1).

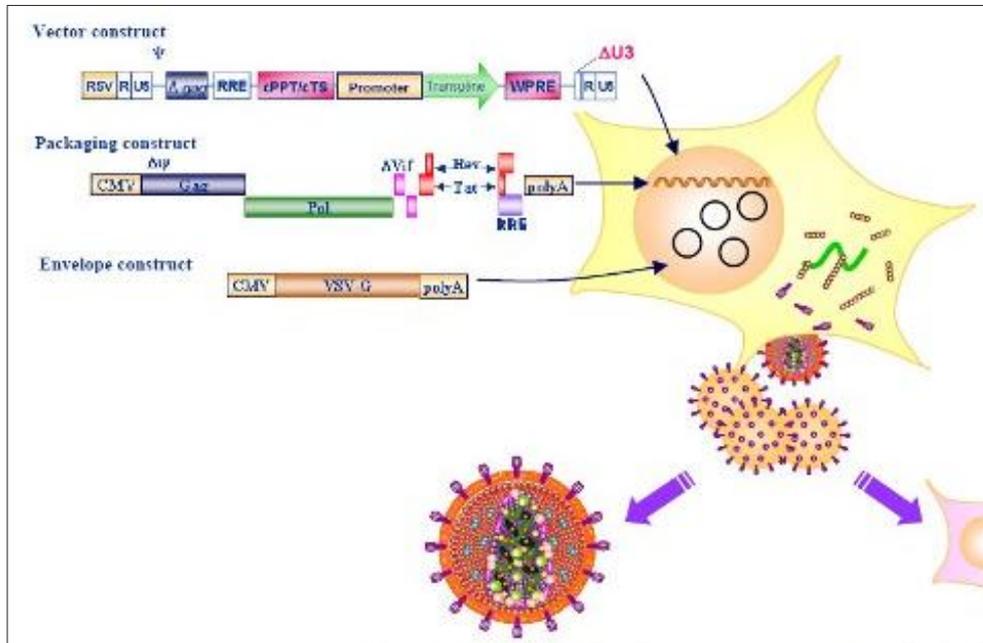


Abbildung 15: Schematischer Ablauf der lentiviralen Virusproduktion

(geändert nach: <http://tronolab.epfl.ch>)

Das Helferplasmid pMD2.G codiert für das Virushüllprotein (*env*) VSV-G des vesikulären Stomatitis Virus (VSV), das zweite Helferplasmid psPAX2 codiert für die gruppenspezifischen Antigene (*gag*) und Polymerasen (*pol*). Die so erzeugten Lentiviren sind replikationsdefizient, da sie keine genomische Information für *env*, *gag* oder *pol* besitzen. Mithilfe der Reversen Transkriptase und der Integrase integrieren sie ihre genetische Information in das Genom der Wirtszelle. So können stabile Zelllinien erzeugt werden, die hier z. B. mithilfe von dem Antibiotikum Puromycin selektioniert wurden (s. Tab. 6).

Das Verpackungsplasmid psPAX2 gehört zu den Helferplasmiden der zweiten Generation und wurde denen der dritten Generation bevorzugt, da die der zweiten Generation laut *Broad Institute* höhere Titer ermöglichen sollen.

2.3.4 Liposomen-vermittelte Transfektion von HEK 293T-Zellen

Von der Behörde für Stadtentwicklung und Umwelt der Freien und Hansestadt Hamburg wurde eine S2-Genehmigung für die Anzucht von Lentiviren erteilt (IB 24-242/04).

Die Lentivirusproduktion erfolgte durch chemische Kotransfektion (kationische Lipide) der jeweiligen shRNA-Vektoren bzw. Transferkonstrukte mithilfe von zwei Helferplasmiden (pMD2.G und psPAX2) in HEK 293T-Zellen. Sämtliche Medien, Flüssigkeiten, Kulturgefäße und Arbeitsmaterialien wurden steril eingesetzt, und es wurde unter Laminarluftfluss gearbeitet. Die Ansätze wurden in 50 ml-Sammelgefäßen zusammenpipettiert.

Ansatz A:

OptiMEM® (RT)	1,5 ml
Lipofectamine™ 2000 (4 °C)	36 µl

Gemischt durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml-Pipette. Ansatz A wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurde Ansatz B hergestellt.

Ansatz B:

OptiMEM® (RT)	1,5 ml
Helferplasmid pMD2.G (4 °C)	10 µg
Helferplasmid psPAX2 (4 °C)	10 µg
Transfektor (4 °C)	20 µg

Gemischt durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren mit einer 5 ml-Pipette.

Ansatz A und Ansatz B wurden zusammengefügt und mit einer 5 ml-Pipette mehrmals auf- und abpipettiert. Dieser Ansatz AB wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Von einer 10 cm-Ø-HEK 293T-Zellkulturschale mit einer 80-90%igen Konfluenz wurde das Kulturmedium abgesaugt. Es wurden 5 ml auf 37 °C angewärmtes OptiMEM® hinzugegeben und anschließend der Ansatz AB gleichmäßig auf dieser Zellkulturschale verteilt. Die Zellen mit dem Transfektionsansatz wurden für drei Tage bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten 5%igen CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank ohne Mediumwechsel kultiviert. Nach drei Tagen waren durch die Virusproduktion alle Zellen lysiert, d. h. sie waren abgerundet und schwammen vom Kulturschalenboden ab. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Virussuspension in ein 50 ml-Sammelgefäß überführt und die Zellen bei 3000 rpm, 5 min, RT pelletiert (Zentrifugenmodell *Universal 30 RT*). Der Überstand wurde durch einen Sterilfilter (0,45 µm) zur Abtrennung von Zellbestandteilen gegeben und nach Aliquotierung bei -80 °C gelagert.

2.3.5 Lentivirustiterbestimmung mittels p24-Antigen ELISA

Die Durchführung eines ELISA wurde erstmals durch Engvall und Perlmann zur quantitativen Bestimmung von Antigenen (1971) bzw. von Antikörpern (1972) beschrieben. Es handelt

sich um einen Enzymimmunoassay (EIA), mit dessen Hilfe geringste Mengen an Antigen oder Antikörper nachgewiesen werden können. Dabei kommt es zu einer Wechselwirkung zwischen Antigen und Antikörper, die durch eine Enzym-katalysierte Chromogenumwandlung sichtbar gemacht wird. Das lösliche und farblose Chromogen wird dabei zu einem löslichen und gefärbten Stoff umgesetzt, der sich durch Messung mit dem Fotometer quantifizieren lässt. Alle Reaktionen des ELISA finden mit einem immobilisierten Partner statt, was die Trennung von gebundenen und nicht gebundenen Reagenzien erheblich erleichtert.

Der in dieser Arbeit zur Anwendung gekommene ELISA wurde als sogenannter *Sandwich-ELISA* in 96-Loch-Mikrotiterplatten aus Plastik durchgeführt. Dabei war ein monoklonaler muriner Antikörper gegen das HIV-1 p24-Antigen an die feste Phase (96-Loch-Mikrotiterplatte) gebunden, und die zu untersuchende Probe, der lentivirale Zellkulturüberstand, wurde mit dem fixierten Antikörper inkubiert. Fand zwischen dem Antikörper auf der Platte und dem p24-Antigen der Probe eine Bindung statt, wurde die Probe ebenfalls an die Platte gebunden. Diese Reaktion wurde durch Inkubation mit einem Biotin-konjugierten zweiten Antikörper, auch gegen das HIV-1 p24-Antigen gerichtet, nachgewiesen. Nach Substratzugabe (hier Streptavidin-HRP) katalysierte das am zweiten Antikörper gekoppelte Konjugat die mit einem Farbumschlag des farblosen Substrates verbundene Reaktion, die in einem Fotometer bei 450 nm quantifiziert wurde. Die Quantifizierung erfolgte mittels Vergleich der Absorptionen aus einer mit rekombinantem HIV-1 p24-Antigen erstellten Standardkurve. Das kommerziell erworbene Kit hatte ein Detektionssensitivitätslimit von 100 pg/ml HIV p24-Antigen oder ca. 500-3000 *transducing unit/ml* (TU/ml) VSV-G-Lentiviren.

Alle Arbeiten wurden, soweit möglich, unter laminarem Luftstrom durchgeführt. Es wurden nur gefilterte Pipettenspitzen und zuvor sterilisierte Plastikreaktionsgefäße benutzt. Der Test wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, die Inkubation der Virusproben mit dem auf der Platte gebundenen Antikörper erfolgte bei 4 °C für 16 h. Zur Verdünnung des im Kit enthaltenen Waschpuffers wurde Aqua ad iniectabilia verwendet.

Die Berechnung der funktionellen Virentiter (TU/ml) wurde nach einer auf der Internetseite <http://tronolab.epfl.ch> veröffentlichten Formel durchgeführt.

TU vs. pg des p24-Antigens

Verhältnis zwischen TU und pg des p24-Antigens

- Es sind ca. 2000 Moleküle des p24-Antigens pro *physical particle* (PP) im HIV enthalten
- $2 \cdot 10^3 \times 24 \cdot 10^3$ Da des p24-Antigens pro PP
- $48 \cdot 10^6 / \text{Avogadro} = 48 \cdot 10^6 / 6 \cdot 10^{23} = 8 \cdot 10^{-17}$ g des p24-Antigens pro PP
 $= 8 \cdot 10^{-5}$ pg des p24-Antigens pro PP
- 1 ng des p24-Antigens = $1,25 \cdot 10^7$ PP
- ca. 1 PP pro 10^{-16} g des p24-Antigens
- 10^4 PP pro pg des p24-Antigens

Ein gut verpacktes VSV-G-Pseudotyp-Lentivirus hat einen Infektionsindex im Bereich von 1 TU pro 1000 PP bis 1 TU pro 100 PP (oder weniger). Daher ist die Spanne des Titers einer normalen Lentivirusproduktion ca. 10 bis 100 TU/pg des p24-Antigens. 10^6 TU/ml = 10^{8-9} PP/ml = 8-80 ng/ml

Das erhaltene Ergebnis ist jedoch ein Lentivirus *physical particle* Titer, d. h. p24-Antigen-Proteinmenge und nicht der infektiöse Titer (TU/ml). Dieser kann zwischen verschiedenen Zelllinien stark variieren (Kafri et al., 1999; Kahl et al., 2004; White et al., 1999) und wurde in dieser vorliegenden Arbeit durch Kombination des per ELISA erhaltenen Titers und der visuellen Beurteilung anhand der GFP-Fluoreszenz ermittelt.

2.3.6 Überprüfung der shRNA-Sequenz in den Lentiviren

Aus den hergestellten Lentiviren wurde mittels Sequenzierung (s. 2.2.11) die von der Firma Open Biosystems einklonierte shRNA-Sequenz überprüft. Die Viren wurden einer RNA-Extraktion und reversen Transkription unterzogen (s. 2.9.1.1 und 2.9.2). Anschließend wurde eine nicht-quantitative Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR, s. Tab. 13) mit der zuvor erhaltenen cDNA durchgeführt (s. 2.9.4). Mit diesem PCR-Produkt wurde dann eine Sequenzier-PCR angesetzt (s. 2.2.11), dazu wurden zwei Sequenzierprimer konstruiert (Softwareprogramm Primer3), die vor und nach der shRNA-Sequenz in dem pLKO.1 Vektor zu liegen kamen. Die Primer wurden anschließend kommerziell synthetisiert.

Tabelle 8: pLKO.1 Sequenzierprimer

Primer	Sequenz
pLKO.1 Vorwärtssequenzierprimer	5'-CAAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGA-3'
pLKO.1 Rückwärtssequenzierprimer	5'-TGGATCTCTGCTGTCCCTGT-3'

Die Primer wurden lyophilisiert geliefert und vor der Verwendung auf eine Konzentration von 5 µM mit Aqua ad iniectabilia eingestellt. Die Lagerung der gelösten Primer erfolgte bei -20 °C.

2.3.7 Generation von stabilen lentiviralen shRNA-exprimierenden Zelllinien

Auf eine 6 cm-Ø-Zellkulturschale der jeweiligen Zelllinie NIH3T3 (s. 2.4) oder den primär isolierten glatten Muskelzellen (SMC, s. 2.7.2) wurde nach Abnahme des Kulturmediums 1 ml des jeweiligen Lentivirus gegeben (RT). Nach 30 min Inkubation bei 37 °C und 5%iger CO₂-Atmosphäre in einem Brutschrank wurden 3 ml frisches Medium hinzugefügt (das der jeweiligen Zellsorte entsprechende). Nach 24 h wurde dieser Zellkulturschale Puromycin in einer Konzentration von 2 mg/ml hinzugefügt. Nach weiteren 48 h war ein deutliches Zellsterben der nichtinfizierten Zellen zu beobachten, und der erste Mediumwechsel wurde vorgenommen. Mit jedem Mediumwechsel erfolgte die Zugabe von 2 mg/ml Puromycin auf die Zellkulturschale. Es wurde solange mit Puromycin selektioniert, bis kein deutlich vermehrtes Zellsterben mehr zu beobachten war. In der laufenden Kultur wurde in regelmäßigen Abständen zwar 2 mg/ml Puromycin hinzugefügt, es kam jedoch nie zu einem vermehrten Zellsterben, d. h. alle Zellen hatten das Virusgenom stabil integriert. Es wurden von beiden Zellsorten jeweils stabile Zelllinien für die Empty-, Non-Target-, E3- und E5-Vektoren hergestellt und selektioniert. Zur Kontrolle wurden jeweils Zellen ohne Lentivirusinfektion mit 2 mg/ml Puromycin behandelt; diese Zellen starben alle nach kürzester Zeit ab.

2.4 NIH3T3-Zellkultur

Die stabile adhärente Mausfibroblastenzelllinie wurde genauso behandelt wie die QBI-HEK 293A-Zelllinie, daher sei auf diese Abschnitte in der vorliegenden Arbeit verwiesen (s. 2.2.13 und 2.2.13.1). Die benutzten Medien usw. waren identisch, die Namen wurden der Übersichtlichkeit halber im Anhang (s. 8.2) jedoch nicht auf NIH3T3-Medium usw. geändert.

2.5 Tierexperimentelle Arbeiten: Neugeborene Mäuse

2.5.1 Tierhaltung und Genehmigung

Männliche und weibliche C57BL/6J-Mäuse aus Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Ssniff®) und Leitungswasser nach Belieben gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden neugeborene (1.-4. Tag nach Geburt) Tiere verwendet. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org #242).

2.5.2 Organentnahme

Neugeborene Maus-Kardiomyozyten (NMCM = *Neonatal Mouse Cardiomyocytes*) wurden nach einem abgewandelten Protokoll von Laugwitz et al. (2005) isoliert. Die Tiere wurden dekapitiert und thorakotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in *Hank's balanced salt solution* ohne Calcium (HBSS) gelagert. Pro Experiment wurden 40 Herzen präpariert.

Nach der Herzentnahme erfolgten die Zellpräparation und anschließende Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Zur Antibiose wurden Penicillin G und Streptomycin (P/S; 10 000 U/ml und 10 000 µg/ml) eingesetzt. Alle für den Verdau und die Collagenasebehandlung verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) wurden vor jeder Präparation autoklaviert.

2.5.3 Vorverdau über Nacht

Die Herzen wurden mit mikrochirurgischen Scheren von anhängendem Gewebe wie Blutgefäßen befreit und mit kaltem HBSS gewaschen. Nach Teilung der Herzen in vier Stücke erfolgte ein weiterer Waschschrift mit kaltem HBSS. Es schloss sich über Nacht ein rotierender Vorverdau der 40 Herzen zur Entfernung von überschüssigem Blut und toten Zellen in 35 ml Trypsin-HBSS-Lösung (0,5 mg/ml) bei 4 °C an (in einem 250 ml-Sammelgefäß).

2.5.4 Collagenasebehandlung

Aus der über Nacht vorverdauten Suspension wurden 20 ml Überstand abgenommen und verworfen. Die Gewebestückchen wurden in ein 50 ml-Sammelgefäß überführt und mit 20 ml warmen *Light Medium* ergänzt. Diese Lösung wurde für 3 min bei 37 °C in einem Wasserbad geschwenkt, und nach Absetzen der Zellen wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Es wurden 10 ml der Collagenase II-Lösung hinzugefügt und erneut bei 37 °C in einem Wasserbad für 2 min geschwenkt. Dieser Überstand wurde nach Sedimentation der Zellen ebenfalls verworfen. Dem Trypsinvorverdau folgten fünf Wiederholungen einer Collagenasebehandlung mit je 5 ml Collagenase II-Lösung bei 37 °C für jeweils 9 min schwenkend. Alle Überstände wurden in auf Eis vorgekühlten 15 ml-Sammelgefäßen mit je 5 ml *Dark Medium*-Inhalt gesammelt (insgesamt 5 Sammelgefäße). Gefüllte Sammelgefäße wurden in dieser Zeit auf Eis gelagert, wobei das Serum in dem *Dark Medium* die Collagenase inaktivierte. Nach der letzten Collagenasebehandlung wurde das restliche Gewebe durch ein mit 2 ml *Dark Medium* vorbenetztes Plastik-Zellsieb gegeben und die Lösung den Sammelgefäßen hinzugefügt. Die Zellsuspension in den Sammelgefäßen wurde pelletiert (Zentrifugenmodell *Universal 30 RT*; 600 rpm, 8 min, RT). Die Überstände wurden in neue Sammelgefäße transferiert und erneut zentrifugiert (600 rpm, 5 min, RT). Anschließend wurden die Überstände verworfen und jedes Pellet in 2 ml 37 °C warmen *Dark Medium* resuspendiert. Die Suspensionen wurden vereinigt und Sammelgefäße mit *Dark Medium* nachgespült, sodass am Ende ein Gesamtvolumen von 25 ml vorlag.

2.5.5 Aufreinigung von Kardiomyozyten

Es folgte der erste Aufreinigungsschritt, in dem die gesamte Zellsuspension auf eine T-75-Zellkulturflasche gegeben und für 75 min bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten 10%igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert wurde. So wurde eine Anreicherung der Kardiomyozyten im Überstand durch ihre im Vergleich zu den Nicht-Kardiomyozyten langsamere Anheftung erreicht (*Preplating*). Dieses wurde nach 75 min wiederholt, in dem der gesamte Überstand abgenommen wurde und auf eine neue T-75-Zellkulturflasche gegeben wurde. Die erste T-75 Zellkulturflasche wurde mit 5 ml warmen *Dark Medium* gewaschen, die erhaltene Waschlösung wurde zusätzlich auf die zweite T-75-Zellkulturflasche gegeben. Diese wurde ebenfalls für 75 min bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten 10%igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in ein 50 ml-Sammelgefäß überführt, die zweite T-75-Zellkulturflasche mit 7,5 ml warmen *Dark Medium* gewaschen und die gesamte Suspension zentrifugiert (320 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde in ein neues Sammelgefäß transferiert und erneut pelletiert (320 rpm, 5 min, RT). Die zwei Pellets wurden je in 2 ml warmen *Dark*

Medium resuspendiert, und anschließend wurde die Zellzahl ermittelt. Dieses wurde mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer nach vorheriger Verdünnung mit *Dark Medium* und Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau durchgeführt. Da nur tote Zellen durch Trypanblau angefärbt werden, ermöglichte diese Färbung die Bestimmung der Lebendzellendichte sowie der Vitalität der Zellen. Während der Aufreinigung wurde eine 12-*well*-Platte mit Laminin-Lösung beschichtet und bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten 10%igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank aufbewahrt. Die überschüssige Laminin-Lösung wurde abgesaugt und die NMCM mit einer Dichte von 94 285 Zellen/cm² (330 000 Zellen/12-*well*) ausgesät. Das Gesamtvolumen pro *well* betrug 2,5 ml. Dem *Dark Medium* wurde zuvor für die Kultivierung der Antimetabolit Ara-C (25 µM) zugesetzt, der die DNA-Synthese und damit die Zellteilung hemmt. Dieses war nötig, um ein Überwuchern von Fibroblasten während der Kulturzeit zu vermeiden.

2.5.6 Kultivierung und Intervention

Am Tag 3 nach Isolierung wurde das *Medium* gewechselt und gleichzeitig mit den Adenoviren Ad-shRNA-smMLCK220 oder Ad-shRNA-NS infiziert (MOI 20). Zunächst wurden nur 250 µl auf 37 °C vorgewärmtes und mit Ara-C versehenes *Dark Medium* pro 12-*well* hinzugefügt. Diese 250 µL enthielten bereits die entsprechenden Virusmengen. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten 10%igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank wurden noch 2250 µl auf 37 °C vorgewärmtes und mit Ara-C versehenes *Dark Medium* pro 12-*well* ergänzt. Eine visuelle Kontrolle mittels Fluoreszenzmikroskop anhand der GFP-Expression wurde nach 24 und 48 h vorgenommen und dokumentiert.

2.6 Tierexperimentelle Arbeiten: Neugeborene Ratten

2.6.1 Tierhaltung und Genehmigung

Männliche und weibliche Wistar-Ratten aus Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden bei handelsüblichem Labortierfutter (Ssniff®) und Leitungswasser nach Belieben gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden neugeborene (1.-3. Tag nach Geburt) Tiere verwendet. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org #238).

2.6.2 Organentnahme

Die Tiere wurden dekapitiert und thorakotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in gekühltem calcium- und bicarbonatfreiem Hanks Puffer mit HEPES (CBFHH) gelagert.

2.6.3 Trypsinverdau

Nach der Herzentnahme erfolgten die Zellpräparation und anschließende Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Zur Antibiose wurden P/S (10 000 U/ml und 10 000 µg/ml) eingesetzt. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, steril filtriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck (Scheren, Pinzetten) und das später verwendete Zellsieb wurden vor jeder Präparation autoklaviert.

Nach Säuberung der Herzen und Abtrennung des Gefäßstiels sowie der Vorhöfe wurden die Herzen in eine neue Kulturschale mit CBFHH transferiert und mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere bis auf eine Größe von kleiner als 1 mm³ zerkleinert. Mit einer mit CBFHH benetzten, weitlumigen Pipette erfolgte die Überführung der Gewebestücke in ein 50 ml-Sammelgefäß, in dem nach weiterem dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin nach einer modifizierten Methode von Webster et al. (1993) durchgeführt wurde. Die Anzahl der Herzen pro Verdau schwankte zwischen 20 und 45.

Die zerkleinerten Gewebestücke wurden mit 7,5 ml (bei 35-40 Herzen) Trypsin-Arbeitslösung versetzt und für 10 min unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Neigungswinkel 15°, 60 Kippbewegungen/min) inkubiert. Anschließend wurde der trübe Überstand verworfen. Nach Resuspension der Gewebestücke in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung und einer Inkubation (10 min) unter fortwährendem Schwenken wurde der Überstand erstmalig in ein steriles 50 ml-Sammelgefäß, das 2,5 ml aktives fetales Kälberserum (FKS-R) zur Hemmung der enzymatischen Aktivität des Trypsins enthielt, überführt. Nach Inkubation der Gewebestücke mit DNase-Arbeitslösung (6,5 ml) und Triturierung (Auf- und Abpipettieren, weitlumige Pipette, 32-mal) wurde der Überstand ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Die Zeiten der weiteren Inkubationen mit Trypsin-Arbeitslösung wurden dem Maß der Trübung angepasst, wobei eine maximale Zeit von 5 min nicht überschritten wurde. Dieser Wechsel von Proteinverdau und Inaktivierung des Trypsins durch in der DNase-Arbeitslösung enthaltenes FKS-R wurde unter Reduktion der Volumina in 0,5 ml-Schritten auf 6 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung), jeweils nach Füllung eines Sammelgefäßes, durchgeführt. Der komplette Verdau der Gewebestücke

dauerte bei 35-40 Herzen im Mittel 3 h, wobei durchschnittlich 5 Sammelgefäße gefüllt wurden. Gefüllte Sammelgefäße wurden in dieser Zeit auf Eis gelagert.

Anschließend wurden die Sammelgefäße zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Universal 30 RT*; 60 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnehmen des klaren Überstandes wurden die pelletierten Zellen in den Sammelgefäßen in jeweils 3 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM) aufgenommen und in einem Sammelgefäß (50 ml) gepoolt. Zusätzlich wurden die leeren Sammelgefäße mit 3 ml NKM gespült und auch diese Volumina zusammen mit dem Rest gepoolt. Zu dem Sammelvolumen wurde schließlich DNase-Stammlösung (0,8% des Gesamtvolumens) hinzupipettiert. Nach Trituration wurden die Zellen erneut pelletiert (60 g, 15 min, 4 °C). Das Zellpellet wurde in 10 ml NKM-Medium resuspendiert und durch ein Zellsieb (Maschengröße: 250 µm) gegeben. Das Sammelgefäß und das Sieb wurden mit jeweils 10 ml NKM gespült, sodass die Zellen am Ende in einem Volumen von 30 ml vorlagen. Die Zellzählung erfolgte nach vorheriger 1:500 Verdünnung mit *CASY[®]ton*-Lösung unter Zuhilfenahme eines *Cell Counters*. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von 7,4 Millionen pro ml eingestellt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

2.6.3.1 Aufreinigung von Kardiomyozyten

Nach Abnehmen der für EHTs benötigten Zellen wurde die restliche Zellsuspension auf Zellkulturschalen mit 10 cm Durchmesser verteilt, wobei eine Zahl von 20 Mio. Zellen pro Schale nicht überschritten wurde. Das Volumen wurde auf etwa 12 ml pro Schale aufgefüllt und die Zellen für ca. 1,5 h bei 37 °C und einer wasserdampfgesättigten 7%igen CO₂-Atmosphäre im Brutschrank inkubiert, um eine Anreicherung der Kardiomyozyten auf etwa 70% im Überstand durch ihre im Vergleich zu den Nicht-Kardiomyozyten langsamere Anheftung zu erreichen (*Preplating*). Nach Ablauf der Zeit wurden die Kulturschalenoberflächen intensiv mit den Überständen gespült und alle Überstände in ein Sammelgefäß (50 ml) überführt. Die Zellzählung erfolgte nach einer vorherigen 1:400 Verdünnung (*CASY[®]ton*-Lösung) mithilfe eines *Cell Counters*. Die so gewonnenen Zellen wurden für Monolayer-Zellkultur verwendet und werden im weiteren Text mit NRCM (= *Neonatal Rat Cardiomyocytes* = Neugeborene Ratten-Kardiomyozyten) abgekürzt.

2.6.4 Herstellung von rekonstituiertem Herzgewebe der neugeborenen Ratte (Engineered Heart Tissue, EHT)

EHTs wurden aus (nicht aufgereinigten) neugeborenen Ratten-Kardiomyozyten, Collagen Typ I, Matrigel™ (Mischung aus Basalmembranproteinen und Wachstumsfaktoren) und serumhaltigem (Pferdeserum und Hühnerembryonenextrakt) Kulturmedium generiert. Collagen und Hühnerembryonenextrakt wurden im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellt.

2.6.4.1 Herstellung von Hühnerembryonenextrakt

60 angebrütete Eier (7.-9. Bruttag, Versuchstierhaltung Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) wurden mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Die Schalen wurden am runden Pol vorsichtig mit einer Schere geöffnet und die Embryonen mit einer sterilen Pinzette entnommen. Nach Dekapitation wurden Köpfe und Körper in einer zuvor sterilisierten Flasche mit 150 ml eisgekühltem CBFHH + 4% P/S gesammelt. Anschließend wurden die Embryonen auf Eis homogenisiert (Polytron®; 6 x 15 s bei maximaler Stufe), auf 300 ml mit eisgekühltem CBFHH + 4% P/S aufgefüllt und danach zentrifugiert (Zentrifugenmodell 5810 R; 60 g, 15 min, 4 °C). Nach Abnehmen und Sammeln der Überstände wurden die Pellets resuspendiert, vereinigt und erneut auf Eis homogenisiert (6x 15 s bei maximaler Stufe). Im Anschluss an eine weitere Zentrifugation (60 g, 15 min, 4 °C) wurden alle Überstände gepoolt, der Hühnerembryonenextrakt im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene (Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Hamburg) mikrobiologisch auf Kontamination mit Bakterien und Mykoplasmen geprüft und in Aliquots á 14 ml bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Eine Präparation mit 60 angebrüteten Eiern ergab ein Gesamtvolumen von 180-230 ml Hühnerembryonenextrakt.

2.6.4.2 Herstellung und Gehaltsbestimmung von Collagen Typ I

Sechs Schwänze ausgewachsener Wistar-Ratten wurden von den Kadavern abgetrennt und bis zu ihrer weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Vor der Collagenpräparation wurden die Rattenschwänze aufgetaut und mit Ethanol (70%) desinfiziert. Die Durchführung der gesamten Präparation erfolgte unter sterilen Bedingungen. Nach Inzision in der Längsachse des Schwanzes wurde die Haut mithilfe einer chirurgischen Pinzette entfernt. Danach konnten die bindegewebigen, Collagen I-Fasern enthaltenden Stränge, die auf den Wirbelknochen aufliegen, an der Schwanzbasis beginnend unter Zuhilfenahme von Skalpell und Pinzette abgezogen werden. Diese wurden anschließend in eine Schale mit PBS überführt und dort zweimal mit PBS gewaschen. Nach Überführung der Collagen-haltigen

Sehnenfäden in sterile 500 ml-Glasgefäße erfolgte die Zugabe von jeweils 300 ml Essigsäure (0,1%). Bei 4 °C wurden die Sehnenfäden über mehrere Tage bis zur fast vollständigen Auflösung gerührt und anschließend in Zentrifugengefäße überführt. Nach einer Zentrifugation bei 20 000 g für 2 h bei 4 °C (Ultrazentrifugenmodell *Optima L-90K*) zur Abtrennung von nicht gelösten Geweberesten wurde der Überstand gesammelt. Durch die langsame Zugabe eisgekühlter NaCl-Lösung (25%) wurde die Salzkonzentration in der Suspension unter ständigem Rühren auf etwa 4% angehoben und damit das Collagen ausgefällt. Nach einer Inkubation bei 4 °C über Nacht wurde die Suspension erneut zentrifugiert (20 000 g, 30 min, 4 °C). Die Überstände wurden anschließend verworfen und die Pellets in jeweils 250 ml kalter Essigsäure (0,1%) aufgenommen. Die Lösung der Pellets erfolgte durch Rühren über Nacht bei 4 °C. Durch zweimalige Dialyse mithilfe von Dialyseschläuchen gegen Essigsäure (0,1%) bei 4 °C wurde der NaCl-Gehalt in der Collagensuspension auf unter 0,9% reduziert. Die Bestimmung der Collagenkonzentration erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen *Sircol™ Collagen Assays*. Reinheit und Konzentration des Collagens wurden durch Auftrennung über ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel und anschließender Coomassie-Brilliantblaufärbung überprüft (s. 2.8.6 und 2.8.7).

2.6.4.3 Herstellung der Gussformen

In autoklavierbare Kulturschalen (Ø 6 cm, Glas) wurden je zwei Silikondochte (Ø 3,5 mm, etwa 80% der Schalenhöhe) eingeklebt. Nach dem Aushärten wurden Teflonscheiben (Ø 15,5 mm) über diese Dochte gestülpt und die Schalen bis zu ein Drittel ihrer Höhe mit Silikon ausgegossen. Vor der Verwendung wurden Zylinder aus Teflon (Ø 8,2 mm) auf die Dochte aufgebracht, sodass zwei ringförmige Gussformen (Innendurchmesser 8,2 mm, Außendurchmesser 15,5 mm) mit einem Fassungsvermögen von je 900 µl entstanden. Die Kulturschalen wurden schließlich vor der ersten Benutzung intensiv ausgekocht, autoklaviert und bis zur weiteren Verwendung steril gelagert.

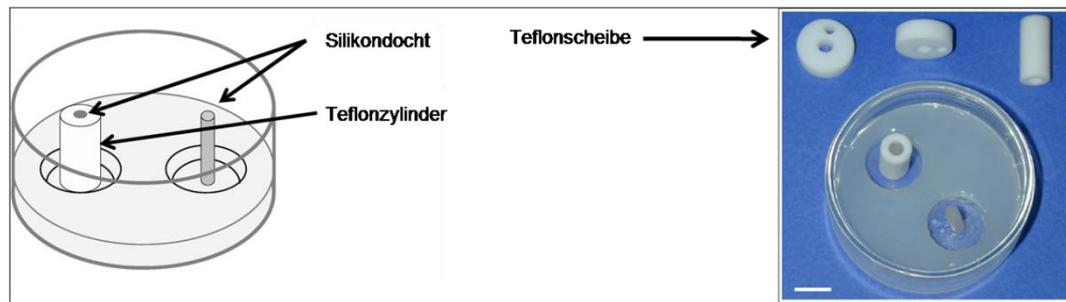


Abbildung 16: Schemazeichnung und Zusammensetzung einer Gussform

Skalierungsbalken = 10 mm

2.6.4.4 Lentivirusinfektion der Zellen für EHTs

Die Zellsuspensionen wurden in Portionen aufgeteilt, zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Universal 30 RT*; 60 g, 15 min, 4 °C), und die jeweilige berechnete Menge (s. 2.3.5) Überstand wurde abgenommen und verworfen. Das abpipettierte Volumen wurde durch die entsprechende Viruslösung komplett ersetzt, sodass die Zellzahl immer bei den eingestellten 7,4 Mio. pro ml blieb. Die variierende Menge der abzunehmenden Überstände ergab sich aus den unterschiedlichen Lentivirustitern. Die Suspensionen aus Zellen und Lentiviren inkubierten bis zur Herstellung der EHTs 1 h auf Eis und wurden unverändert in die EHTs eingesetzt. Die Kontroll-EHTs wurden gleich behandelt; hier wurde der Überstand durch OptiMEM® ersetzt. Die ersetzte Menge wurde aus dem Mittelwert an eingesetzter Viruslösung für die anderen EHTs berechnet.

2.6.4.5 Herstellung von EHTs

Alle zur Herstellung der EHTs notwendigen Pipettierschritte wurden unter sterilen Bedingungen (laminarer Luftfluss) auf Eis mit vorgekühlten Reaktionsgefäßen, Pipetten, Substanzen und Lösungen durchgeführt, um eine vorzeitige Aushärtung des Collagen-Matrigel™-Gemisches zu verhindern. Es wurde immer die gleiche Pipettierreihenfolge eingehalten. Die gewünschte Menge Collagen Typ I wurde vorgelegt und mit zweifach konzentriertem EHT-Medium vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemischs wurde mit NaOH (0,1 M) neutralisiert. Die Zugabe von extrazellulärer Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors der Maus (Matrigel™) erfolgte anschließend vor der Vermengung mit der Zellsuspension, deren Zellkonzentration zuvor auf den benötigten Wert eingestellt wurde. Nach wiederholtem Triturieren des Collagen-Matrigel™-Zell-Gemisches

wurden davon je 900 μl zügig in die Gussformen pipettiert (s. Abb. 17). Anschließend wurden die Kulturschalen für 1 h bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 7%iger CO_2 -Atmosphäre inkubiert, um eine Aushärtung des Collagen-Matrigel™-Zell-Gemisches zu erreichen und nachfolgend vorsichtig mit 6 ml EHT-Medium pro Kulturschale (je 2 EHTs) überschichtet.

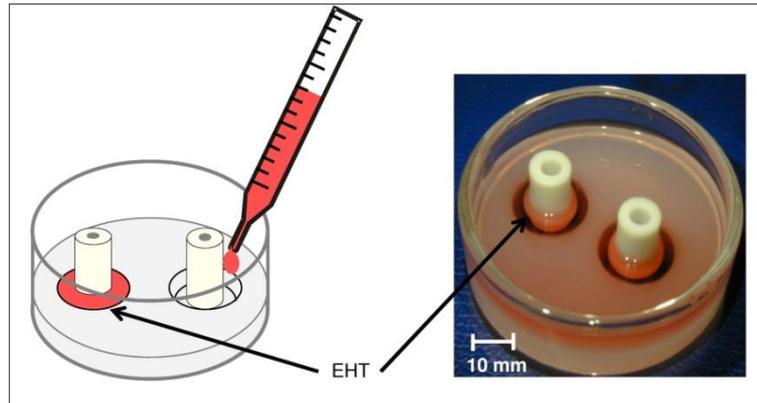


Abbildung 17: Schematische Darstellung des Ausgießens von EHTs (links) und Fotografie einer Gussform mit EHTs am 6. Kulturtag (rechts)

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier EHTs:

Collagen Typ I (6 mg/ml)	444 μl	→ 0,6 mg/EHT
2x EHT-Medium	541 μl	
NaOH (0,1 M)	97 μl	
extrazelluläre Matrix	400 μl	→ 10% (V/V)
Zellsuspension ($7,4 \cdot 10^6$ Zellen/ml)	2518 μl	→ $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/EHT

Das eingesetzte Volumen des Collagens wurde dem Gehalt der jeweiligen Charge so angepasst, dass 0,6 mg pro EHT eingesetzt wurden. Das Volumen des Mediums und der 0,1 M NaOH wurde der Menge an Collagen angepasst. Die Zellkonzentration wurde entsprechend eingestellt, da mit der Zellsuspension auf 4 ml aufgefüllt wurde. Aufgrund der Viskosität der Mischung musste ein Pipettierverlust von 100 μl pro EHT kalkuliert werden. Deshalb konnten mit einem Ansatz von 4 ml 4 EHTs mit einem Volumen von 900 μl gegossen werden.

2.6.5 Kultivierung und Intervention

2.6.5.1 EHTs

Die Kultur der EHTs erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 7%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank. Das Medium wurde am ersten, dritten und fünften Tag nach der Herstellung gewechselt. Am Kulturtag 7 wurden die EHTs auf Abstandhalter (s. Abb. 18) transferiert, um eine bessere Versorgung zu gewährleisten und um sie maximal zu dehnen. Während dieser Zeit wurde das Medium täglich gewechselt. Die Kontraktionsexperimente wurden am Kulturtag 12 bis Kulturtag 14 durchgeführt.

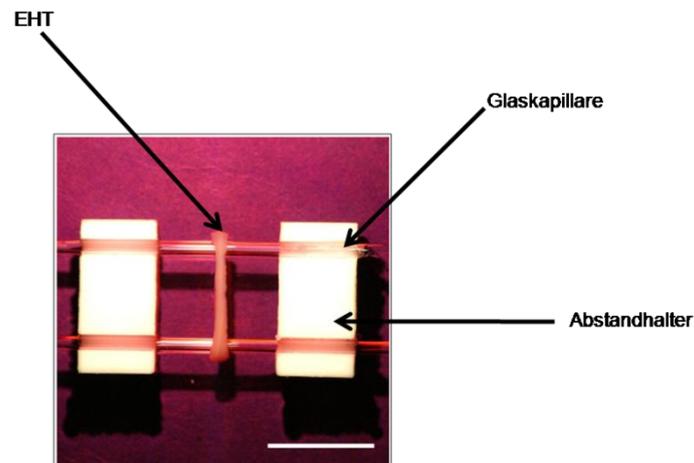


Abbildung 18: EHT auf einem Abstandhalter in einer mit Medium gefüllten Kulturschale
(Skalierungsbalken = 1 cm)

2.6.5.2 Adenovirale Infektion von Standard-EHTs

Standard-EHTs wurden am Tag 11 nach ihrer Herstellung von dem Abstandhalter genommen und für 1 h in einer 12-well-Platte in einem Brutschrank bei 37 °C, wasserdampfgesättigter 7%iger CO₂-Atmosphäre und je 500 µl KM-Medium inkl. dem entsprechenden AV inkubiert. Danach wurden die EHTs auf getrennte (Ad-shRNA-smMLCK220 von Ad-shRNA-NS) Abstandhalter transferiert und für weitere 8 Tage kultiviert.

2.6.5.3 NRCM

Nach dem Aufreinigen der NRCM (s. 2.6.3.1) wurde die Zellsuspension zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Universal 30 RT*; 60 g, 15 min, 4 °C) und überstehendes NKM abgenommen, um die NRCM anschließend in KM-Medium vorsichtig zu resuspendieren. NRCM wurden in der Regel in einer Dichte von etwa $1,25 \cdot 10^5$ Zellen/cm² auf Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm in 2 ml KM-Medium ausgesät. Im Falle einer Lentivirusinfektion wurden diese direkt zu den Zellen in die Kulturschalen pipettiert, das Gesamtvolumen vorerst jedoch auf 500 µl pro Schale begrenzt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und wasserdampfgesättigter 7%iger CO₂-Atmosphäre im Brutschrank wurden 1,5 ml KM-Medium pro Schale hinzugefügt. Hiermit sollte eine maximale Virusinfektion in geringem Volumen erreicht werden. Um die Überwucherung der NRCM durch teilungsfähige Fibroblasten und Endothelzellen zu verhindern, enthielt das KM-Medium den Antimetaboliten 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU), der die DNA-Synthese und damit die Zellteilung hemmt. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und 7% CO₂ im Brutschrank. Nach 24 h war ein großer Teil der KM angeheftet, und die ersten spontanen Kontraktionen waren zu beobachten. Spätestens 48 h nach der Aussaat hatte sich ein dichter Zellrasen gebildet, der kohärent schlug. Zu diesem Zeitpunkt wurde der erste Mediumwechsel vorgenommen. Dazu wurde das vorhandene Medium vorsichtig am Rand der Schale abgesaugt und durch vorgewärmtes frisches Medium ersetzt. Im Falle einer Adenovirusinfektion wurden diese zu diesem Zeitpunkt (48 h nach Zellisolation) zu den Zellen in die Kulturschalen pipettiert, das Gesamtvolumen vorerst jedoch auf 500 µl pro Schale begrenzt. Nach 1 h Inkubation bei 37 °C und 7% CO₂ im Brutschrank wurden 1,5 ml KM-Medium pro Schale hinzugefügt. In dieser Zeit sollte eine maximale Virusinfektion in geringem Volumen stattgefunden haben. Das Medium wurde bei allen Versuchsbedingungen alle weiteren 48 h bis zum Abschluss des Experimentes gewechselt und betrug stets 2 ml pro 3,5-Ø-Kulturschale.

2.6.6 Erfassung der Kontraktionsparameter von EHTs

2.6.6.1 Kontraktionsmessung

Am Kulturtag 12 bis 14 wurden die Kontraktionsparameter der EHTs in modifizierter Tyrode-Lösung (0,2-0,4 mM Calcium) in temperierten Standardorganbädern (s. Abb. 19) ermittelt. Die Aufhängung der EHTs erfolgte vorerst ohne Vordehnung (L_0) zwischen induktiven Kraftaufnehmern und statischen Haltepolen in Organbädern mit Tyrode-Lösung (Eschenhagen et al., 1997). Die Kontraktionsexperimente wurden unter elektrischer Stimulation (Frequenz 2 Hz, Pulsdauer 5 ms, Stromstärke 20% über der Reizschwelle) bei 37 °C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen durchgeführt. Alle Interventionen wurden

an optimal vorgedehnten Muskelpräparaten (L_{\max}) durchgeführt. Als L_o wurde die durch den Abstandhalter während der Kultur vorgegebene Gewebelänge (14,5 mm) definiert.

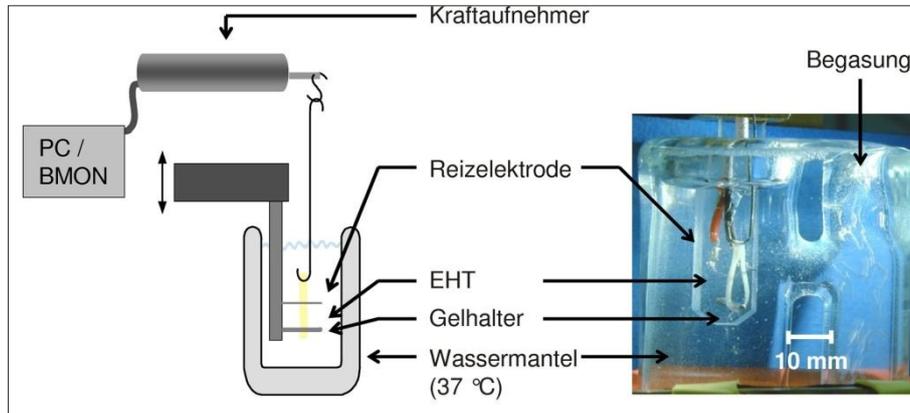


Abbildung 19: Darstellung eines Organbades mit einem EHT

Gezeigt ist ein EHT während eines Kontraktionsexperimentes in einem Organbad auf einem Kraftaufnehmer. Die Tyrode-Lösung wird kontinuierlich mit Carbogen begast und auf 37 °C temperiert. Elektroden zu beiden Seiten des EHTs dienen der elektrischen Stimulation.

Die elektrische Stimulation wurde 5 min nach dem Aufhängen eingeschaltet und die EHTs ohne Vordehnung bei 0,4 mM Calcium für 20 min equilibriert. Nach einem Wechsel der Tyrode-Lösung (0,4 mM Calcium) und kurzer Equilibrierung von etwa 5 min wurde die Vordehnung in Schritten von 0,1 mm von L_o auf L_{\max} gesteigert und damit die Kraft-Längen-Beziehung ermittelt. Anschließend wurde die Tyrode-Lösung abgelassen, durch Tyrode-Lösung mit 0,2 mM Calcium ersetzt und für 15 min equilibriert.

2.6.6.2 Das Erstellen von Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Interventionssubstanzen

Es wurde zu Beginn der Experimente mit unbehandelten EHTs zur Vermeidung β -adrenerger Effekte 0,3 μM des β -Adrenozeptor-Antagonisten Nadolol zugegeben und danach ca. 7 min bis zur erneuten Equilibrierung der EHTs gewartet. Nachfolgend wurde mit verschiedenen Interventionssubstanzen behandelt (s. Tab. 1 und vgl. 2.1.3.2). Anschließend wurde Phenylephrin in steigenden Konzentrationen von 0,001–100 μM zugegeben. Nach jeder Zugabe wurde gewartet, bis die Kontraktionskraft ein Plateau erreichte. Zur Bestimmung der Maximalkraft der EHTs wurde anschließend 10 μM Isoprenalin hinzugefügt, d. h. in einer Konzentration, die die β -Blockade durch Nadolol überkommt. Nach den Kontraktions-

versuchen wurden alle EHTs in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.6.6.3 Das Erstellen von Phenylephrin- und Calcium-Konzentrations-Wirkungs-Kurven

Diese Versuchsdurchführung verlief analog zu dem unter 2.6.6.2 beschriebenen Punkt. Abweichend wurden die lentiviral-behandelten EHTs und zugehörigen Kontroll-EHTs verwendet (s. 2.6.4.4). Nach Bestimmung des Maximaleffektes mit Isoprenalin wurde die Tyrode-Lösung (0,2 mM Calcium) dreimal gewechselt, und nach der Equilibrierung der EHTs erfolgte die Bestimmung der Reaktion auf steigende Calciumkonzentrationen durch eine kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve (KWK) von Calcium (0,2 mM Ausgangslage, Calcium-KWK von 0,5-4,0 mM). Nach Abschluss der Kontraktionsexperimente wurde ein Großteil der EHTs in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert. Ein anderer Teil wurde durch 30 mM Butandionmonoxim (BDM)-Lösung 30 min lang relaxiert, in 0,05 M TBS gespült und in 4%iger Paraformaldehyd-Lösung für eine spätere histologische Aufarbeitung fixiert.

2.6.6.4 Datenerfassung und -verarbeitung

Die Erfassung der Daten erfolgte identisch wie unter 2.1.3.6 mittels eines PC-gestützten Biomonitoring Systems (BMON). Das Gewicht zur Kalibrierung der Messverstärker betrug abweichend 150 mg.

2.7 Glatte Muskelzellen-Zellkultur

2.7.1 Tierhaltung, Genehmigung und Organentnahme

Eine männliche, 12 Wochen alte C57BL/6J-Maus aus Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde bei handelsüblichem Labortierfutter (Ssniff®) und Leitungswasser nach Belieben gehalten. Die Organentnahme wurde durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org #240).

Das Tier wurde nach leichter CO₂-Betäubung dekapitiert, und die Harnblase wurde freigelegt. Nach Herausschneiden der Harnblase wurde diese auf einem Papiertuch entleert und in eine mit PBS-gefüllte Zellkulturschale gelegt. Unter laminarem Luftfluss wurde dann noch einmal sorgfältig auf überschüssiges Gewebe kontrolliert und dieses abgetrennt.

2.7.2 Zellisolierung und Kultivierung

Das Gewebestück wurde dann in eine neue leere Zellkulturschale überführt und 10 min mit mikrochirurgischem Besteck zerkleinert. Anschließend wurden die Gewebestücke mit einer weitlumigen Pipette und 3 ml SMC-Medium-1 in eine T-25-Zellkulturflasche überführt. Dabei wurden die Gewebestücke gründlich auf dem Boden verteilt und die Flasche anschließend mit dem Boden nach oben in einen Brutschrank bei 37 °C, wasserdampfgesättigter 5%iger CO₂-Atmosphäre gegeben. Der erste Mediumwechsel erfolgte nach drei Tagen mit SMC-Medium-1. Dabei wurde darauf geachtet, dass keines der Gewebestücke mit abgesaugt wurde und sich diese nach dem Mediumwechsel wieder am Boden absetzten. Es waren bereits nach ein paar Tagen erste glatte Muskelzellen, im Weiteren als SMC (= *Smooth Muscle Cells*) bezeichnet, sichtbar, die sich langsam teilten. Die Kultur lief langsam, aber stetig an. Nach einiger Zeit wiesen die Zellen größere Vakuolen auf, sodass auf das SMC-Medium-2 getauscht wurde. Dieses wurde jeden zweiten Tag gewechselt, und die erste T-25-Flasche konnte 20 Tage nach Zellisolation gesplittet werden. Im Laufe der Kulturzeit zeigte sich, dass die Zellen gut wuchsen, und es wurde nach Etablierung der Zelllinie auf das SMC-Medium-3 getauscht, welches alle drei Tage gewechselt wurde. In diesem Medium wurden auch alle weiteren Experimente durchgeführt.

Um zu vermeiden, dass die Zelldichte zu hoch wurde, die Proliferationsrate dadurch abnahm und die Zellen schließlich abstarben, musste sie durch Passagieren regelmäßig verringert werden. Dies war in der Regel alle 7 bis 10 Tage notwendig. Bei einer Zelldichte >80% Konfluenz wurde in einem für die folgenden Versuche entsprechendem Verhältnis gesplittet. Die Zellen wurden hierfür einmal mit PBS gewaschen und durch 2-3-minütige Inkubation mit Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellsuspension wurde zum Abstoppen der Enzymwirkung mit DMEM (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃) auf das zehnfache Volumen aufgefüllt und 5 min bei Raumtemperatur, 1000 rpm zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Rotina 35 R*). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in SMC-Medium-3 resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung in Zellkulturflaschen oder Zellkulturschalen überführt.

2.7.2.1 Einfrieren und Auftauen von SMC

Zum Einfrieren wurden die SMC, wie unter 2.7.2 beschrieben, abgelöst. Die Zentrifugation wurde bei 1500 rpm, 5 min und Raumtemperatur durchgeführt (Zentrifugenmodell *Rotina 35 R*). Das Zellpellet wurde in SMC-Einfriermedium aufgenommen (pro konfluenter T-75-Zellkulturflasche wurden 1,5 ml Einfriermedium verwendet), und die Zellen wurden durch Senkung der Temperatur um 1 °C/h im Isopropanol-Einfriergefäß bei -80 °C eingefroren. Anschließend folgte die Lagerung bis zur späteren Verwendung in flüssigem N₂.

Das Auftauen erfolgte durch Anwärmung in der Hand, bis nur noch ein kleines gefrorenes Stück vorhanden war. Dann wurde die Zellsuspension mit dem fünffachen Volumen an DMEM (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃) aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde zentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT), das Pellet in SMC-Medium-3 resuspendiert und die Zellen anschließend auf Zellkulturflaschen gegeben. Der erste Mediumwechsel wurde nach 24 h vorgenommen.

2.7.3 Herstellung von SMC-Pseudo-EHTs

SMC-Pseudo-EHTs wurden aus kultivierten, lentiviral-stabil transfizierten SMC (s. 2.7.2 und 2.3.7), Collagen Typ I, und serumhaltigem (Pferdeserum und Hühnerembryonenextrakt) Kulturmedium generiert. Collagen und Hühnerembryonenextrakt wurden im Rahmen dieser Arbeit selbst hergestellt (s. 2.6.4.1 und 2.6.4.2).

Die SMC wurden mit Trypsin/EDTA von den 15 cm-Ø-Zellkulturschalen abgelöst (s. 2.7.2) und nach Zentrifugation (Zentrifugenmodell *Rotina 35 R*; 1000 rpm, 5 min, RT) in SMC-Medium-1 resuspendiert und gezählt. Dieses wurde mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer nach vorheriger Verdünnung mit SMC-Medium-3 und Anfärbung der toten Zellen mit Trypanblau durchgeführt. Anschließend wurden analog zu 2.6.4.5 die SMC-Pseudo-EHTs gegossen. Der Unterschied bestand darin, dass zum einen keine schlagenden Herzmuskelzellen verwendet wurden (daher der Begriff Pseudo-EHT) und zum anderen wurde auf das Matrigel™ verzichtet. Dieses wurde durch den gleichen Volumenanteil SMC-Medium-3 ersetzt.

2.7.4 Kultivierung und Intervention

Auch dieser Punkt ist identisch zu den aus NRCM hergestellten EHTs (s. 2.6.5). Obwohl sich die SMC-Pseudo-EHTs zwar innerhalb von wenigen Stunden in der Gussform

zusammengezogen haben, wurden alle Bedingungen von den anderen EHTs bezüglich Mediumwechsel und Kultivierungsdauer übernommen.

2.7.5 Erfassung der Kontraktionsparameter

2.7.5.1 Kontraktionsmessung

Am Kulturtag 12 bis 14 wurden die Kontraktionsparameter der SMC-Pseudo-EHTs in modifizierter Tyrode-Lösung (1,2 mM Calcium) in temperierten Standardorganbädern (s. Abb. 19) ermittelt. Die Aufhängung der SMC-Pseudo-EHTs erfolgte vorerst ohne Vordehnung (L_0) zwischen induktiven Kraftaufnehmern und statischen Haltepolen in Organbädern mit Tyrode-Lösung (Eschenhagen et al., 1997). Die Kontraktionsexperimente wurden ohne elektrische Stimulation bei 37 °C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen durchgeführt. Alle Interventionen wurden an optimal vorgedehnten Muskelpräparaten (L_{max}) durchgeführt. Als L_0 wurde die durch den Abstandhalter während der Kultur vorgegebene Gewebelänge (14,5 mm) definiert. Nach 40 min Equilibrierung und einem Wechsel der Tyrode-Lösung (1,2 mM Calcium) sowie erneuter kurzer Equilibrierung von etwa 10 min wurde die Vordehnung in Schritten von 0,1 mm von L_0 auf L_{max} gesteigert und damit die Kraft-Längen-Beziehung ermittelt. Anschließend wurde erneut die Tyrode-Lösung gewechselt (1,2 mM Calcium) und nach 20 min Equilibrierung mit der Zugabe der verschiedenen Substanzen begonnen.

2.7.5.2 Das Erstellen von Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurven mit Interventionssubstanzen

Dieser Teil ist analog zu den aus NRCM hergestellten EHTs (s. 2.6.6.2), jedoch wurden abweichend alle SMC-Pseudo-EHTs nach Beendigung der Messung in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

2.7.5.3 Datenerfassung und -verarbeitung

Dieser Teil ist ebenfalls gleich zu den aus NRCM hergestellten EHTs (s. 2.6.6.4).

2.8 Erfassung der Proteinexpression

2.8.1 Proteinextraktion: Gewebe

Das Gewicht gefrorener Gewebeproben der Maus und der Ratte wurde mittels einer Digitalwaage erfasst. Die Gewebestücke wurden unter flüssiger Stickstoffkühlung in einem Metallmörser pulverisiert und mit einem Metalllöffel in ein Plastikreaktionsgefäß überführt. Die zehnfache Menge an Kranias-Puffer im Verhältnis zum Gewicht wurde hinzugefügt und nach Zugabe einer kleinen Stahlkugel 2x 30 s bei 30 Hz im *TissueLyser* geschüttelt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Stahlkugeln entfernt, die Proben für 10 min bei 95 °C gekocht, 10 min zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Centrifuge 5415 C*; 13 000 rpm, RT) und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8.2 Proteinextraktion: EHTs

Das Gewicht eines gefrorenen EHTs wurde einmalig mittels einer Digitalwaage festgestellt. Zu einem gefrorenen EHT in einem Plastikreaktionsgefäß wurden eine kleine Stahlkugel und die fünffache Menge an Kranias-Puffer im Verhältnis zum Gewicht gegeben. Dieses wurde 2x 30 s bei 30 Hz im *TissueLyser* geschüttelt. Die Proben blieben 30 min bei Raumtemperatur stehen und wurden dann nochmals 30 s bei 30 Hz im *TissueLyser* durchmischt. Nach weiteren 30 min Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurden die Stahlkugeln entfernt, die Proben für 10 min bei 95 °C gekocht, 10 min zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Centrifuge 5415 C*; 13 000 rpm, RT) und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8.3 Proteinextraktion: Monolayer-Zellen

Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (Ø 3,5 cm) zweimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Für 1 Mio. ausgesäte Zellen wurden 100 µl Kranias-Puffer auf die Zellen pipettiert. Anschließend wurden die Zellen mithilfe eines Zellschabers abgelöst und in ein Plastikreaktionsgefäß überführt. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben für 10 min bei 95 °C gekocht, 10 min zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Centrifuge 5415 C*; 13 000 rpm, RT) und anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.8.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde eine Fertiglösung der Firma Bio-Rad Laboratories verwendet. Die Messung ist schnell und einfach durchzuführen, hängt aber stark von den Faltungseigenschaften des jeweiligen Proteins ab. Diese Methode (Bradford, 1976) basiert auf der Farbveränderung einer sauren Coomassie Brilliantblau G250-Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der Farbveränderung liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm zugrunde, die bei Proteinbindung erfolgt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption nach dem Lambert-Beer'schen Absorptionsgesetz wurde mit Immunglobulin G (IgG) aus Rinderserum eine Standardreihe erstellt. IgG wurde in einer Konzentration von 1,38 mg/ml in Aqua ad iniectabilia gelöst und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert. Diese Stamm-Lösung wurde zur Erstellung der Standardreihe in 0,1 M NaOH verdünnt. Die Standardreihe wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 9: Pipettierschema für die Proteinstandardkurve

Konzentration (µg/ml)	IgG-Standard (1,38 mg/ml) (µl)	NaOH (0,1 M) (µl)
0	0	800
3,45	2,5	797,5
6,90	5	795
10,35	7,5	792,5
13,80	10	790
20,70	15	785
27,60	20	780
41,60	30	770

Es wurden 5 µl der Proteinprobe zu 795 µl 0,1 M NaOH in Einmalküvetten pipettiert, anschließend mit 200 µl Bradford-Lösung aufgefüllt und gut gemischt. Nach Inkubation für 10 min wurde die Absorption in einem Fotometer (*Smart Spec[®] 3000*) bei 595 nm gemessen. Aus der Absorption lässt sich nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Proteinkonzentration errechnen. Die Proben wurden in 0,1 M NaOH so verdünnt, dass die gemessenen Absorptionen im mittleren Bereich der Standardkurve lagen und mindestens in Doppelbestimmung gemessen. Die Proteinbestimmung erfolgte in 0,1 M NaOH, um eine vollständige Lösung des Proteins zu gewährleisten.

2.8.5 Probenvorbereitung

Die Proben wurden zur Anpassung der Proteinkonzentration gegebenenfalls mit Probenpuffer verdünnt. Nach Hinzugabe von 1% (V/V) Ladungsmix wurden die Proben für 10 min bei 95 °C gekocht, 10 min zentrifugiert (Zentrifugenmodell *Centrifuge 5415 C*; 13 000 rpm, RT) und unmittelbar auf ein Gel aufgetragen.

2.8.6 Gelelektrophorese

Die Proteine wurden nach ihrem Molekulargewicht über ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurden stets 1 mm dicke Gele mit 10 Taschen gegossen. Zuerst wurde ein Trenngel (7,5%, V/V, für Proteine mit einem Molekulargewicht >100 kDa; 15%, V/V, für Proteine mit einem Molekulargewicht <100 kDa) gegossen und nach dessen Aushärten darauf ein Sammelgel (4%, V/V), in dem durch einen Kunststoff-Kamm Taschen zur Beladung mit den Proben freigehalten wurden. Nach dem Aushärten wurden die Kämmе gezogen und die Taschen dreimal mit Laufpuffer gespült. Zur späteren Zuordnung der Proteine wurden 7 µl eines Molekulargewichtsmarkers (*Precision Plus Protein Dual Color*) in eine Tasche geladen. Die Elektrophorese wurde mit konstantem Gleichstrom von 12 mA gestartet. Nachdem die Lauffront (Bromphenolblau) die Unterkante erreicht hatte, nach ca. 3,5 h, wurde die Elektrophorese beendet und das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt.

2.8.7 Immunoblot

Mit dieser immunologischen Methode (Western Blot) lassen sich elektrophoretisch getrennte und auf eine Membran transferierte Proteine mit spezifischen Antikörpern selektiv markieren und in einer Farb- oder Fluoreszenzreaktion detektieren (Towbin et al., 1979; Burnette, 1981).

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulose Membran (0,45 µm Porengröße) übertragen. Der Blotaufbau sah dabei folgendermaßen aus: Anode, Schwamm, 3x Whatman Filterpapier, Nitrocellulose Membran, SDS-Polyacrylamidgel, 3x Whatman Filterpapier, Schwamm, Kathode. Das SDS-Polyacrylamidgel und die Nitrocellulose Membran wurden zuvor 10 min in Transferpuffer equilibriert, das Filterpapier kurz mit Transferpuffer angefeuchtet. Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen wurden mit einer verkürzten serologischen Pipette ausgerollt. Der Protein-Transfer erfolgte eisgekühlt über Nacht bei einer konstanten

Spannung von 26 V. Am nächsten Morgen schloss sich nach Wechsel des Kühlelements ein einstündiger Transfer bei 300 mA an. Eine Quellung des Gels wurde durch das im Transferpuffer enthaltene Methanol verhindert. Nach Beendigung des Transfers wurde die Membran für 5 min in Aqua bidest. equilibriert und das SDS-Polyacrylamidgel zur Kontrolle der Transfereffizienz für 30 min mit Coomassie Brilliantblau-Lösung angefärbt. Der Farbstoff Coomassie Brilliantblau G250 ist ein blauer Trimethylmethanfarbstoff, der besonders mit basischen Aminosäuren wie Arginin oder Lysin Komplexe bildet. Daher wird er zur unspezifischen Anfärbung von Proteinen verwendet. Die Nachweisgrenze der Methode liegt bei 0,5 µg Protein pro Bande in einem Gel. Die mit Coomassie Brilliantblau-Lösung angefärbten SDS-Polyacrylamidgele wurden durch mehrfachen Wechsel mit Entfärber 2 über Nacht auf einem Horizontalschüttler entfärbt. Das Ergebnis wurde elektronisch festgehalten (*Chemi Genius*²).

Um die auf die Nitrocellulose Membran übergegangenen Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran für 5 min mit Ponceau S-Lösung gefärbt und das Ergebnis elektronisch festgehalten (*Chemi Genius*²). Um später auf einer Membran mehrere Proteine darzustellen wurde die Membran ggf. mit einer Skalpellklinge durchgeschnitten und jeder Abschnitt mit einer Markierung versehen. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran mit TBST gewaschen und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen mit Block-Lösung-WB für 60 min inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper (in TBST verdünnt + Natriumazid (NaN₃) zur Stabilisierung) ohne vorheriges Spülen zugegeben und über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Die Verdünnungen der einzelnen Antikörper sind der Tabelle 10 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 min folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettichs gekoppelt ist, in Block-Lösung-WB für 1 h. Anschließend wurde zweimal für je 10 min in TBST und zweimal für je 10 min in TBS gewaschen. Die Membran wurde für 5 min mit dem *SuperSignal*[®] *West Dura Extended Duration Substrate* Detektions-Kit inkubiert, das ein Substrat der Peroxidase enthält. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysierte dabei die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser und atomarem Sauerstoff. Dieser Sauerstoff oxidierte das im Reagenz ebenfalls enthaltene Luminol, und es zeigte sich eine Chemolumineszenz. Durchgeschnittene Membranen wurden nun wieder passend zusammengefügt und entwickelt. Zur Visualisierung wurden entweder Fotofilme, je nach Stärke der Lumineszenz für 5 s bis 20 min, belichtet und sofort entwickelt; oder die Chemolumineszenz wurde mithilfe des *Bio Imaging Systems* (*Chemi Genius*²), je nach Stärke der Lumineszenz für 10 s bis 15 min, detektiert.

Tabelle 10: Antikörper für Immunoblot

Untersuchtes Protein und zugehöriger Primär-Antikörper	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nummer	Sekundär-Antikörper
Anti- α -sarkomerisches Aktinin (97 kDa)	1:1000 (in TBST)	Sigma (Steinheim)	A7811	Anti-Maus- POX (1:10 000)
Anti- β -Aktin (42 kDa)	1:5000 (in TBST)	Sigma (Steinheim)	A5316	Anti-Maus- POX (1:5000)
Anti-Calsequestrin (~55 kDa)	1:2500 (TBST)	Affinity bioreagents (Golden, CO, USA)	PA1-913	Anti- Kaninchen (1:10 000)
Anti-Kaninchen (Sekundär-Antikörper)	Varierte, s. jeweils rechte Spalte (in Block- Lösung-WB)	Sigma (Steinheim)	A0545	entfällt
Anti-Kardiales Myosin-bindendes Protein-C (cMyPB-C; 150 kDa)	1:10000 (in TBST)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. W. A. Linke, Universität Heidelberg	entfällt	Anti-Maus- POX (1:10 000)
Anti-Maus (Sekundär-Antikörper)	Varierte, s. jeweils rechte Spalte (in Block- Lösung-WB)	Sigma (Steinheim)	A3682	entfällt
Anti-Maus-POX (Sekundär-Antikörper)	Varierte, s. jeweils rechte Spalte (in Block- Lösung-WB)	Jackson ImmunoResearch (Newmarket, Vereinigtes Königreich)	515-035- 003	entfällt
Anti-MLC2a-Gesamt (19,5 kDa)	1:500 (in TBST)	Eigene Konstruktion, Herstellung durch Eurogentec (Seraing, Belgien)	entfällt	Anti- Kaninchen (1:5000)
Anti-MLC2a-Phospho (19,5 kDa)	1:500 (in TBST)	Eigene Konstruktion, Herstellung durch Eurogentec (Seraing, Belgien)	entfällt	Anti- Kaninchen (1:5000)
Anti-MLC2v (~20 kDa)	1:5000 (in TBST)	Alexis (Lausen, Schweiz)	BC- 1150SL001	Anti-Maus (1:5000)
Anti-smMLCK (220 kDa und 130 kDa)	1:1000 (in TBST)	Sigma (Steinheim)	M7905	Anti-Maus- POX (1:10 000)

2.8.7.1 Datenerfassung und -verarbeitung

Die belichteten Filme wurden digitalisiert (*Chemi Genius²*) und die Schwärzung der einzelnen Banden mittels Densitometrie quantifiziert (Auswertungssoftware *GeneTools*). Nach der Subtraktion des für die jeweilige Bande korrespondierenden Hintergrundes wurden die jeweiligen Signale auf ihre Ladungskontrolle Calsequestrin normalisiert. Anschließend wurden sie auf den Mittelwert der unbehandelten Kontrollen der jeweiligen Membran bezogen. In den Abbildungen des Ergebniskapitels sind die Daten in Prozent des Mittelwerts der Kontrollen dargestellt.

2.9 Erfassung der mRNA-Expression

Zur Erfassung der Genexpression wurde die Gesamt-RNA nach einer modifizierten Methode von Chomczynski und Sacchi (1987) aus Gewebe, EHTs bzw. Monolayer-Zellen präpariert. Die Expressionsanalyse erfolgte nach Umschreibung in cDNA mittels reverser Transkriptase durch klassische RT-PCR oder quantitative *real-time* PCR (*TaqMan*[®]).

2.9.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden nur sterile Pipettenspitzen mit Filter und zuvor autoklavierte Plastikreaktionsgefäße benutzt. Der Metallmörser und der Metalllöffel wurden zwischen den einzelnen Pulverisierungsschritten wegen der Kontaminationsgefahr besonders gründlich gesäubert. Die Stahlkugeln wurden mit 0,4 N HCl gereinigt und mit dem RNase-Inhibitor Diethylpyrocarbonat (DEPC, 0,1%) versetztem Wasser gespült.

2.9.1.1 RNA-Extraktion: Gewebe

Das Gewicht gefrorener Gewebeproben der Maus und der Ratte wurde mittels einer Digitalwaage erfasst. Die Gewebestücke wurden unter flüssiger Stickstoffkühlung in einem Metallmörser pulverisiert und mit einem Metalllöffel in ein Plastikreaktionsgefäß überführt. Die 20-fache Menge an eiskaltem RNAzol B[®] im Verhältnis zum Gewicht wurde hinzugefügt und nach Zugabe einer kleinen Stahlkugel 2x 1 min bei 30 Hz im *TissueLyser* geschüttelt. Zu den Homogenaten wurde ein Fünftel des Gesamtvolumens Chloroform hinzupipettiert. Die Probengefäße wurden darauf für 30 s geschüttelt (Vortex) und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Zur Beschleunigung der Phasenaufftrennung wurden die Proben 15 min lang bei 4 °C mit 12 000 g (Zentrifugenmodell *EBA 12 R*) zentrifugiert. Die hydrophile RNA-haltige Phase wurde dann vorsichtig abgenommen und in ein neues Plastikreaktionsgefäß pipettiert. Die hydrophobe phenolische Phase wurde verworfen. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol versetzt und nach erneutem kurzen Schütteln (Vortex) 10 min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die RNA pelletiert (12 000 g, 5 min, 4 °C), der klare Überstand verworfen und das Pellet mit 500 µl Ethanol (75%) gewaschen. Das Gefäß wurde wiederholt kurz geschüttelt (Vortex), um das präzipitierte Pellet vom Gefäßboden zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation (7500 g, 5 min, 4 °C), wurde der Überstand verworfen und das Pellet ein zweites Mal mit 500 µl Ethanol (75%) gewaschen und zentrifugiert (7500 g, 5 min, 4 °C). Nach Abgießen des Überstandes wurde das Pellet bei Raumtemperatur 5 min getrocknet. Das Präzipitat wurde je nach Größe in 10-50 µl DEPC-Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde fotometrisch (Fotometer

Smart Spec[®] 3000) bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Eine Absorption (A) gleich eins entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml (Sambrooke et al. 1989, *Chapter 7*). Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die Absorption bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und die Ratio A260:A280 gebildet (1,5-2,0 bei allen Versuchen, Optimum 2,0). Wenn möglich, erfolgte direkt anschließend die reverse Transkription, ansonsten erfolgte die Lagerung der isolierten RNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C.

2.9.1.2 RNA-Extraktion: EHTs

Abweichend von der RNA-Extraktion aus Gewebe wurden die gefrorenen EHTs nicht pulverisiert, sondern direkt nach Zugabe von der 20-fachen Menge an eiskaltem RNAzol B[®] im Verhältnis zum Gewicht und einer kleinen Stahlkugel 2x 1 min bei 30 Hz im *TissueLyser* geschüttelt. Ansonsten sind alle Arbeitsschritte identisch mit den unter 2.9.1.1 beschriebenen, jedoch wurde jedes Pellet immer nur in 10 µl DEPC-Wasser gelöst.

2.9.1.3 RNA-Extraktion: Monolayer-Zellen

Die Präparation von RNA aus Monolayer-Zellen erfolgte auf Eis. Das Kulturmedium aus der Kulturschale (Ø 3,5 cm) wurde abgesaugt, die Zellen zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen, 1 ml eiskaltes RNAzol B[®] hinzupipettiert und in der Schale verteilt. Mit einem Zellschaber wurden die Monolayer-Zellen abgekratzt und das Lysat in ein Plastikreaktionsgefäß überführt. Ansonsten sind alle Arbeitsschritte analog zu den unter 2.9.1.1 beschriebenen, allerdings wurde jedes Pellet grundsätzlich nur in 10 µl DEPC-Wasser gelöst.

2.9.1.4 RNA-Agarosegel

Die isolierten RNA-Proben wurden auf einem RNA-Agarosegel auf ihre Reinheit überprüft. Dazu wurde 1 g Agarose mit 100 ml 1x MOPS aufgekocht, und der abgekühlten Lösung wurden 5,67 ml säurefreies Formaldehyd und 2 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Diese Lösung wurde in einen vorbereiteten Gelschlitten unter Einsetzung eines Taschenkamms gegossen (vgl. 2.2.6). Zu 3 µg der RNA-Probe wurde das zweifache Volumen Denaturierungspuffer gegeben. Dieser Ansatz wurde bei 95 °C für 2 min denaturiert (Thermoblock). Nach Abkühlung wurden 2 µl *Loading Buffer* hinzugefügt und die Proben

kurz anzentrifugiert (Zentrifugenmodell *Centrifuge 5415 C*). Nach dem Erstarren des RNA-Agarosegels wurde der Gelträger in die mit 1x MOPS-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt und der Taschenkamm unter Puffer aus dem Gel gezogen. Nach Beladung der Geltaschen wurde an das RNA-Agarosegel in *Sub-Cell GT* Elektrophorese-Kammern eine elektrische Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt, bis die gewünschte Auftrennung erfolgte. Das in die RNA interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierte unter UV-Licht (302 nm) und wurde mithilfe eines *Bio Imaging Systems (Chemi Genius²)* elektronisch festgehalten. Es erfolgte die Auftrennung der ribosomalen RNA in die 18- und 28-S Untereinheiten, und eventuelle Degradierungen durch RNAsen konnten anhand des RNA-Agarosegels erkannt werden. Nur die eindeutig qualitativ guten RNA-Proben wurden für weitere Experimente herangezogen.

2.9.2 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wurde RNA durch die Reverse Transkriptase in cDNA übersetzt. Die reverse Transkription der isolierten RNA erfolgte mithilfe des *SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR-Kits*. Für die reverse Transkription wurden ausschließlich sterile Pipettenspitzen mit Filter sowie zuvor autoklavierte Plastikreaktionsgefäße benutzt. Nach der Konzentrationsbestimmung wurden 1 µg RNA in ein neues Plastikreaktionsgefäß gegeben und mit DEPC-Wasser auf 7 µl aufgefüllt. Es wurden 2 µl Oligo(dT)₁₂₋₁₈-Primer (0,5 µg/µl), der zum Poly-A-Schwanz der mRNA komplementär ist, und 1 µl des 10 mM dNTP-Mixes hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde anschließend zum Denaturieren 5 min lang bei 65 °C inkubiert (Hybaid PCR-Gerät *Sprint*). Nach kurzem Abschrecken auf Eis wurde der Reaktionsmix hinzupipettiert. Zur Durchführung der reversen Transkription wurde zunächst 2 min lang bei 42 °C inkubiert und dann die Reverse Transkriptase hinzupipettiert. Eine sich anschließende Inkubation von 50 min bei 42 °C gewährleistete die Umschreibung der mRNA in cDNA. Das Enzym wurde in einem Zyklus von 15 min bei 70 °C inaktiviert. Darauf folgend wurde RNase H zur Eliminierung von nicht umgeschriebener mRNA hinzugefügt und bei 37 °C für 15 min inkubiert. Nach erneutem Abschrecken auf Eis wurde die durch die reverse Transkription erhaltene cDNA bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Für jede RNA-Probe wurde analog eine -RT-Kontrolle mitgeführt, einzig das Enzym *SuperScript™ II RT* wurde nicht mit in den Ansatz gegeben. Dieses war jedoch nur für cDNA-Proben nötig, die nicht der quantitativen RT-PCR zugeführt werden sollte (vgl. 2.9.3). Trotz des exonübergreifenden Designs der Primer und Sonden wurden für jeden Assay der quantitativen RT-PCR exemplarisch -RT-Kontrollen durchgeführt, diese waren alle negativ.

Alle Angaben beziehen sich auf einen Reaktionsansatz. Alle verwendeten Lösungen stammen aus dem *SuperScript™ First Strand Synthesis System for RT-PCR-Kit*, welches käuflich erworben wurde.

Herstellerangaben:

10x RT *buffer*: 200 mM Tris-HCl (pH 8,4), 500 mM KCl
10 mM dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP

Reaktionsmix für Reverse Transkription

10x RT <i>buffer</i>	2 µl
DTT (0,1 M)	2 µl
MgCl ₂ (25 mM)	4 µl
RNaseOUT™ (40 U/µl)	1 µl

Reverse Transkriptase

<i>SuperScript™ II RT</i> (50 U/µl)	1 µl
-------------------------------------	------

<u><i>E. coli</i> RNase H</u> (2 U/µl)	1 µl
--	------

2.9.3 Design und Optimierung von Primern

Die Auswahl von Primern mit optimierter Schmelztemperatur, Sekundärstruktur, Basenzusammensetzung und Länge des Amplikons für die RT-PCR erfolgte mittels der Software *ABI Primer Express®*. Oligonukleotide mit den optimierten Sequenzen für RT-PCR wurden von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Das Design und die Herstellung von Primern und Sondern für die quantitative RT-PCR wurde von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) durchgeführt. Zur Überprüfung der Spezifität der Primerpaare wurden RT-PCR-Reaktionen durchgeführt und die PCR-Produkte auf einem zwei Prozentigen Agarosegel analysiert. Bei nur einer sichtbaren Bande mit der Größe des erwarteten Amplikons wurde das Primerpaar als spezifisch angenommen. Um unspezifische Amplifikationen von genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Primer und/oder Sonden so gewählt, dass ihre Zielsequenzen die Grenze zwischen zwei benachbarten Exons überschritten. Die Spezifität der Primer wurde mithilfe des *BLAST*-Programms überprüft. Die Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden für die nicht-quantitative RT-PCR und quantitative RT-PCR

Gen	Sequenz des Vorwärtsprimers	Sequenz des Rückwärtsprimers	Sequenz der Sonde
GAPDH (Maus) für die nicht-quantitative RT-PCR	5'-GTATGACTCCACTCACGGCAAA-3'	5'-GGTCTCGCTCCTGGAAGATG-3'	entfällt
GAPDH (Maus) für die quantitative RT-PCR	5'-ATGTTCCAGTATGACTCCACTCACG-3'	5'-GAAGACACCAGTAGACTCCACGACA-3'	5'-FAM-AAGCCCATCACCAT-CTTCCAGGAGCGAGA-TMR-3'
GAPDH (Ratte)	5'-AACTCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3'	5'-CAGTCTTCTGAGTGGCAGTGATG-3'	5'-FAM-ATGGACTGTGGTCAT-GAGCCCTTCCA-TMR-3'
Gα ₂ (Maus und Ratte)	5'-CAAGGCTCTGTGGGAGGAT-3'	5'-CGAAGCAGGTCCTGGTCACT-3'	5'-FAM-AGGAAGTACTGGG-CACAGTCGATCAGC-TMR-3'
MLC2a (Maus und Ratte)	5'-CAAGGAAGAGTTCAAGCAGCTTC-3'	5'-GCAGAGAGACTTGTAGTCAATGTTG-3'	5'-FAM-CATGACCCAGGCA-GACAAGTTCTCTCT-TMR-3'
MLC2sk (Maus)	5'-CAGACTCAGATCCAGGAG-3'	5'-CAAACATGGTCAGGAAGAC-3'	entfällt
MLC2v (Maus)	5'-CATTCTCAACGCATTCAAGGT-3'	5'-GGGAAAGGCTGCGAACAT-3'	entfällt
MLC2v (Ratte)	5'-CTAAGGGACACGTTTGCTGC-3'	5'-TGAAGGCGTTGAGAAGGTTCT-3'	5'-FAM-CGGACGAGTGAACG-TGAAAACGAA-TMR-3'
skMLCK (Maus) für die nicht-quantitative RT-PCR	5'-ATGGTGTTCGTCAGGCAGATC-3'	5'-TCCCAAAATTCACCTTCAGTTTCTC-3'	entfällt
skMLCK (Maus) für die quantitative RT-PCR	5'-GAAGGACCAGAGTGCCAGAAT-3'	5'-GCTACTGATCTTCTTGAAGCGATT-3'	5'-FAM-AGCAGGATCTGGG-ACTTGAGGCGA-TMR-3'
smMLCK 130 kDa (Maus)	5'-GGCTCACGTTTTCTGTCTCC-3'	5'-GGCCTTGGTGTCTCACTGG-3'	5'-FAM-CTGAGCATCGTCCA-CAGTGACTTGGA-TMR-3'
smMLCK 130 kDa (Ratte)	Vorwärtsprimer 1 5'-CTGCAAGATCGAAGGATACCCA-3' Vorwärtsprimer 2 5'-GATTTGACTGCAAGATCGAAGGATAC-3' Vorwärtsprimer 3 5'-GGAGTTGTGGAGGGAAGC-3'	5'-CCGTCTTCATCGTAGTCTATCTGGA-3'	5'-FAM-ACCCTGAGGTTGT-CTGGTTCAAGGA-TMR-3'
smMLCK 220 kDa (Maus) für die nicht-quantitative RT-PCR	5'-TGCTCACTCCATCTGTGAGG-3'	5'-CTGGCTTCCATCCATGACTT-3'	entfällt
smMLCK 220 kDa (Maus) für die quantitative RT-PCR	5'-CGTCCAAGAGAAGAAAGGTGAA-3'	5'-CATCCATGACTTTGAGGTGCGA-3'	5'-FAM-AGCTCGCAGCAAG-CCCATCGC-TMR-3'
smMLCK 220 kDa (Ratte)	5'-AGGTGACCGTGGAGCTGAC-3'	5'-CCTGGAAATCCTGAGGCTTT-3'	5'-FAM-ATCTTATGAAGAAGC-ATGGTCAGCCGTTT-TMR-3'

TMR = TAMRA

Bei dem Assay smMLCK 130 kDa der Ratte dienten die drei verschiedenen Vorwärtsprimer einem Vergleichsexperiment (s. 3.6.4.3.1). Für alle weiteren Ergebnisse wurde ausschließlich der Vorwärtsprimer 2 verwendet.

2.9.4 Nicht-quantitative RT-PCR

Die PCR diente zur exponentiellen *in vitro*-Amplifikation von DNA-Sequenzen zwischen zwei Oligonukleotid-Fragmenten (Primern), die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge binden (Saiki et al., 1985; Saiki et al., 1988). Die Oligonukleotid-Primer hybridisieren an komplementäre Regionen des zu amplifizierenden DNA-Fragments (*Template*). Eine hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase hängt Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden (*Annealing*) und synthetisiert das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment in Gegenwart von freien Desoxynukleosid-Triphosphaten (dNTPs; *Elongation*). Darauf folgt ein neuer Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese. Der Zyklus wird 20 bis 50-mal wiederholt (s. Tab. 12). Es handelt sich um eine Kettenreaktion, bei der winzige Mengen einer gegebenen DNA-Sequenz exponentiell amplifiziert werden (ideale Kopienzahl bei 30 Zyklen: 2^{30}). Im Rahmen dieser Arbeit wurde per nicht-quantitativer RT-PCR die aus RNA umgeschriebene cDNA mit unterschiedlichen Primern zur Klärung der Frage der Genexpression in verschiedenen Geweben amplifiziert.

Für die nicht-quantitative RT-PCR wurden nur sterile Pipettenspitzen mit Filter und zuvor autoklavierte Plastikreaktionsgefäße benutzt. Der beschriebene Reaktionsansatz versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet. Der 10x Reaktionspuffer 2 und das $MgCl_2$ (25 mM) wurden als Set mit der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase erworben. Die Oligonukleotide wurden lyophilisiert geliefert und vor der Verwendung auf eine Konzentration von 5 μM mit Aqua ad iniectionabilia eingestellt. Die Lagerung der gelösten Oligonukleotide erfolgte bei $-20\text{ }^{\circ}C$.

Reaktionsansatz:

Ausgangs (<i>Template</i>)-cDNA	1 μl (150-200 ng)
10x Reaktionspuffer 2	2,5 μl
dNTP-Mix (10 mM)	2,5 μl
$MgCl_2$ (25 mM)	1,95 μl
Vorwärtsprimer (5 μM)	1,00 μl
Rückwärtsprimer (5 μM)	1,00 μl
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (5U/ μl)	0,3 μl
Aqua ad iniectionabilia	ad 25 μl

Tabelle 12: Temperaturbedingungen für die nicht-quantitative RT-PCR zur Identifizierung der MLCK-Isoformen

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	7 min	1
94 °C	30 s	} 17 * = - 0,5 °C pro Zyklus
* 67 °C	30 s	
72 °C	30 s	
94 °C	30 s	15
59 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	1

Die nicht-quantitative RT-PCR-Reaktion wurde mit einem *GeneAmp*[®] *PCR System 9700* PCR-Gerät nach obigem Temperaturschema durchgeführt.

Tabelle 13: Temperaturbedingungen für die nicht-quantitative RT-PCR zur Überprüfung der shRNA-Sequenz in den Lentiviren

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
94 °C	7 min	1
94 °C	30 s	32
58,6 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	7 min	1

Die nicht-quantitative RT-PCR-Reaktion wurde mit einem *GeneAmp*[®] *PCR System 9700* PCR-Gerät nach obigem Temperaturschema durchgeführt.

Die amplifizierte DNA wurde über ein 3%iges Agarosegel separiert (s. 2.2.6). Zur DNA-Probe wurden 20% (V/V) 6x-DNA-Ladepuffer gegeben und 12 µl des Ansatzes neben einem Molekulargewichtsmarker auf das Agarosegel aufgetragen. Das Agarosegel wurde mit TBE-Puffer in *Sub-Cell GT* Elektrophorese-Kammern überschichtet und eine elektrische

Gleichspannung von 5-10 V/cm Gellänge angelegt, bis die gewünschte Auftrennung erfolgte. Zum Anfärben von DNA-Banden wurde dem Agarosegel vor dem Gießen Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,1 µg/ml zugefügt. Das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid fluoreszierte unter UV-Licht (302 nm). Die Fluoreszenz wurde mithilfe eines *Bio Imaging Systems (Chemi Genius²)* elektronisch festgehalten.

2.9.5 Quantitative RT-PCR

Die mRNA-Expression wurde auch mittels quantitativer *real-time* PCR der durch reverse Transkription erhaltenen cDNA mit einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Detektion und Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit während der Amplifikation. Es ist möglich, relative quantitative Angaben über die Menge an cDNA bzw. mRNA eines bestimmten Gens in einer Probe zu machen; bzw. aus einer Probe können mehrere Gene gleichzeitig untersucht werden. Hierzu wurde für jedes Gen eine fluorogene Sonde konstruiert, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden Reporter-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) markiert ist, während das 3'-Ende einen *Quencher*-Farbstoff (6-Carboxy-tetramethylrhodamin; TAMRA) trägt. Wird die intakte Sonde durch ultraviolettes Licht angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter-Farbstoffs durch den *Quencher* aufgrund seiner räumlichen Nähe unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde spezifisch mit dem komplementären Abschnitt des Matrizen-Stranges zwischen dem Vorwärts- und dem Rückwärtsprimer. In der Extensionsphase hydrolysiert die im Reaktionsansatz enthaltene Polymerase (AmpliTaQ Gold[®]) aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die an die Zielsequenz hybridisierte Sonde. Durch die daraus resultierende Aufhebung der räumlichen Nähe zwischen Reporter und *Quencher* kommt es nach Anregung durch ultraviolettes Licht zu Fluoreszenz, die entsprechend der Akkumulation von PCR-Produkt mit jedem PCR-Zyklus ansteigt und in Echtzeit während des gesamten PCR-Laufes aufgezeichnet werden kann. Durch die statistische Anlagerung der Sonde und Primer ist die Geschwindigkeit des Anstiegs der Fluoreszenz direkt proportional zur Expression des entsprechenden Gens. Zur Quantifizierung kann der Zeitpunkt während des Laufes bestimmt werden, zu dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (*threshold*) übersteigt (ct-Wert). Da bei jedem Zyklus der PCR eine Verdoppelung der Zielsequenzen stattfindet, gilt: Expression [Gen X] proportional zu $2^{-\text{ct-Wert}}$.

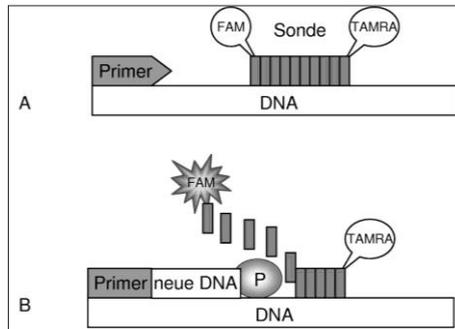


Abbildung 20: Prinzip der *TaqMan*[®]-PCR

A: Sequenzspezifische Anlagerung der Sonde und eines Primers. B: Synthese der neuen DNA und Hydrolyse der Sonde durch die Polymerase (P). Durch die räumliche Trennung von Reporter-Farbstoff FAM und *Quencher*-Farbstoff TAMRA kann FAM ein Fluoreszenzsignal emittieren.

2.9.5.1 Versuchsbedingungen

Für die quantitative RT-PCR wurden ausschließlich Pipettenspitzen mit Filter sowie zuvor autoklavierte Plastikreaktionsgefäße benutzt. Der beschriebene Reaktionsansatz versteht sich als Ansatz für eine Probe. Für eine entsprechend höhere Probenzahl n wurde ein n -facher Ansatz berechnet. Die Temperaturbedingungen waren bei jedem Lauf identisch und sind in Tabelle 15 aufgeführt. Zur Quantifizierung der Expression wurde für jedes Gen und jeden Lauf eine Verdünnungsreihe mitgeführt. Dazu wurde eine Mischung aus allen für den jeweiligen Lauf verwendeten cDNAs erstellt und diese in relativen Standardkonzentrationen von 1,0000, 0,2500, 0,0625, 0,0156, 0,0039 und 0,0010 eingesetzt. Die aus der Standardreihe erhaltenen relativen Konzentrationen wurden für jede Probe auf die relative Konzentration von GAPDH oder $G\alpha_s$ als internen Standard bezogen. Zum Ausgleich von Pipettierfehlern wurde ein passiver Referenzfluoreszenzfarbstoff (ROX, *Reference dye*) hinzugefügt. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung ausgeführt. Bei jedem PCR-Lauf wurde eine NTC (*No Template Control*, Kontrolle ohne cDNA, Wasser-Kontrolle) mitgeführt. Die Messung der Fluoreszenzsignale am Ende der PCR und deren Analyse wurden mithilfe des *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection Systems* und der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software*, Version 2.1.1 durchgeführt. In Abbildung 21 sind exemplarisch Fluoreszenzkurven der Verdünnungsreihe eines quantitativen RT-PCR Laufs gezeigt.

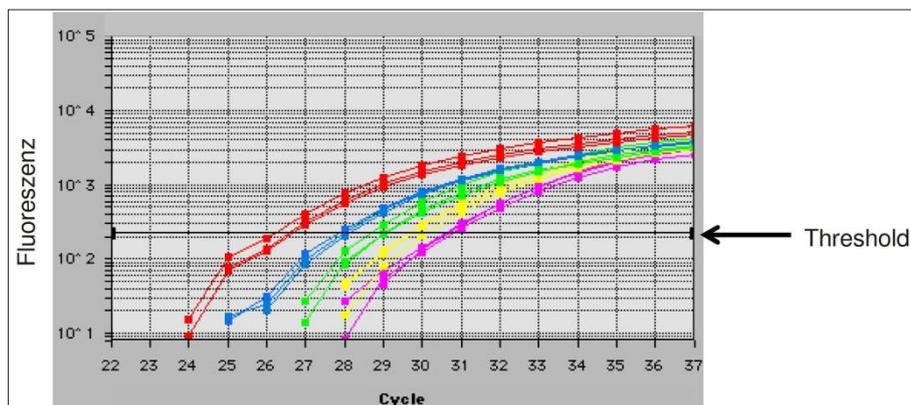


Abbildung 21: Fluoreszenzkurven der Verdünnungsreihe eines exemplarischen quantitativen RT-PCR Laufs

Kurven gleicher Farbe repräsentieren die identische Verdünnung, die hier jeweils in Dreifachbestimmung gemessen wurde

Reaktionsansatz quantitative RT-PCR

Der 10x Reaktionspuffer 2 und das $MgCl_2$ (25 mM) wurden als Set mit der AmpliTaq Gold[®] DNA Polymerase erworben. Die Oligonukleotide und Sonden wurden lyophilisiert geliefert und vor der Verwendung auf eine Konzentration von 5 μM bzw. 10 μM mit Aqua ad iniectabilia eingestellt. Die Lagerung der gelösten Oligonukleotide und Sonden (diese lichtgeschützt) erfolgte bei -20 °C.

Das Zusammenpipettieren der Reaktionsansätze und die Verteilung auf die 384-*well*-Platte erfolgte unter laminarem Luftfluss. Nach Verschluss der Platte mit einer durchsichtigen Klebefolie wurde die Platte anzentrifugiert (Zentrifugenmodell 5810 R; 800 rpm, 1 min, RT) und direkt danach im *ABI PRISM 7900HT*-Gerät gestartet.

Ausgangs (<i>Template</i>)-cDNA	2,0 μl
10x Reaktionspuffer 2	1,0 μl
dNTP-Mix (10 mM)	0,8 μl
$MgCl_2$ (25 mM)	1,2 μl
Vorwärtsprimer (5 μM)	variiert, s. Tabelle 14
Rückwärtsprimer (5 μM)	variiert, s. Tabelle 14
Sonde (10 μM)	variiert, s. Tabelle 14
<i>ROX</i> , Reference Dye	0,1 μl
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase (5U/ μl)	0,1 μl
Aqua ad iniectabilia	ad 10 μl

Tabelle 14: Primer- und Sondenkonzentrationen für den Reaktionsansatz der quantitativen RT-PCR

Gen	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Sonde
GAPDH (Maus)	400 nM	600 nM	300 nM
GAPDH (Ratte)	400 nM	600 nM	300 nM
G α_s (Maus und Ratte)	600 nM	400 nM	100 nM
MLC2a (Maus und Ratte)	300 nM	900 nM	200 nM
MLC2v (Maus)	300 nM	900 nM	300 nM
skMLCK (Maus)	400 nM	600 nM	300 nM
smMLCK 130 kDa (Maus)	400 nM	600 nM	300 nM
smMLCK 130 kDa (Ratte)	400 nM (alle 3 Varianten)	600 nM	300 nM
smMLCK 220 kDa (Maus)	600 nM	400 nM	200 nM
smMLCK 220 kDa (Ratte)	450 nM	450 nM	300 nM

Tabelle 15: Temperaturbedingungen für die quantitative RT-PCR

Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
50 °C	2 min	1
95 °C	10 min	1
94 °C 60,6 °C	15 s 1 min	40

2.9.5.2 Auswertung von quantitativen RT-PCR Daten

Die Auswertung der erhaltenen Daten erfolgte mithilfe der Gerätesoftware SDS in der Version 2.1.1 und Microsoft® Excel® 2007. Die gemessenen ct-Werte (Zyklus, bei dem ein im Bereich der logarithmischen Amplifikation festgelegter Schwellenwert überschritten wird) der Dreifachbestimmung jeder Probe wurden gemittelt. Die relativen Mengenverhältnisse wurden aus den Differenzen der gemittelten ct-Werte der einzelnen Amplikons in den verschiedenen Proben zu dem zugehörigen gemitteltem ct-Wert des *Housekeeping*-Gens (GAPDH oder G α_s) gebildet.

2.10 Immunhistochemie/Immunzytochemie

Mithilfe der Immunfluoreszenz gelingt es, Proteine in Zellen nach vorheriger Behandlung zur Fluoreszenz anzuregen und somit auf mikroskopischer Ebene direkt Aussagen über ihr Vorkommen, ihre Lokalisation und Funktion zu machen. Das Prinzip beruht auf einer Epitoperkennung durch einen Primärantikörper und der speziesspezifischen Bindung eines Sekundärantikörpers, gekoppelt mit einem Fluoreszenzfarbstoff an den primären Antikörper.

2.10.1 EHTs

Alle Schritte wurden in den Vertiefungen einer 12-*well*-Gewebekulturplatte und auf einem Horizontalschüttler durchgeführt. Das Gesamtvolumen betrug pro *well* 2 ml.

Darstellung von α -Aktinin und kardialem Myosin-bindenden Protein-C (cMyPB-C)

EHTs wurden wie unter 2.6.6.2 beschrieben 30 min lang mit 30 mM BDM relaxiert, dann 3x 10 min in 0,05 M TBS gespült und zur Fixierung über Nacht bei 4 °C mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung behandelt. Formaldehyd bewirkt eine Quervernetzung der Proteine, wodurch die Zellen konserviert werden. Nach 8x 1h Waschen mit 0,05 M TBS erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen sowie die Permeabilisierung der Zellwände mit Block-Lösung-IH über Nacht bei 4 °C. Anschließend wurde 8x 1 h mit 0,05 M TBS gespült. Die permeabilisierten Zellen wurden für 96 h bei 4 °C mit dem in Ak-Lösung verdünnten Anti-Kaninchen- α -sarkomerisches-Aktinin IgG1 aus der Maus (1:200) und dem Anti-cMyPB-C (1:500) als zwei verschiedene Primär-Antikörper gleichzeitig inkubiert. Es folgte über Nacht ein Waschschritt in 0,05 M TBS und daraufhin die lichtgeschützte Inkubation mit den sekundären Antikörpern. α -Aktinin wurde durch Alexa Fluor[®] 488-markiertes Anti-Maus IgG der Ziege (1:600) und cMyPB-C durch Alexa Fluor[®] 546-markiertes Anti-Kaninchen IgG der Ziege (1:600) entwickelt. Die Inkubation wurde bei 4 °C für 96 h durchgeführt. Zusätzlich wurde zur Darstellung der Zellkerne TO-PRO[®]-3 Iodid, das in DNA interkaliert, in einer Verdünnung von 1:1000 zur Lösung des sekundären Antikörpers gegeben. Anschließend wurde 8x 1h mit TBS gewaschen (lichtgeschützt). Beim Eindeckeln der EHTs mit Mowiol 4-88 wurden diese zwischen Objektträger und Deckgläschen (24x60 mm) gequetscht, um eine gute Fokussierung zu ermöglichen. Die Objektträger wurden bei 4 °C im Dunkeln gelagert. Nach dem Aushärten der Präparate wurden die Fluoreszenzbilder mittels eines konfokalen Lasermikroskops erstellt. Die rote Fluoreszenz in den so gewonnenen Bildern zeigt das kardiale Myosin-bindende Protein-C, während die grüne Fluoreszenz α -Aktinin darstellt, die Zellkerne erscheinen mit einer blauen Fluoreszenz.

Tabelle 16: Antikörper und Farbstoffe für die Immunhistologie

Untersuchtes Protein und zugehöriger Primär-Antikörper bzw. Farbstoffe	Verdünnung	Hersteller	Katalog-Nummer	Sekundär-Antikörper
Alexa Fluor [®] 488-markiertes Anti-Maus IgG der Ziege (Sekundär-Antikörper)	1:600 (in Ak-Lösung)	Invitrogen (Karlsruhe)	A11029	entfällt
Alexa Fluor [®] 546-markiertes Anti-Kaninchen IgG der Ziege (Sekundär-Antikörper)	1:600 (in Ak-Lösung)	Invitrogen (Karlsruhe)	A11035	entfällt
Anti-Kardiales Myosin-bindendes Protein-C (cMyPB-C)	1: 1:500 (in Ak-Lösung)	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von PD Dr. W. A. Linke, Universität Heidelberg	entfällt	Alexa Fluor [®] 546-markiertes Anti-Kaninchen IgG der Ziege
Anti- α -sarkomerisches Aktinin	1:200 (in Ak-Lösung)	Sigma (Steinheim)	A 7811	Alexa Fluor [®] 488-markiertes Anti-Maus IgG der Ziege
TO-PRO [®] -3 Iodid (1 mM Lösung in DMSO)	1:1000 (in Ak-Lösung)	Invitrogen (Karlsruhe)	T3605	entfällt

2.10.2 Datenerfassung mittels konfokaler Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie diente zur Untersuchung von fixierten *whole-mount*-EHT-Präparaten durch ein räumliches Objekt. Dies wird durch die Lochblende (*Pinhole*) erreicht, die sich im Brennpunkt des Mikroskops, konfokal zum beleuchteten Punkt im Präparat, befindet und nur exakt fokussiertes Licht passieren lässt. Durch das Ausblenden nicht fokussierten Lichtes können Signale ober- bzw. unterhalb der gewünschten Schärfenebene den Detektor nicht erreichen und tragen nicht zur Bildentstehung bei. Alle konfokalen Darstellungen wurden mit der LSM 510 Meta Software auf einem Axiovert 200 M Mikroskop erstellt. Die Aufnahmen der Fluoreszenzen erfolgte nach Einkopplung der zugehörigen Laserlinie. Die Detektorempfindlichkeit und Laserintensität pro Kanal wurde je nach Präparat so gewählt, dass die größte im Experiment vorliegende Intensität im Bereich der Detektorsättigung lag. Alle übrigen Einstellungen wie Auflösung, *Scans*geschwindigkeit und Signalmittelung wurden entsprechend den Anforderungen der Fragestellung und den Gegebenheiten in dem Präparat so gewählt, dass unter Berücksichtigung der Probenstabilität eine möglichst hohe Signalqualität erhalten wurde. Diese einmal festgelegten Einstellungen wurden während der Aufnahme der Präparate einer experimentellen Serie nicht verändert.

2.10.2.1 Quantitative Bestimmung morphologischer Parameter

Mithilfe der Software *LSM 5 Image Browser* wurden anhand der Fluoreszenzbilder Sarkomerlängen von NRCM in EHTs bestimmt und anschließend statistisch ausgewertet. Die Software erlaubt es, die Sarkomerlänge präzise zu markieren und diese dann daraus automatisch zu bestimmen.

2.11 Statistik

Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetisches Mittel \pm dem Standardfehler des Mittelwertes (SEM), berechnet aus den Einzelwerten (n), angegeben. Die statistische Signifikanz wurde mittels zweiseitigem ungepaartem Student-t-Test (beim Vergleich zweier Gruppen) bzw. dem ANOVA-Test und ggf. anschließendem Post Hoc Test nach Scheffe (beim Vergleich mehrerer Gruppen) mit den Programmen *Prism4* und *StatView* ermittelt. Der Vergleich von Konzentrations-Wirkungs-Kurven bei der Kontraktionsmessung erfolgte durch ANOVA für wiederholte Messungen mittels *StatView*-Software. Ein p-Wert kleiner oder gleich 0,05 wurde als signifikant angenommen. Signifikante Differenzen sind im Text erwähnt und in den Abbildungen gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Alle Ergebnisse sind in tabellarischer Form am Ende dieser Arbeit (8.6) aufgeführt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde die Darstellung der Daten im Text auf ein für das Verständnis notwendige Maß beschränkt.

3.1 Charakterisierung des Modells: Erwachsene Mäuse

In unserer Arbeitsgruppe lagen erstmalig Daten von menschlichen Vorhofproben vor, dass es nach α_1 -adrenerger Rezeptorstimulation sowohl zu einem MLCK-vermittelten Anstieg der Kontraktionskraft als auch zu einer MLCK-abhängigen Zunahme der Phosphorylierung der MLC2a kommt (Grimm et al., 2005). Da man jedoch an menschlichen Proben auf die Hilfsmittel der pharmakologischen Inhibitoren limitiert ist und keine weitreichenden Veränderungen auf molekularer Ebene untersucht werden können, sollte zu Beginn meiner Arbeit ein geeignetes Tiermodell gefunden werden. Dazu wurden zunächst Kontraktionsexperimente mit Phenylephrin in An- und Abwesenheit des α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Prazosin an linken Vorhöfen der Maus durchgeführt. Zur Klärung der Frage, ob die MLCK-Aktivität für den positiv inotropen Effekt α_1 -adrenerger Stimulation notwendig ist, wurden weitere Kontraktionsexperimente unter Einfluss von drei verschiedenen MLCK-Inhibitoren (Wortmannin, ML-7 und ML-9) angefertigt. Der Einfluss der IP_3 -Rezeptor-vermittelten Calciumfreisetzung wurde anhand eines pharmakologischen IP_3 -Rezeptorblockers (2-APB) geprüft.

Weiterhin erfolgten biochemische Untersuchungen zur Charakterisierung des Modells der erwachsenen Maus mit Hinblick auf die MLCK und ihre Isoformen. Als Methoden wurden hier der Western Blot für die Protein-Ebene und die nicht-quantitative RT-PCR sowie die quantitative RT-PCR für die mRNA-Ebene angewandt.

3.1.1 Kontraktionsexperimente der Maus: Der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt

3.1.1.1 Prazosin als α_1 -Adrenozeptor-Antagonist: Effekt von Phenylephrin

Es wurde in Anwesenheit von 0,3 μ M Nadolol der α_1 -Adrenozeptor-Antagonist Prazosin (1 μ M) zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Nach Erstellung der Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve (PE-KWK) von 0,3-100 μ M wurden anschließend 10 μ M Isoprenalin hinzugefügt.

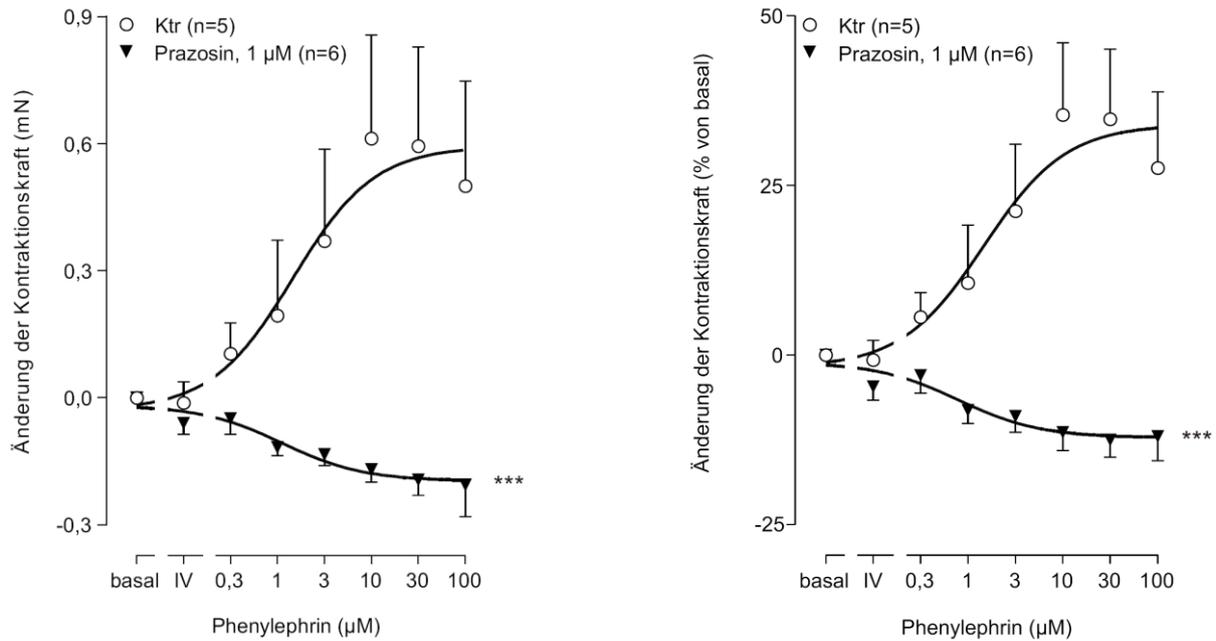


Abbildung 22: Effekt von Phenylephrin unter α_1 -Adrenozeptorblockade mit Prazosin

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 µM), IV = Intervention (Prazosin, 1 µM). Im linken Teil der Abbildung ist die Änderung der Kontraktionskraft in mN und im rechten Teil die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin und in An- bzw. Abwesenheit von 1 µM Prazosin dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,57 mN, Prazosin 1,67 mN. *** $p < 0,001$, Prazosin vs. Ktr, ANOVA

Der α_1 -Adrenozeptorblocker Prazosin (1 µM) führte zu einer kompletten Hemmung des α_1 -adrenergen positiv inotropen Effektes unter Phenylephrin-Stimulation. Bei maximaler Phenylephrin-Konzentration von 100 µM erreichte die Prazosin-behandelte Gruppe 88% Kontraktionskraft von basal vs. 128% in der Kontrollgruppe ($p < 0,01$ vs. Ktr, t-Test). Zum Zeitpunkt des maximalen Phenylephrineffektes der Kontrollgruppe bei 10 µM Phenylephrin (135%) erzielte die mit Prazosin-behandelte Gruppe nur 89% Kontraktionskraft von basal ($p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test).

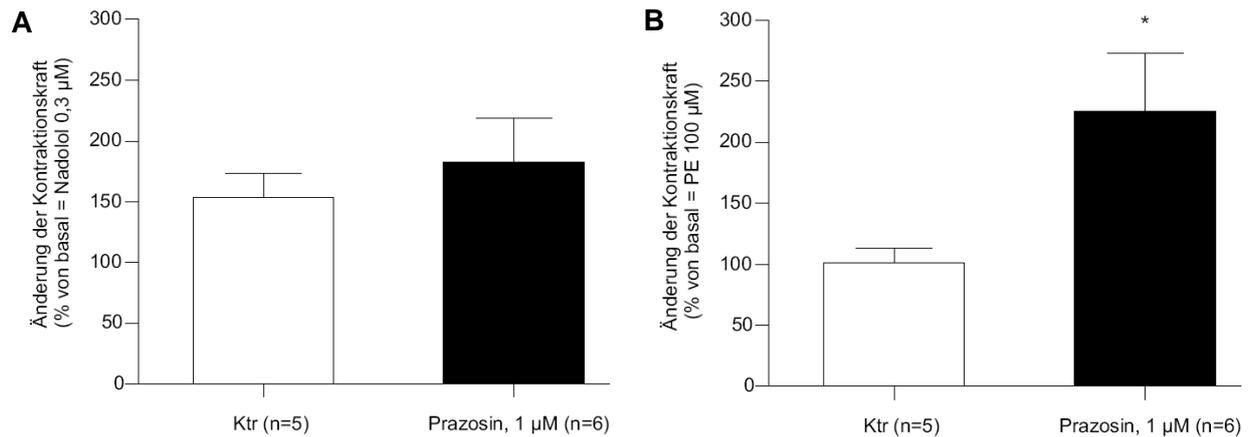


Abbildung 23: Effekt von Isoprenalin unter α_1 -Adrenozeptorblockade mit Prazosin nach PE-KWK

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, in Abb. 23A entspricht basal nach Nadolol-Gabe, und in Abb. 23B entspricht basal der maximalen Kontraktionskraft von 100 μ M Phenylephrin. Ausgangslage absolut: Abb. 23A Ktr 1,57 mN, Prazosin 1,67 mN bzw. Abb. 23B Ktr 2,07 mN, Prazosin 1,47 mN.

Bei Basiswertsetzung nach Nadolol-Gabe unterschied sich der Effekt von Isoprenalin unter α_1 -Adrenozeptorblockade mit Prazosin zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant voneinander (Prazosin 182% vs. Ktr 154%, ns. vs. Ktr, t-Test). Anders jedoch bei der Berechnung mit dem zweiten Basiswert (Phenylephrin 100 μ M). Die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal betrug hier in der Prazosin-behandelten Gruppe 225% vs. Kontrollgruppe 101% (* $p < 0,05$ vs. Ktr, t-Test).

3.1.2 Kontraktionsexperimente der Maus: Die MLCK-Inhibition

3.1.2.1 MLCK-Inhibition durch Wortmannin: Effekt von Phenylephrin

In Gegenwart von 0,3 μM Nadolol wurde Wortmannin (Wort, 10 μM) als MLCK-Inhibitor bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Es wurde eine PE-KWK von 0,3-100 μM erstellt und nach Abschluss eine einmalige Konzentration von 10 μM Isoprenalin (ISO) ergänzt. Diese Experimente mit $n=13$ Vorhöfen in der Kontrollgruppe und $n=18$ für die Wortmannin-behandelte Gruppe konnten nicht gewertet werden, da 83% der mit Wortmannin behandelten Vorhöfe arrhythmisch waren, und Wortmannin als solches eine z. T. ausgeprägte Zunahme der Kraft verursacht hatte (s. Abb. 24 und Abb. 25). Die Versuche wurden nach einiger Zeit in leicht abgewandelter Form wiederholt, sodass es zu einer Aussage über die Effekte der MLCK-Inhibition durch Wortmannin kommen konnte (s. S. 98 und 3.1.2.2).

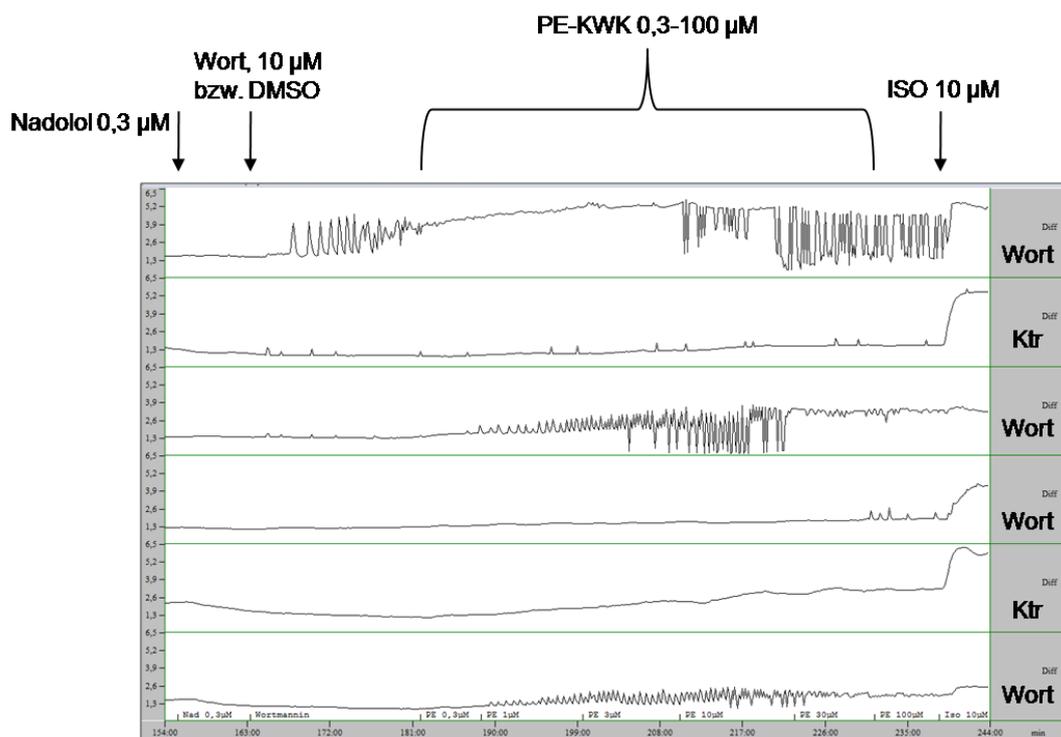


Abbildung 24: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes von linken Vorhöfen der Maus unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin und Stimulation mit Phenylephrin sowie Isoprenalin

Es ist die Differenz der minimalen und maximalen Kontraktionskraft in mN über den Zeitverlauf (min) gezeigt. Die verschiedenen linken Vorhöfe mit den jeweiligen Interventionen sind der rechten Spalte zu entnehmen. Oberhalb der Abbildung ist die jeweilige Zugabe von Antagonisten/Agonisten dargestellt.

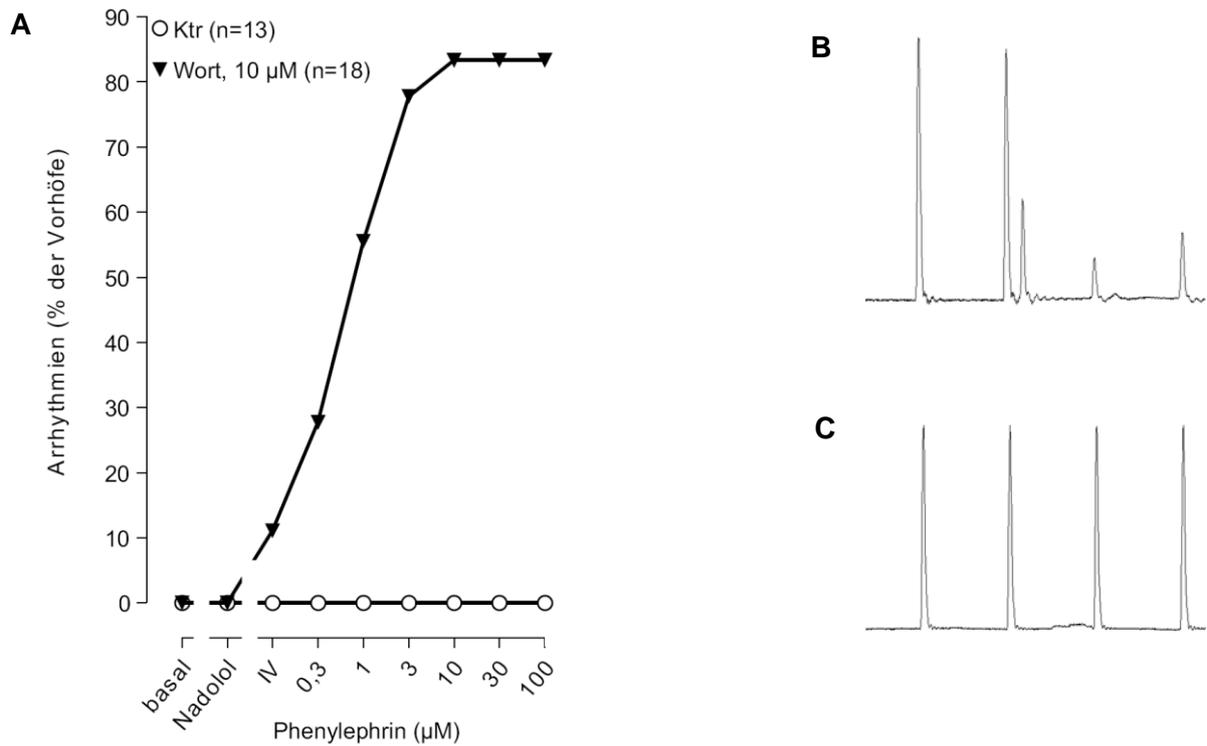


Abbildung 25: Kumulative Entwicklung von Arrhythmien unter Wortmannin-Behandlung

Basal = nach Equilibrierung und vor Zugabe aller Substanzen, Nadolol = Nadolol 0,3 µM, IV = Intervention (Wortmannin, 10 µM). In Abb. 25A ist die kumulative Entwicklung von Arrhythmien in linken Vorhöfen der Maus zu ihrem Zeitpunkt des Auftretens in Abhängigkeit der hinzugefügten Substanzen dargestellt. In Abb. 25B sind exemplarisch die dazugehörigen Einzelamplituden der Kontraktionsmessung für die Wortmannin-behandelte Gruppe, analog in Abb. 25C die Kontrollgruppe, gezeigt.

In Anwesenheit von 0,3 μM Nadolol wurde der MLCK-Inhibitor Wortmannin (10 μM) bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Anschließend wurde nach Bolusgabe von Phenylephrin eine Konzentration von 100 μM eingestellt.

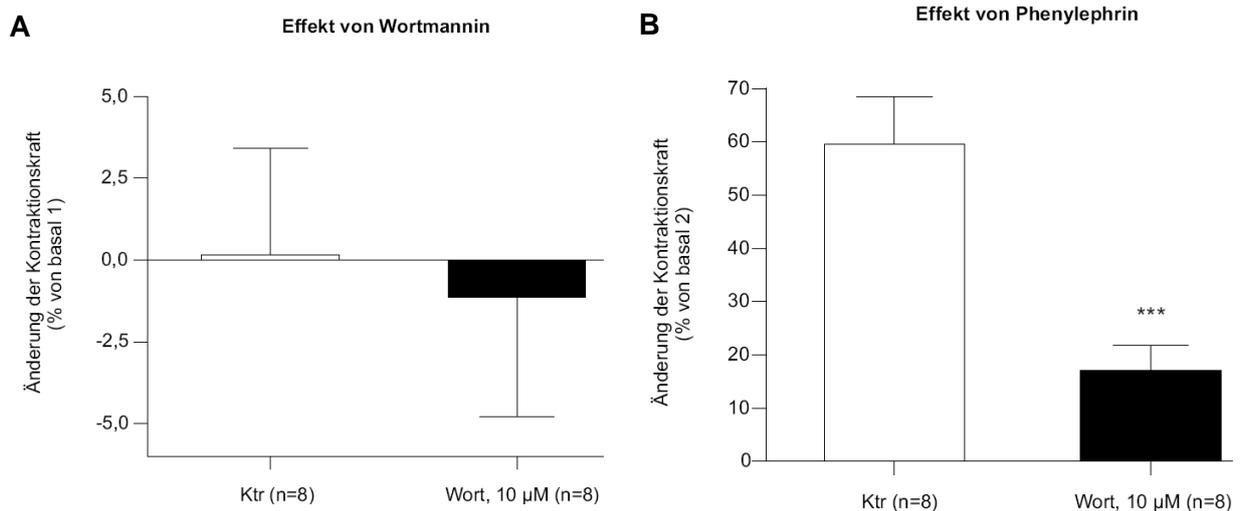


Abbildung 26: Effekt von Wortmannin und einer Bolusgabe Phenylephrin

Basal 1 = Nadolol 0,3 μM , basal 2 = Wortmannin, 10 μM bzw. DMSO. In Abb. 26A ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal 1 nach Intervention, d. h. Wortmannin, 10 μM oder DMSO dargestellt. Die Abb. 26B zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal 2 nach einer einmaligen Gabe von 100 μM Phenylephrin. Ausgangslage absolut: Abb. 26A Ktr 1,14 mN, Wortmannin 1,55 mN bzw. Abb. 26B Ktr 1,13 mN, Wortmannin 1,51 mN.

Wortmannin (10 μM) hatte basal keinen signifikanten Effekt auf die Kontraktionskraft (-1,14% vs. Ktr 0,17%, ns., t-Test). Nach einer Gabe von 100 μM Phenylephrin erreichte die Kontraktionskraft in % von basal 2 in der Wortmannin-behandelten Gruppe 117% vs. 160% in der Kontrollgruppe (***) $p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test).

3.1.2.2 MLCK-Inhibition durch Wortmannin: Effekt von Phenylephrin in Kombination mit Endothelin-1

Es wurde in Gegenwart von 0,3 μM Nadolol der MLCK-Inhibitor Wortmannin (10 μM) bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Nach Erstellung der PE-KWK von 0,3-100 μM wurden eine Einzelkonzentration 100 nM Endothelin-1 (ET-1) sowie anschließend 10 μM Isoprenalin hinzugefügt.

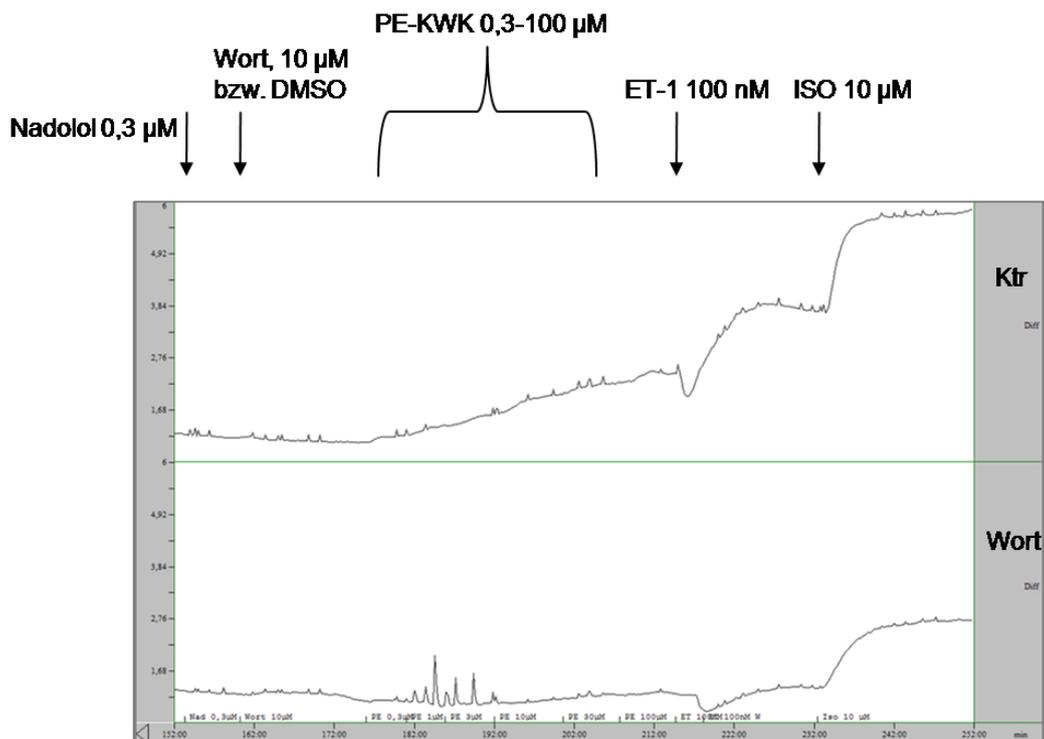


Abbildung 27: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes von linken Vorhöfen der Maus unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin und Stimulation mit Phenylephrin, Endothelin-1 sowie Isoprenalin

Dargestellt ist die Differenz der minimalen und maximalen Kontraktionskraft in mN über den Zeitverlauf (min). Die verschiedenen linken Vorhöfe mit den jeweiligen Interventionen sind in der rechten Spalte gezeigt. Die jeweilige Zugabe von Antagonisten/Agonisten ist mit Pfeilen oberhalb der Aufzeichnung dargestellt.

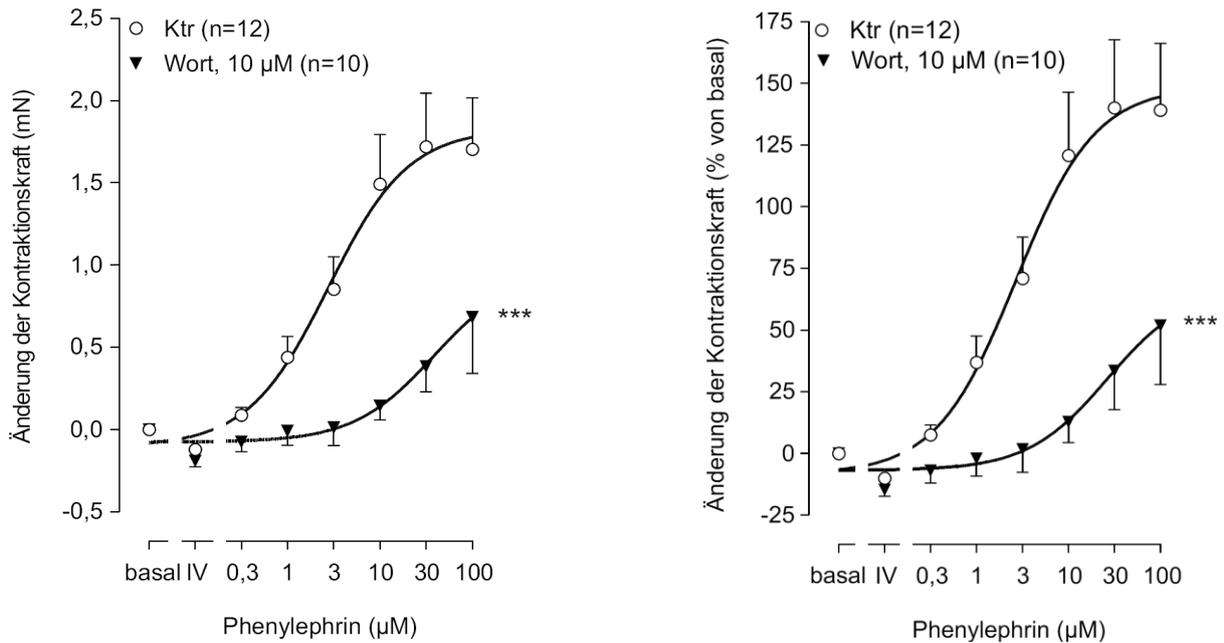


Abbildung 28: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 µM), IV = Intervention (Wortmannin, 10 µM oder DMSO). Es ist die Änderung der Kontraktionskraft im linken Teil der Abbildung und die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal im rechten Teil der Abbildung jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin und in An- bzw. Abwesenheit von 10 µM Wortmannin dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,20 mN, Wortmannin 1,29 mN. *** $p < 0,001$ vs. Ktr, ANOVA

Unter Wortmannin-Einfluss war die PE-KWK um eine Logarithmus (log)-Stufe nach rechts verschoben sowie der maximale Effekt von Phenylephrin deutlich reduziert (134% von basal vs. 242% in der Kontrollgruppe bei 30 µM Phenylephrin, $p < 0,01$ vs. Ktr, t-Test).

Endothelin-1 hatte an den linken Vorhöfen der Maus einen biphasischen Effekt. Zunächst kam es für ca. 1,5 Minuten zu einer Abnahme der Kraft, im Anschluss aber zu einer anhaltenden Zunahme der Kraft um 57,3% (s. Abb. 29).

Ergebnisse

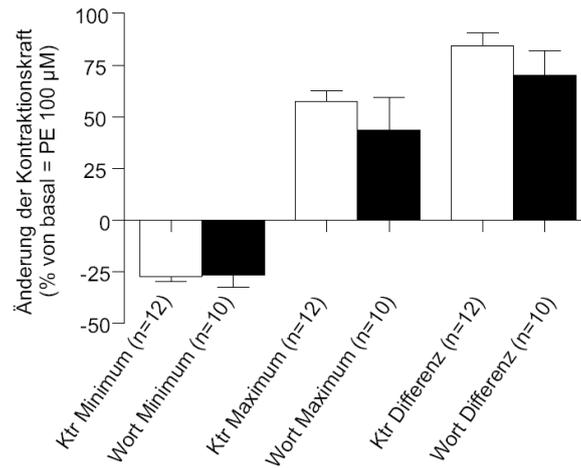


Abbildung 29: Effekt von Endothelin-1 unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin nach PE-KWK

Ktr = Kontrolle, Wort = Wortmannin, 10 µM, PE = Phenylephrin. Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, hier der Endpunkt der PE-KWK mit 100 µM. Es wurde sowohl das Minimum des negativ inotropen Effektes als auch das Maximum des positiv inotropen Effektes der Kontrollgruppe mit der Wortmannin-behandelten Gruppe verglichen. Ebenfalls konnte die Differenz aus dem minimalen und maximalen Effekt von ET-1 gebildet und zum Vergleich herangezogen werden. Ausgangslage absolut: Ktr 2,90 mN, Wortmannin 1,97 mN.

Wortmannin (10 µM) hatte unter diesen Versuchsbedingungen weder auf die inotropen Effekte von Endothelin-1 noch auf die Differenz dieser einen signifikanten Einfluss.

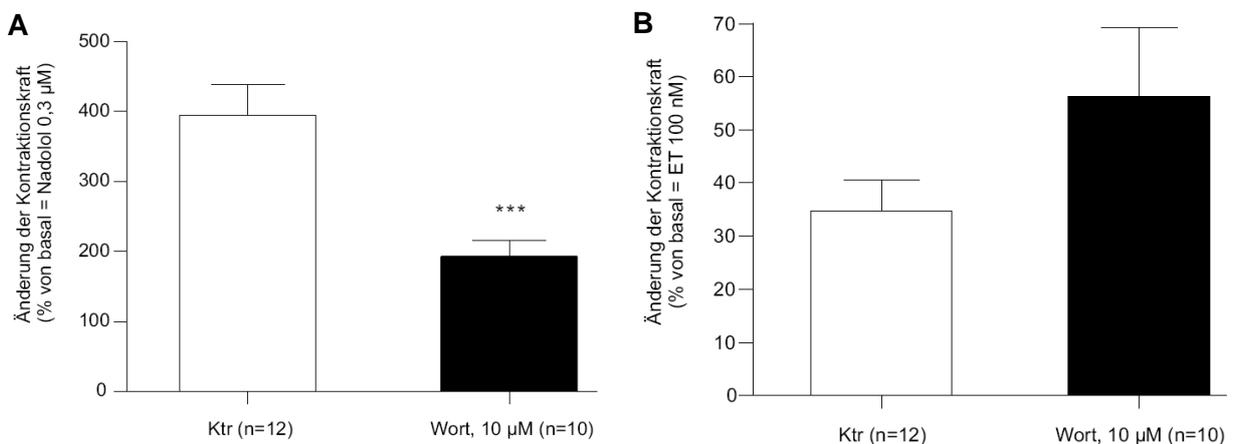


Abbildung 30: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin nach PE-KWK und ET-1-Gabe

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, in Abb. 30A entspricht basal nach Nadolol-Gabe, und in Abb. 30B entspricht basal der maximalen Kontraktionskraft von Endothelin-1. ↴

Ausgangslage absolut: Abb. 30A Ktr 1,20 mN, Wortmannin 1,29 mN bzw. Abb. 30B Ktr 4,60 mN, Wortmannin 2,42 mN.

Die MLCK-Inhibition durch Wortmannin (10 μM) hatte unter diesen Versuchsbedingungen bei der Basiswertsetzung nach Nadolol-Gabe einen signifikanten Einfluss auf die β -adrenerg-vermittelte Kontraktionskraft (Wort 192% vs. Ktr 395%, *** $p < 0,001$, t-Test). Bei Basiswertsetzung nach Abschluss der PE-KWK und ET-1-Gabe konnte hingegen kein signifikanter Einfluss auf die von Isoprenalin vermittelte Kontraktionskraft festgestellt werden (Wort 56,3% vs. Ktr 34,8%, ns., t-Test).

3.1.2.3 MLCK-Inhibition durch Wortmannin: Effekt von Isoprenalin

In Anwesenheit von 0,3 μM Nadolol wurde der MLCK-Inhibitor Wortmannin (10 μM) bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Anschließend wurde eine Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 0,01-10 μM erstellt.

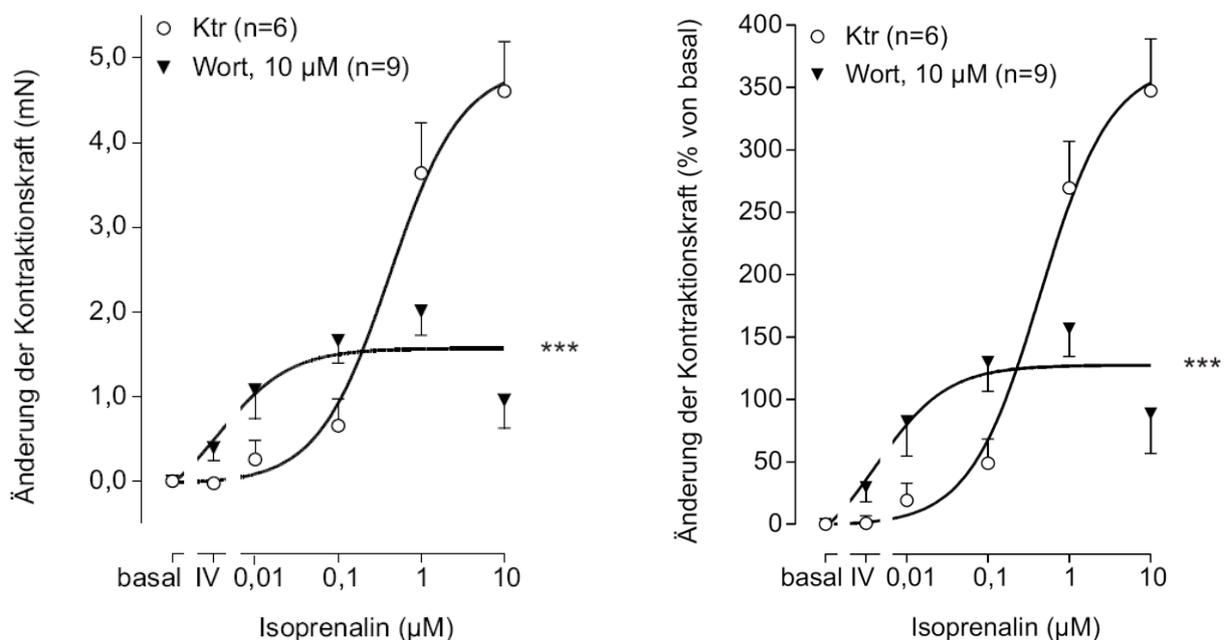


Abbildung 31: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 μM), IV = Intervention (Wortmannin, 10 μM oder DMSO). Im linken Teil der Abbildung ist die Änderung der Kontraktionskraft und im rechten Teil die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Isoprenalin und in ∇

An- bzw. Abwesenheit von 10 μM Wortmannin dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,37 mN, Wortmannin 1,33 mN.

Die MLCK-Inhibition durch Wortmannin (10 μM) hatte unter diesen Versuchsbedingungen auf die Isoprenalin-vermittelte Kontraktionskraftentwicklung einen Einfluss (***) ($p < 0,001$ vs. Ktr, ANOVA). Die Kontraktionskraft in % von basal betrug maximal 257% vs. 447% in der Kontrollgruppe ($p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test). Der maximale Effekt unter Isoprenalin-Stimulation war in der Wortmannin-Gruppe schon bei einer Isoprenalin-Konzentration von 1 μM erreicht, während die Kontrollgruppe ihren Maximaleffekt erst bei 10 μM aufwies.

3.1.2.4 MLCK-Inhibition durch ML-7: Effekt von Phenylephrin

In Gegenwart von 0,3 μM Nadolol wurde der MLCK-Inhibitor ML-7 (10 μM) bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Anschließend wurde eine PE-KWK von 0,3-100 μM erstellt sowie abschließend nach Bolusgabe von Isoprenalin eine Konzentration von 10 μM eingestellt.

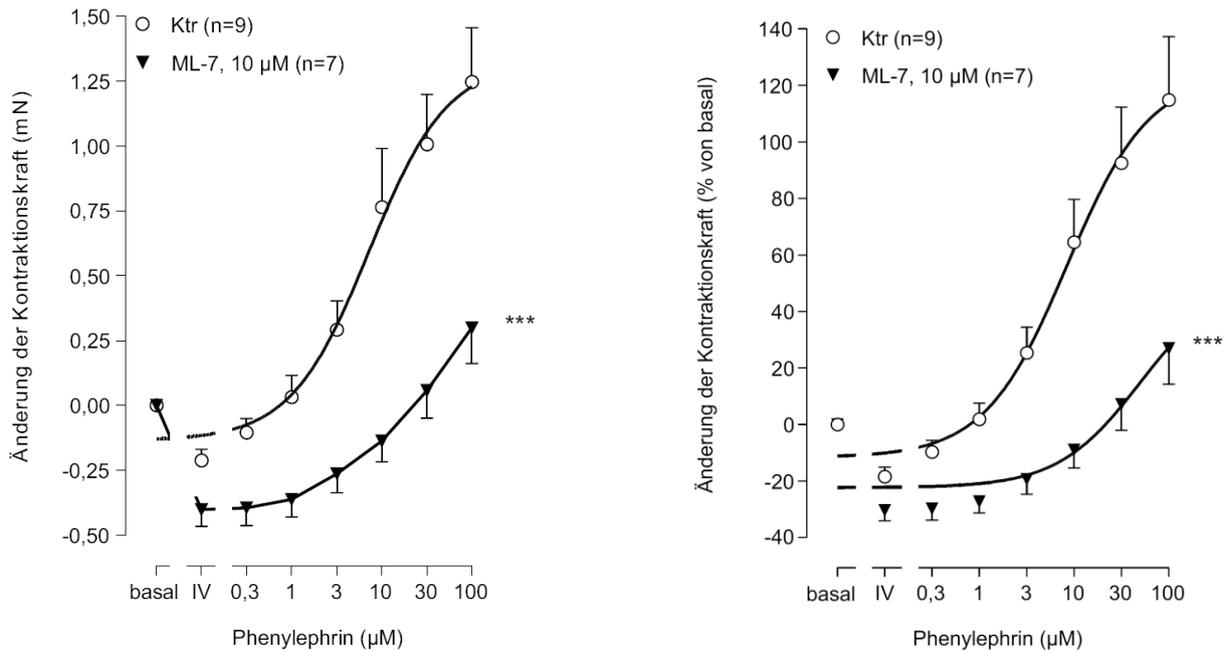


Abbildung 32: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit ML-7

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 μM), IV = Intervention (ML-7, 10 μM oder DMSO). Im linken Teil der Abbildung ist die Änderung der Kontraktionskraft und im rechten Teil die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin und in An- bzw. Abwesenheit von 10 μM ML-7 dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,30 mN, ML-7 1,34 mN. *** $p < 0,001$ vs. Ktr, ANOVA

Eine Inhibition der MLCK mit ML-7 (10 μM) führte zu einer Verschiebung der PE-KWK um eine log-Stufe nach rechts. Weiterhin war der maximale Effekt von Phenylephrin deutlich abgeschwächt (127% von basal vs. 215% in der Kontrollgruppe bei 100 μM Phenylephrin, $p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test).

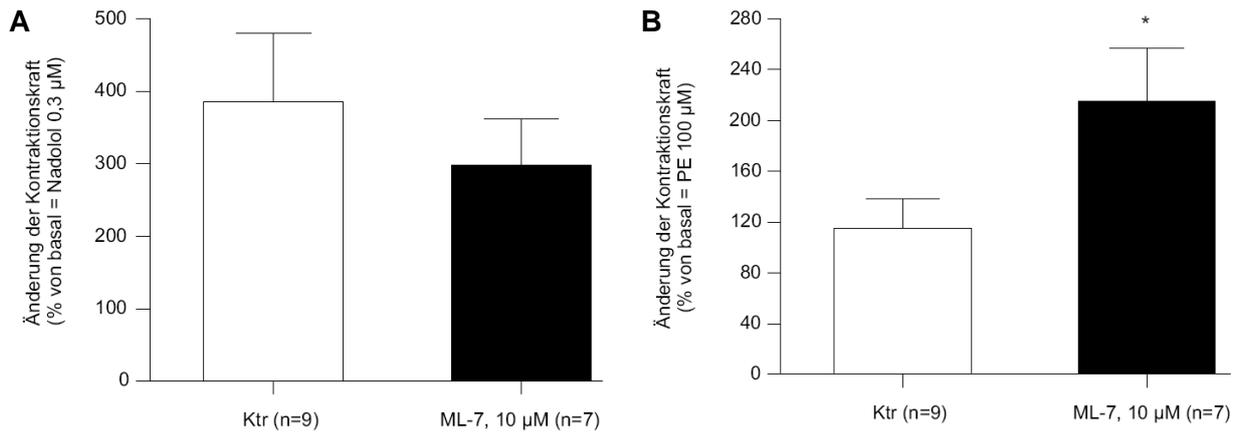


Abbildung 33: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach PE-KWK

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, in Abb. 33A entspricht basal nach Nadolol-Gabe, und in Abb. 33B entspricht basal der maximalen Kontraktionskraft von 100 µM Phenylephrin. Ausgangslage absolut: Abb. 33A Ktr 1,30 mN, ML-7 1,34 mN bzw. Abb. 33B Ktr 2,54 mN, ML-7 1,64 mN.

Bei Basiswertsetzung nach Nadolol-Gabe unterschied sich der Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 (10 µM) zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant voneinander (ML-7 299% vs. Ktr 386%, ns. vs. Ktr, t-Test). Bei der Berechnung mit dem zweiten Basiswert (Phenylephrin 100 µM) hatte der MLCK-Inhibitor ML-7 (10 µM) unter diesen Versuchsbedingungen einen signifikanten Einfluss auf die von Isoprenalin vermittelte Kontraktionskraft (ML-7 215% vs. Ktr 115%, * p < 0,05 vs. Ktr, t-Test).

3.1.2.5 MLCK-Inhibition durch ML-7: Effekt von Phenylephrin in Kombination mit Endothelin-1

Es wurde in Gegenwart von 0,3 μM Nadolol der MLCK-Inhibitor ML-7 bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Nach Erstellung der PE-KWK von 0,3-100 μM wurden 100 nM Endothelin-1 als Einzelkonzentration sowie anschließend nach Bolusgabe von Isoprenalin eine Konzentration von 10 μM eingestellt.

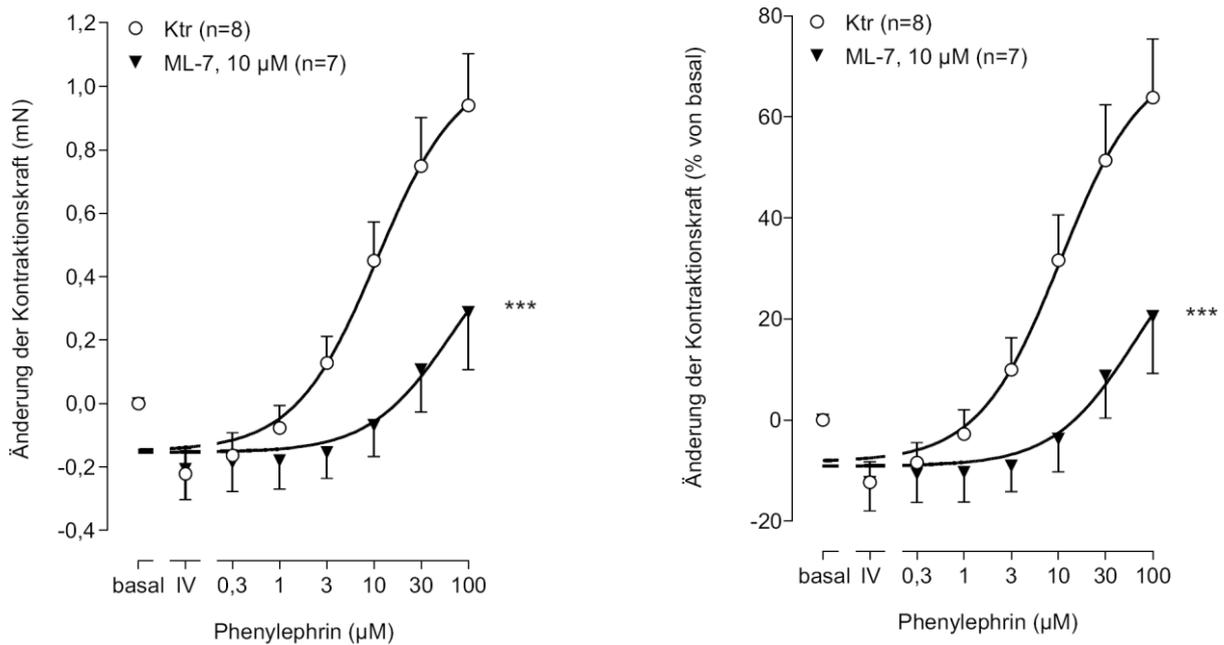


Abbildung 34: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit ML-7

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 μM), IV = Intervention (ML-7, 10 μM oder DMSO). Es ist die Änderung der Kontraktionskraft im linken Teil der Abbildung und die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal im rechten Teil der Abbildung jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin und in An- bzw. Abwesenheit von 10 μM ML-7 dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,54 mN, ML-7 1,40 mN. *** $p < 0,001$ vs. Ktr, ANOVA

Durch den MLCK-Inhibitor ML-7 (10 μM) wurde sowohl die PE-KWK um eine log-Stufe nach rechts verschoben als auch der maximale Effekt von Phenylephrin deutlich abgeschwächt (120% von basal vs. 164% in der Kontrollgruppe bei 100 μM Phenylephrin, $p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test).

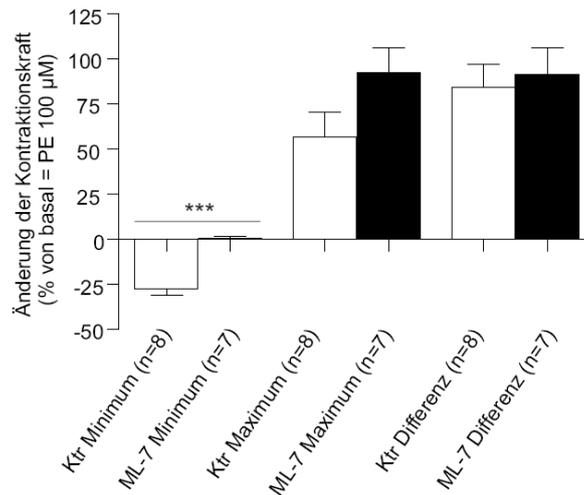


Abbildung 35: Effekt von Endothelin-1 unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach PE-KWK

Ktr = Kontrolle, ML-7 = ML-7, 10 µM, PE = Phenylephrin. Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, hier der Endpunkt der PE-KWK mit 100 µM. Es wurde sowohl das Minimum des negativ inotropen Effektes als auch das Maximum des positiv inotropen Effektes der Kontrollgruppe mit der ML-7-behandelten Gruppe verglichen. Ebenfalls konnte die Differenz aus dem minimalen und maximalen Effekt von Endothelin-1 gebildet und zum Vergleich herangezogen werden. Ausgangslage absolut: Ktr 2,48 mN, ML-7 1,69 mN.

Endothelin-1 führte nach Abschluss der PE-KWK noch zu einem weiteren positiv inotropen Effekt (ML-7 92,2% vs. Ktr 56,6%), der sich aber zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant unterschied (ML-7 vs. Ktr, ns., t-Test). Der initial negativ inotrope Effekt von Endothelin-1 war in der mit ML-7-behandelten Gruppe deutlich reduziert (0,77% vs. -27,7% in der Kontrollgruppe, *** $p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test). Die Differenzen zwischen minimalem und maximalem inotropen Effekt unterschieden sich nicht signifikant voneinander (ML-7 91,4% vs. Ktr 84,3%, ns., t-Test).

Ergebnisse

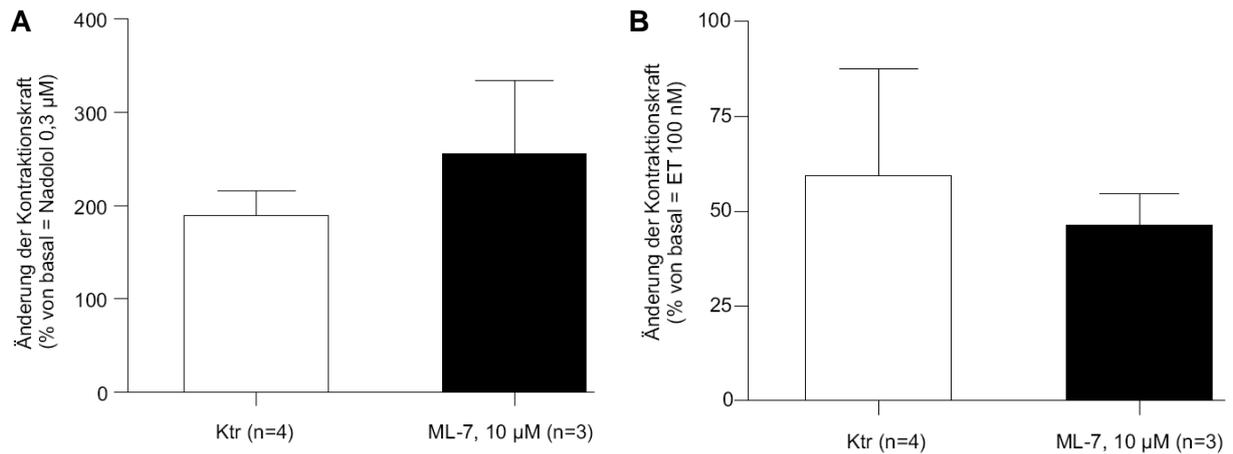


Abbildung 36: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach PE-KWK und ET-1-Gabe

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, hier die maximale Kontraktionskraft nach Gabe von 0,3 µM Nadolol (Abb. 36A) bzw. 100 nM Endothelin-1 (Abb. 36B). Ausgangslage absolut: Abb. 36A Ktr 1,54 mN, ML-7 1,40 mN bzw. Abb. 36B Ktr 3,78 mN, ML-7 3,25 mN.

Der MLCK-Inhibitor ML-7 (10 µM) hatte unter diesen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die von Isoprenalin vermittelte Kontraktionskraft (ML-7 256% vs. Ktr 189% bzw. ML-7 46,4% vs. Ktr 59,4%, ns., t-Test).

3.1.2.6 MLCK-Inhibition durch ML-7: Effekt von Endothelin-1

Des Weiteren wurden die Experimente mit dem MLCK-Inhibitor auch in umgekehrte Abfolge durchgeführt, d. h. zunächst wurde in Anwesenheit von 0,3 μM Nadolol der MLCK-Inhibitor ML-7 (10 μM) bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Nach Erstellung der Endothelin-1-Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 0,3-100 nM wurden 100 μM Phenylephrin als Einzelkonzentration sowie anschließend 10 μM Isoprenalin hinzugefügt.

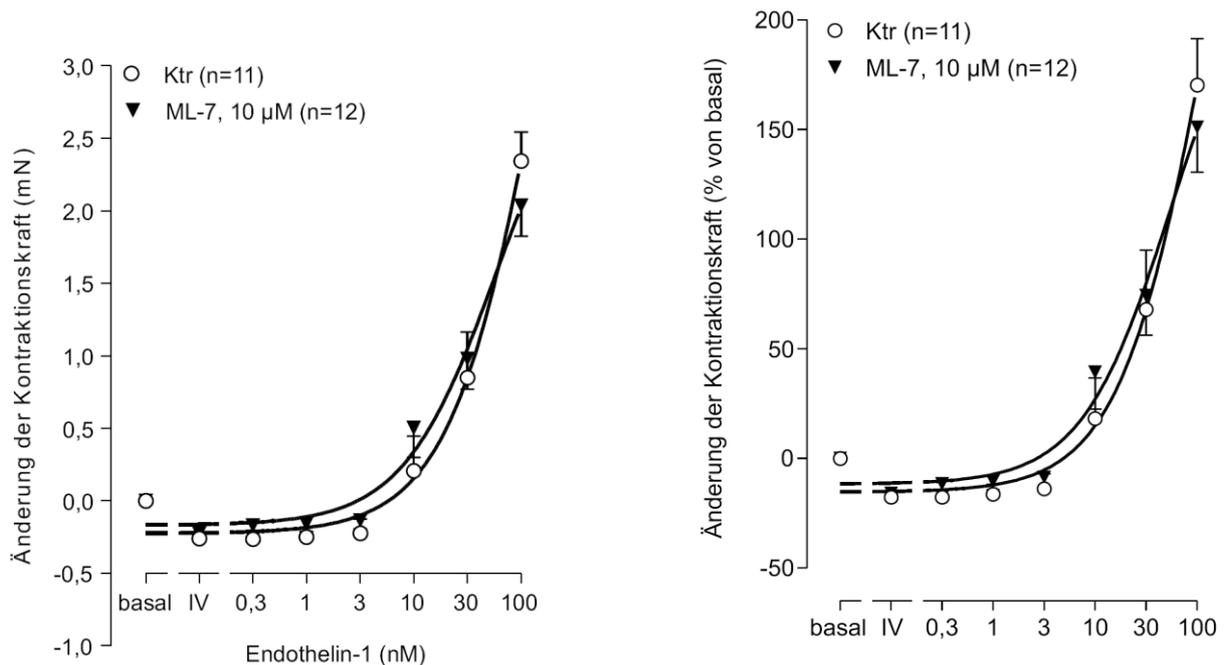


Abbildung 37: Effekt von Endothelin-1 unter MLCK-Inhibition mit ML-7

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 μM), IV = Intervention (ML-7, 10 μM oder DMSO). Es ist die Änderung der Kontraktionskraft im linken Teil der Abbildung und die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal im rechten Teil der Abbildung jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Endothelin-1 und in An- bzw. Abwesenheit von 10 μM ML-7 dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,48 mN, ML-7 1,47 mN. Die Kurven unterschieden sich jeweils nicht signifikant voneinander (ns. vs. Ktr, ANOVA).

Die MLCK-Inhibition durch ML-7 (10 μM) beeinflusste weder den Kurvenverlauf noch den Maximaleffekt von Endothelin-1.

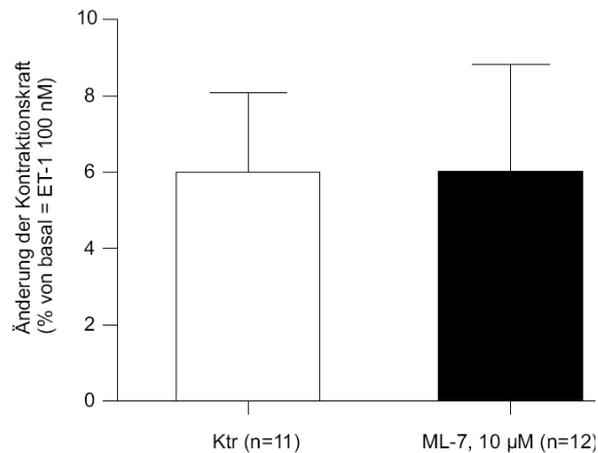


Abbildung 38: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach ET-1-KWK

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, hier der Endpunkt der ET-1-KWK. Ausgangslage absolut: Ktr 3,82 mN, ML-7 3,50 mN.

Phenylephrin führte nach Abschluss der Endothelin-1-Konzentrations-Wirkungs-Kurve nur noch zu einem geringen zusätzlichen positiv inotropen Effekt (jeweils 6,0%), der sich zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant voneinander unterschied (ns. vs. Ktr, t-Test).

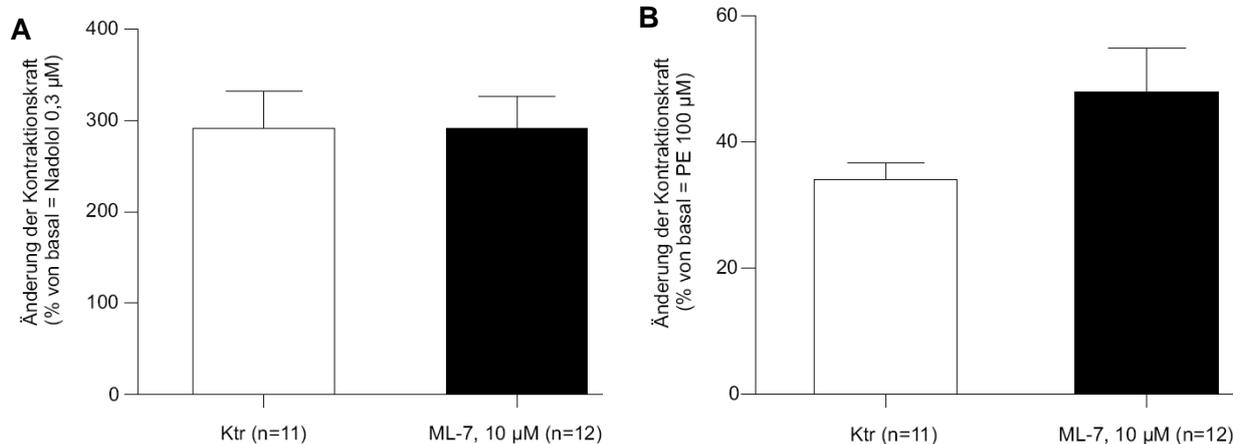


Abbildung 39: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach ET-1-KWK und PE-Gabe

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, hier die maximale Kontraktionskraft nach Gabe von 0,3 µM Nadolol (Abb. 39A) bzw. 100 µM Phenylephrin (Abb. 39B). Ausgangslage absolut: Abb. 39A Ktr 1,48 mN, ML-7 1,47 mN bzw. Abb. 39B Ktr 4,07 mN, ML-7 3,69 mN.

Der MLCK-Inhibitor ML-7 (10 μM) hatte unter diesen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die von Isoprenalin vermittelte Kontraktionskraft (ML-7 291% vs. Ktr 291% bzw. ML-7 48,0% vs. Ktr 34,0%, ns., t-Test).

3.1.2.7 MLCK-Inhibition durch ML-7: Effekt von Isoprenalin

In Gegenwart von 0,3 μM Nadolol wurde der MLCK-Inhibitor ML-7 bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Anschließend wurde eine Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 0,01-10 μM erstellt.

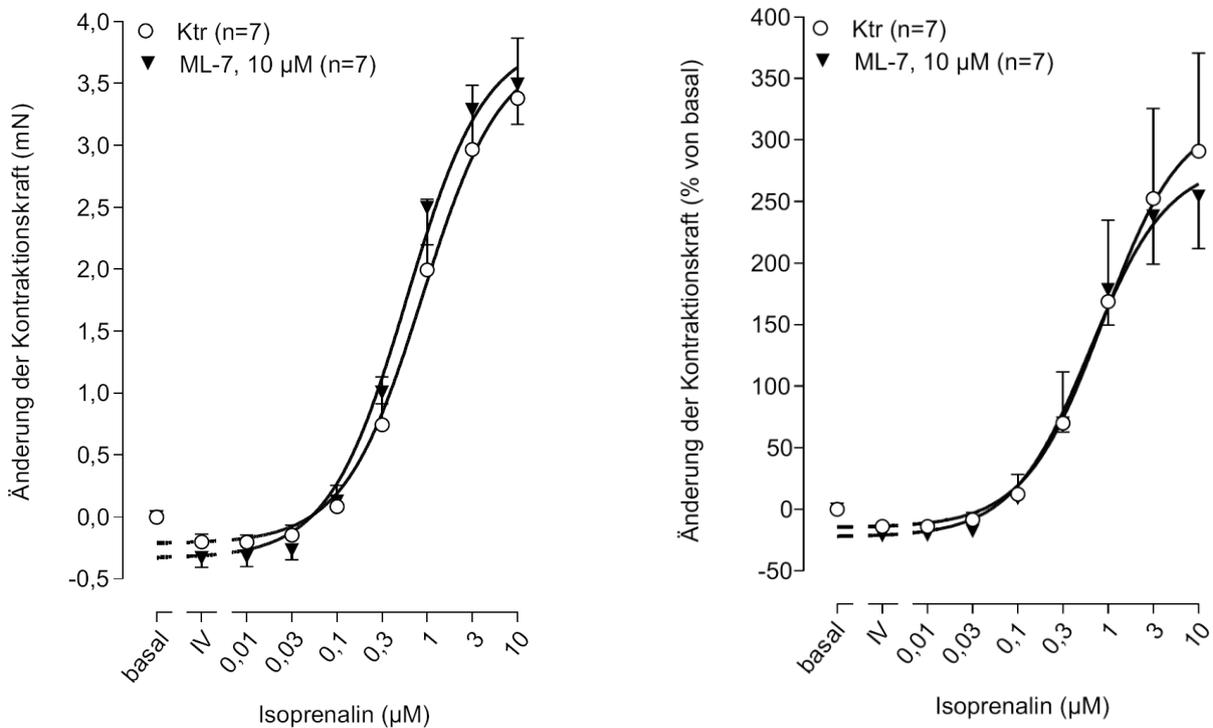


Abbildung 40: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 μM), IV = Intervention (ML-7, 10 μM oder DMSO). Es ist die Änderung der Kontraktionskraft im linken Teil der Abbildung und die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal im rechten Teil der Abbildung jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Isoprenalin und in An- bzw. Abwesenheit von 10 μM ML-7 dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,57 mN, ML-7 1,49 mN. Die Kurven unterschieden sich jeweils nicht signifikant voneinander (ns. vs. Ktr, ANOVA).

Durch MLCK-Inhibition mit 10 μM ML-7 wurde weder der Kurvenverlauf noch der Maximaleffekt von Isoprenalin beeinflusst.

3.1.2.8 MLCK-Inhibition durch ML-9: Effekt von Phenylephrin in Kombination mit Isoprenalin

Es wurde in Anwesenheit von 0,3 μM Nadolol der MLCK-Inhibitor ML-9 (50 μM) zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Nach Hinzugabe einer Einmalkonzentration von Phenylephrin (100 μM) wurde nach Erreichen der maximalen Kraft unter Phenylephrin anschließend nach Bolusgabe von Isoprenalin eine Konzentration von 10 μM in den Organbädern eingestellt.

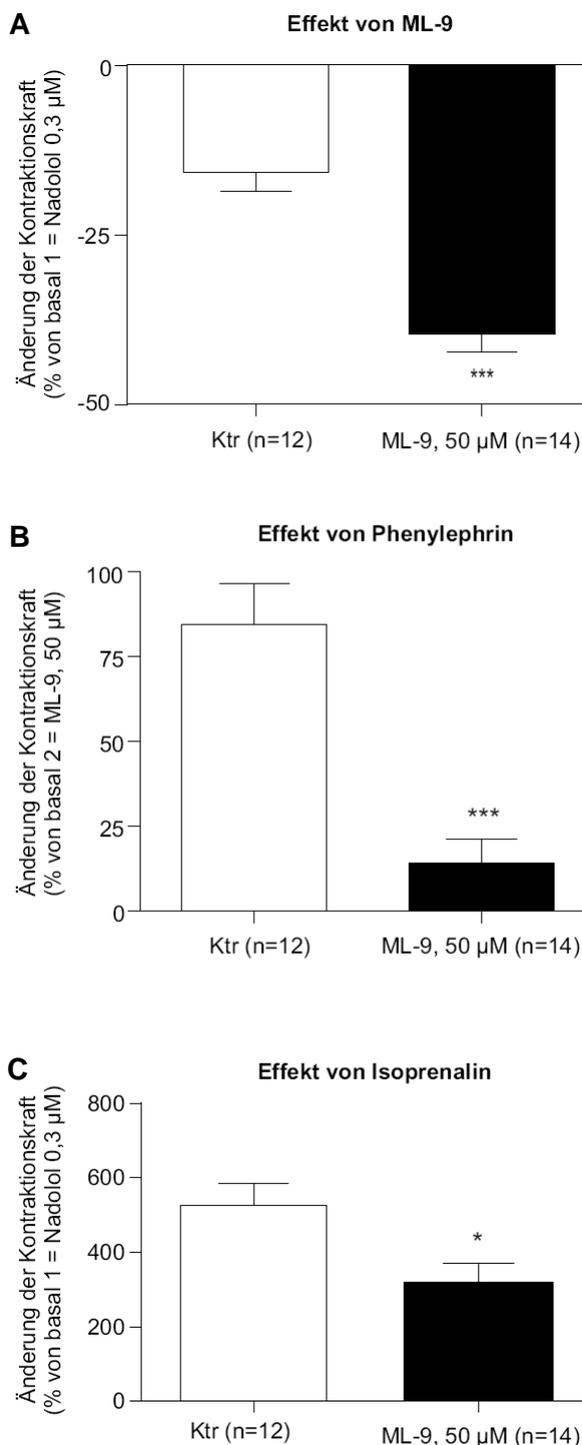


Abbildung 41: Einfluss der MLCK-Inhibition durch ML-9 im linken Vorhof der Maus

Basal 1 = Nadolol 0,3 μM , basal 2 = ML-9, 50 μM . In Abb. 41A ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal 1 nach Interventionszufuhr, d. h. ML-9, 50 μM , dargestellt. Die Abb. 41B zeigt die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal 2 nach einer einmaligen Gabe von Phenylephrin 100 μM . In Abb. 41C ist die Kontraktionskraft in % von basal 1 nach Hinzugabe von 10 μM Isoprenalin dargestellt. Ausgangslage absolut: basal 1 Ktr 0,76 mN, basal 1 ML-9 0,89 mN, basal 2 Ktr 0,65 mN, basal 2 ML-9 0,53 mN.

Der MLCK-Inhibitor ML-9 (50 μM) führte zu einer Kontraktionskraftabnahme um 39,7% vs. 15,8% in der Kontrollgruppe (** $p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test). Die Gabe von 100 μM Phenylephrin vermittelte einen abgeschwächten positiv inotropen Effekt (ML-9 14,1% vs. Ktr 84,3%, ** $p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test). Auch auf den von Isoprenalin vermittelten Effekt hatte ML-9 einen Einfluss (ML-9 320% vs. Ktr 527%, * $p < 0,05$ vs. Ktr, t-Test).

3.1.3 Kontraktionsexperimente der Maus: Die IP_3 -vermittelte Calciumfreisetzung

In Gegenwart von 0,3 μM Nadolol wurde der IP_3 -Rezeptorblocker 2-APB bzw. das Lösungsmittel DMSO zu den linken Vorhöfen der Maus in die Organbäder gegeben. Nach Erstellung der Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve von 0,3-100 μM wurde anschließend 10 μM Isoprenalin hinzugefügt. Diese Experimente wurden mit zwei verschiedenen 2-APB-Konzentrationen durchgeführt, 2 und 20 μM .

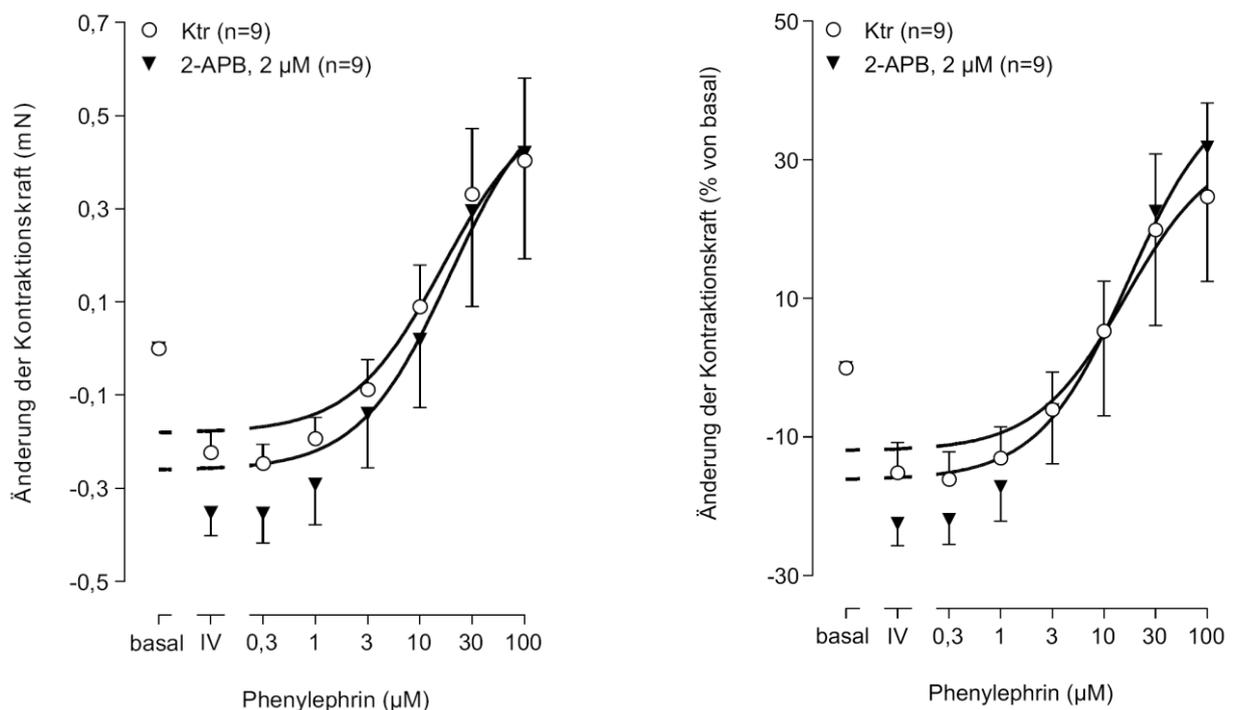


Abbildung 42: Effekt von Phenylephrin unter IP_3 -Rezeptorblockade mit 2-APB, 2 μM

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 μM), IV = Intervention (2-APB, 2 μM oder DMSO). Es ist die Änderung der Kontraktionskraft im linken Teil der Abbildung und die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal im rechten Teil der Abbildung jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin und in An- bzw. Abwesenheit von 2 μM 2-APB dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,73 mN, 2-APB 1,70 mN. Die Kurven unterschieden sich in beiden Fällen nicht signifikant voneinander (ns. vs. Ktr, ANOVA).

Durch eine Blockade des IP₃-Rezeptors mit 2-APB (2 μM) konnte unter diesen Versuchsbedingungen kein Einfluss auf die von Phenylephrin vermittelte Kontraktionskraft nachgewiesen werden.

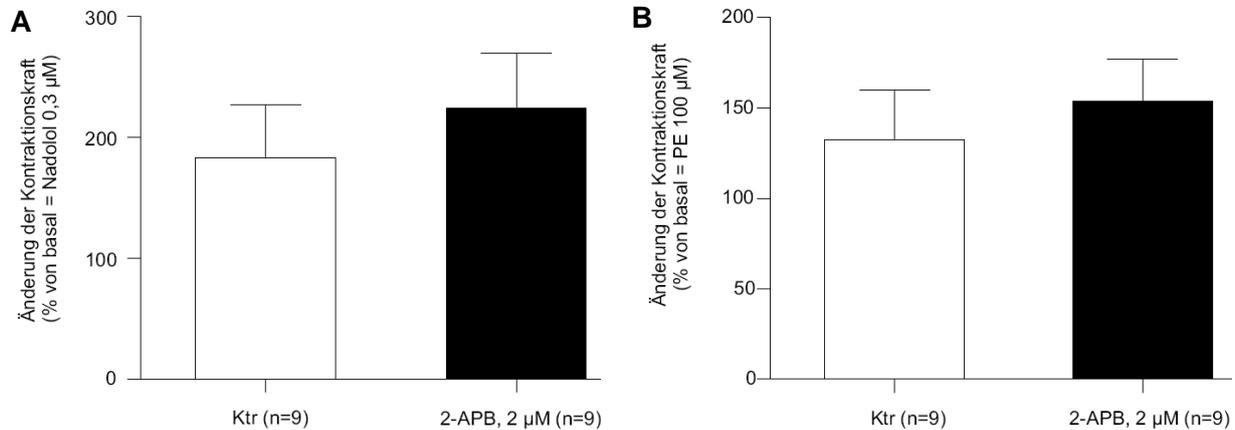


Abbildung 43: Effekt von Isoprenalin unter IP₃-Rezeptorblockade mit 2-APB, 2 μM nach PE-KWK

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, hier die maximale Kontraktionskraft nach Gabe von 0,3 μM Nadolol (Abb. 43A) bzw. 100 μM Phenylephrin (Abb. 43B). Ausgangslage absolut: Abb. 43A Ktr 1,73 mN, 2-APB 1,70 mN bzw. Abb. 43B Ktr 2,13 mN, 2-APB 2,12 mN.

Die IP₃-Rezeptorblockade mittels 2-APB (2 μM) hatte unter diesen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die von Isoprenalin vermittelte Kontraktionskraft (2-APB 224% vs. Ktr 183% bzw. 2-APB 154% vs. Ktr 132%, ns. vs. Ktr, t-Test).

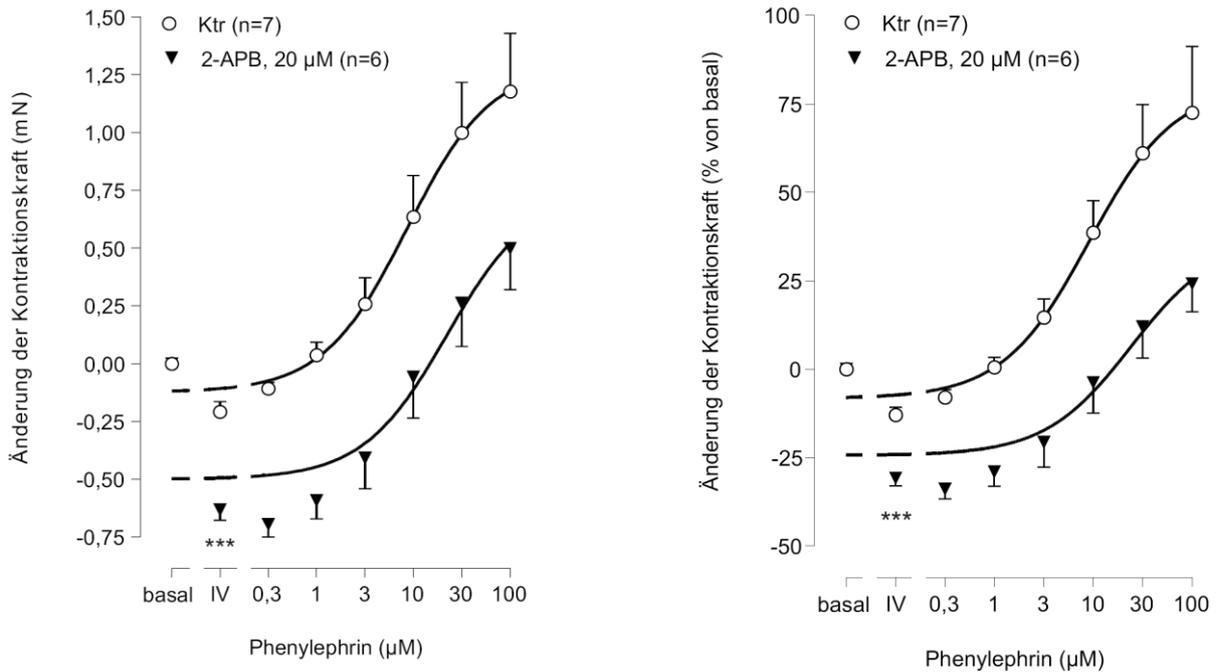


Abbildung 44: Effekt von Phenylephrin unter IP₃-Rezeptorblockade mit 2-APB, 20 µM

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 µM), IV = Intervention (2-APB, 20 µM oder DMSO). Es ist die Änderung der Kontraktionskraft im linken Teil der Abbildung und die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal im rechten Teil der Abbildung jeweilig unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin und in An- bzw. Abwesenheit von 20 µM 2-APB dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 1,75 mN, 2-APB 2,10 mN.

Die Kurven verliefen parallel und unterschieden sich in beiden Fällen nicht signifikant voneinander (ns. vs. Ktr, ANOVA). Es kam jedoch initial zu einer signifikanten Reduktion der Kontraktionskraft durch 20 µM 2-APB (2-APB 69,2% vs. Ktr 87,1% von basal, *** $p < 0,001$ vs. Ktr, t-Test).

Ergebnisse

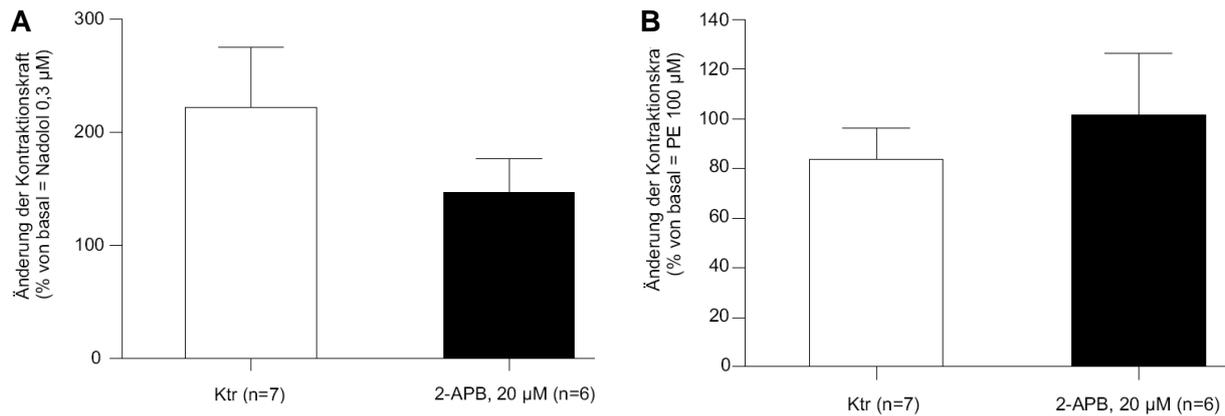


Abbildung 45: Effekt von Isoprenalin unter IP₃-Rezeptorblockade mit 2-APB, 20 µM nach PE-KWK

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, hier die maximale Kontraktionskraft nach Gabe von 0,3 µM Nadolol (Abb. 45A) bzw. 100 µM Phenylephrin (Abb. 45B). Ausgangslage absolut: Abb. 45A Ktr 1,75 mN, 2-APB 2,10 mN bzw. Abb. 45B Ktr 2,93 mN, 2-APB 2,60 mN.

Die IP₃-Rezeptorblockade mittels 2-APB (20 µM) hatte unter diesen Versuchsbedingungen keinen signifikanten Einfluss auf die von Isoprenalin vermittelte Kontraktionskraft (2-APB 147% vs. Ktr 222% bzw. 2-APB 101% vs. Ktr 83,7%, ns. vs. Ktr, t-Test).

3.1.4 MLCK-Expression

Die Untersuchung der Expression der MLCK und ihrer Isoformen wurde sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Protein-Ebene durchgeführt. Vorwiegend diente hier das Tiermodell der Maus zur Charakterisierung der MLCK-Expression, da die MLCK-Isoform identifiziert werden sollte, die an den Ergebnissen der Kontraktionsexperimente eine tragende Rolle übernimmt.

3.1.4.1 MLCK-Isoformen der Maus: mRNA-Ebene

Aus verschiedenen Gewebeproben der Maus wurde die RNA isoliert und nach Umschreibung in cDNA entweder eine nicht-quantitative RT-PCR oder eine quantitative RT-PCR zur Messung der verschiedenen MLC2- und MLCK-Isoformen durchgeführt.

3.1.4.1.1 RNA-Qualität

Die isolierten RNA-Proben wurden nach Denaturierung auf einem RNA-Agarosegel auf ihre Reinheit überprüft, und nur eindeutig qualitativ gute RNA-Proben wurden für die weiteren Untersuchungen miteinbezogen. Zur Beurteilung der Qualität diente neben dem RNA-Agarosegel auch die fotometrisch gemessene Ratio aus A260:A280 (s. 2.9.1.1).

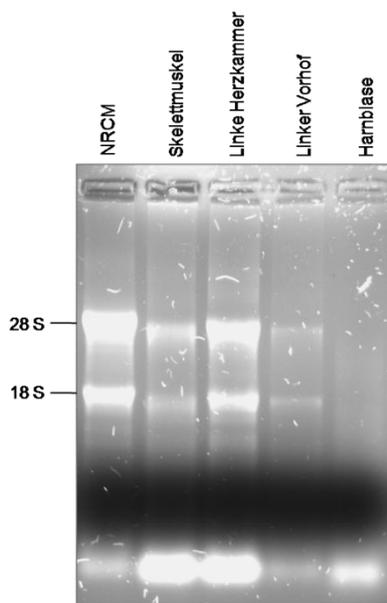


Abbildung 46: RNA-Agarosegel von verschiedenen Maus- sowie NRCM-RNA-Proben

Dieses ist ein beispielhaftes RNA-Agarosegel für die vorliegende Arbeit. Für die Proben NRCM, Skelettmuskel und linke Herzkammer wurden je 3 µg RNA aufgetragen, für die Probe linker Vorhof 0,42 µg und für die Harnblase 0,62 µg. Trotz der geringen RNA-Einsatzmenge wurde die Harnblasenprobe als qualitativ schlecht beurteilt und daher nicht weiterverwendet. Für die anderen Proben konnte jeweils die 18 und 28 S-Untereinheit nachgewiesen werden.

Etwa 5% der aufbereiteten RNA-Proben wurden von der weiteren Verwendung nach einer RNA-Agarosegel-Analyse ausgeschlossen.

3.1.4.1.2 Ergebnisse mittels nicht-quantitativer RT-PCR

Zur Normierung der Beladung der Agarosegele bzw. der eingesetzten cDNA-Menge wurde das „Housekeeping gene“ GAPDH amplifiziert. Weiterhin wurden mittels nicht-quantitativer RT-PCR (32 Zyklen) die Gene smMLCK 130 kDa, smMLCK 220 kDa, skMLCK, MLC2a, MLC2v und MLC2sk jeweils in RNA-Proben aus Harnblase, linker Vorhof, linke Herzkammer und Skelettmuskel untersucht.

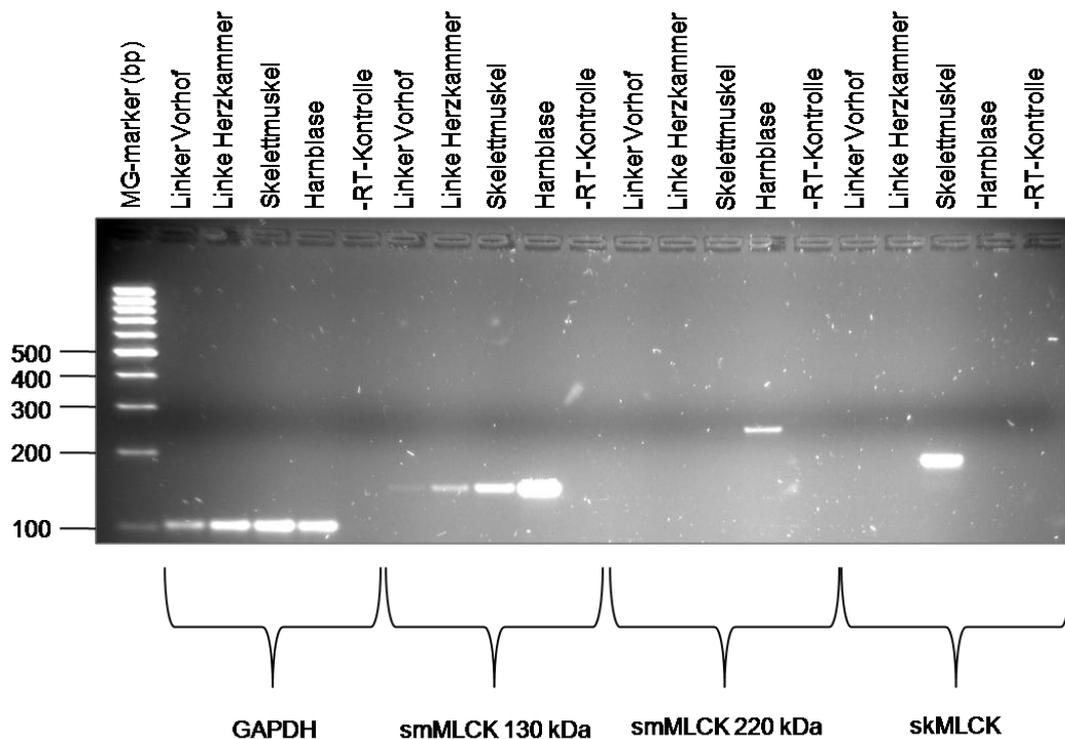


Abbildung 47: 3%iges Agarosegel mit RT-PCR Produkten der MLCK-Isoformen

MG-Marker: 100bp DNA Ladder *GeneRuler*TM. Es sind jeweils für die Gewebe linker Vorhof, linke Herzkammer, Harnblase und Skelettmuskel die Amplifikationsprodukte der Gene GAPDH, smMLCK 130 kDa, smMLCK 220 kDa und skMLCK dargestellt.

Das „Housekeeping gene“ GAPDH (101 bp) diente zur Abschätzung der gleichmäßigen Beladung. In allen Geweben konnte die smMLCK 130 kDa (147 bp) detektiert werden, die größte Menge fand sich in der Harnblase, gefolgt vom Skelettmuskel, linker Herzkammer und linkem Vorhof. Die smMLCK 220 kDa (250 bp) konnte nur in der Harnblase nachgewiesen werden. Auch die skMLCK (184 bp) zeigte eine Gewebespezifität exklusiv für den Skelettmuskel. Als Negativkontrolle wurde je Gen eine -RT-Kontrolle mitgeführt. Diese

enthielt eine gepoolte cDNA aus den verwendeten RNA-Proben, welche jedoch ohne das Enzym *SuperScript™ II RT* umgeschrieben wurde.

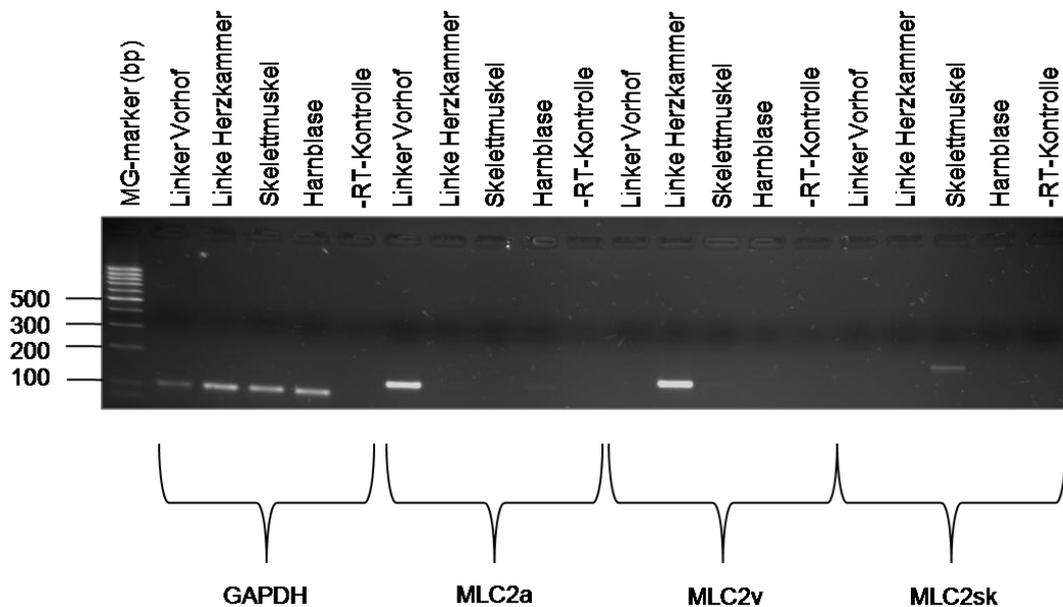


Abbildung 48: 3%iges Agarosegel mit RT-PCR Produkten der MLC2-Isoformen

MG-marker: 100bp DNA Ladder *GeneRuler™*. Gezeigt sind die Amplifikationsprodukte der Gene MLC2a, MLC2v und MLC2sk, jeweilig für die Gewebe linker Vorhof, linke Herzkammer, Harnblase und Skelettmuskel.

Ebenfalls zur Abschätzung der gleichmäßigen Beladung wurde GAPDH (101 bp) als „*Housekeeping gene*“ amplifiziert. Die MLC2a (124 bp) konnte nur im linken Vorhof, die MLC2v (136 bp) ausschließlich in der linken Herzkammer und die MLC2sk (193 bp) nur im Skelettmuskel nachgewiesen werden. Eine -RT-Kontrolle wurde als Negativkontrolle für jedes Gen mitgeführt (vgl. Abb. 47).

3.1.4.1.3 Ergebnisse mittels quantitativer RT-PCR

Zur Quantifizierung der MLCK-mRNA-Menge wurden die Isoformen smMLCK 220 kDa, smMLCK 130 kDa und skMLCK mittels TaqMan[®]-Sonden untersucht.

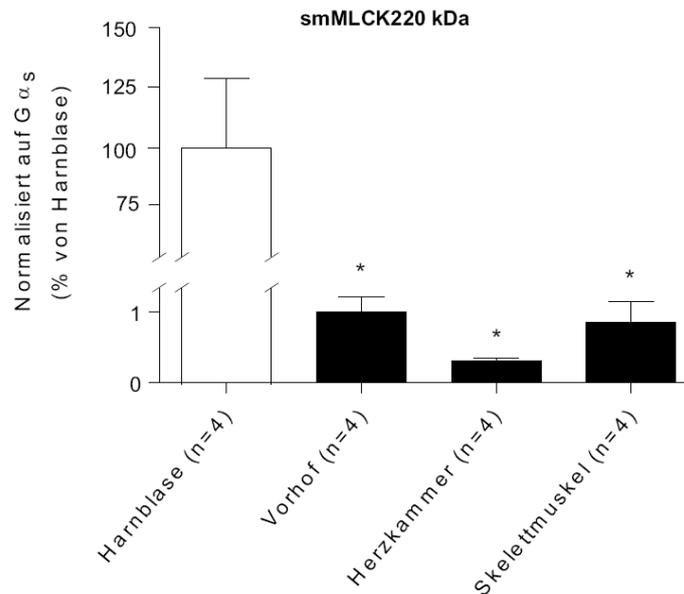


Abbildung 49: smMLCK 220 kDa-mRNA-Menge von verschiedenen Geweben der Maus

Dargestellt ist die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene smMLCK 220 kDa-mRNA-Menge aus verschiedenen Geweben der Maus, normalisiert auf das „Housekeeping gene“ Gα_s. Zur Normalisierung wurde die Harnblase gleich 100% gesetzt, da hier die Konzentration der smMLCK 220 kDa mRNA von den untersuchten Gewebearten erwartungsgemäß am höchsten war (vgl. 1.4). Mittelwerte der ct-Werte: Gα_s (1:8 Verdünnung) Harnblase 26,25, Vorhof 25,84, Herzkammer 25,58, Skelettmuskel 25,95 bzw. smMLCK 220 kDa Harnblase 26,06, Vorhof 31,82, Herzkammer 33,18, Skelettmuskel 33,26.

Im Vorhof konnte die smMLCK 220 kDa mit 0,99% detektiert werden, in der Herzkammer wurde die smMLCK 220 kDa mit 0,31% nachgewiesen, und im Skelettmuskel zeigte sich eine smMLCK 220 kDa-Expression von 0,85%. Alle Ergebnisse waren signifikant gegenüber der Harnblase (* p<0,05 vs. Harnblase, t-Test).

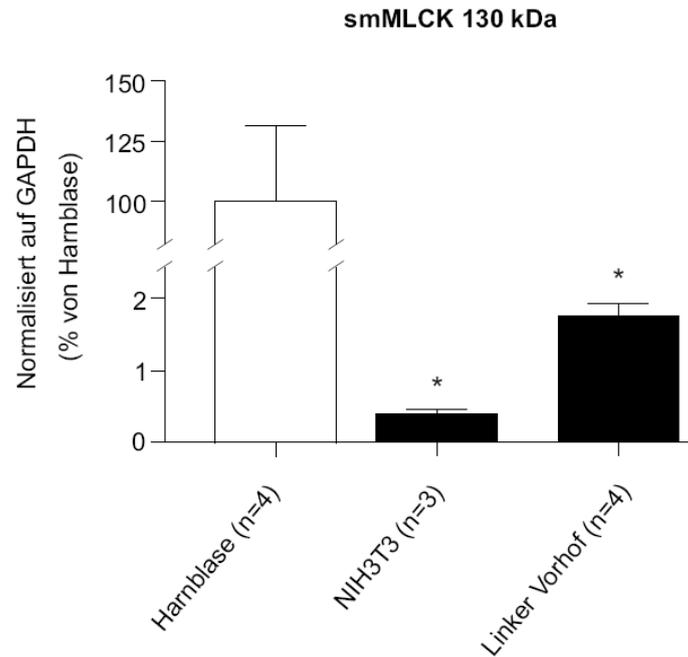


Abbildung 50: smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge von verschiedenen Geweben der Maus und NIH3T3-Zellen

Dargestellt ist die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge aus verschiedenen Geweben der Maus und NIH3T3-Zellen, normalisiert auf das „*Housekeeping gene*“ GAPDH. Zur Normalisierung wurde Harnblase gleich 100% gesetzt, da hier die Konzentration der smMLCK 130 kDa mRNA von den untersuchten Gewebearten erwartungsgemäß am höchsten war (vgl. Abb. 49). Mittelwerte der ct-Werte: GAPDH (1:8 Verdünnung) Harnblase 23,32, NIH3T3 22,28, Vorhof 25,23 bzw. smMLCK 130 kDa Harnblase 24,64, NIH3T3 31,13, Vorhof 31,71.

Normalisiert auf die Harnblase, konnten im linken Vorhof 1,76% (* $p < 0,05$ vs. Harnblase, t-Test) und in NIH3T3-Zellen 0,41% (* $p < 0,05$ vs. Harnblase, t-Test) der smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge nachgewiesen werden.

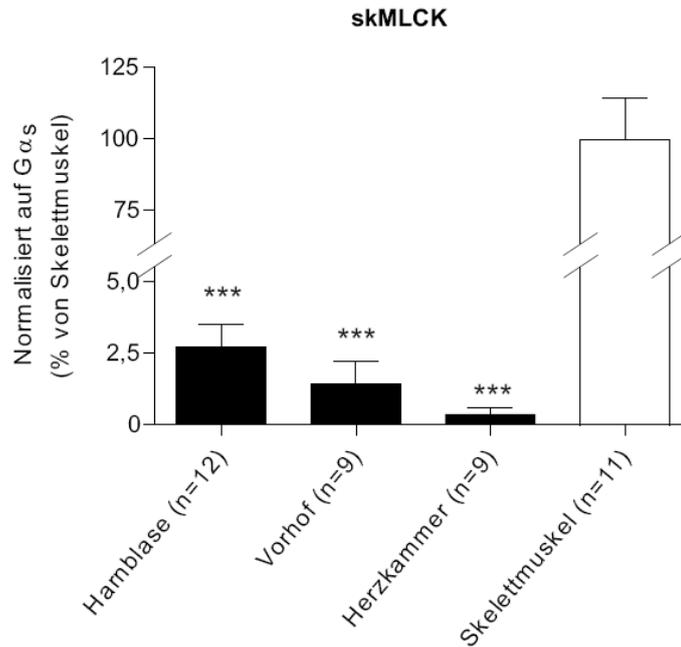


Abbildung 51: skMLCK-mRNA-Menge von verschiedenen Geweben der Maus

Dargestellt ist die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene skMLCK-mRNA-Menge aus verschiedenen Geweben der Maus, normalisiert auf das „Housekeeping gene“ $G\alpha_s$. Zur Normalisierung wurde der Skelettmuskel gleich 100% gesetzt, da hier die Expression der skMLCK von den untersuchten Gewebearten erwartungsgemäß am höchsten war (vgl. 1.4). Mittelwerte der ct-Werte: $G\alpha_s$ (1:8 Verdünnung) Harnblase 26,01, Vorhof 25,47, Herzkammer 24,32, Skelettmuskel 24,64 bzw. skMLCK Harnblase 31,57, Vorhof 35,50, Herzkammer 33,27, Skelettmuskel 27,06.

In der Harnblase zeigte sich eine skMLCK-Expression von 2,71%, im Vorhof konnte die skMLCK mit 1,44% detektiert werden, und in der Herzkammer wurde die skMLCK mit 0,35% nachgewiesen. Alle Ergebnisse waren signifikant gegenüber dem Skelettmuskel (***) $p < 0,001$ vs. Skelettmuskel, t-Test).

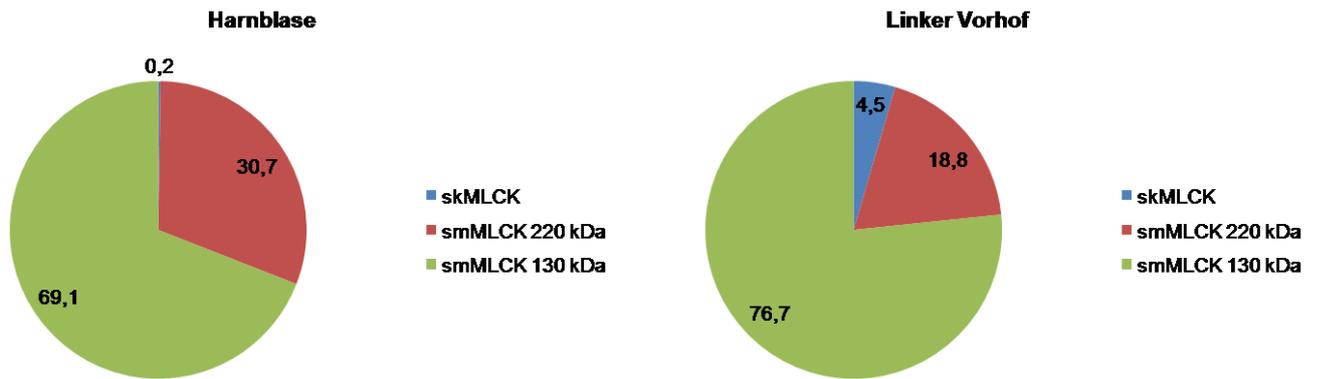


Abbildung 52: Anteile der verschiedenen MLCK-Isoformen an der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge
 Dargestellt sind die unterschiedlichen mRNA-Mengen (in % von der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge) der MLCK-Isoformen in der Harnblase und im linken Vorhof der Maus. Die n-Zahlen stimmen mit denen in Abb. 49 bis 51 aufgeführten überein (s. dort).

In der Harnblase hatte die skMLCK 0,2% Anteil an der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge, die smMLCK 220 kDa stellte ca. ein Drittel der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge (30,7%), und der größte Teil (69,1%) wurde durch die smMLCK 130 kDa repräsentiert. Im linken Vorhof war die skMLCK mit 4,5% an der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge beteiligt und die smMLCK 220 kDa mit 18,8%. Mehr als drei Viertel der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge im linken Vorhof entstammten der smMLCK 130 kDa (76,7%). Somit scheint die smMLCK 130 kDa mit 76,7% im linken Vorhof, und vermutlich ähnlichen Werten im ganzen Herzen, die wichtigste MLCK-Isoform zu sein. Die smMLCK 220 kDa spielt mit 18,8% Anteil an der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge offenbar nur eine untergeordnete Rolle; noch geringer dürfte die Bedeutung der erst mittels quantitativer RT-PCR messbar gewordenen skMLCK im Herzmuskel sein.

3.1.4.2 Gewebeverteilung der MLCK-Isoformen der Maus: Protein-Ebene

Aus verschiedenen Gewebeproben der Maus sowie aus NRCM wurden die Proteine isoliert und nach Bestimmung der Proteinkonzentration der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sowie anschließendem Western Blot zugeführt.

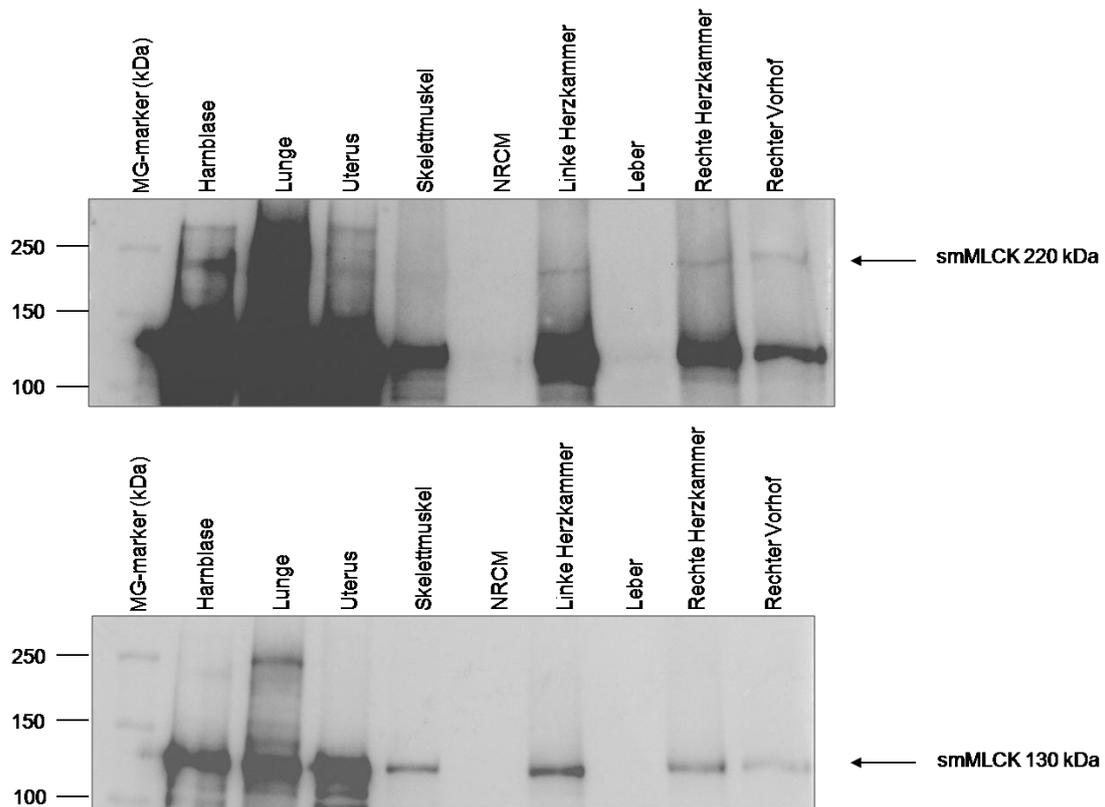


Abbildung 53: Western Blot von Mausgewebeproben und NRCM, inkubiert mit Anti-smMLCK

Gezeigt ist zweimal die gleiche Membran mit unterschiedlich langer Belichtungsdauer. Eingesetzte Proteinmengen: Harnblase 6,6 μg , Lunge 104,2 μg , Uterus 39,9 μg , Skelettmuskel 179,8 μg , NRCM 61,9 μg , linke Herzkammer 46,7 μg , Leber 149,3 μg , rechte Herzkammer 63,7 μg , Rechter Vorhof 42,4 μg .

Die smMLCK 130 kDa konnte in allen Geweben detektiert werden, in den NRCM jedoch nur in einer geringen Menge, was vermutlich durch Einsatz einer größeren Proteinmenge zu verbessern wäre (vgl. Abb. 54A). Die smMLCK 220 kDa ließ sich in Harnblase, Lunge, Uterus, rechter und linker Herzkammer und rechtem Vorhof nachweisen. Dass die NRCM-Probe negativ war, lag vermutlich ebenfalls an der eingesetzten Proteinmenge, wie die weiteren Versuche zeigen sollten (s. Abb. 54A).

3.1.4.3 Gewebeverteilung der MLCK-Isoformen der Ratte: Protein-Ebene

Aus verschiedenen Gewebeproben der Ratte sowie erneut aus NRCM wurden die Proteine isoliert und der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese sowie anschließend dem Western Blot zugeführt.

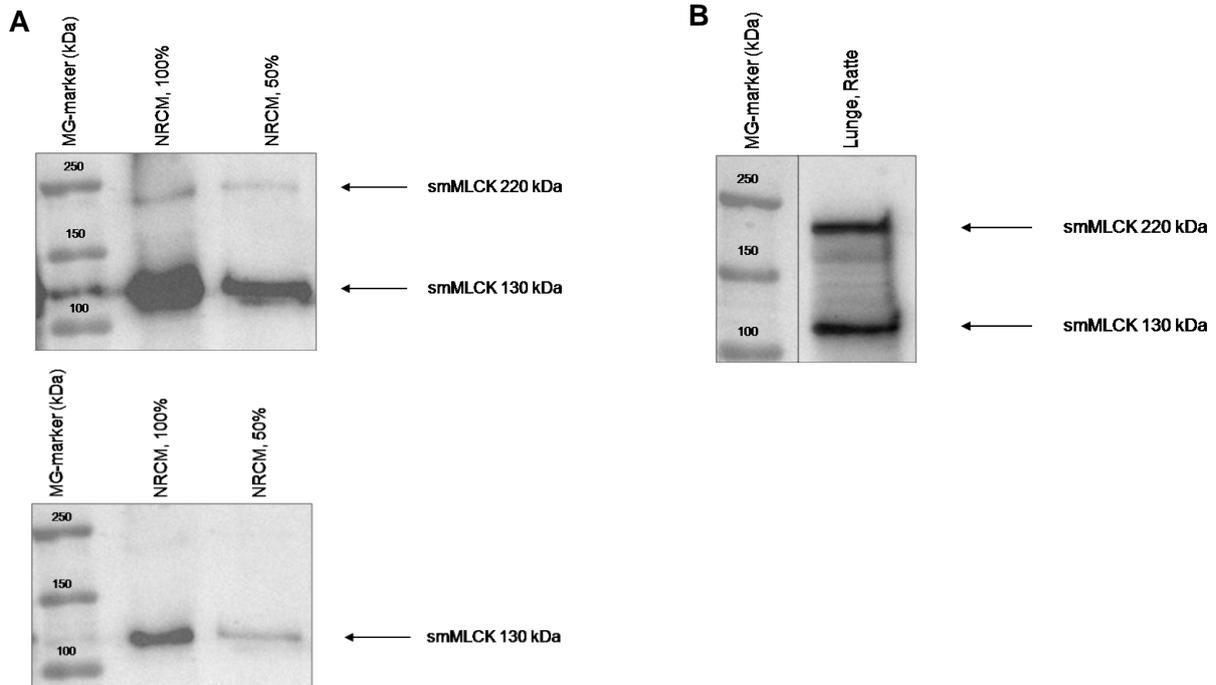
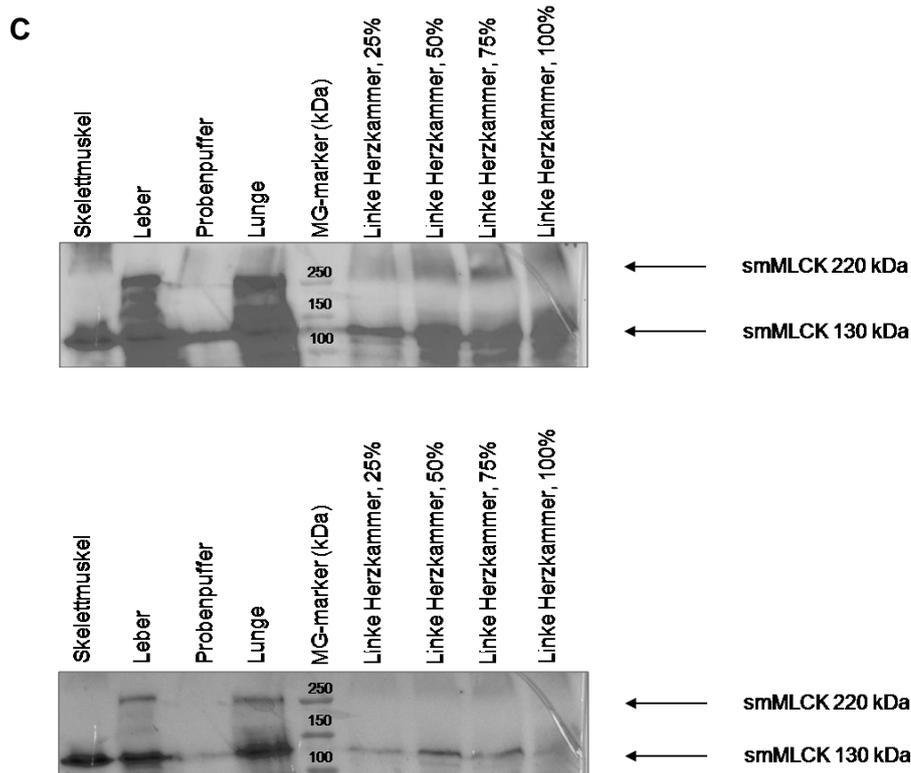


Abbildung 54: Western Blot von Rattengewebeproben und NRCM, inkubiert mit Anti-smMLCK

In Abb. 54A ist zweimal der gleiche Ausschnitt einer Membran mit unterschiedlich langer Belichtungsdauer dargestellt. Sie zeigt die Proteinproben der NRCM in zwei verschiedenen Konzentrationen. Die Abb. 54B zeigt einen Ausschnitt einer Membran mit Lungengewebe der Ratte. In Abb. 54C (s. S. 126) ist zweimal die gleiche Membran mit unterschiedlich langer Belichtungsdauer dargestellt. Die Proteinkonzentrationen wurden nicht bestimmt und bei Skelettmuskel, Leber und Lunge anhand der eingesetzten μl der jeweiligen Mausgewebeproben angepasst. Die Proteinprobe der linken Herzkammer wurde in vier verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (100, 75, 50 und 25%). Probenpuffer bedeutet, dass in dieser Spur kein Probenmaterial geladen wurde, sondern nur der Probenpuffer in äquivalenter Menge.



Wie im Gewebe der Maus konnte auch in allen untersuchten Gewebeproben der Ratte die smMLCK 130 kDa detektiert werden (Skelettmuskel, Leber, Lunge, linke Herzkammer und NRCM). Die smMLCK 220 kDa konnte analog zum Mausgewebe bei der Ratte in der Leber und in der Lunge gefunden werden. Nach erneuter, konzentrierter NRCM-Proteinisolierung konnte die smMLCK 220 kDa auch dort gezeigt werden. In den Gewebeproben der linken Herzkammer der Ratte konnte trotz mehrerer Versuche (hier ist nur ein exemplarischer Western Blot dargestellt) die smMLCK 220 nicht so klar gezeigt werden wie z. B. in der Lunge. Daher wurde für alle weiteren Western Blots mit Hinblick auf die MLCK das Lungengewebe als Positivkontrolle mitgeführt.

Die Charakterisierung des α_1 -adrenergen Signalweges war im Zusammenhang auf die MLCK unter Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren zwar aussagekräftig, dennoch begrenzt. Daher sollte der Einfluss der MLCK auf den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt im Herzmuskel auf molekularer Ebene mittels RNA-Interferenz weiter untersucht werden. Dazu wurden ein adenoviraler und ein lentiviraler Ansatz verfolgt.

3.2 Adenovirale shRNA-Expression

Es wurden zwei verschiedene shRNA-exprimierende Adenoviren hergestellt, Ad-shRNA-smMLCK220 für den *Knockdown* und Ad-shRNA-NS als Kontrollvirus. Zunächst mussten die shRNA-Sequenzen in verschiedene Transfervektoren kloniert werden, bevor mittels Liposomen-vermittelter Transfektion von HEK 293-Zellen die Viren produziert werden konnten. Es schlossen sich Aufkonzentrierungs- und Aufreinigungsschritte an.

3.2.1 Klonierung der shRNA-Sequenzen in verschiedene Transfervektoren

3.2.1.1 pALsh Vektor

Die unter 2.2.12.2 hergestellten shRNA-Oligonukleotide wurden in den pALsh Vektor inkloniert und anschließend einer Restriktionsanalyse unterzogen (s. 2.2.12.3.1.1).

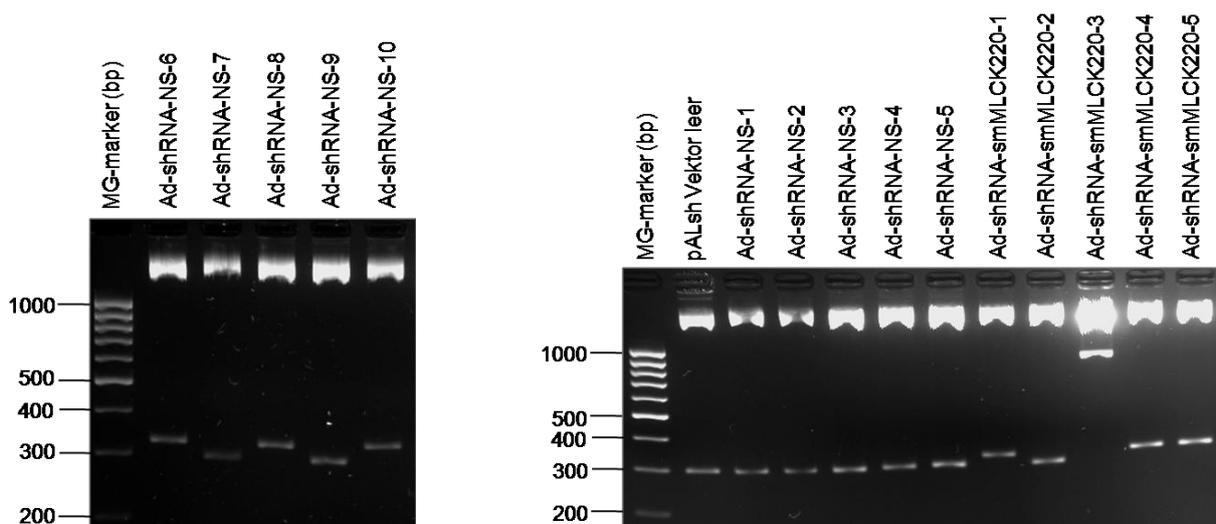


Abbildung 55: Restriktionsanalyse der pALsh Vektoren auf 3%igen Agarosegelen

MG-marker: 100bp DNA Ladder, *GeneRuler™*. Die Zahlen hinter dem Virusnamen bezeichnen die temporäre Klon-Nummer.

Der Verdau der pALsh Vektoren mit *Xba*I und *Kpn*I ergab positive Banden von 347-351 bp Größe. In diesem Fall wurde die shRNA-Sequenz von 44 bzw. 48 bp erfolgreich in den pALsh Vektor einkloniert (bei Ad-shRNA-NS Klon-Nummer 6, 8 und 10, bei Ad-shRNA-smMLCK220 Klon-Nummer 1, 4 und 5). Der leere pALsh Vektor hat eine Größe von 300 bp, siehe rechtes Agarosegel (S. 127), Spur direkt neben dem MG-marker. Der ungeschnittene pALsh Vektor, bzw. hier als zweites Fragment zu sehen, hat eine Größe von ~2000 bp. Für die Klonierung in den pAdTrack-CMV Vektor wurde Klon-Nummer 6 für den Ad-shRNA-NS und Klon-Nummer 1 für den Ad-shRNA-smMLCK220 verwendet.

3.2.1.2 pAdTrack-CMV Vektor

Die unter 3.2.1.1 erhaltenen positiven Klone wurden in den pAdTrack-CMV *Shuttle*-Vektor einkloniert und anschließend einer Restriktionsanalyse unterzogen (s. 2.2.12.3.2).

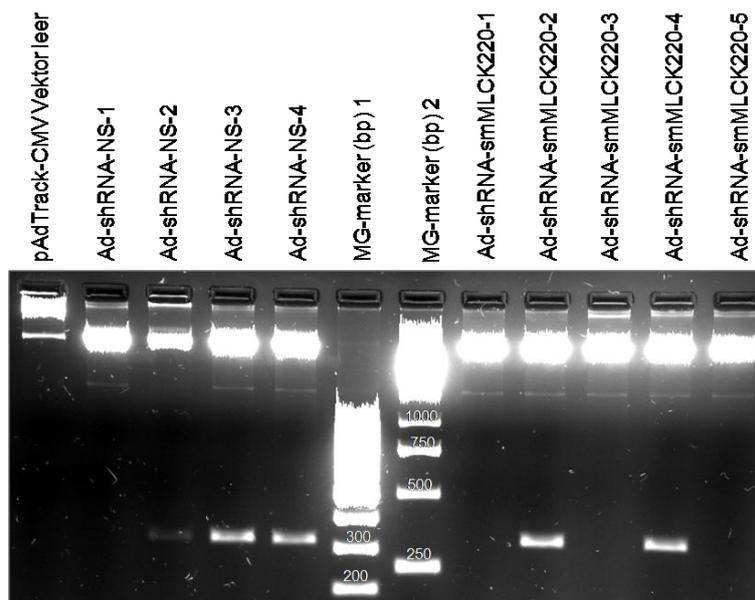


Abbildung 56: Restriktionsanalyse der pAdTrack-CMV Vektoren auf einem 2%igen Agarosegel
 MG-marker 1: 100bp DNA Ladder, *GeneRuler™*, MG-marker 2: 1kb DNA Ladder, *GeneRuler™*. Die Zahlen hinter dem Virusnamen bezeichnen die temporäre Klon-Nummer.

Die Restriktionsanalyse der pAdTrack-CMV Vektoren mit *Xba*I und *Kpn*I ergab analog zum Verdau der pALsh Vektoren positive Banden von 347-351 bp Größe (vgl. Abb. 55). Der leere pAdTrack-CMV Vektor hat eine Größe von ~9,2 kb, aufgetragen in der linken Spur des Agarosegels. Für die Klonierung in den pAdEasy-1 Vektor wurde Klon-Nummer 3 für den Ad-shRNA-NS und Klon-Nummer 2 für den Ad-shRNA-smMLCK220 verwendet. Die so kontrollierten und als positiv befundenen Konstrukte wurden nach Linearisierung mit dem

Enzym *PmeI* in *E. coli* BJ5183 mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) zur homologen Rekombination gebracht. Die rekombinationspositiven Klone konnten durch *PacI* Restriktionsanalyse identifiziert werden (s. u.).

3.2.1.3 pAdEasy-1 Vektor

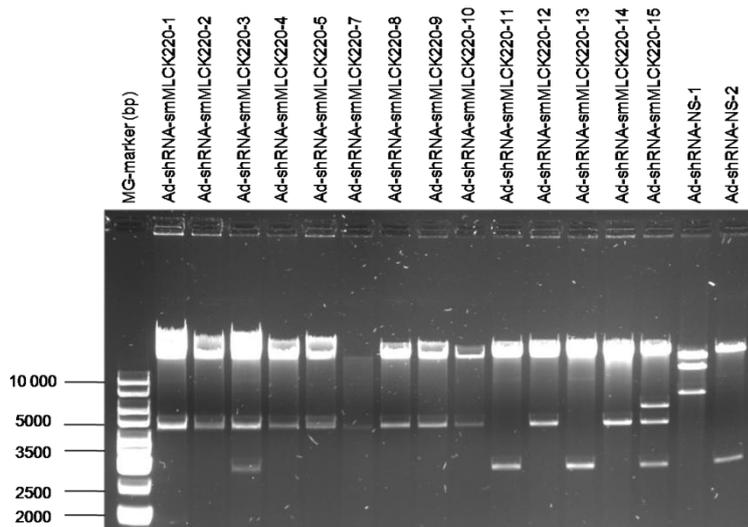
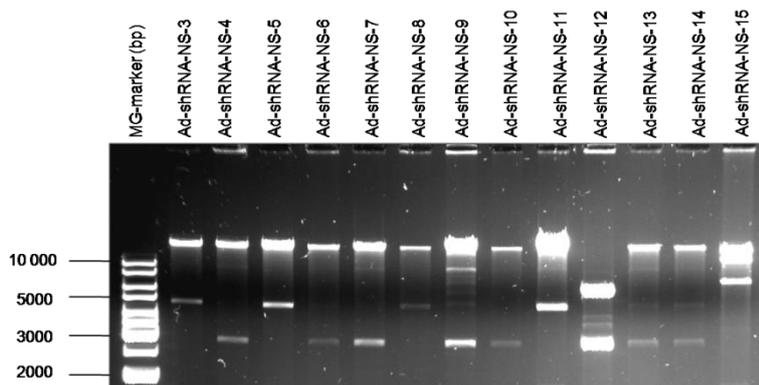


Abbildung 57: 0,8%ige Agarosegele mit geschnittener Plasmid-DNA von pAdEasy-1-shRNA-smMLCK220 bzw. pAdEasy-1-shRNA-NS nach der homologen Rekombination
 MG-marker: 1kb DNA Ladder, *GeneRuler™*. Die Zahlen hinter dem Virusnamen bezeichnen die temporäre Klon-Nummer.



Die *PacI*-Restriktionsanalyse der isolierten Plasmide zeigte nach erfolgreicher homologer Rekombination ein großes DNA-Fragment (>33,4 kb) und zusätzlich jeweils ein kleineres Fragment von etwa 2,9 kb (als positive homologe Rekombination gewertet). Bei der alternativen homologen Rekombination des Replikationsursprungs an Stelle des linken Armes, trat in einigen Fällen ein 4,5 kb anstatt eines ~3,0 kb DNA-Fragments auf, da durch die Rekombinationsvariante eine zweite *PacI*-Erkennungssequenz eingebracht wurde.

Dieses wurde als negative homologe Rekombination gewertet. Positiv waren bei dem Ad-shRNA-smMLCK220 Klon-Nummer 11 und 13, bei dem Ad-shRNA-NS Klon-Nummer 2, 4, 6, 7, 13 und 14. Nummer 9 wurde als negativ gewertet. Die hier gezeigten Proben zeigen nur eine Auswahl positiver Klone.

Für die Retransformation in *E. coli* DH10B wurde Klon-Nummer 13 für den Ad-shRNA-smMLCK220 und Klon-Nummer 7 für den Ad-shRNA-NS gewählt. Es wurde nach erfolgter Transformation, Amplifikation und Aufreinigung der Plasmid-DNA ein kleiner Teil mit der Restriktionsendonuklease *PacI* geschnitten und ein 0,8%iges Agarosegel zur Gegenkontrolle angefertigt.



Abbildung 58: 0,8%ige Agarosegele mit geschnittener Plasmid-DNA von pAdEasy-1-shRNA-smMLCK220 bzw. pAdEasy-1-shRNA-NS nach der Retransformation in *E. coli* DH10B

MG-marker: 1kb DNA Extension Ladder

Die mit *PacI* verdauten Proben zeigten wie zuvor (s. Abb. 57) die bei der homologen Rekombination erzeugten DNA-Fragmente von 2,9 kb und ca. 33 kb.

Eine weitere Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Xba*I und *Kpn*I führte zum Herausschneiden des shRNA-haltigen *Inserts* aus dem pAdTrack-CMV Vektor (vgl. Abb. 11).

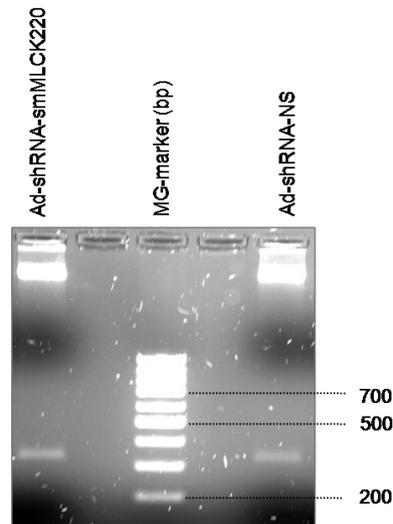


Abbildung 59: Restriktionsanalyse mit *Xba*I und *Kpn*I der pAdEasy-1 Vektoren auf einem 1%igen Agarosegel

MG-marker = 100bp DNA Ladder *GeneRuler*TM

Die mit den Enzymen *Xba*I und *Kpn*I verdauten Proben zeigten jeweils das aus dem pAdTrack-CMV Vektor herausgeschnittene *Insert* von ca. 350 bp Größe.

3.2.1.4 Sequenzierung der shRNA-Konstrukte im pAdEasy-1 Vektor

Die positiven Rekombinationen (2,9 kb) wurden mit *Pme*I linearisiert und die gefällte DNA einer Sequenzierung unterzogen. Die mit einem im H1 Promotor liegenden Sequenzierungsprimer durchgeführte DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) ergab eine 100%ige Übereinstimmung mit der gewählten shRNA-Sequenz der smMLCK220 kDa. Für die Nonsense-shRNA-Sequenz konnte jedoch keine absolute Deckung mit der ursprünglichen Sequenz gefunden werden, da eine Base, ein Guanin, fehlte (s. Abb. 61). Die „neue“ shRNA-Sequenz für das Adenovirus Ad-shRNA-NS wies jedoch nach Kontrolle mittels *BLAST*-Programm ebenfalls keinerlei Homologie zu einem Gen der Maus oder Ratte auf. Daher wurde diese shRNA-Sequenz weiterhin als Kontrolle und späteres Adenokontrollvirus verwendet.

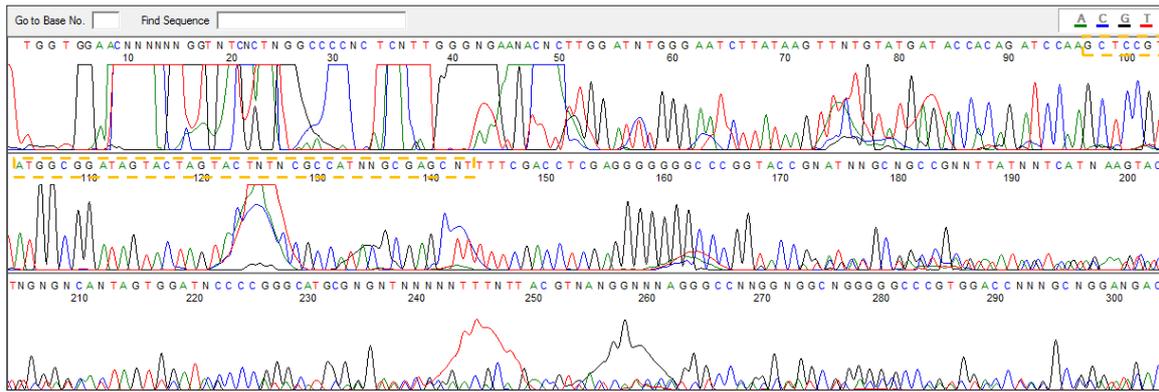


Abbildung 60: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für Ad-shRNA-NS

In orangefarbenen, gestrichelten Linien umrandet, ist die Nonsense-shRNA-Sequenz gezeigt. Dieses ist ein beispielhaftes Ergebnis einer Sequenzierung. Mehrfachbestimmungen wurden durchgeführt und zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit der gewählten klonierten Sequenz, bzw. mit der Ausnahme des fehlenden Guanins am Beginn der Sequenz (s. Abb. 61).

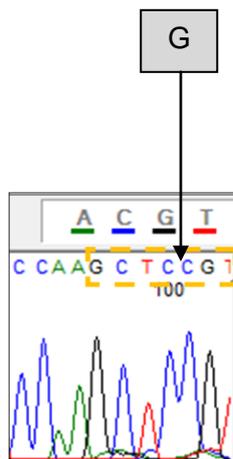


Abbildung 61: Ausschnitt aus Abbildung 60 vergrößert dargestellt

Vergrößert gezeigt der Anfangsbereich mit dem fehlenden Guanin zwischen zwei Cytosinbasen (vgl. 2.2.12.1, s. Tab. 3)

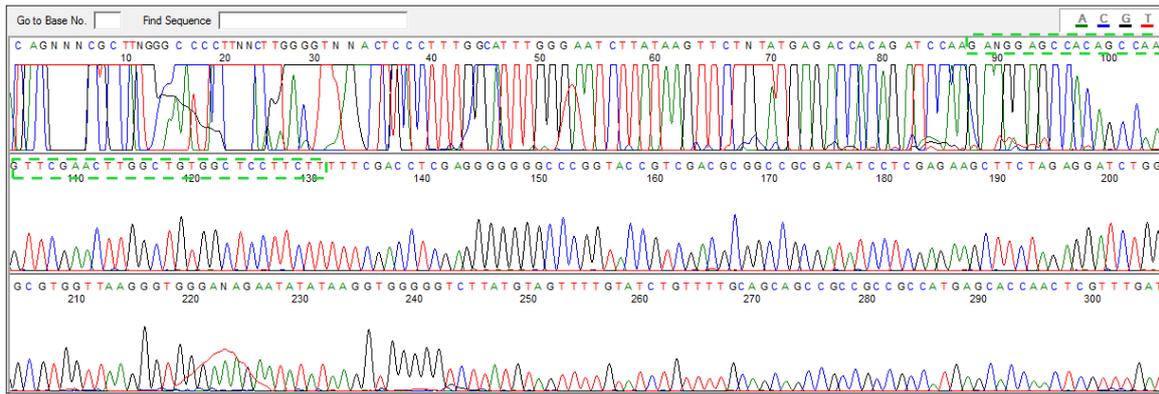
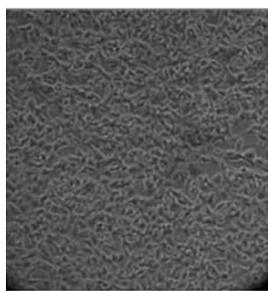


Abbildung 62: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für Ad-shRNA-smMLCK220

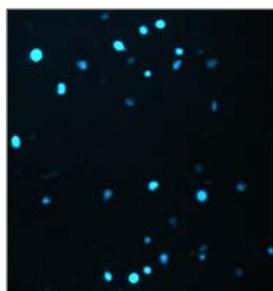
In grünfarbigen, gestrichelten Linien umrandet, ist die smMLCK 220 kDa-shRNA-Sequenz gezeigt. Dieses ist ein beispielhaftes Ergebnis einer Sequenzierung. Mehrfachbestimmungen wurden durchgeführt und zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit der gewählten klonierten Sequenz.

3.2.1.5 Liposomen-vermittelte Transfektion der pAdEasy-1-Konstrukte in QBI-HEK 293A-Zellen

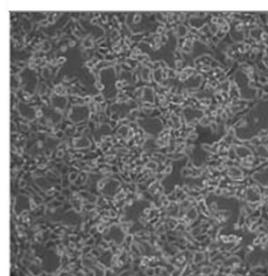
Die positiven Rekombinationen (2,9 kb) wurden mit *PmeI* linearisiert und die gefällte DNA in QBI-HEK 293A-Zellen transfiziert, in denen die Viren sich bilden und vermehren konnten (s. 2.2.13.2). Nach Transfektion in QBI-HEK 293A-Zellen zeigten die positiv transfizierten Zellen nach 2-3 Tagen eine grüne Fluoreszenz.



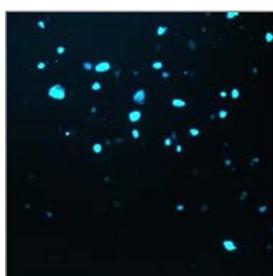
Ad-shRNA-smMLCK220
Phasenkontrastaufnahme



Ad-shRNA-smMLCK220
Fluoreszenzaufnahme



Ad-shRNA-NS
Phasenkontrastaufnahme



Ad-shRNA-NS
Fluoreszenzaufnahme

Abbildung 63: Transfektion von QBI-HEK 293A-Zellen

Die Abbildungen (10-fache Vergrößerung, Fluoreszenzmikroskop) zeigen die mit den Konstrukten pAdEasy-1-shRNA-smMLCK220 und pAdEasy-1-shRNA-NS Liposomen-vermittelt transfizierten QBI-HEK 293A-Zellen am dritten Tag nach Transfektion. Es sind jeweils Phasenkontrastaufnahmen sowie die Epifluoreszenz durch GFP-exprimierende Zellen dargestellt.

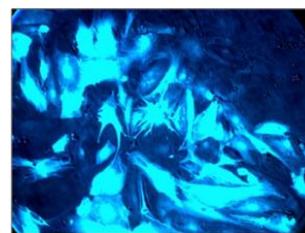
Im ersten Infektionszyklus wiesen nicht alle Zellen eine grüne Fluoreszenz auf, und der Infektionsverlauf war relativ langsam (sechs bis sieben Tage). Mit steigender Anzahl von Infektionszyklen nahmen die Geschwindigkeit des Infektionsverlaufs und die Zahl direkt infizierter Zellen stetig zu. Nach der Präparation hochtitriger Virussuspensionen wurde die Konzentration der Viren ausgetitert.

3.2.1.6 Titerbestimmung der Adenoviren Ad-shRNA-smMLCK220 und Ad-shRNA-NS

Die Effizienz der adenoviralen Infektion wurde in NRCM überprüft (s. 2.2.13.6). Hierfür wurden NRCM mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen infiziert. Der Infektionsverlauf wurde nach 48 h ausgewertet. Dabei wurde mikroskopisch mit einer 20-fachen Vergrößerung (Fluoreszenzmikroskop) die Verdünnung je Zellkulturschale ermittelt, die gerade noch 100% aller Zellen GFP exprimieren lässt, d. h. grün fluoresziert. Im Folgenden ist nur eine Auswahl der mikroskopischen Aufnahmen zu sehen; die Titration wurde als Doppelbestimmung durchgeführt.



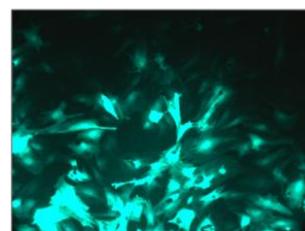
Ad-shRNA-smMLCK220
Phasenkontrastaufnahme



Ad-shRNA-smMLCK220
Fluoreszenzaufnahme



Ad-shRNA-NS
Phasenkontrastaufnahme



Ad-shRNA-NS
Fluoreszenzaufnahme

Abbildung 64: Titration von Ad-shRNA-smMLCK220 und Ad-shRNA-NS in NRCM

Es sind die Phasenkontrastaufnahmen sowie die Epifluoreszenz durch GFP-exprimierende Adenoviren gezeigt. In den im oberen Teil der Abbildung dargestellten Bildern wurde das Ad-shRNA-smMLCK220 in einer 1:10 Verdünnung auf 500 000 NRCM gegeben (1 μ l) und in den unten gezeigten Bildern das Ad-shRNA-NS in einer 1:100 Verdünnung (1 μ l). Zu beachten ist, dass die UV-Lampe ∇

zu den Zeitpunkten der Aufnahmen nicht vollständig zentriert war, d. h. der obere rechte Bereich wurde für die Titerbeurteilung nicht mit eingeschlossen. Für die bessere Sichtweise wurden hier die Bilder 48 h nach Infektion gezeigt. Bei beiden Viren war bereits mit dieser angegebenen Verdünnung nach 24 h eine 100%ige Infektion der Zellen zu erkennen. Die Stärke der Fluoreszenz nahm nach weiteren 24 h zu.

Für das Ad-shRNA-smMLCK220 wurde ein Titer von $5 \cdot 10^6/\mu\text{l}$ und für das Ad-shRNA-NS ein Titer von $5 \cdot 10^7/\mu\text{l}$ ermittelt.

3.3 Verwendung des Ad-shRNA-smMLCK220 in NMCM

Das hergestellte Adenovirus mit der shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 220 kDa der Maus sollte zunächst in primären Kardiomyozyten der Maus (NMCM) auf Funktionalität des *Knockdowns* überprüft werden. Dazu wurden die NMCM 48 h nach Isolation mit einer MOI von 20 infiziert und 49 h nach Infektion einer Protein- und RNA-Isolierung zugeführt. Als Kontrollbedingungen wurden jeweils unbehandelte NMCM (d. h. nur mit *Dark Medium* = Negativkontrolle) bzw. mit dem Nonsense Adenovirus Ad-shRNA-NS infizierte mitgeführt.

3.3.1 Infektionsverlauf der adenoviral-infizierten NMCM

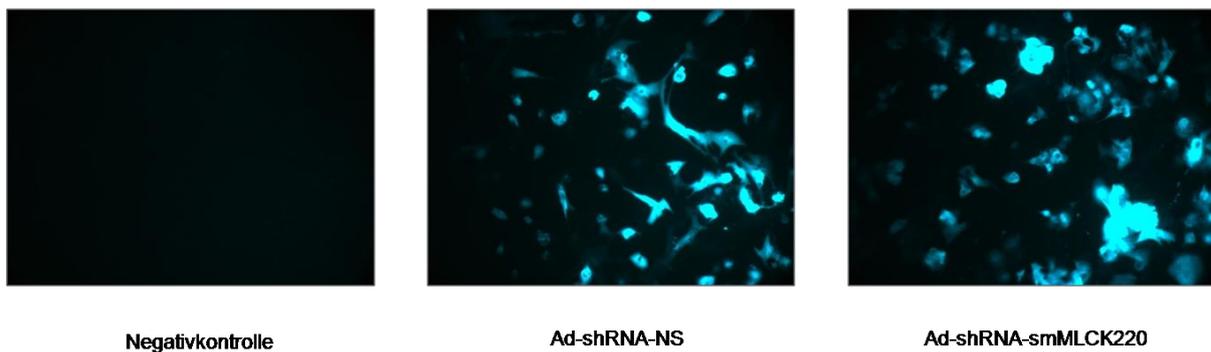


Abbildung 65: Adenovirale Infektion von NMCM

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen des GFPs der adenoviral-infizierten NMCM mit einer 20-fachen Vergrößerung (Fluoreszenzmikroskop) 44,5 h nach Infektion (MOI 20).

Mit beiden Viren konnte mit einer MOI von 20 jeweils eine 100%ige Infektion der NMCM erreicht werden.

3.3.2 Adenoviraler smMLCK *Knockdown* auf Protein-Ebene in NMCM

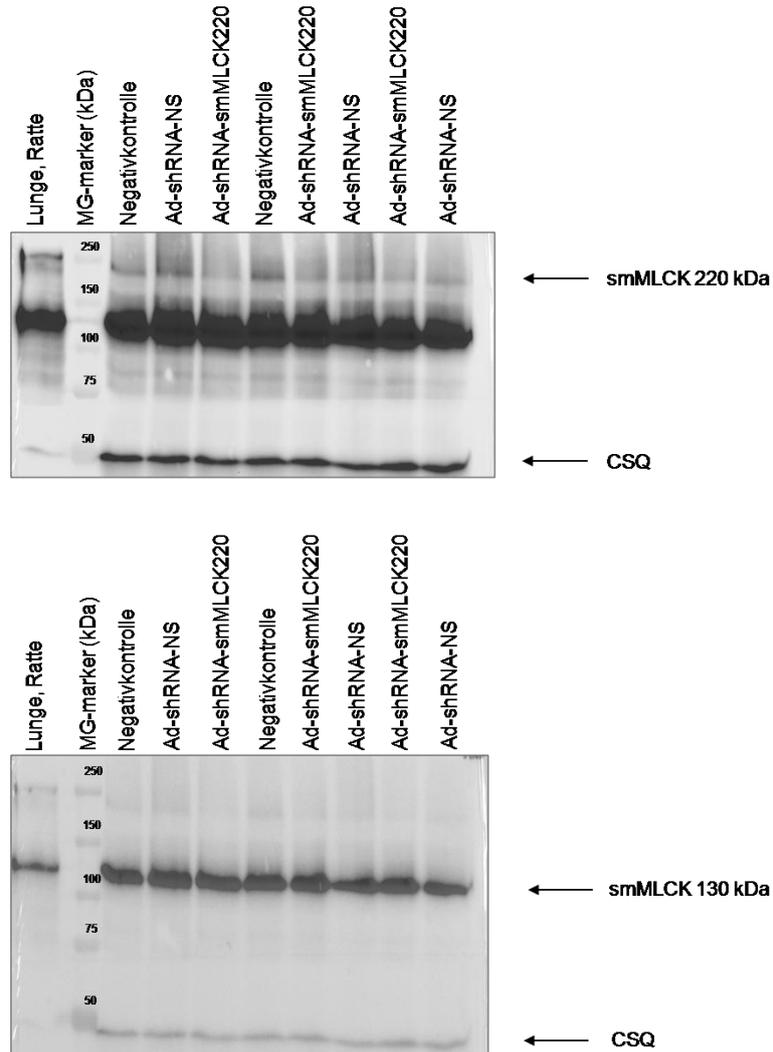


Abbildung 66: Western Blot von adenoviral-infizierten NMCM, inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-Calsequestrin

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer adenoviralen NMCM-Behandlung. Dargestellt ist zweimal die gleiche Membran mit unterschiedlich langer Belichtungsdauer. Lungengewebe der Ratte diente als Positivkontrolle. Calsequestrin (CSQ), das als nicht reguliertes Kardiomyozyten-spezifisches „Housekeeping gene“ gilt, wurde hier als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

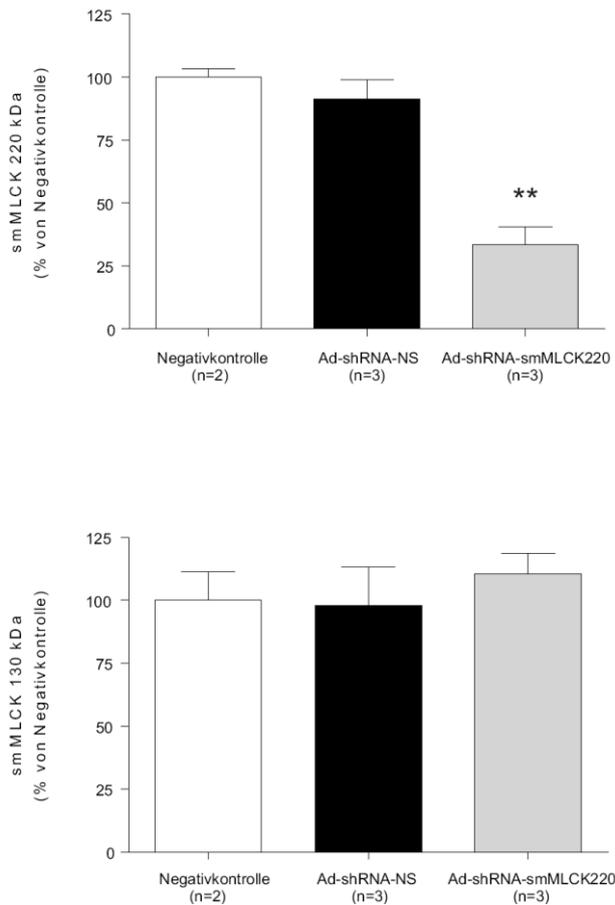


Abbildung 67: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 66 gezeigten Western Blot Membranen von adenoviral-infizierten NMCM

Dargestellt sind die smMLCK 220 und 130 kDa-Proteinmengen in % von Negativkontrolle. Die unbehandelten NMCM (= Negativkontrolle) wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Durch die adenovirale Infektion der NMCM wurde die smMLCK 220 kDa in den mit Ad-shRNA-smMLCK220-infizierten Zellen auf 33,3% in Bezug auf die Negativkontrolle herunterreguliert (** $p < 0,01$ vs. Negativkontrolle, t-Test). Hingegen zeigte die Infektion mit dem Ad-shRNA-NS-Virus keinen Einfluss auf die Proteinmenge der smMLCK 220 kDa. Die Proteinmenge der smMLCK 130 kDa war weder von Ad-shRNA-smMLCK220 noch mit Ad-shRNA-NS in NMCM beeinflusst, was auf eine Spezifität der shRNA-Sequenz ausschließlich gegen die lange, smMLCK 220 kDa Isoform hinweist.

3.3.3 Adenoviraler smMLCK *Knockdown* auf mRNA-Ebene in NMCM

NMCM wurden entweder nur mit *Dark Medium* (inkl. Ara-C) oder mit den verschiedenen Adenoviren (MOI 20) für 49 h behandelt. Danach wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Eine quantitative RT-PCR mit TaqMan[®]-Sonden für $G\alpha_s$ zur Normalisierung und zur Quantifizierung der mRNA für smMLCK 220 und 130 kDa wurde im Anschluss durchgeführt.

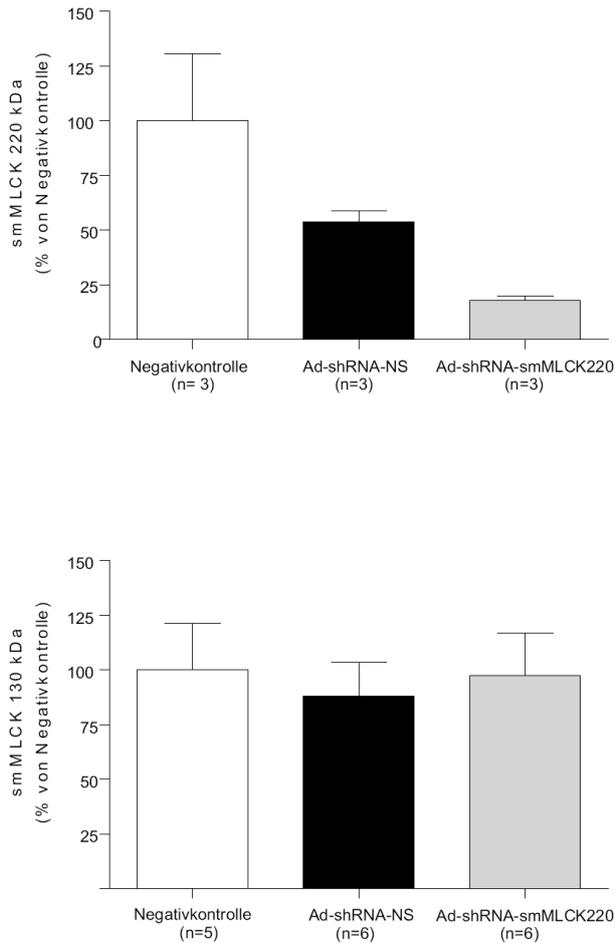


Abbildung 68: smMLCK-mRNA-Menge von adenoviral-infizierten NMCM

Dargestellt ist die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene smMLCK 220 und 130 kDa-mRNA-Menge aus adenoviral-infizierten NMCM. Die unbehandelten NMCM (= Negativkontrolle) wurden auf 100% normalisiert. Das „House-keeping gene“ $G\alpha_s$ diente als Ladungskontrolle.

Die smMLCK 220 kDa-mRNA-Bestimmung zeigte große Schwankungen und konnte aus dem zweiten Experiment aufgrund von zu hohen ct-Werten (mit über 35) nicht gewertet werden. Eindeutig ist jedoch die aus dem einen Experiment gewonnene Tendenz, dass auf mRNA-Ebene eine Infektion mit dem Ad-shRNA-smMLCK220 in NMCM zu einer deutlichen Reduktion der smMLCK 220 kDa führte. Die mRNA konnte auf 17,8% im Vergleich zur Negativkontrolle abgesenkt werden ($p=0,06$, ns. vs. Negativkontrolle). Die Infektion mit dem Ad-shRNA-NS-Virus führte auf mRNA-Ebene auch zu einer tendenziellen Reduktion der smMLCK 220 kDa-mRNA-Menge. Dieses ist aber durch die Schwankungen innerhalb der Kontrollgruppe und die hohen ct-Werte nur mit Einschränkung zu bewerten, zumal auf Protein-Ebene dieser Effekt nicht sichtbar war. Im Vergleich zur Negativkontrolle konnte weder mit dem Ad-shRNA-NS noch mit dem Ad-shRNA-smMLCK220 eine signifikante Veränderung in Bezug auf die mRNA-Menge der smMLCK 130 kDa beobachtet werden.

3.4 Verwendung des Ad-shRNA-smMLCK220 in NRCM

Nach erfolgreichem *Knockdown* in NMCM sollte der Effekt des Adenovirus mit der shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 220 kDa der Maus auch in NRCM getestet werden. Die shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 220 kDa weist einen *Mismatch* zur Rattensequenz auf. Die Nonsense-shRNA hat, wie bei der Maus, auch im Rattengenom keinerlei Homologie zu einem bekannten Gen.

Es wurden die NRCM 48 h nach Isolation mit einer MOI von 2,5 bis 20 infiziert und 48 h nach Infektion der Protein- und RNA-Isolierung zugeführt. Als Kontrollbedingungen wurden jeweils unbehandelte NRCM (d. h. nur mit KM-Medium = Negativkontrolle) bzw. mit dem Nonsense-Adenovirus Ad-shRNA-NS infiziert mitgeführt.

3.4.1 Infektionsverlauf der adenoviral-infizierten NRCM

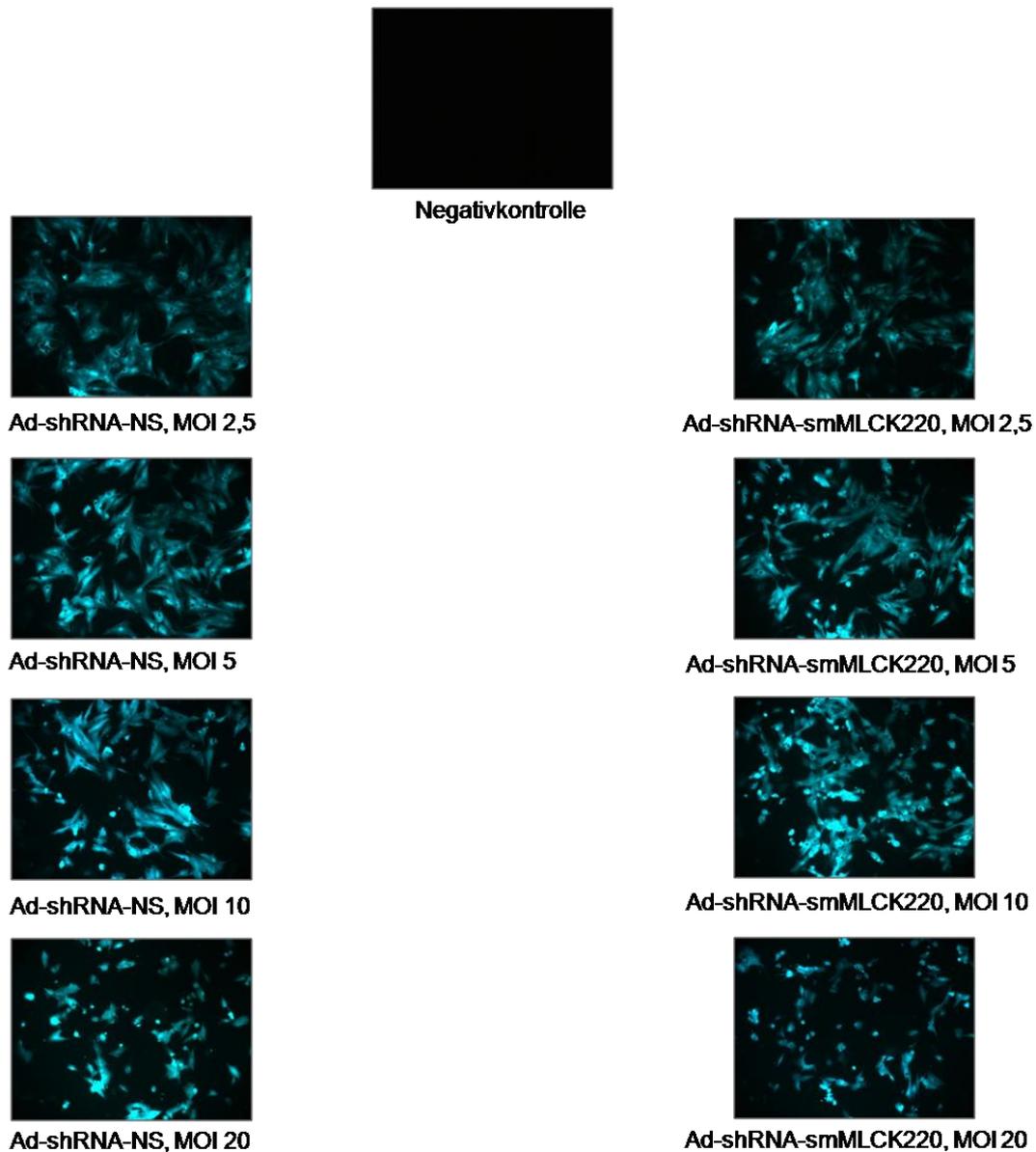


Abbildung 69: Adenovirale Infektion von NRCM

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen des GFPs der adenoviral-infizierten NRCM mit einer 20-fachen Vergrößerung (Fluoreszenzmikroskop) 46,5 h nach Infektion (MOI zwischen 2,5 und 20).

Schon mit einer MOI von 2,5 wiesen 100% der Zellen 24 h nach Infektion eine grüne Fluoreszenz auf, die sich nach weiteren 24 h noch in der Leuchtkraft verstärkte. Mit beiden Viren zeigte sich eine konzentrationsabhängige Zunahme der Fluoreszenz, die jedoch auch mit einem vermehrten Zellsterben einherging. So waren mit einer MOI von 20 bei den mit dem Ad-shRNA-smMLCK220-infizierten Zellen nach 46,5 h ca. 50% der Zellen tot. Bei den Ad-shRNA-NS-infizierten NRCM waren es deutlich weniger, ca. 75% der Zellen waren noch vital.

3.4.2 Adenoviraler smMLCK *Knockdown* auf Protein-Ebene in NRCM

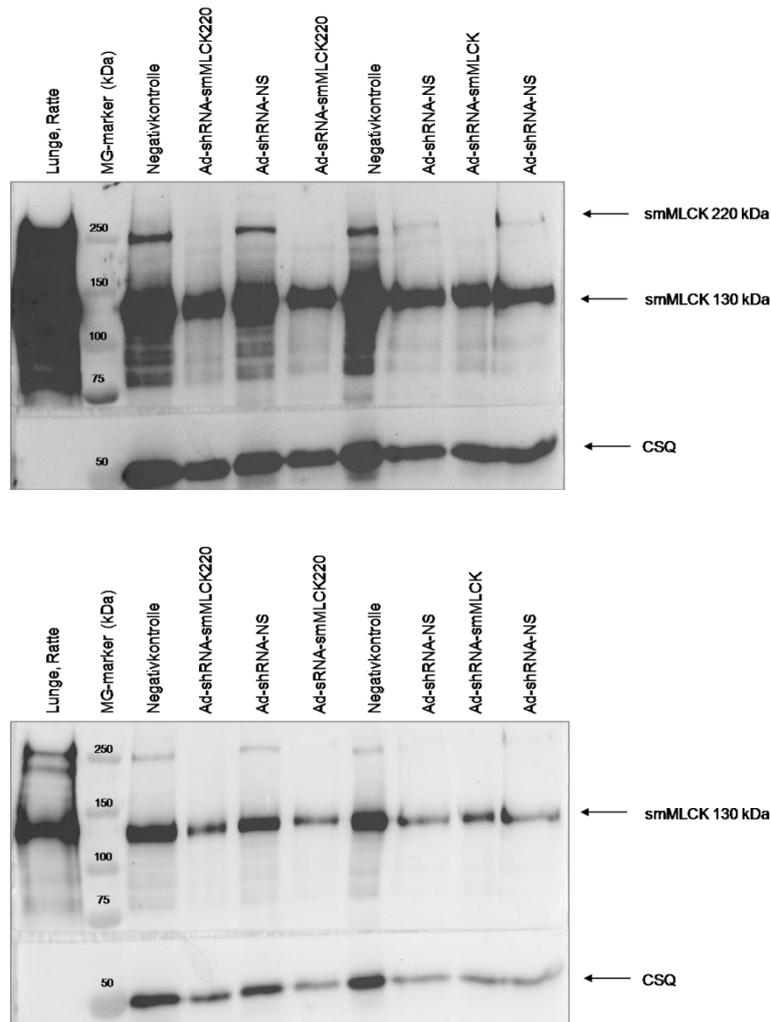


Abbildung 70: Western Blot von adenoviral-infizierten NRCM (MOI 20), inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer adenoviralen NRCM-Behandlung mit einer MOI von 20. Dargestellt ist zweimal die gleiche Membran mit unterschiedlich langer Belichtungsdauer. Lungengewebe der Ratte diente als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

Ergebnisse

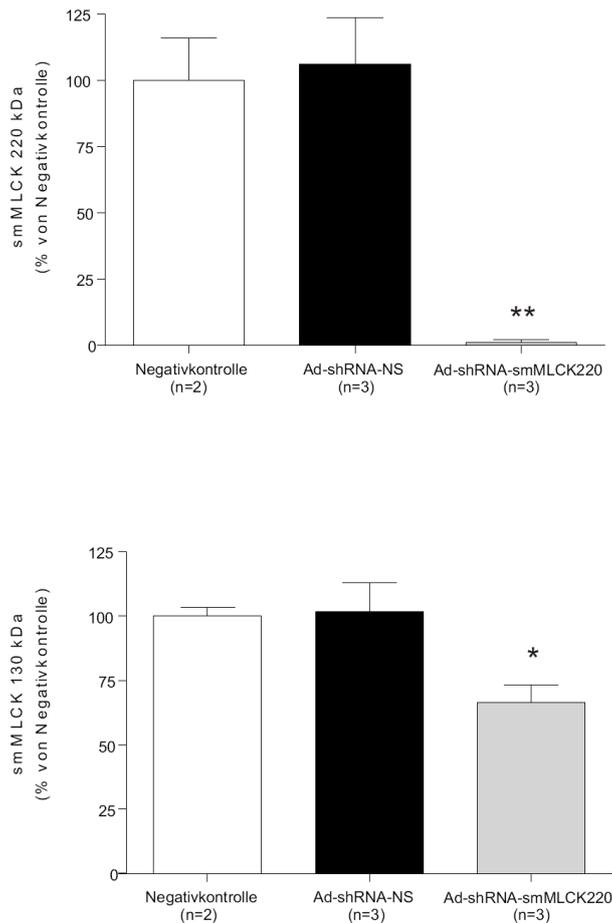


Abbildung 71: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 70 gezeigten Western Blot Membranen

Dargestellt sind die smMLCK 220 und 130 kDa-Proteinmengen in % von Negativkontrolle. Die unbehandelten NRCM (= Negativkontrolle) wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Gegenüber der Negativkontrolle führte eine Infektion der NRCM mit dem Ad-shRNA-smMLCK220 bei einer MOI von 20 zu einer Proteinmengenreduktion der smMLCK 220 kDa auf 1,09% (** $p < 0,01$ vs. Negativkontrolle, t-Test). Überraschenderweise wurde auch die Menge der smMLCK 130 kDa auf 66,5% (* $p < 0,05$ vs. Negativkontrolle, t-Test) herunterreguliert. Die smMLCK-Proteinmengen in den mit dem Nonsense-Adenovirus behandelten Zellen waren nicht signifikant verändert.

Um zu untersuchen, ob die als unspezifisch angesehene Herunterregulation der smMLCK 130 kDa Folge der hohen MOI und der damit verbundenen Zytotoxizität war, wurden die Versuche mit niedriger MOI (2,5) wiederholt (s. Abb. 72).

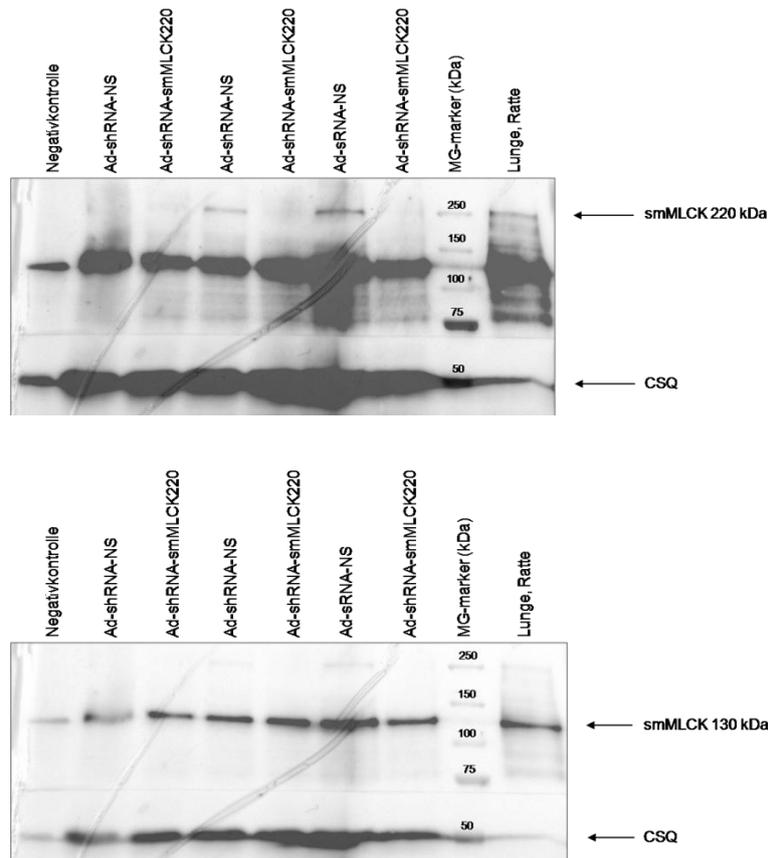


Abbildung 72: Western Blot von adenoviral-infizierten NRCM (MOI 2,5), inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer adenoviralen NRCM-Behandlung mit einer MOI von 2,5. Dargestellt ist zweimal die gleiche Membran mit unterschiedlich langer Belichtungsdauer. Lungengewebe der Ratte diente als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

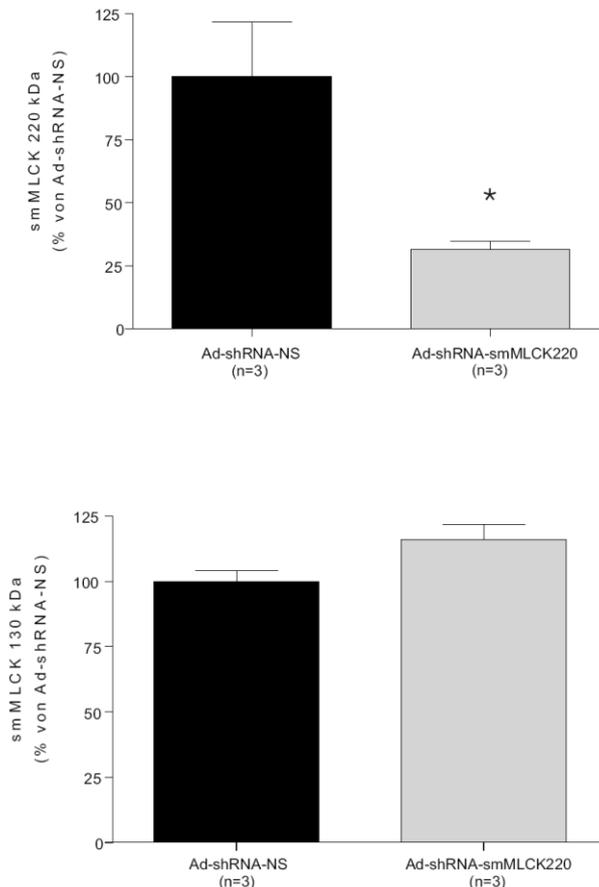


Abbildung 73: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 72 gezeigten Western Blot Membranen

Dargestellt sind die smMLCK 220 und 130 kDa-Proteinmengen in % von Negativkontrolle. Die mit dem Ad-shRNA-NS-behandelten NRCM wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Gegenüber der Ad-shRNA-NS-Kontrolle führte eine Infektion der NRCM mit dem Ad-shRNA-smMLCK220 bei einer MOI von 2,5 zu einer Proteinmengenreduktion der smMLCK 220 kDa auf 31,4% (* $p < 0,05$ vs. Ad-shRNA-NS, t-Test). Die Menge der smMLCK 130 kDa wurde hingegen nicht signifikant reguliert. Da auf der Membran nur eine Negativkontrollspur geladen wurde, und diese für die Auswertung der smMLCK 220 kDa etwas dünn erschien, wurde in diesem Fall das Nonsense-Adenovirus, welches bei einer MOI von 20 nicht reguliert war, als Kontrolle herangezogen.

Da die Ad-shRNA-smMLCK220-Infektion der NMCM und NRCM zu einer signifikanten Proteinmengereduktion der smMLCK 220 kDa führte, sollte im weiteren Verlauf untersucht werden, ob der *Knockdown* der smMLCK 220 kDa auch einen Einfluss auf die Proteinmenge der MLC2a-P hat (s. Abb. 74).

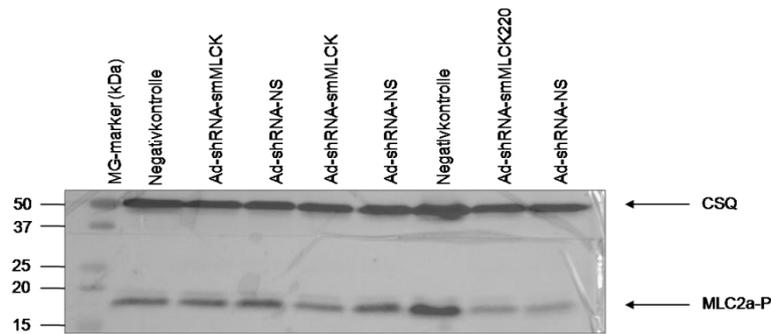


Abbildung 74: Western Blot von adenoviral-infizierten NRCM (MOI 5), inkubiert mit Anti-MLC2a-P und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer adenoviralen NRCM-Behandlung mit einer MOI von 5. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

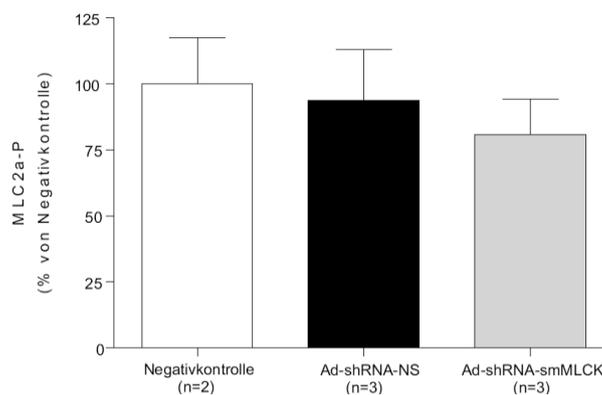


Abbildung 75: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 74 gezeigten Western Blot Membran

Dargestellt ist die MLC2a-P-Proteinmenge in % von Negativkontrolle. Die unbehandelten NRCM (= Negativkontrolle) wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Gegenüber der Negativkontrolle führte eine Infektion der NRCM sowohl mit dem Ad-shRNA-smMLCK220 als auch mit dem Ad-shRNA-NS bei einer MOI von 5 zu keiner signifikanten Veränderung der MLC2a-P-Proteinmenge.

3.4.3 Adenoviraler smMLCK *Knockdown* auf mRNA-Ebene in NRCM

NRCM wurden entweder nur mit KM-Medium (= Negativkontrolle) oder mit den verschiedenen Adenoviren (MOI 2,5-20) für 49 h behandelt. Danach wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Eine quantitative RT-PCR mit TaqMan[®]-Sonden für $G\alpha_s$ zur Normalisierung und zur Quantifizierung der mRNA für smMLCK 130 kDa, smMLCK 220 kDa, MLC2a und MLC2v wurde im Anschluss durchgeführt.

Die smMLCK 220 kDa-mRNA-Bestimmung zeigte große Schwankungen und konnte aufgrund von zu hohen ct-Werten (mit über 35) nicht gewertet werden. Auch die anderen untersuchten Isoformen zeigten keine klare Virus-Dosis-Abhängigkeit, sodass dieser Versuch aufgrund seiner Ergebnisse als nicht aussagekräftig gewertet werden musste.

3.5 Charakterisierung des Modells: EHTs

Um die EHTs als funktionelles Modell für einen smMLCK *Knockdown* nutzen zu können, musste zunächst überprüft werden, ob sich am EHT-Modell auch ein α_1 -adrenerger positiv inotroper Effekt nachweisen lässt und ob dieser dann durch MLCK-Inhibitoren beeinflussbar ist. Dazu wurden EHTs ohne jegliche Intervention, d. h. auch ohne OptiMEM[®] (s. 2.6.4.5, Standard-Pipettierschema), hergestellt und anhand von Kontraktionsexperimenten untersucht.

3.5.1 Kontraktionsexperimente der EHTs: Der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt

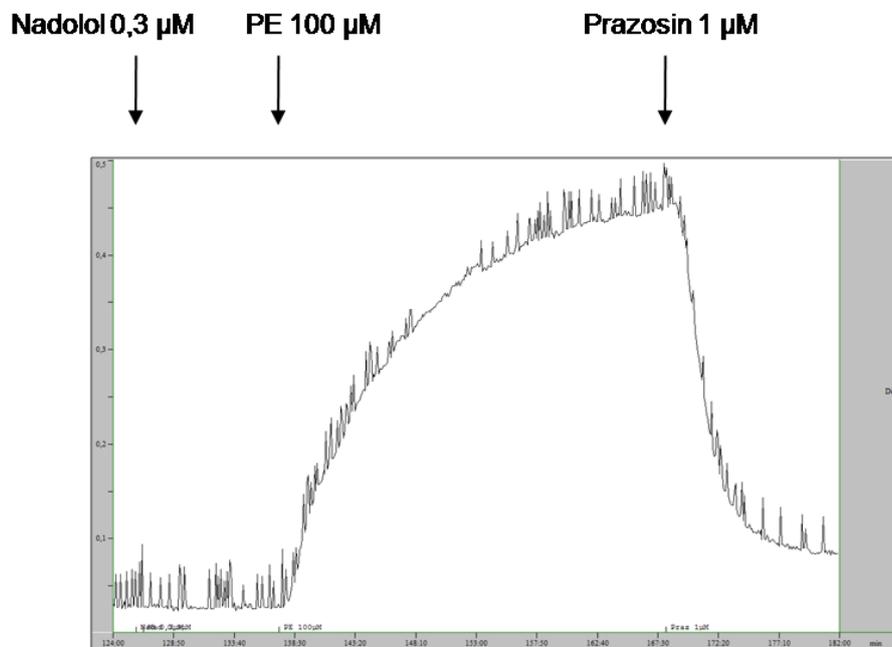


Abbildung 76: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes eines EHTs

Dargestellt ist ein Ausschnitt einer Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes von einem Standard-EHT. Gezeigt ist die Differenz der minimalen und maximalen Kraft in mN über den Zeitverlauf. Nach einmaliger Phenylephringabe von 100 µM kam es zu einem deutlichen positiv inotropen Effekt, der durch 1 µM des α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Prazosin nahezu aufgehoben werden konnte.

Somit ließ sich erstmalig auch in EHTs ein α_1 -adrenerger positiv inotroper Effekt zeigen, und das Modell konnte für einen funktionellen MLCK *Knockdown* und dessen Auswirkung auf den α_1 -adrenergen Effekt herangezogen werden.

3.5.2 Kontraktionsexperimente der EHTs: Die MLCK-Inhibition

Nachdem auch in EHTs der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt gezeigt werden konnte, sollte vor einem funktionellen MLCK *Knockdown* der Effekt einer MLCK-Inhibition durch pharmakologische Substanzen untersucht werden. Dazu wurden Standard-EHTs anhand von Kontraktionsexperimenten unter Einfluss von dem MLCK-Inhibitor ML-7 mit kumulativen Phenylephrinkonzentrationen untersucht.

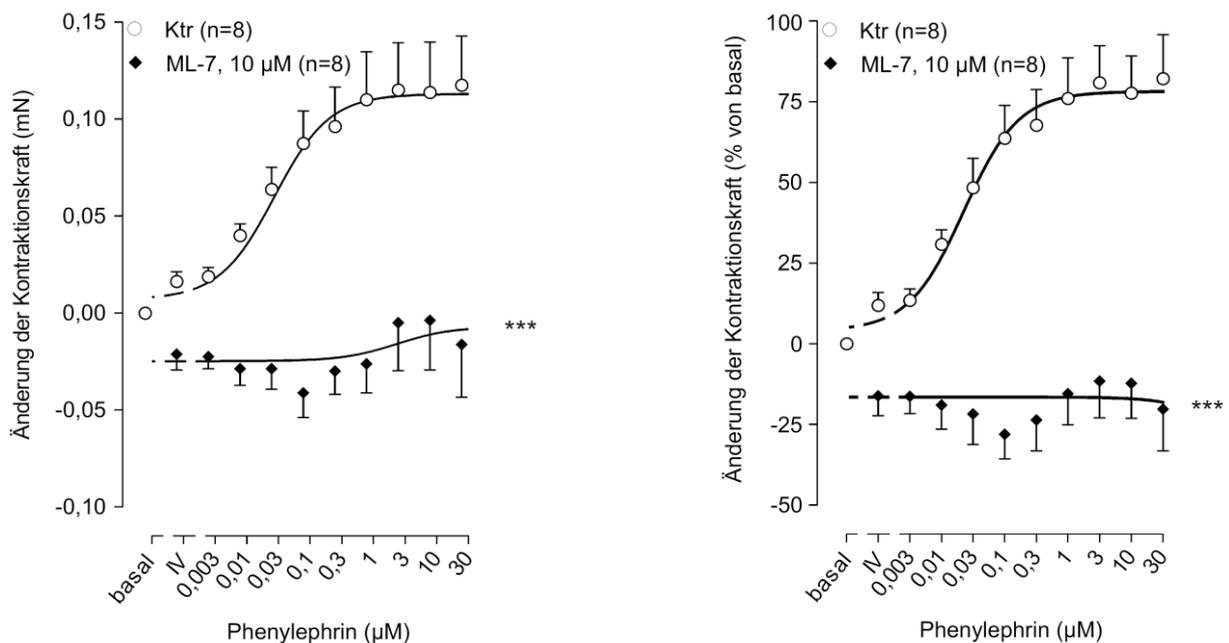


Abbildung 77: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit ML-7

Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 µM), IV = Intervention (ML-7, 10 µM oder DMSO). Es ist die Änderung der Kontraktionskraft im linken Teil der Abbildung und die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal im rechten Teil der Abbildung jeweils unter steigenden Konzentrationen von Phenylephrin und in An- bzw. Abwesenheit von 10 µM ML-7 dargestellt. Ausgangslage absolut: Ktr 0,16 mN, ML-7 0,18 mN. *** p < 0,001 vs. Ktr, ANOVA

ML-7 (10 µM) führte in Standard-EHTs zu einem deutlich abgeschwächten α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt nach Phenylephrin-Stimulation. Der Maximaleffekt war bei einer Phenylephrin-Konzentration von 3 µM erreicht. Die Kontrollgruppe wies eine Kontraktionskraft von 181% von basal auf, während die mit ML-7-behandelte Gruppe nur 88,4% von basal erreichte (p < 0,001, t-Test).

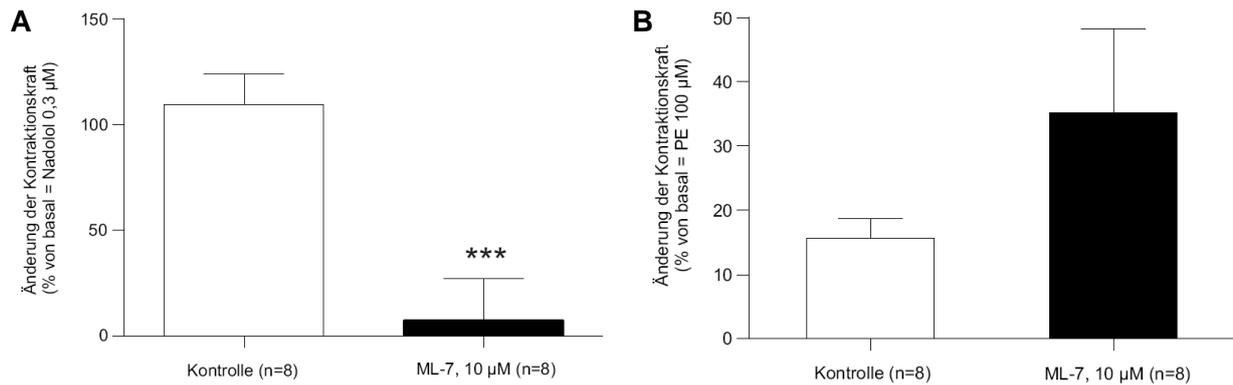


Abbildung 78: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7

Dargestellt ist der Effekt einer Einzelkonzentration Isoprenalin (10 µM) nach Abschluss der in Abbildung 77 gezeigten Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungskurve. Gezeigt ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal, hier die maximale Kontraktionskraft nach Gabe von 0,3 µM Nadolol (Abb. 78A) bzw. 30 µM Phenylephrin (Abb. 78B). Ausgangslage absolut: Abb. 78A Ktr 0,16 mN, ML-7 0,18 mN bzw. Abb. 78B Ktr 0,28 mN, ML-7 0,17 mN.

Der MLCK-Inhibitor ML-7 (10 µM) hatte unter diesen Versuchsbedingungen bei der Basiswertsetzung von Nadolol einen signifikanten Einfluss auf die von Isoprenalin vermittelte Kontraktionskraft in Standard-EHTs (ML-7 7,35% vs. Ktr 110%, *** p<0,001, t-Test). Bei der Ausganglagenberechnung nach Abschluss der PE-KWK zeigte sich kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen bzgl. des Isoprenalineffektes (ML-7 35,1% vs. Ktr 15,6%, ns., t-Test).

3.5.3 Einfluss der MLCK-Inhibition mittels ML-7 auf Protein-Ebene in EHTs

Nach Abschluss der Kontraktionsexperimente (s. 3.5.2) wurden die EHTs der Proteinisolierung zugeführt und nachfolgend Western Blots angefertigt.

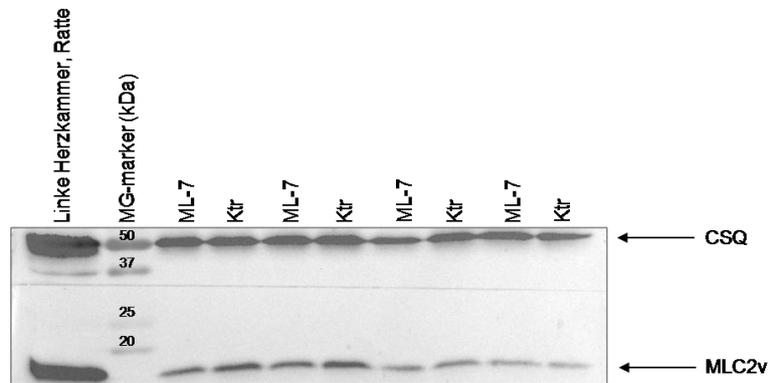


Abbildung 79: Western Blot von ML-7-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-MLC2v und Anti-CSQ

Ktr = Kontroll-EHT mit DMSO behandelt, ML-7 = mit 10 μ M ML-7-behandeltes EHT

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer MLCK-Inhibition mittels 10 μ M ML-7 an EHTs. Eine aus der linken Herzkammer der Ratte gewonnene Proteinprobe diente als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

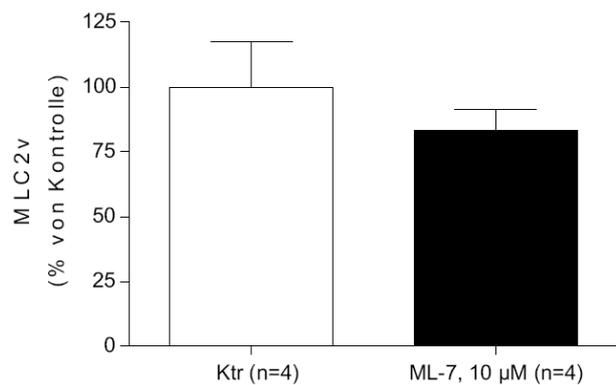


Abbildung 80: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 79 gezeigten Western Blot Membran

Dargestellt ist die MLC2v-Proteinmenge in % von Kontrolle. Die unbehandelten EHTs wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Eine Behandlung der EHTs mit 10 μ M ML-7 führte zu keiner signifikanten Veränderung der MLC2v-Proteinmenge vs. Kontrolle (t-Test).

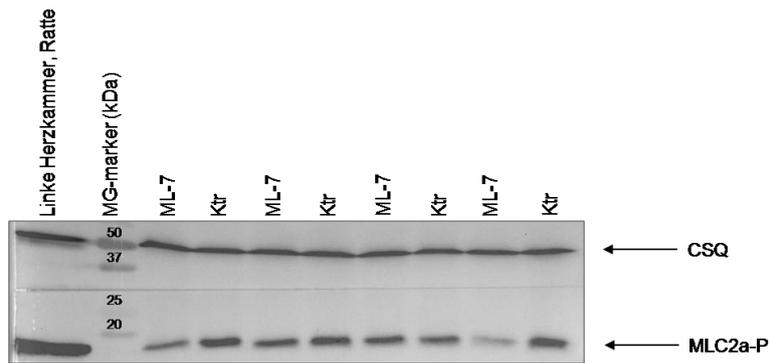


Abbildung 81: Western Blot von ML-7-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-MLC2a-P und Anti-CSQ

Ktr = Kontroll-EHT mit DMSO behandelt, ML-7 = mit 10 μ M ML-7-behandeltes EHT

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer MLCK-Inhibition mittels 10 μ M ML-7 an EHTs. Eine aus der linken Herzkammer der Ratte gewonnene Proteinprobe diente als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

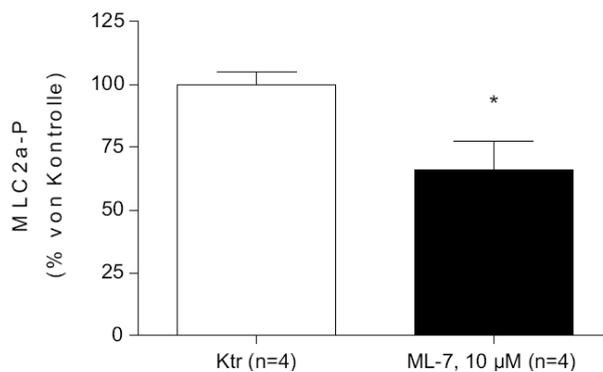


Abbildung 82: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 81 gezeigten Western Blot Membran

Dargestellt ist die MLC2a-P-Proteinmenge in % von Kontrolle. Die unbehandelten EHTs wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Gegenüber den Kontroll-EHTs führte eine Behandlung mit 10 μ M ML-7 zu einer Reduktion des Phospho-MLC2a (MLC2a-P)-Signals auf 66,0% (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, t-Test).

3.5.4 Adenovirale shRNA-Expression in EHTs

Standard-EHTs wurden am Tag 11 nach ihrer Herstellung für 1 h mit dem entsprechenden AV inkubiert. Danach wurden die EHTs auf getrennte (Ad-shRNA-NS von Ad-shRNA-smMLCK220) Abstandhalter transferiert und für weitere 8 Tage kultiviert.

3.5.5 Infektionsverlauf der adenoviral-infizierten EHTs

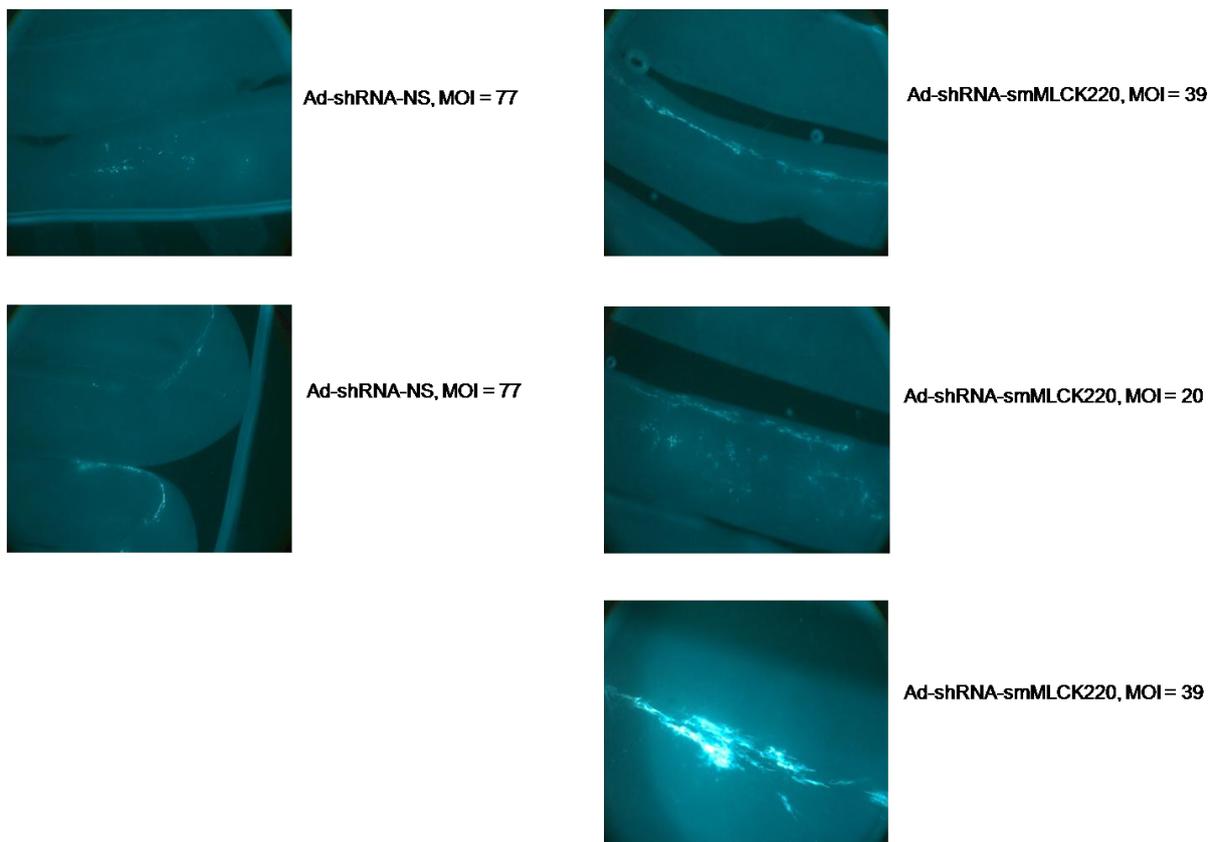


Abbildung 83: Adenovirale Infektion von EHTs

Gezeigt sind Fluoreszenzaufnahmen des GFPs der adenoviral-infizierten EHTs mit einer 2,5-fachen Vergrößerung (Fluoreszenzmikroskop) 8 Tage nach Infektion (MOI = 20 bzw. 39 für den Ad-shRNA-smMLCK220 und MOI = 77 für den Ad-shRNA-NS).

Die GFP-Expression war 8 Tage nach Infektion nur noch vereinzelt und schwach zu sehen. Da die Kontraktionsexperimente 8 Tage nach Infektion durchgeführt wurden, sind auch die Aufnahmen zu diesem Zeitpunkt angefertigt worden. Es schien jedoch so, dass die GFP-Expression 24-48 h nach Infektion bedeutend stärker war (nicht dargestellt). Diese

Ergebnisse lassen Zweifel an der Effizienz des gewählten experimentellen Ansatzes aufkommen.

3.5.5.1 Adenoviraler smMLCK Knockdown auf Protein-Ebene in EHTs

Das Adenovirus mit der shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 220 kDa der Maus wurde im Vergleich mit dem Nonsense Adenovirus in EHTs getestet. Die Viren wurden in einer MOI von 20/39 bzw. 39/77 eingesetzt (vgl. Abb. 83) und nach Abschluss der Kontraktionsexperimente der Proteinisolierung zugeführt. Nachfolgend wurden Western Blots im Hinblick auf die MLCK angefertigt.

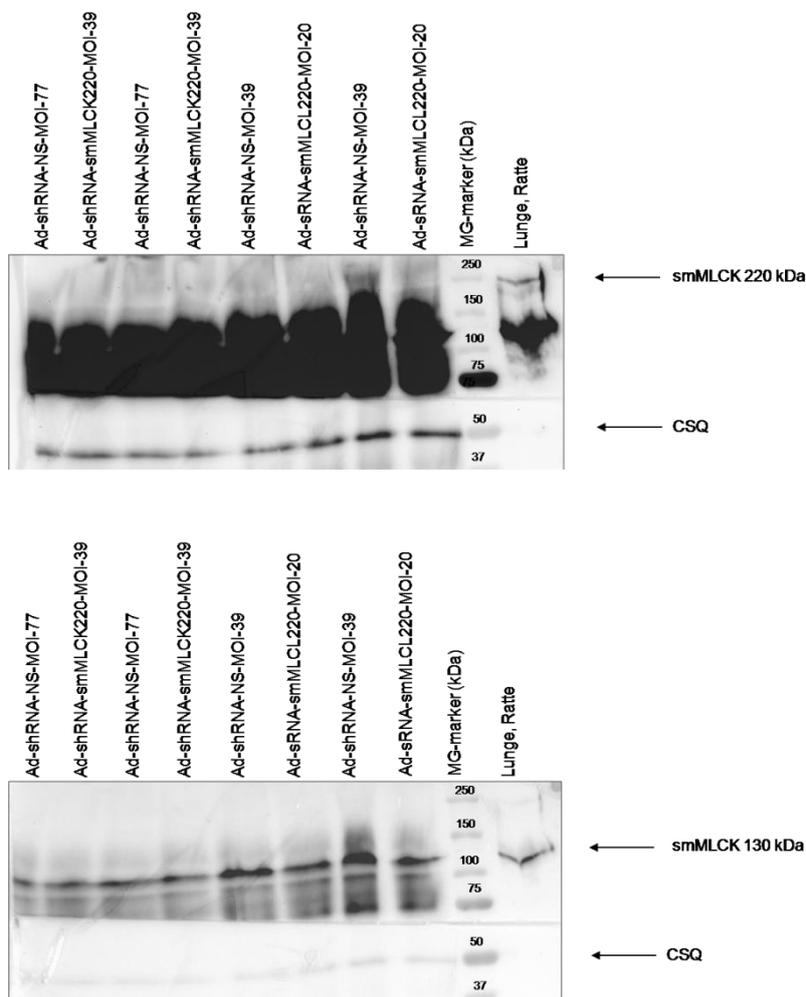


Abbildung 84: Western Blot von adenoviral-infizierten EHTs, inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer adenoviralen EHT-Behandlung mit einer MOI von 20/39 für den Ad-shRNA-smMLCK220 und einer MOI von 39/77 für den Ad-shRNA-NS. Dargestellt ist zweimal die gleiche Membran mit ↴

unterschiedlich langer Belichtungsdauer. Lungengewebe der Ratte diente als Positivkontrolle. Calsequestrin wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrations-bestimmung durchgeführt wurde.

Trotz extrem langer Belichtungsdauer und auch unter Anwendung eines Fotofilmes, konnte keine smMLCK 220 kDa auf Protein-Ebene in den EHTs detektiert werden. Es ist ein bekanntes Problem, dass große Proteine in EHTs nicht oder nur äußerst schwer mittels Western Blot nachgewiesen werden können, da der hohe Collagenanteil die Aufarbeitung erschwert.

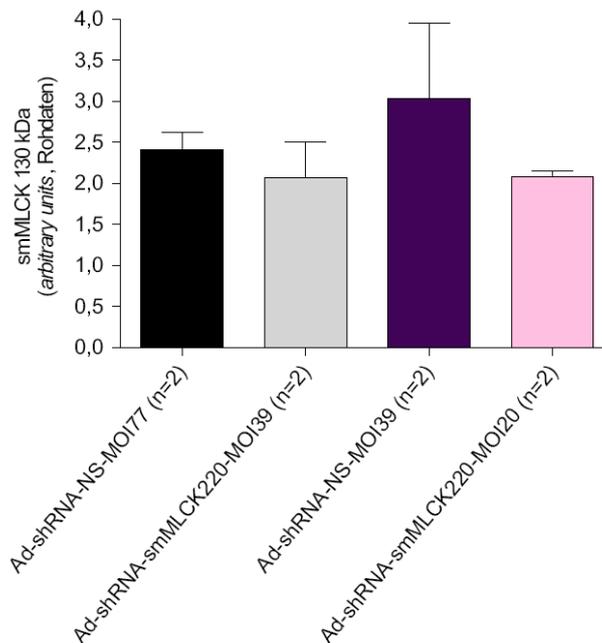


Abbildung 85: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 84 gezeigten Western Blot Membran

Dargestellt sind die Rohdaten der Auswertung (*arbitrary units*) der smMLCK130 kDa-Proteinmenge. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Das Ad-shRNA-smMLCK220 führte sowohl bei einer MOI von 39 als auch bei einer MOI von 20 zu einem Quotienten aus smMLCK130 kDa/CSQ von 2,07 (*arbitrary units*). Diese war im Vergleich zu den Quotienten bei den mit dem Ad-shRNA-NS-behandelten EHTs von 2,41 (MOI = 77) bzw. 3,01 (MOI = 39) tendenziell, aber nicht signifikant erniedrigt.

Mit dem Adenovirus konnte in NMCM und NRCM ein smMLCK *Knockdown* auf Protein-Ebene gezeigt werden, nicht jedoch auf mRNA-Ebene. Dieses war möglicherweise auch durch die Zytotoxizität der Adenoviren bedingt. In EHTs war die Effektivität der Adenoviren hinsichtlich der Infektion und der technischen Möglichkeiten dieser enttäuschend. Es ist jedoch anzunehmen, dass höhere Virustiter mit höherer Zytotoxizität verbunden sind und sich somit nachteilig auf das gesamte Konstrukt sowie seine Kontraktilität auswirken. Daher wurde ein neuer, lentiviraler Ansatz geplant. Lentiviren zeichnen sich durch eine sehr geringe Eigentoxizität aus, und somit konnten die EHTs am Tag ihrer Herstellung mit dem Virus infiziert werden, was zusätzlich einen genügend langen Zeitraum zum *Knockdown* brachte (s. 3.6).

3.6 Lentivirale shRNA-Expression

Es wurden neben Kontrollentiviren zwei verschiedene Lentiviren (E3 und E5 genannt) mit einem gegen die Sequenz der smMLCK 130 kDa (bzw. gegen die gesamte smMLCK, vgl. 2.3.1) gerichteten shRNA-exprimierenden Vektor hergestellt.

3.6.1 pLKO.1 Vektorüberprüfung

Die aus *E. coli* vermehrte Plasmid-DNA der verschiedenen lentiviralen shRNA-Sequenzen bzw. Empty-Kontrolle wurden nach Restriktionsverdau mit den Enzymen *Bam*HI und *Nde*I auf einem 1%igen Agarosegel überprüft (s. 2.2.5 und 2.2.6).

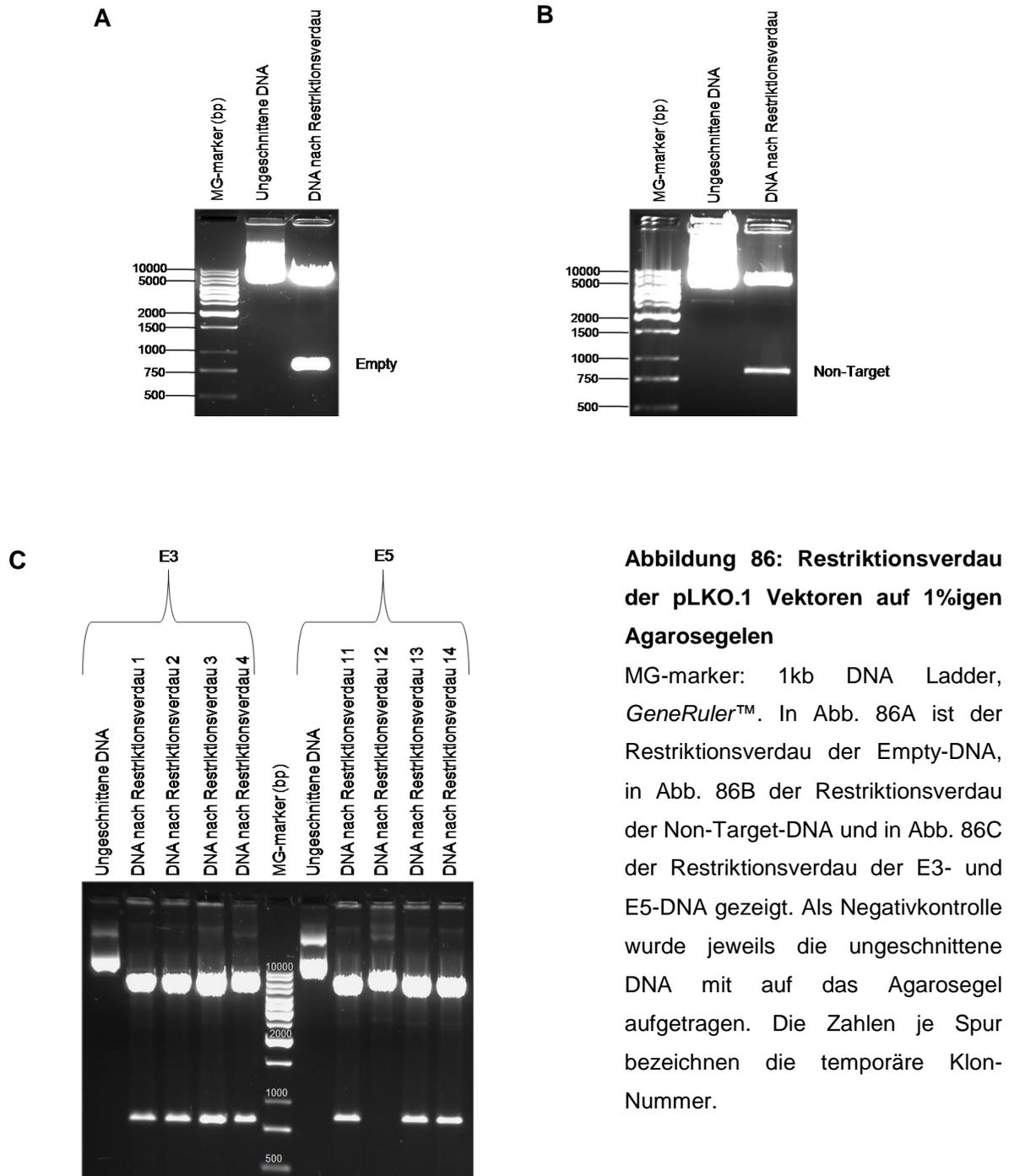


Abbildung 86: Restriktionsverdau der pLKO.1 Vektoren auf 1%igen Agarosegelen

MG-marker: 1kb DNA Ladder, *GeneRuler*TM. In Abb. 86A ist der Restriktionsverdau der Empty-DNA, in Abb. 86B der Restriktionsverdau der Non-Target-DNA und in Abb. 86C der Restriktionsverdau der E3- und E5-DNA gezeigt. Als Negativkontrolle wurde jeweils die ungeschnittene DNA mit auf das Agarosegel aufgetragen. Die Zahlen je Spur bezeichnen die temporäre Klon-Nummer.

Der ungeschnittene Vektor führte zu einer 7-10 kb großen Bande, die geschnittenen Vektoren zeigten eine erwartete Bande bei 6,3 kb und bei 794 bp für das *Insert*. Daher wurde bei E5 Klon-Nummer 12 als negativ gewertet. Für die Amplifikation der DNA wurde für E3 der Klon-Nummer 3 und für E5 Klon-Nummer 13 ausgewählt.

3.6.2 Sequenzierung der lentiviralen shRNA-Sequenz

Die aus Lentiviren isolierte und in cDNA umgeschriebene RNA wurde nach einer Amplifikation mittels RT-PCR einer DNA-Sequenzierung nach Sanger et al. (1977) unterzogen. Die Primer hierfür lagen entweder unmittelbar vor oder nach der einklonierten shRNA-Sequenz. Es konnte jeweils eine 100%ige Übereinstimmung mit der vom Hersteller angegebenen shRNA-Sequenz der E3-, E5- und Non-Target-Lentiviren nachgewiesen werden.

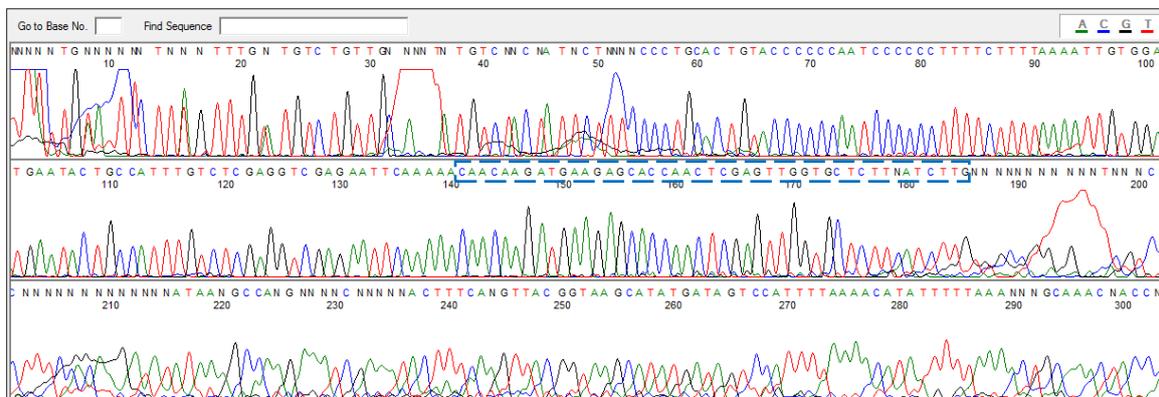


Abbildung 87: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für das Lentivirus Non-Target

In blaufarbigen, gestrichelten Linien umrandet, ist ein Teil der Non-Target-shRNA-Sequenz gezeigt. Dieses ist ein beispielhaftes Ergebnis einer Sequenzierung. Mehrfachbestimmungen wurden durchgeführt und zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit der gewählten, vom Hersteller angegebenen Sequenz.

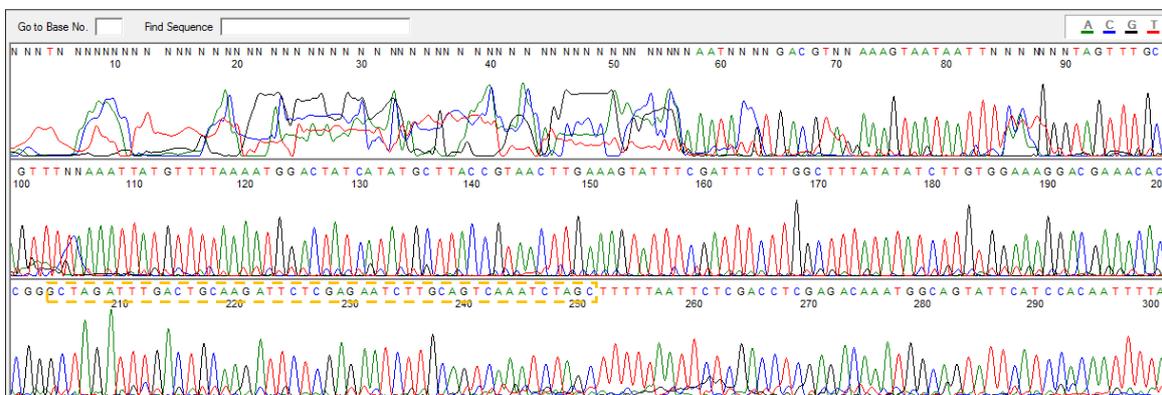


Abbildung 88: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für das Lentivirus E3 ↴

In orangefarbenen, gestrichelten Linien umrandet, ist die E3-shRNA-Sequenz gezeigt. Dieses ist ein beispielhaftes Ergebnis einer Sequenzierung. Mehrfachbestimmungen wurden durchgeführt und zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit der gewählten, vom Hersteller angegebenen Sequenz.

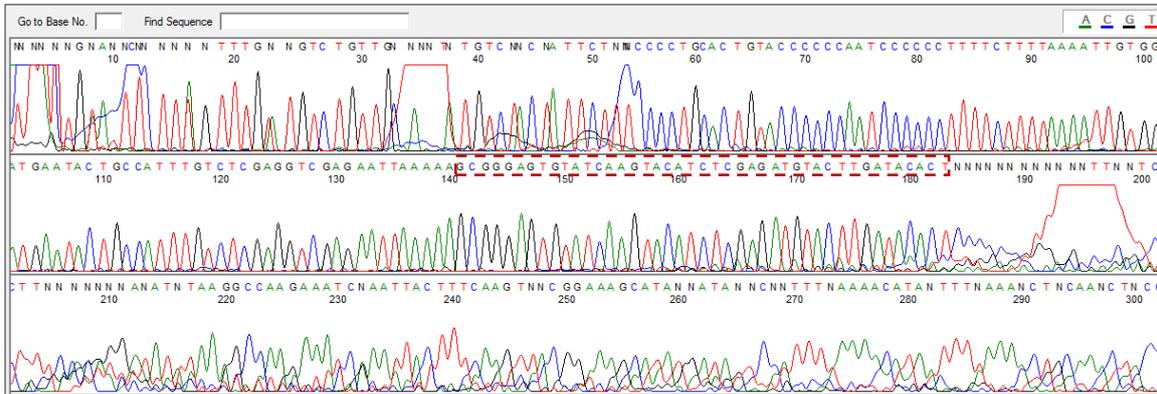


Abbildung 89: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für das Lentivirus E5

In dunkelrotfarbenen, gestrichelten Linien umrandet, ist ein Teil der E5-shRNA-Sequenz in der komplementären Abfolge gezeigt. Dieses ist ein beispielhaftes Ergebnis einer Sequenzierung. Mehrfachbestimmungen wurden durchgeführt und zeigten eine 100%ige Übereinstimmung mit der gewählten, vom Hersteller angegebenen Sequenz.

3.6.3 Lentiviraler smMLCK *Knockdown* auf mRNA-Ebene in NIH3T3-Zellen

Zur ersten Testung des lentiviral-vermittelten shRNA-*Knockdowns* der smMLCK wurden NIH3T3-Zellen für verschiedene Zeitspannen (24 h, 48 h und 7 Tage) mit den Lentiviren inkubiert und nach RNA-Isolierung und Gewinnung von cDNA anhand von quantitativer RT-PCR untersucht. Zur Quantifizierung des lentiviralen Effektes wurde smMLCK 130 kDa und zur Normalisierung GAPDH mittels TaqMan[®]-Sonden erfasst.

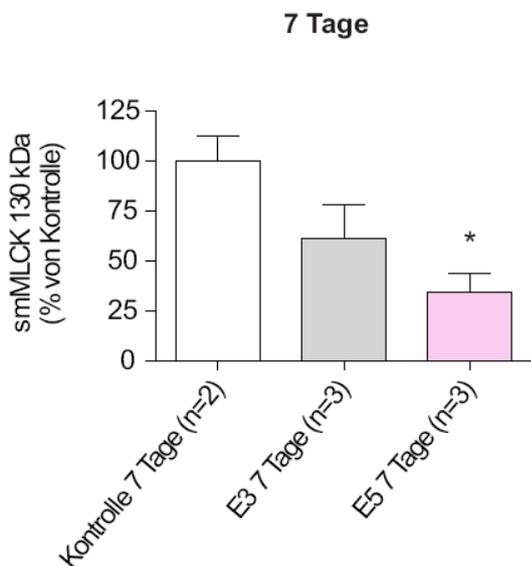
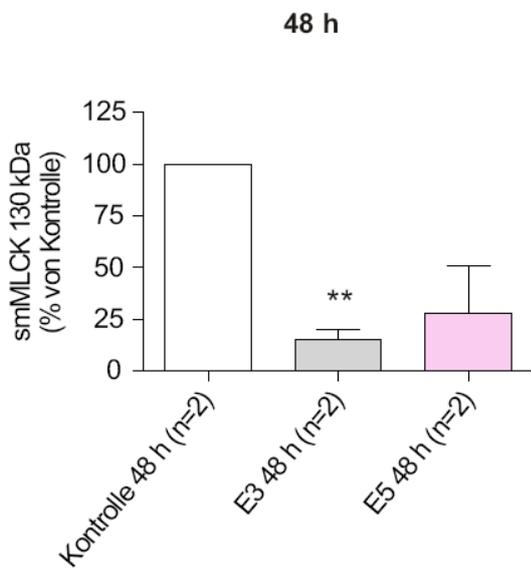
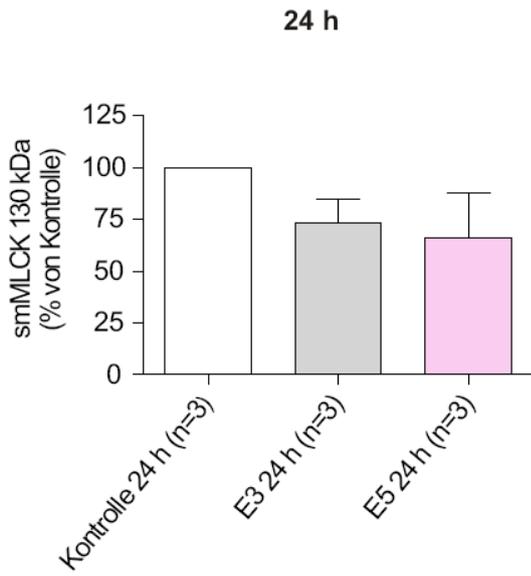


Abbildung 90: smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge von lentiviral-infizierten NIH3T3-Zellen

Dargestellt ist die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge zu unterschiedlichen Zeitpunkten aus lentiviral-infizierten NIH3T3-Zellen. Die unbehandelten NIH3T3-Zellen (= Kontrolle) wurden auf 100% normalisiert. Das „House-keeping gene“ GAPDH diente als Ladungskontrolle.

Die Lentiviren E3 und E5 zeigten in Vorversuchen mit der Mausfibroblastenzelllinie NIH3T3 eine mittels quantitativer RT-PCR nachgewiesene Reduktion der smMLCK 130 kDa nach 24 h auf 73,3% bzw. 66,0%. Nach 48 h konnte bei dem E3-Virus eine signifikante Reduktion der smMLCK 130 kDa auf 15,0% gezeigt werden (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle, t-Test). Die Reduktion durch das E5-Virus auf 28,0% war nicht signifikant ($p = 0,09$, ns. vs. Kontrolle, t-Test). Nach 7 Tagen Inkubationszeit mit den Lentiviren konnte in den E3-behandelten Zellen eine Reduktion der smMLCK 130 kDa auf 61,6% ($p = 0,20$, ns. vs. Kontrolle, t-Test) und in den E5-behandelten Zellen eine Reduzierung der mRNA-Menge auf 34,3% (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, t-Test) gezeigt werden.

Das eine Virus (E3, gegen die Sequenz der Ratte und Maus gerichtet) sollte zum Einsatz in EHTs kommen, um Aufschluss über funktionelle Auswirkungen zu erhalten. Dieses sollte ebenfalls mit den anderen Viren als Kontrollbedingung durchgeführt werden (Kontrolle = unbehandelte EHTs, Empty-Virus, Non-Target-Virus und als visuelle Kontrolle eGFP-Virus).

3.6.4 Lentiviraler smMLCK *Knockdown* in NRCM

Bevor die Lentiviren in EHTs zum Einsatz kommen sollten, musste die *Knockdown*-Effizienz in NRCM überprüft werden. Dazu wurden NRCM am Tag ihrer Isolierung (Tag 0) entweder mit OptiMEM® als Kontrolle, Empty-Lentivirus, Non-Target-Lentivirus, E3-Lentivirus, E5-Lentivirus oder eGFP-Lentivirus behandelt bzw. infiziert.

3.6.4.1 Infektionsverlauf lentiviral-infizierter NRCM

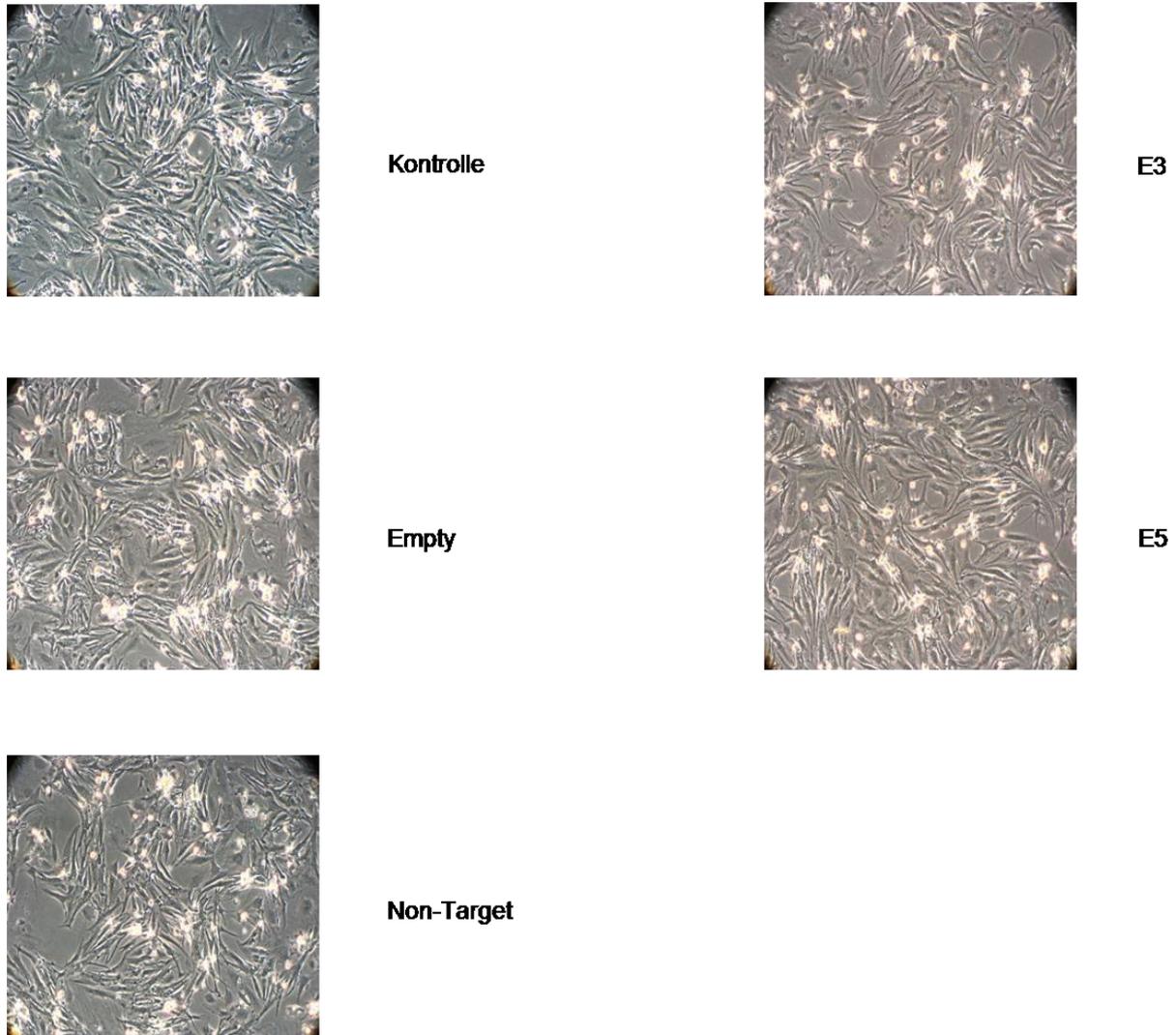


Abbildung 91: Lentivirale Infektion von NRCM

Gezeigt sind Phasenkontrastaufnahmen der lentiviral-infizierten NRCM und der mit OptiMEM[®] behandelten Kontrolle mit einer 20-fachen Vergrößerung (Phasenkontrastmikroskop) 131 h nach Infektion ($1,5 \cdot 10^6$ TU/ml).

Die Zellen unterschieden sich im Laufe der Kultivierungszeit morphologisch nicht voneinander. Die mit dem Virus E3 bzw. E5 infizierten Zellen schlugen jedoch mit einer auffallend langsameren Frequenz als die anderen Zellen.

3.6.4.2 Lentiviraler smMLCK *Knockdown* auf Protein-Ebene in NRCM

Am Tag 5,5 (136 h) nach Infektion der NRCM mit den verschiedenen Lentiviren bzw. OptiMEM® als Kontrolle wurden die Proteine isoliert und nachfolgend Western Blots angefertigt.

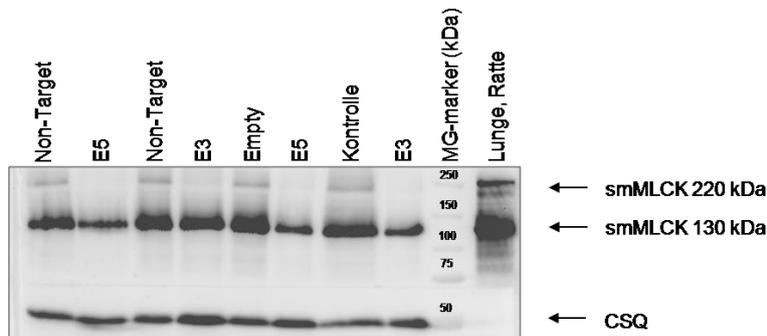


Abbildung 92: Western Blot von lentiviral-behandelten NRCM, inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer lentiviralen NRCM-Behandlung. Lungengewebe der Ratte diente als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Protein-konzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

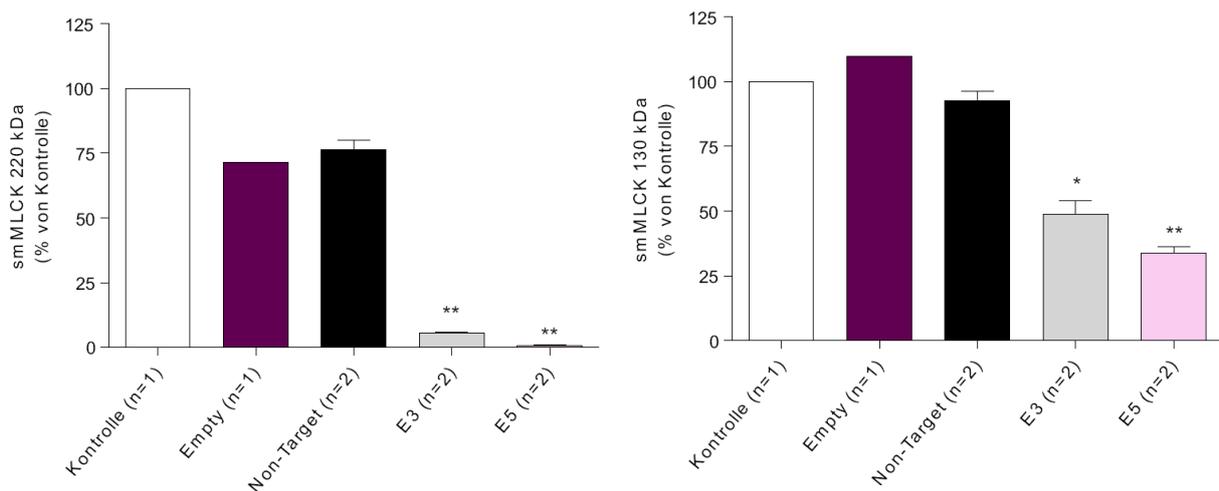


Abbildung 93: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 92 gezeigten Western Blot Membran

Dargestellt sind die smMLCK 220 kDa- und smMLCK 130 kDa-Proteinmengen in % von Kontrolle. Die unbehandelten NRCM wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Durch die lentivirale Behandlung der NRCM wurde die smMLCK 220 kDa-Proteinmenge auf 5,54% (** $p < 0,01$ vs. Non-Target, t-Test) in der E3-Gruppe und auf 0,61% (** $p < 0,01$ vs. Non-Target, t-Test) in der E5-Gruppe reduziert. Die Proteinexpression der smMLCK 130 kDa war in der E3-Gruppe auf 48,8% (* $p < 0,05$ vs. Non-Target, t-Test) und in der E5-Guppe auf 33,8% (** $p < 0,01$ vs. Non-Target, t-Test) zurückgegangen.

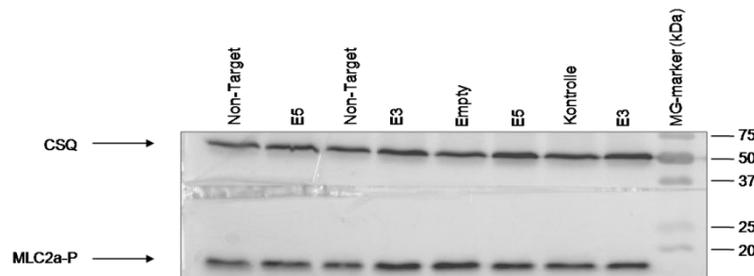


Abbildung 94: Western Blot von lentiviral-behandelten NRCM, inkubiert mit Anti-MLC2a-P und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer lentiviralen NRCM-Behandlung. Lungengewebe der Ratte diente als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

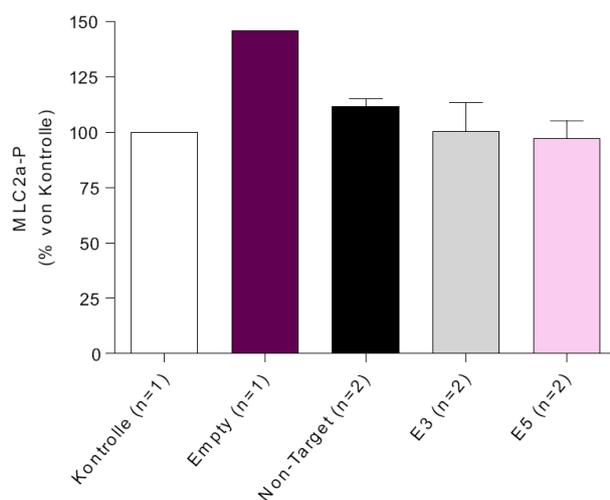


Abbildung 95: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 94 gezeigten Western Blot Membran

Dargestellt ist das MLC2a-P-Signal in % von Kontrolle. Die unbehandelten NRCM wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Die lentivirale Behandlung der NRCM hatte keinen signifikanten Einfluss auf das MLC2a-P-Signal.

3.6.4.3 Lentiviraler smMLCK *Knockdown* auf mRNA-Ebene in NRCM

3.6.4.3.1 Primer-Vergleich für den Assay der smMLCK 130 kDa der quantitativen RT-PCR

Da die lentivirale shRNA-Sequenz E3 teilweise homolog zu dem Vorwärtsprimer des ursprünglich konstruierten Assays der smMLCK 130 kDa für die quantitative RT-PCR ist, sollte mit einem neuen und einem weiteren, bereits vorhandenen Vorwärtsprimer die Spezifität des Assays getestet werden. Hierzu wurden mit dem Lentivirus E3 infizierte NRCM und die Kontrollen (nur mit OptiMEM® behandelt) einer RNA-Isolierung, folgender cDNA-Umschreibung und schließlich der quantitativen RT-PCR zugeführt. Es wurden drei verschiedene Mastermixe mit den unterschiedlichen Primer-Kombinationen hergestellt, wobei Primer 2 der ursprünglich verwendete war.

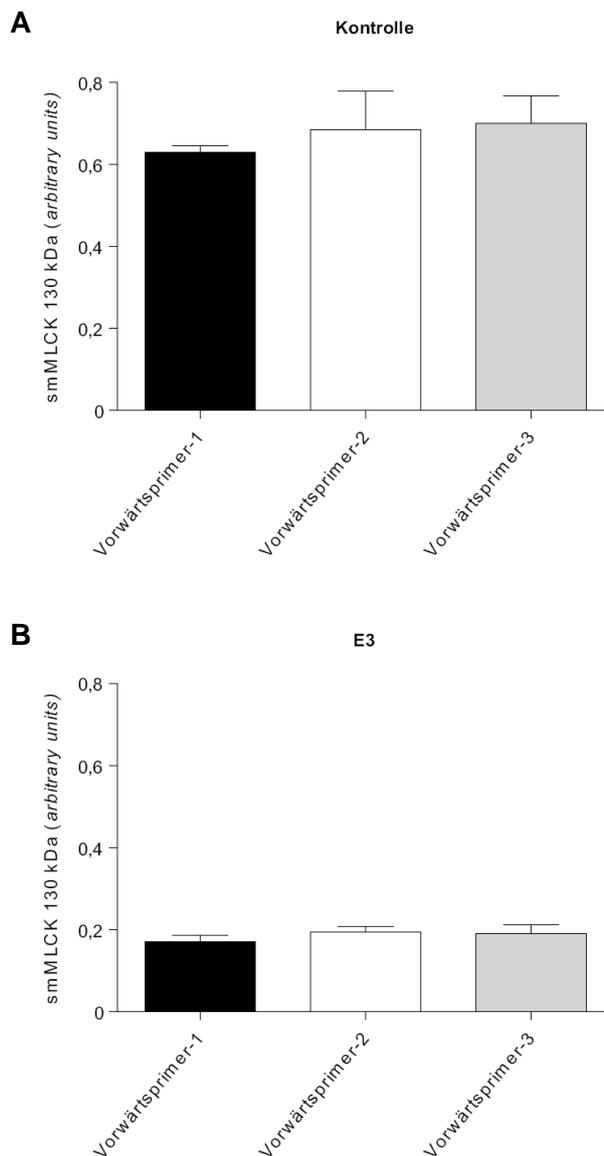


Abbildung 96: smMLCK 130 kDa-mRNA-Daten aus lentiviral-infizierten NRCM zum Zwecke des Primer-Vergleiches

Dargestellt ist exemplarisch die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge aus lentiviral-infizierten NRCM, n=2 je Gruppe. Das „Housekeeping gene“ $G\alpha_s$ diente als Ladungskontrolle. Die verschiedenen Säulen stellen die unterschiedlichen verwendeten Vorwärtsprimer des Assays dar. Der Rückwärtsprimer war jeweils identisch. In Abb. 96A sind die Rohdaten (*arbitrary units*) der Kontrolle der NRCM dargestellt, in Abb. 96B die Rohdaten der E3-behandelten NRCM.

Zwischen den drei verschiedenen Vorwärtsprimern konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Detektion der smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge mittels quantitativer RT-PCR festgestellt werden. Daher wurde weiterhin der ursprünglich konstruierte Primer 2 verwendet.

3.6.4.3.2 Einfluss verschiedener Viruskonzentrationen auf die smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge

Es sollte untersucht werden, ob verschiedene Konzentrationen an E3-Lentivirus einen unterschiedlich starken Effekt auf die mRNA-Menge, bzw. den *Knockdown* dieser, in NRCM haben. Dazu wurden NRCM am Tag 5 nach ihrer Isolierung mit entsprechenden Viruskonzentrationen infiziert (analog der Adenovirusinfektion von NRCM 48 h nach Isolation, s. 2.6.5.3), und nach weiteren 5 Tagen wurde die RNA isoliert. Nach Umschreibung der RNA in cDNA wurde diese der quantitativen RT-PCR zugeführt. Zur Quantifizierung des lentiviralen Effektes wurde smMLCK 130 kDa und zur Normalisierung $G\alpha_s$ mittels TaqMan[®]-Sonden erfasst.

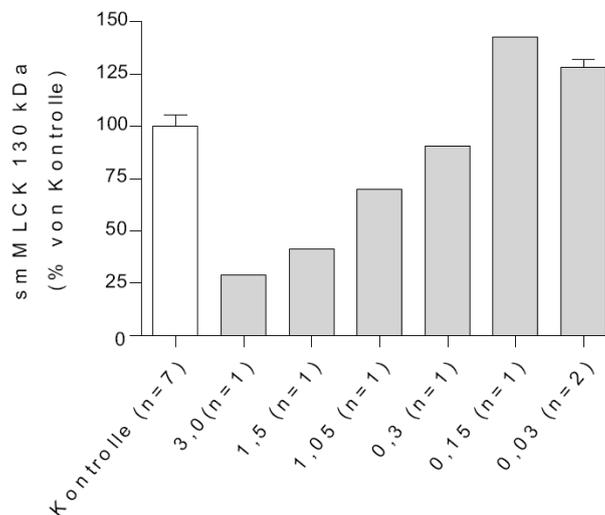


Abbildung 97: smMLCK 130 kDa-mRNA-Daten aus NRCM mit verschiedenen Titern an E3-Lentivius infiziert

Kontrolle = nur mit OptiMEM[®] behandelt. Gezeigt ist die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge aus lentiviral-infizierten NRCM. Die unbehandelten NRCM (= Kontrolle) wurden auf 100% normalisiert. Das „Housekeeping gene“ $G\alpha_s$ diente als Ladungskontrolle. Die Zahlen je grauer Säule bezeichnen den Titer des E3-Lentivirus, z. B. $3,0 \cdot 10^6$ TU/ml, $1,5 \cdot 10^6$ TU/ml, usw.. Aufgrund der zu geringen n-Zahl wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Obwohl keine statistische Auswertung vorgenommen werden konnte, lässt sich eindeutig eine E3-Lentivirustiter-abhängige Abnahme der smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge in den NRCM unter diesen Versuchsbedingungen beobachten.

3.6.4.3.3 Einfluss des lentiviralen smMLCK *Knockdowns* auf verschiedene Gene

Am Tag 5,5 (136 h) nach Infektion der NRCM ($1,5 \cdot 10^6$ TU/ml) mit den verschiedenen Lentiviren bzw. OptiMEM® als Kontrolle wurde die jeweilige RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Eine quantitative RT-PCR mit TaqMan®-Sonden für $G\alpha_s$ zur Normalisierung und zur Quantifizierung der mRNA für smMLCK 130 kDa, smMLCK 220 kDa, MLC2a und MLC2v wurde im Anschluss durchgeführt.

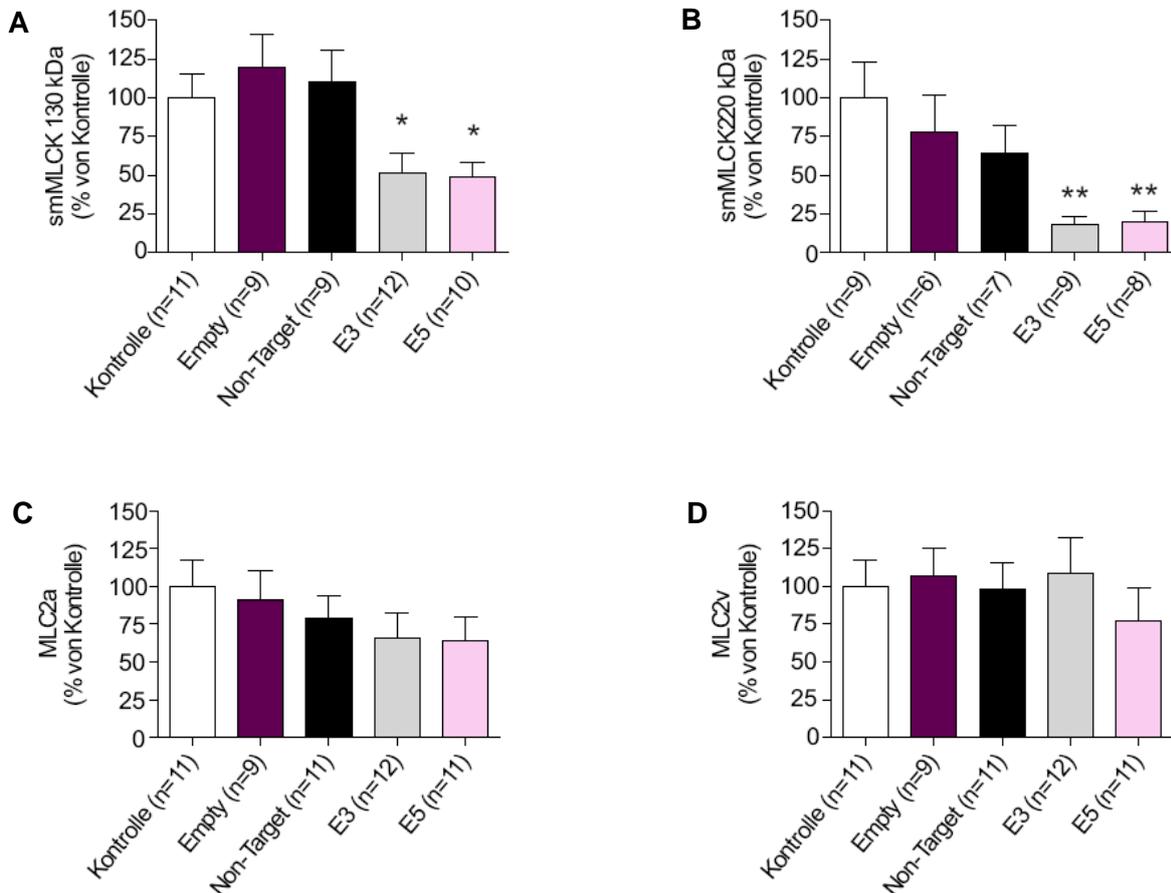


Abbildung 98: mRNA-Daten verschiedener Gene aus lentiviral-infizierten NRCM

Dargestellt ist die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene smMLCK 130 kDa- (Abb. 98A), smMLCK 220 kDa- (Abb. 98B), MLC2a- (Abb. 98C) und MLC2v- (Abb. 98D) mRNA-Menge aus lentiviral-infizierten NRCM. Die unbehandelten NRCM (= Kontrolle) wurden auf 100% normalisiert. Das „Housekeeping gene“ $G\alpha_s$ diente als Ladungskontrolle

Durch eine Behandlung der NRCM mit dem Lentivirus E3 ging die smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge auf 50,9% zurück (* $p < 0,05$). In den E5-behandelten Zellen konnte eine Reduzierung der smMLCK 130 kDa auf 49,1% detektiert werden (* $p < 0,05$). Die Inkubation mit den Lentiviren hatte ebenfalls einen Einfluss auf die mRNA-Menge der smMLCK 220 kDa, sie ging in den E3-behandelten NRCM auf 18,1% zurück (** $p < 0,01$). In den mit dem Lentivirus E5 infizierten Zellen konnte noch eine smMLCK 220 kDa-mRNA-Menge von 19,5% detektiert werden (** $p < 0,01$). Eine lentivirale Infektion der NRCM hatte weder auf die mRNA-Menge der MLC2a noch der MLC2v einen signifikanten Einfluss (ns.). Alle statistischen Analysen wurden als t-Test und vs. Kontrolle durchgeführt.

3.7 Funktioneller smMLCK *Knockdown* mittels lentiviraler shRNA-Expression

Nachdem in Vorversuchen an NIH3T3-Zellen und NRCM ein *Knockdown* der smMLCK mittels lentiviraler shRNA-Expression nachgewiesen werden konnte, wurden EHTs hergestellt und mit den verschiedenen Lentiviren infiziert, um eine funktionelle Aussage über den smMLCK *Knockdown* zu erhalten.

Dazu wurden verschiedene EHTs am Tag 0 entweder mit OptiMEM[®] als Kontrolle, Empty-Lentivirus, Non-Target-Lentivirus, E3-Lentivirus oder eGFP-Lentivirus behandelt bzw. infiziert ($1,5 \cdot 10^6$ TU/ml). Am Kulturtag 7 wurden die EHTs aus der Gussform auf einen Abstandhalter (statischen Stretcher) transferiert, und an den Kulturtagen 12 bis 14 wurden die Kontraktionsexperimente durchgeführt. Es wurde zunächst in Anwesenheit von $0,3 \mu\text{M}$ Nadolol die Phenylophrin-Konzentrations-Wirkungs-Kurve aufgezeichnet, und zum Abschluss wurde eine einmalige maximale Konzentration von Isoprenalin ($10 \mu\text{M}$) hinzugefügt. Anschließend wurde mehrfach gespült, um die zugegebenen Substanzen wieder auszuwaschen. Wenn sich die Kontraktionskraft der EHTs nicht mehr verändert hat, wurde mit der Aufzeichnung der Calcium-Konzentrations-Wirkungs-Kurve begonnen. Die eGFP-Gruppe diente nur als visuelle Kontrolle und wurde nicht in die Kontraktionsexperimente eingeschlossen. Nach Abschluss der Kontraktionsexperimente wurden die EHTs entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und für weitere Experimente bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert oder für die immunhistologische Aufarbeitung vorbereitet.

3.7.1 Infektionsverlauf der lentiviral-infizierten EHTs

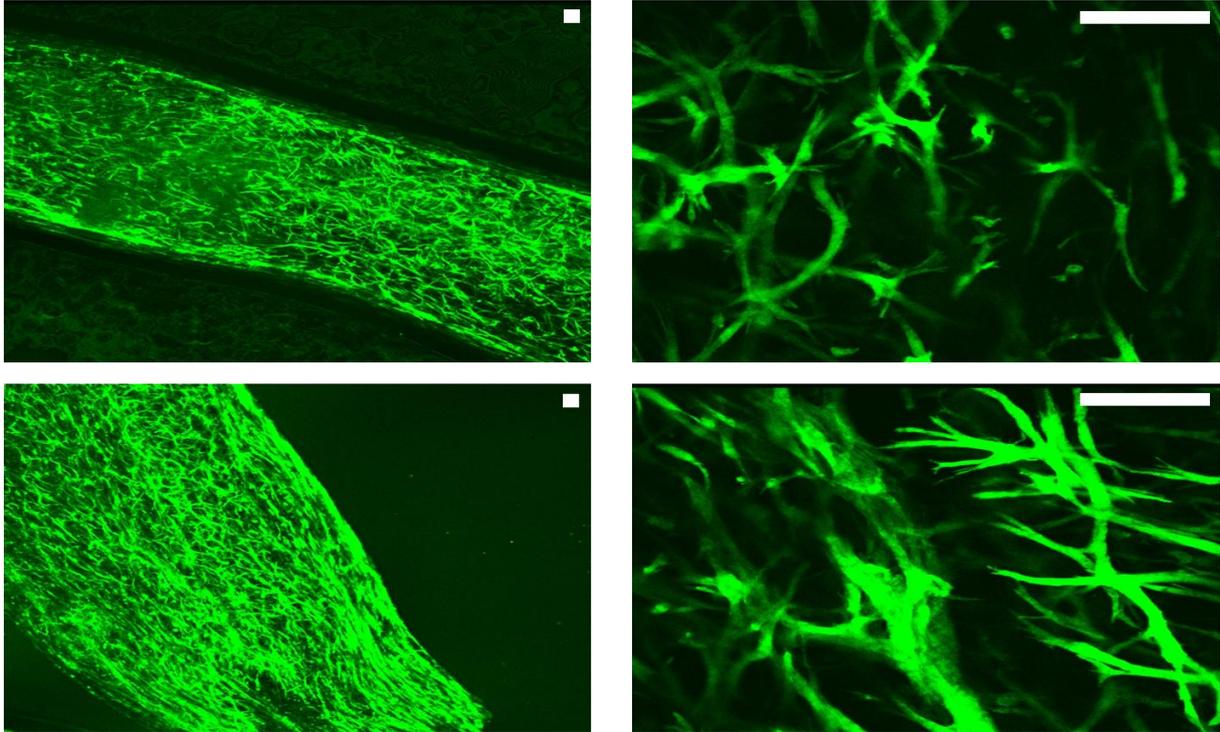


Abbildung 99: Mit eGFP-Lentivirus infiziertes EHT

Dargestellt ist ein mit dem eGFP-Lentivirus ($1,5 \cdot 10^6$ TU/ml) am Kulturtag 0 infiziertes EHT. Die Aufnahmen wurden mit einem konfokalen Lasermikroskop am Tag 13 nach Infektion erstellt. Skalierungsbalken = 100 μ m.

3.7.2 Einfluss des smMLCK *Knockdowns* auf den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt

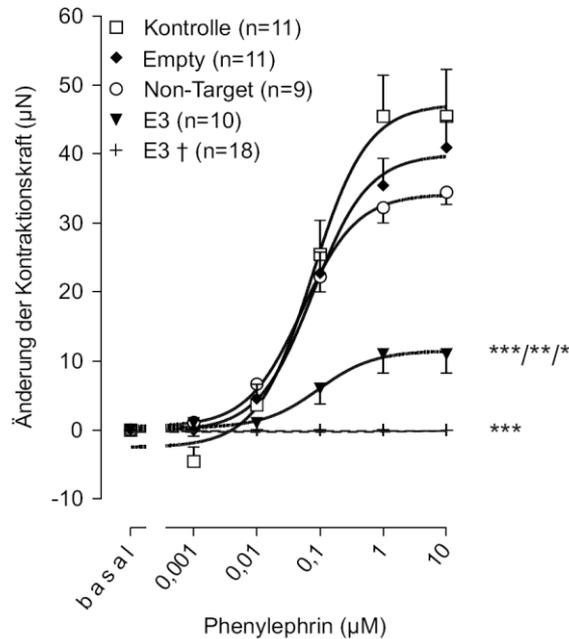


Abbildung 100: Effekt von Phenylephrin in verschiedenen lentiviral-behandelten EHTs bzw. Kontroll-EHTs

E3 † = mit dem Lentivirus E3 behandelte EHTs, die nach Ende der Kultivierungszeit nicht mehr geschlagen haben und auch durch starke elektrische Stimulation während der Kontraktionsexperimente nicht zum Schlagen erregt werden konnten. Basal = nach Nadolol-Gabe (0,3 µM). Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von steigenden Phenylephrinkonzentrationen. Ausgangslage absolut: Kontrolle 0,21 mN, Empty 0,15 mN, Non-Target 0,14 mN, E3 0,03 mN, E3 † 0,00 mN. E3 † *** $p < 0,001$ vs. Kontrolle, Empty und Non-Target, jeweils ANOVA sowie Scheffe Test.

Die mit dem Lentivirus E3 infizierten EHTs zeigten gegenüber den Kontroll-EHTs nicht nur basal eine geringe Kontraktionskraft, auch der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt nach maximaler Phenylephringabe war deutlich abgeschwächt. Im Vergleich zu den drei Kontrollgruppen, die sich untereinander nicht signifikant voneinander unterschieden, erreichte die E3-Gruppe nur 20% des maximalen Phenylephrineffektes (*** $p < 0,001$ vs. Kontrolle, ** $p < 0,01$ vs. Empty und * $p < 0,05$ vs. Non-Target, jeweils ANOVA sowie Scheffe Test). Viele der mit dem E3-Lentivirus infizierten EHTs schlugen gar nicht mehr (und konnten somit nicht in die Berechnung mit einbezogen werden) oder schlugen mindestens deutlich abgeschwächt im Vergleich zu allen drei Kontrollgruppen.

3.7.3 Einfluss des smMLCK *Knockdowns* auf den β -adrenergen Effekt

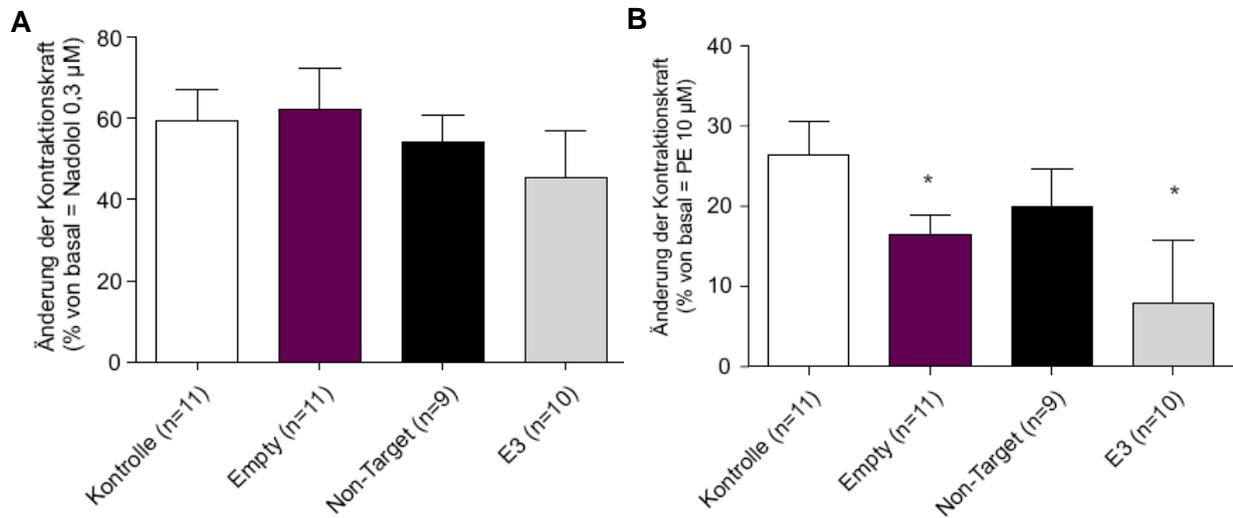


Abbildung 101: Effekt von Isoprenalin in verschiedenen lentiviral-behandelten EHTs bzw. Kontroll-EHTs

Dargestellt ist die Änderung der Kontraktionskraft nach einmaliger Gabe von Isoprenalin (10 µM) in % von basal nach Abschluss der in Abbildung 100 gezeigten PE-KWK. Als Basiswert wurde in Abb. 101A der Nadolol-Wert 0,3 µM gesetzt, in Abb. 101B der PE-Wert 10 µM. Ausgangslage absolut Abb. 101A Kontrolle 0,21 mN, Empty 0,15 mN, Non-Target 0,14 mN, E3 0,03 mN bzw. Abb. 101B Kontrolle 0,26 mN, Empty 0,20 mN, Non-Target 0,17 mN, E3 0,04 mN.

Wird der Zeitpunkt nach Nadolol-Gabe als Basis genommen, so hat der smMLCK *Knockdown* unter diesen Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die β -adrenerg-vermittelte Kontraktionskraft (Kontrolle 59,3%, Empty 62,2%, Non-Target 54,3%, E3 45,5%, jeweils ns. vs. Kontrolle, t-Test). Bei der Basiswertsetzung von PE = 10 µM erreichte die E3-behandelte Gruppe nach Isoprenalin-Gabe 8,0% Kontraktionskraft von basal vs. 26,4% in der Kontrollgruppe (* p<0,05 vs. Kontrolle, t-Test). Bei diesen Berechnungen muss aber der deutlich geringere Basalwert in der E3-Gruppe einschränkend berücksichtigt werden. Unerwartet signifikant unterschied sich bei der Berechnung mit dem Basalwert von PE = 10 µM auch die Empty-Gruppe von der Kontrollgruppe (16,4% vs. 26,4%, * p<0,05 vs. Kontrolle, t-Test). Auch die Gabe von 10 µM Isoprenalin konnte in der Gruppe E3 † zu keiner Auslösung von Kontraktionen führen. Somit konnten diese 18 EHTs nicht in obige Berechnung mit einbezogen werden.

3.7.4 Einfluss des smMLCK *Knockdowns* auf den Calciumeffekt

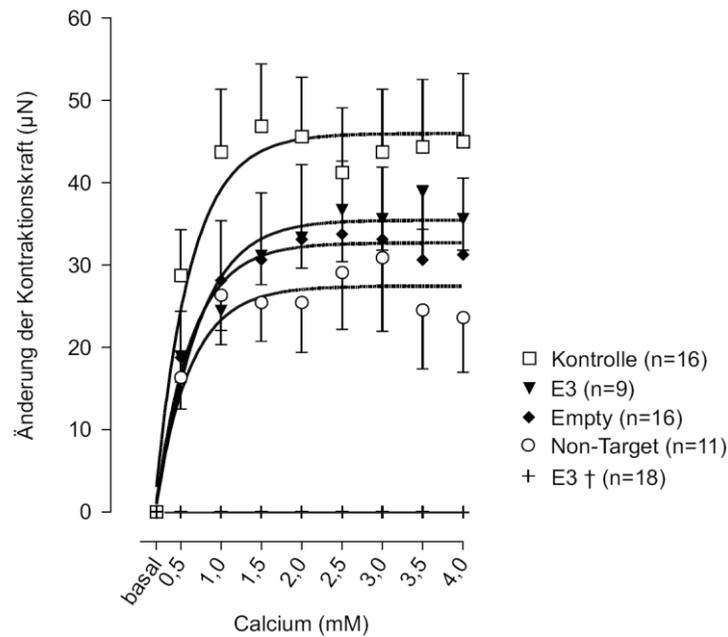


Abbildung 102: Effekt von Calcium in verschiedenen lentiviral-behandelten EHTs bzw. Kontroll-EHTs

E3 † = mit dem Lentivirus E3 behandelte EHTs, die nach Ende der Kultivierungszeit nicht mehr geschlagen haben und auch durch starke elektrische Stimulation während der Kontraktionsexperimente nicht zum Schlagen erregt werden konnten. Basal = 0,2 mM Calcium. Gezeigt ist die Änderung der Kontraktionskraft in Abhängigkeit von steigenden Calciumkonzentrationen. Ausgangslage absolut: Kontrolle 0,19 mN, Empty 0,17 mN, Non-Target 0,15 mN, E3 0,06 mN, E3 † 0,00 mN.

Die Calciumkurven unterschieden sich im Vergleich zu den Phenylephrinkurven nicht signifikant voneinander.

3.7.5 Lentiviraler smMLCK *Knockdown* auf Protein-Ebene in EHTs

Aus den unter 3.7.2 bis 3.7.4 beschriebenen EHTs wurden Proteine isoliert und Western Blots u. a. mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form der vorhofspezifischen Myosin-Leichtkette (MLC2a-P) angefertigt. Als Ladungskontrolle wurde der Antikörper Calsequestrin (CSQ) verwendet. Der MLC2a-P-Antikörper wurde von uns zwar als vorhofspezifische Form konstruiert, er zeigte jedoch in Experimenten mit Herzkammerngewebe (wie den EHTs) auch eine eindeutige Reaktion (vgl. z. B. Abb. 81), sodass

er für die Charakterisierung des Phosphorylierungsstatus der MLC2 im Allgemeinen herangezogen wurde. In Versuchen anderer Mitglieder des Arbeitsbereiches Experimentelle Pharmakologie im UKE wurden mit diesem Antikörper aus einem Gesamthomogenat des Herzens zwei Banden mittels Western Blot nachgewiesen, was die Doppelspezifität belegt.

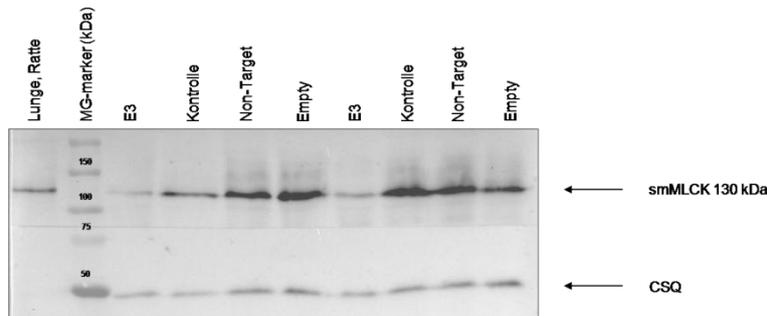


Abbildung 103: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer lentiviralen EHT-Behandlung mit Hinblick auf das Protein MLCK. Lungengewebe der Ratte diente als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

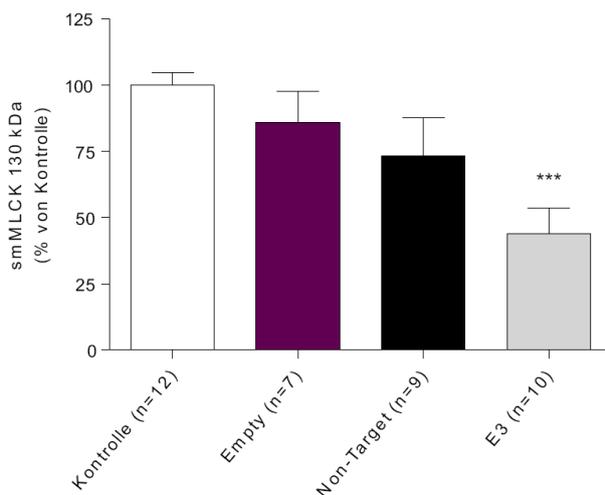


Abbildung 104: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 103 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran

Gezeigt sind die smMLCK 130 kDa-Proteinmengen in % von Kontrolle. Die unbehandelten EHTs wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Eine lentivirale Behandlung hat in den E3-behandelten EHTs zu einer Herunterregulation der smMLCK 130 kDa-Proteinmenge auf 43,9% (***) $p < 0,001$ vs. Kontrolle, t-Test) geführt.

3.7.5.1 Effekte eines MLC2 *Knockdowns* mittels lentiviraler shRNA-Expression auf den Proteingehalt von MLC2 und MLC2a-P

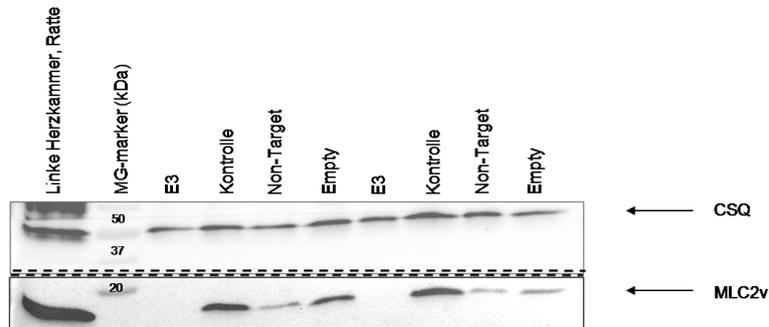


Abbildung 105: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-MLC2v und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer lentiviralen EHT-Behandlung mit Hinblick auf das Protein MLC2v. Eine Proteinprobe von Gewebe aus der linken Herzkammer diene als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

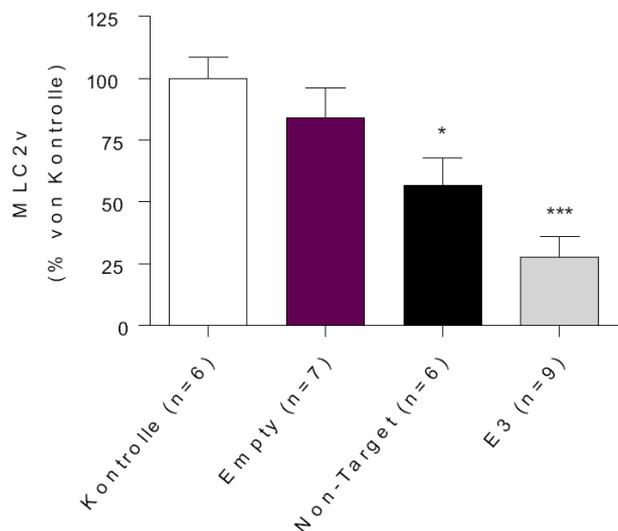


Abbildung 106: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 105 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran

Gezeigt sind die MLC2v-Proteinmengen in % von Kontrolle. Die unbehandelten EHTs wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Eine lentivirale Behandlung der EHTs führte unerwarteterweise in der E3-Gruppe zu einer Proteinmengenreduktion der MLC2v auf 27,7% (** $p < 0,001$ vs. Kontrolle, t-Test). Auch die Reduktion in der Non-Target-Gruppe war signifikant mit einer Reduktion auf 56,6% (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, t-Test).

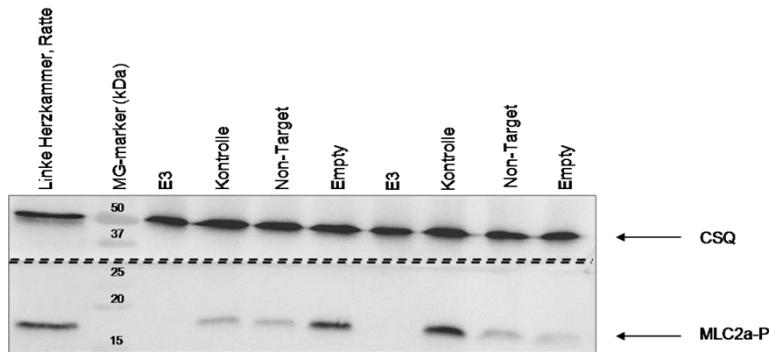


Abbildung 107: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-MLC2a-P und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer lentiviralen EHT-Behandlung mit Hinblick auf das Protein MLC2a-P. Eine Proteinprobe von Gewebe aus der linken Herzkammer diente als Positivkontrolle. CSQ wurde als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

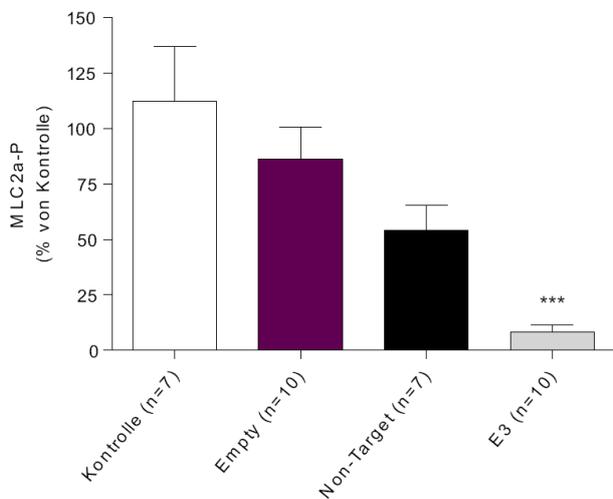


Abbildung 108: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 107 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran

Gezeigt sind die MLC2a-P-Proteinmengen in % von Kontrolle. Die unbehandelten EHTs wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Eine lentivirale Behandlung der EHTs führte in der E3-Gruppe zu einer Proteinmengenreduktion der MLC2a-P auf 8,47% (***) $p < 0,001$ vs. Kontrolle, t-Test).

3.7.5.1.1 Auffälliges Bandenmuster in der Coomassiefärbung

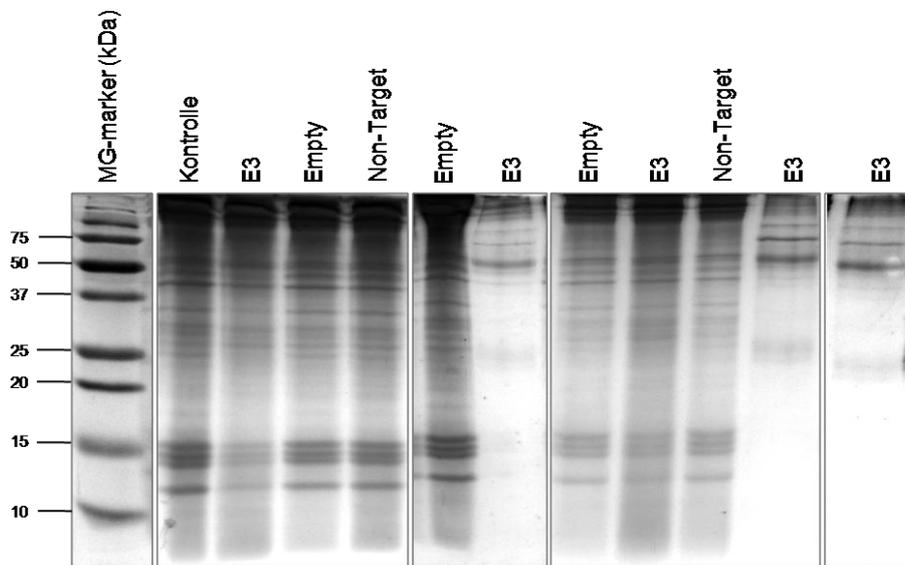


Abbildung 109: Coomassiegefärbte Gele nach Transfer auf Nitrocellulose Membran

Gezeigt sind verschiedene SDS-Polyacrylamidgelausschnitte einer Kontrollfärbung mit Coomassie Brilliantblau-Lösung nach dem erfolgten Transfer auf Nitrocellulose Membran.

Da routinemäßig alle Gele nach einem Transfer auf die Nitrocellulose Membran mit einer Coomassie Brilliantblau-Lösung angefärbt wurden, fiel hier das besondere Bandenmuster in den E3-behandelten EHTs auf. Im Vergleich zu den Kontroll-EHTs ist zum einen der Bereich um 15 kDa auffällig verdünnt, und der obere Bereich scheint atypisch verschoben zu sein.

3.7.5.2 Effekte eines MLCK *Knockdowns* mittels lentiviraler shRNA-Expression auf den Proteingehalt kardialer Strukturproteine

Um zu überprüfen, inwieweit die verschiedenen Lentiviren und insbesondere der MLCK *Knockdown* die Regulationsmechanismen und die Funktion der zellulären Prozesse beeinflussen, wurde die Proteinexpression mit Antikörpern gegen herzspezifische Proteine, welche in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind, analysiert. CSQ wurde jeweils als Ladungskontrolle mitgeführt, da die Beladung der Gele ohne vorherige Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt wurde.

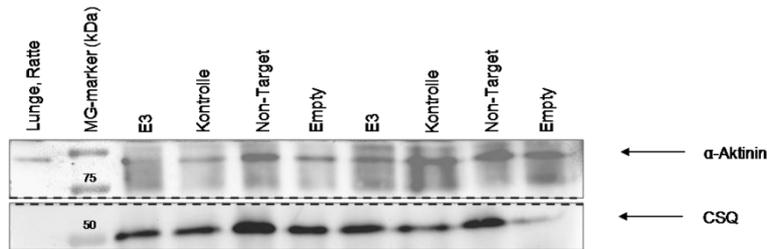


Abbildung 110: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti- α -Aktinin und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer lentiviralen EHT-Behandlung mit Hinblick auf das Protein α -Aktinin. Eine Proteinprobe vom Gewebe der Lunge diente als Positivkontrolle.

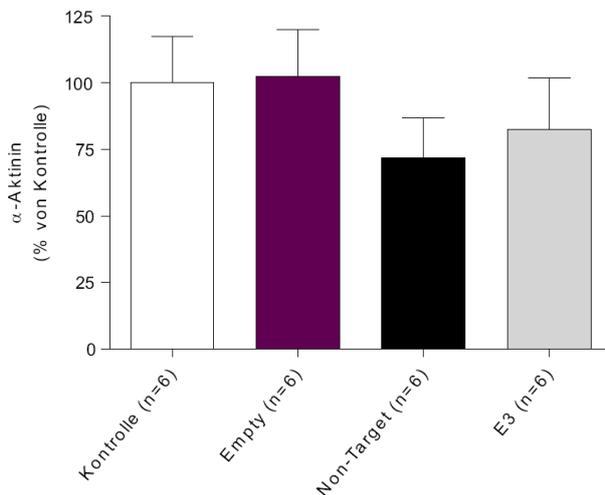


Abbildung 111: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 110 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran

Gezeigt sind die α -Aktinin-Proteinmengen in % von Kontrolle. Die unbehandelten EHTs wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Die Infektion der EHTs mit verschiedenen Lentiviren sowie der smMLCK *Knockdown* hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinmenge des α -Aktinins.

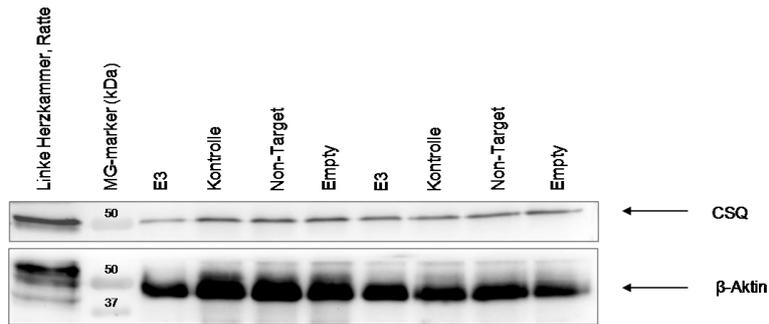


Abbildung 112: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti- β -Aktin und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer lentiviralen EHT-Behandlung mit Hinblick auf das Protein β -Aktin. Eine Proteinprobe vom Gewebe aus der linken Herzkammer diente als Positivkontrolle.

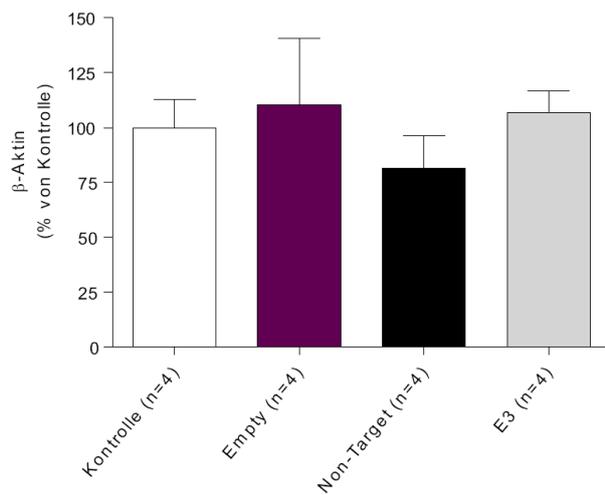


Abbildung 113: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 112 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran

Gezeigt sind die β -Aktin-Proteinmengen in % von Kontrolle. Die unbehandelten EHTs wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Die Infektion der EHTs mit verschiedenen Lentiviren und insbesondere der smMLCK *Knockdown* veränderten die Proteinmenge des β -Aktins nicht signifikant.

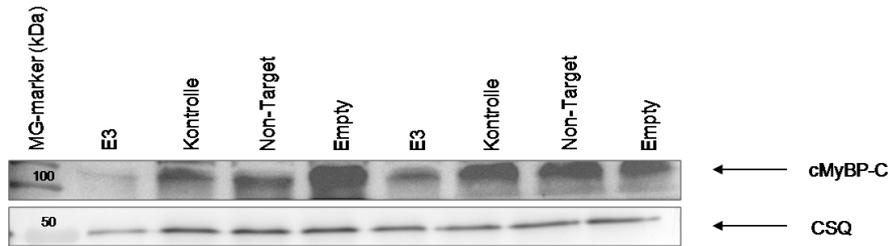


Abbildung 114: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-cMyBP-C und Anti-CSQ

Gezeigt ist ein exemplarischer Western Blot für die durchgeführten Versuche in Mehrfachbestimmung einer lentiviralen EHT-Behandlung mit Hinblick auf das Protein cMyBP-C.

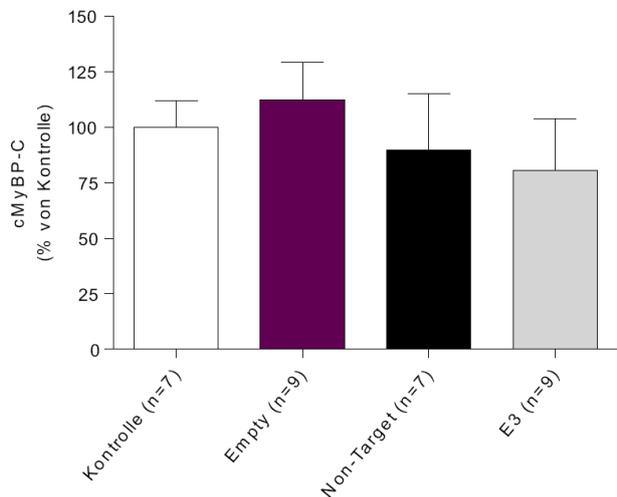


Abbildung 115: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 114 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran

Gezeigt sind die cMyBP-C-Proteinmengen in % von Kontrolle. Die unbehandelten EHTs wurden auf 100% normalisiert. CSQ diente als Ladungskontrolle.

Die Infektion der EHTs mit verschiedenen Lentiviren und insbesondere der smMLCK *Knockdown* hatten keinen signifikanten Einfluss auf die Proteinmenge des kardialen Myosin-bindenden Protein-C. Das cMyBP-C-Signal der E3-Gruppe erscheint teilweise stärker reduziert auf der Western Blot Membran, die densitometrischen Messungen und Mehrfachbestimmungen konnten dieses jedoch nicht bestätigen.

Auch wenn auf die kardialen Strukturproteine hier kein Einfluss festgestellt werden konnte, so schien die Proteinmenge insgesamt in den E3-EHTs reduziert zu sein, da meistens auch das Calsequestrin (trotz identischen Probevolumens) leicht verringert war. Diese Beobachtung passt zu dem Gesamteindruck der konfokalen Lasermikroskopie (vgl. 3.8), denn obwohl die Zellstruktur nicht verändert war, schien das gesamte E3-EHT über weniger Zellen zu verfügen als das Non-Target-EHT.

3.7.6 Lentiviraler smMLCK *Knockdown* auf mRNA-Ebene in EHTs

Aus den unter 3.7.2 bis 3.7.4 beschriebenen EHTs wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Eine quantitative RT-PCR mit TaqMan[®]-Sonden für $G\alpha_s$ zur Normalisierung und zur Quantifizierung der mRNA für smMLCK 130 kDa, smMLCK 220 kDa, MLC2a und MLC2v wurde im Anschluss durchgeführt.

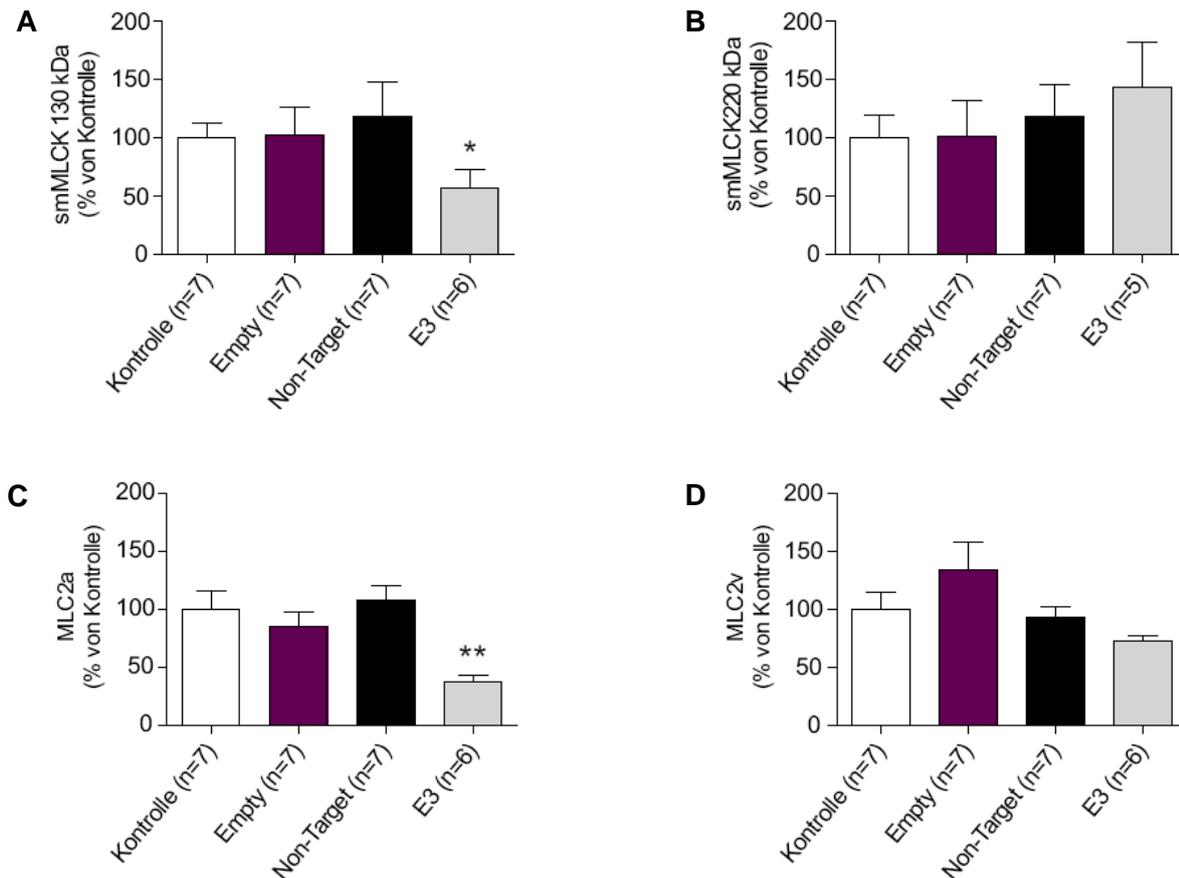


Abbildung 116: mRNA-Daten verschiedener Gene aus lentiviral-infizierten EHTs

Dargestellt ist die mittels quantitativer RT-PCR erhaltene smMLCK 130 kDa- (Abb. 116A), smMLCK 220 kDa- (Abb. 116B), MLC2a- (Abb. 116C) und MLC2v- (Abb. 116D) mRNA-Menge aus lentiviral-infizierten EHTs. Die unbehandelten EHTs (= Kontrolle) wurden auf 100% normalisiert. Das „Housekeeping gene“ $G\alpha_s$ diente als Ladungskontrolle.

Durch eine Behandlung der EHTs mit dem Lentivirus E3 ging die smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge auf 57,5% zurück (* $p < 0,05$ vs. Kontrolle, t-Test). Die Inkubation mit den Lentiviren reduzierte die mRNA-Menge der MLC2a in den E3-behandelten EHTs auf 37,5% (** $p < 0,01$ vs. Kontrolle, t-Test). Eine lentivirale Infektion der EHTs hatte weder auf die mRNA-Menge der smMLCK 220 kDa noch der MLC2v einen signifikanten Einfluss (ns. vs. Kontrolle, t-Test).

3.8 Immunfluoreszenz

Zur Beurteilung der Morphologie von Kardiomyozyten in EHTs wurde α -sarkomerisches Aktinin, ein in der Z-Bande (*disc*) lokalisiertes sarkomerisches Protein, mittels Immunfluoreszenz dargestellt. Ebenfalls immunhistologisch nachgewiesen wurde das kardiale Myosin-bindende Protein-C (cMyBP-C), welches zu einer Gruppe von Proteinen gehört, denen in quer gestreifter Muskulatur regulatorische und strukturbindende Funktionen zugeschrieben werden. Es ist am Aufbau des dicken Filamentsystems beteiligt (Obinata et al., 1984; Schultheiss et al., 1990), wobei mehrere Interaktionen mit anderen sarkomerischen Proteinen beschrieben wurden.

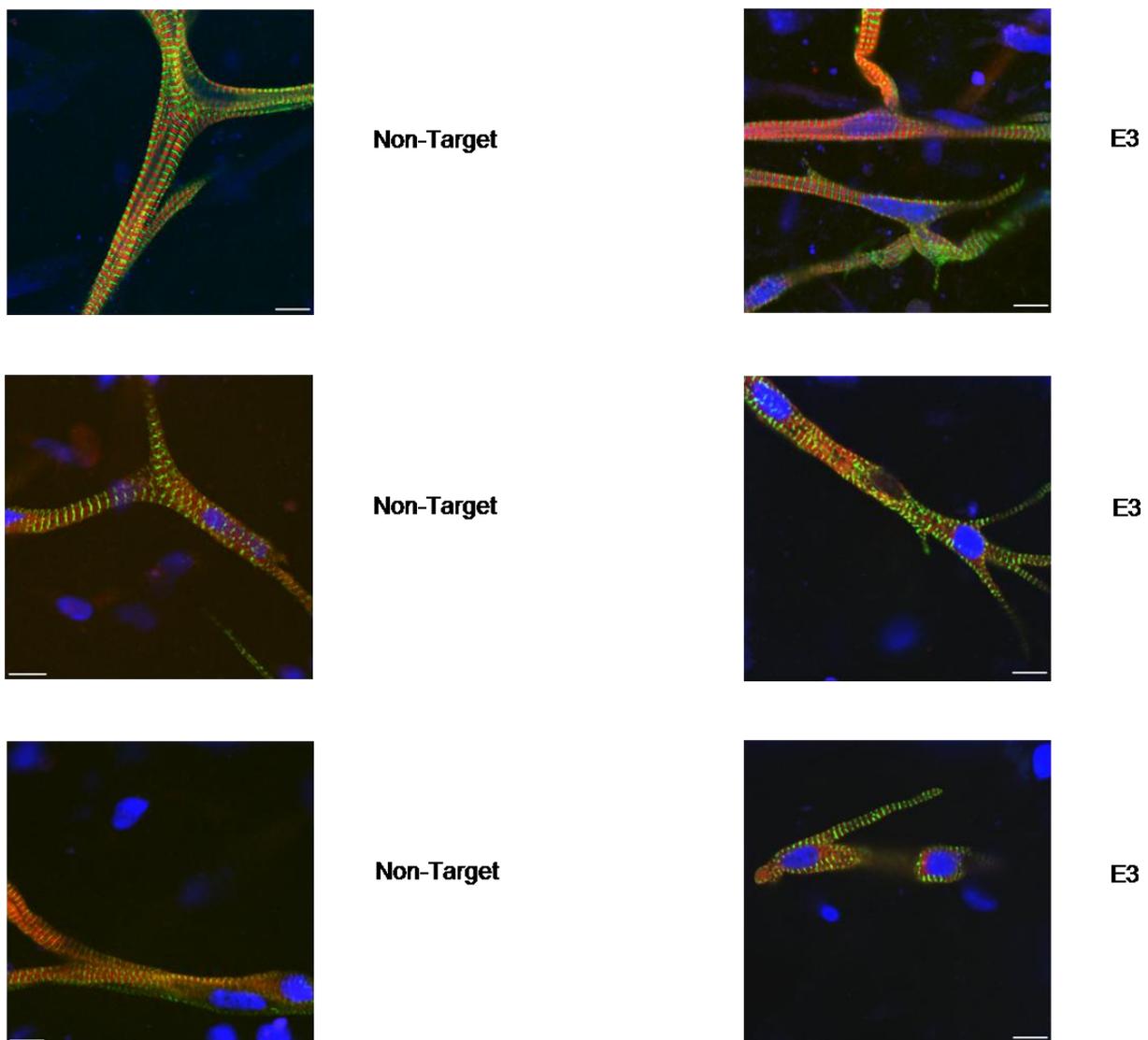


Abbildung 117: Immunfluoreszenzaufnahmen von lentiviral-infizierten EHTs, inkubiert mit Anti- α -Aktinin und Anti-cMyBP-C sowie TO-PRO[®]-3 Iodid

Im linken Teil der Abb. 117 sind exemplarisch die mit dem Non-Target-Lentivirus infizierten EHTs und im rechten Teil der Abb. 117 exemplarisch die mit dem E3-Lentivirus infizierten EHTs ↴

immunhistologisch gezeigt. Das α -sarkomerische Aktinin ist in grüner Fluoreszenz und das cMyBP-C in roter Fluoreszenz, in Doppelbanden sichtbar. Zusätzlich wurden in den EHTs die Zellkerne mit TO-PRO[®]-3 Iodid angefärbt, welche sich hier blau darstellen. Skalierungsbalken = 10 μm .

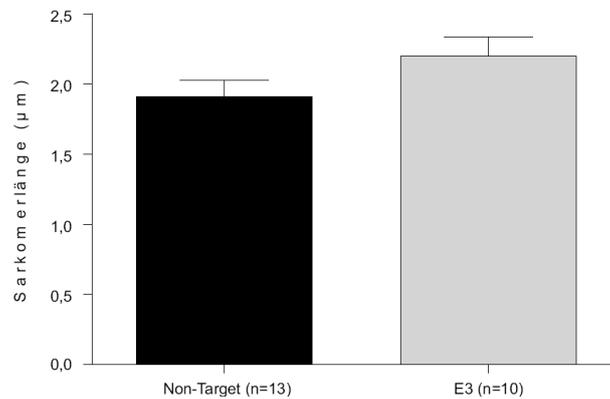


Abbildung 118: Auswertung der Sarkomerlängen der u. a. in Abbildung 117 gezeigten Aufnahmen

Eine Auswertung mit dem Programm LSM 5 *Image Browser* ergab keinen signifikanten Unterschied in der Sarkomerlänge zwischen den Non-Target- und den E3-infizierten EHTs (bzw. den darin enthaltenen NRCM; E3 2,19 μm vs. Non-Target 1,91 μm , ns., t-Test). Es schien jedoch so, dass in den E3-infizierten EHT-Präparaten deutlich weniger Zellen vorhanden waren als in den Non-Target-infizierten EHTs.

3.9 Funktioneller smMLCK *Knockdown* in lentiviral-stabil transfizierten SMC

Da die MLCK in der glatten Muskulatur schon besser untersucht und verstanden ist als im Herzen, sollte ein Zusatzmodell aus glatter Muskulatur zum Vergleich herangezogen werden. Hierzu wurde Gewebe mit besonders hoher smMLCK-Expression und leichter Zugänglichkeit sowie anderer Muskelform-freier Beschaffenheit gewählt, die Harnblase der männlichen Maus. Aus dieser wurden glatte Muskelzellen isoliert, kultiviert und ein Teil der Zellen mit den verschiedenen Lentiviren (Empty, Non-Target, E3 und E5) stabil transfiziert sowie mithilfe des Antibiotikums Puromycin selektioniert. Um den Einfluss eines stabilen smMLCK *Knockdowns* in SMC funktionell zu ermitteln, wurden aus den E5-SMC und zugehörigen Kontroll-SMC jeweils SMC-Pseudo-EHTs hergestellt, kultiviert und anhand von Kontraktionsexperimenten untersucht.

3.9.1 Kontraktionsexperimente der SMC-Pseudo-EHTs: Die MLCK-Inhibition

Zusätzlich zu einem funktionellen smMLCK *Knockdown* sollte der kumulative Effekt einer MLCK-Inhibition durch pharmakologische Substanzen untersucht werden. Dazu wurden SMC-Pseudo-EHTs in einer 1,2 mM calciumhaltigen Tyrode-Lösung unter Einfluss von dem MLCK-Inhibitor ML-7 mit einer einmaligen Konzentration Phenylephrin und anschließendem Wechsel auf kaliumreiche Tyrode-Lösung (1,2 mM Calcium) behandelt. Diese kaliumreiche Tyrode-Lösung bewirkt eine Depolarisation der Zellmembran und führt zu einem maximalen Calciumeinstrom in die Zellen.

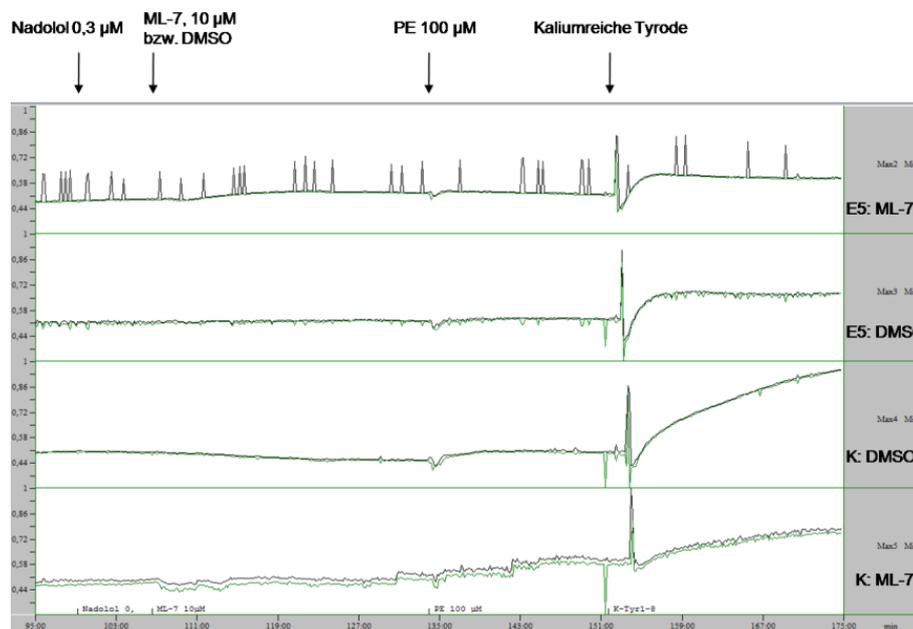


Abbildung 119: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes der SMC-Pseudo-EHTs mit ML-7, 10 µM

Gezeigt ist die minimale und maximale Kontraktionskraft in mN über den Zeitverlauf (min). Die verschiedenen EHTs mit den jeweiligen Interventionen sind der rechten Spalte zu entnehmen. Die entsprechende Zufuhr von Antagonisten/Agonisten ist mit Pfeilen oberhalb der Aufzeichnung dargestellt.

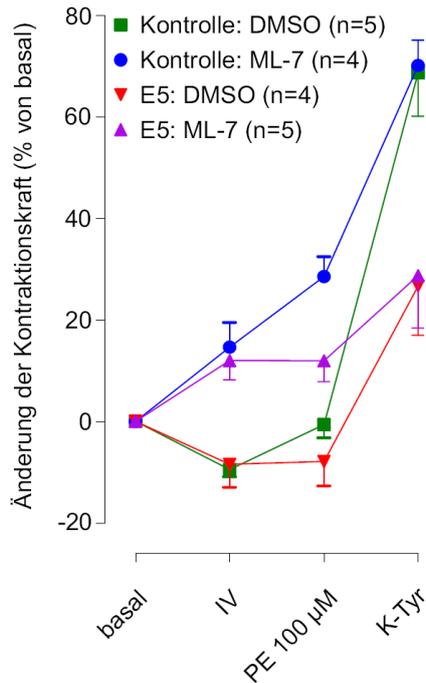


Abbildung 120: Einfluss der MLCK-Inhibition in SMC-Pseudo-EHTs

Basal = Nadolol 0,3 µM, IV = ML-7, 10 µM bzw. DMSO, K-Tyr = kaliumreiche Tyrode-Lösung. Es ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal nach Interventionszufuhr, d. h. ML-7, 10 µM oder DMSO, nach Gabe von 100 µM Phenylephrin sowie nach Wechsel auf kaliumreiche Tyrode-Lösung dargestellt. Ausgangslage absolut basal: Kontrolle: DMSO 0,57 mN, Kontrolle: ML-7 0,51 mN, E5: DMSO 0,44 mN, E5: ML-7 0,49 mN.

Da die durchgeführte Versuchsreihe keiner Konzentrations-Wirkungs-Kurve entspricht, wurden die statistischen Analysen für jeden einzelnen Punkt mittels t-Test durchgeführt und der Übersichtlichkeit tabellarisch dargestellt:

	Abb. 120: IV			
	Kontrolle: DMSO	Kontrolle: ML-7	E5: DMSO	E5: ML-7
Kontrolle: DMSO	entfällt	p<0,01	ns.	p<0,001
E5: DMSO	ns.	p<0,05	entfällt	p<0,05

	Abb. 120: PE 100 µM			
	Kontrolle: DMSO	Kontrolle: ML-7	E5: DMSO	E5: ML-7
Kontrolle: DMSO	entfällt	ns.	ns.	ns.
E5: DMSO	ns.	p<0,05	entfällt	p<0,05

	Abb. 120: K-Tyr			
	Kontrolle: DMSO	Kontrolle: ML-7	E5: DMSO	E5: ML-7
Kontrolle: DMSO	entfällt	ns.	p<0,05	p<0,05
E5: DMSO	p<0,05	p<0,01	entfällt	ns.

Eine Gabe von ML-7, 10 μM führte unerwarteterweise in den Kontroll-SMC-Pseudo-EHTs und den lentiviral-stabil transfizierten E5-SMC-Pseudo-EHTs zu einer Zunahme der Kontraktionskraft um 14,6% bzw. 12,0% von basal. Die Gabe von DMSO verringerte die Kontraktionskraft von basal in der Kontrollgruppe um 9,5% bzw. in der E5-Gruppe um 8,4%.

Die Zufuhr von 100 μM Phenylephrin steigerte die Kontraktionskraft in den Kontrollgruppen um 8,9 bzw. 13,9 Prozentpunkte von basal 2 = Phenylephrin 100 μM . In den E5-SMC-Pseudo-EHTs war praktisch keine Reaktion auf Phenylephrin detektierbar (E5: DMSO 0,54, E5: ML-7 -0,05 Prozentpunkte von basal 2).

Der Wechsel auf die kaliumreiche Tyrode-Lösung führte in der DMSO-behandelten Kontrollgruppe zu einem deutlichen Anstieg der Kontraktionskraft von basal auf 169% und in der ML-7-behandelten Gruppe auf 170%. Die durch kaliumreiche Tyrode-Lösung herbeigeführte Zunahme der Kontraktionskraft war in den E5-SMC-Pseudo-EHTs vermindert, besonders in den ML-7-behandelten (E5: DMSO 34,6, E5: ML-7 16,9 Prozentpunkte von basal 2).

3.9.2 Kontraktionsexperimente der SMC-Pseudo-EHTs: Die Rho-Kinase-Inhibition

Weiterhin sollte neben einem funktionellen smMLCK *Knockdown* auch der kumulative Effekt einer Rho-Kinase-Inhibition durch pharmakologische Substanzen untersucht werden. Dazu wurden SMC-Pseudo-EHTs in einer 1,2 mM calciumhaltigen Tyrode-Lösung unter Einfluss von dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 mit einer einmaligen Konzentration Phenylephrin und anschließendem Wechsel auf kaliumreiche Tyrode-Lösung (1,2 mM Calcium) behandelt.

Ergebnisse

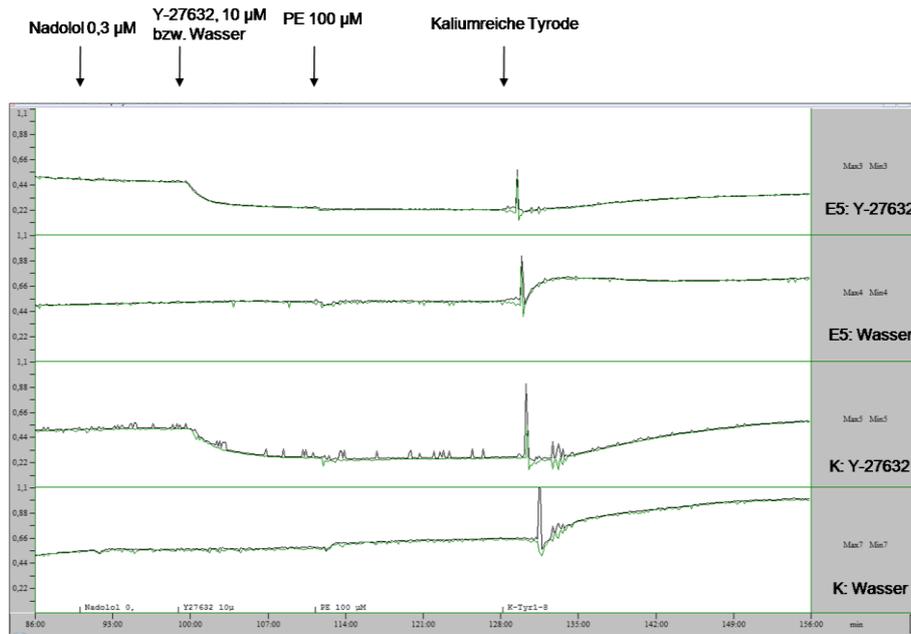


Abbildung 121: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes der SMC-Pseudo-EHTs mit Y-27632, 10 µM

Dargestellt ist die minimale und maximale Kontraktionskraft in mN über den Zeitverlauf (min). Die verschiedenen EHTs mit den jeweiligen Interventionen sind in der rechten Spalte aufgeführt. Die entsprechende Zufuhr von Antagonisten/Agonisten ist mit Pfeilen oberhalb der Aufzeichnung dargestellt.

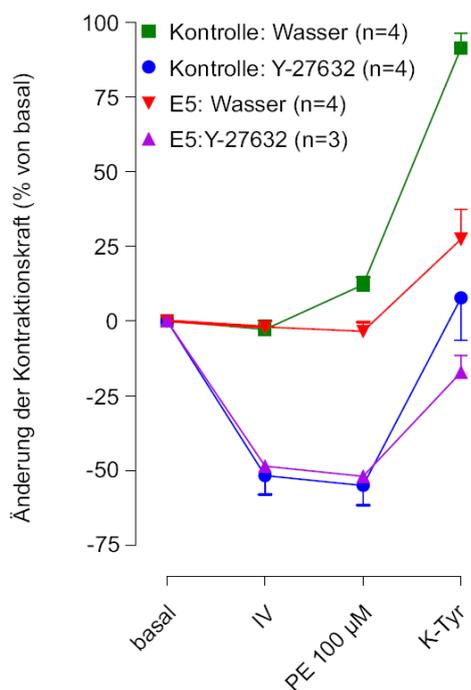


Abbildung 122: Einfluss der Rho-Kinase-Inhibition in SMC-Pseudo-EHTs

Basal = Nadolol 0,3 µM, IV = Y-27632, 10 µM bzw. Wasser, K-Tyr = kaliumreiche Tyrode-Lösung. Es ist die Änderung der Kontraktionskraft in % von basal nach Interventionszufuhr, d. h. Y-27632, 10 µM bzw. Wasser, nach Gabe von 100 µM Phenylephrin sowie nach Wechsel auf kaliumreiche Tyrode-Lösung dargestellt. Ausgangslage absolut basal: Kontrolle: Wasser 0,49 mN, Kontrolle: Y-27632 0,52 mN, E5: Wasser 0,52 mN, E5: Y-27632 0,49 mN.

Da die durchgeführte Versuchsreihe keiner Konzentrations-Wirkungs-Kurve entspricht, wurden die statistischen Analysen für jeden einzelnen Punkt mittels t-Test durchgeführt und der Übersichtlichkeit tabellarisch dargestellt:

	Abb. 122: IV			
	Kontrolle: Wasser	Kontrolle: Y-27632	E5: Wasser	E5: Y-27632
Kontrolle: Wasser	entfällt	p<0,001	ns.	p<0,0001
E5:Wasser	ns.	p<0,001	entfällt	p<0,0001

	Abb. 122: PE 100 µM			
	Kontrolle: Wasser	Kontrolle: Y-27632	E5: Wasser	E5: Y-27632
Kontrolle: Wasser	entfällt	p<0,0001	p<0,01	p<0,0001
E5:Wasser	p<0,01	p<0,001	entfällt	p<0,0001

	Abb. 122: K-Tyr			
	Kontrolle: Wasser	Kontrolle: Y-27632	E5: Wasser	E5: Y-27632
Kontrolle: Wasser	entfällt	p<0,01	p<0,01	p<0,0001
E5:Wasser	p<0,01	ns.	entfällt	p<0,05

Die Intervention mit dem Rho-Kinase Inhibitor Y-27632, 10 µM führte zu einer starken Abnahme der Kontraktionskraft von basal (Kontrolle: Y-27632 -51,8%, E5: Y-27632 -48,6%).

Die Gabe von Phenylephrin konnte in den mit dem Rho-Kinase Inhibitor behandelten Gruppen keine Steigerung der Kontraktionskraft auslösen (Kontrolle: Y-27632 -45,0%, E5: Y-27632 -48,0% von basal). Lediglich in der Kontrollgruppe führte Phenylephrin zu einem Anstieg der Kontraktionskraft um 12,2% von basal, die E5-SMC-Pseudo-EHTs der Kontrollgruppe zeigten ebenfalls keine Reaktion auf den α_1 -Adrenozeptor-Agonist (96,5% von basal).

Durch Wechsel auf die kaliumreiche Tyrode-Lösung steigerten die Kontroll-EHTs ihre Kontraktionskraft am stärksten (Kontrolle: Wasser um 79,3 Prozentpunkte von basal 2 = Phenylephrin 100 µM, Kontrolle: Y-27632 um 62,8 Prozentpunkte von basal 2). Die E5: Wasser-Gruppe konnte durch den Wechsel auf die kaliumreiche Tyrode-Lösung nur 30,9 Prozentpunkte von basal 2 an Kontraktionskraft zunehmen, die mit Y-27632-behandelte E5-Gruppe hingegen 34,9 Prozentpunkte von basal 2.

4 Diskussion

Von Schümann et al. wurde bereits 1978 die positiv inotrope Wirkung von α_1 -Adrenozeptor-Agonisten an menschlichen Vorhöfen untersucht, und auch die Arbeitsgruppen um Mügge et al. (1983) und Brückner et al. (1984) haben sich schon vor 25 Jahren mit dem α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt an der Herzkammer beschäftigt. Trotz intensiver Forschungsarbeiten sind jedoch die physiologische Bedeutung und die zugrunde liegenden Signaltransduktionsmechanismen von α_1 -Adrenozeptoren bis heute weitgehend ungeklärt. Von Grimm et al. (2005) wurde erstmalig gezeigt, dass die α_1 -adrenerge Rezeptorstimulation in menschlichen Vorhofproben sowohl MLCK-abhängig ist als auch die MLC2a Phosphorylierung über die MLCK vermittelt wird. Daher war insbesondere das Protein MLCK für weitere Untersuchungen im Hinblick auf den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt interessant geworden.

Das Ziel dieser Arbeit war:

1. Die Charakterisierung des Signalweges, der die α_1 -adrenergen Signale zur Aktivierung der MLCK vermittelt.
2. Die Identifizierung der MLCK-Isoform, die für den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt notwendig ist.
3. Die Untersuchung eines funktionellen MLCK *Knockdowns* mithilfe der RNA-Interferenz und dessen Auswirkung auf den α_1 -adrenergen Effekt.

Hierbei wurden folgende Hauptergebnisse erzielt:

1. Der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt im linken Vorhof der Maus wird offenbar überwiegend über den α_{1B} -Adrenozeptorsubtyp vermittelt und ist durch verschiedene MLCK-Inhibitoren deutlich reduzierbar. Die IP_3 -Rezeptor-vermittelte Calciumfreisetzung hat keinen relevanten Einfluss auf den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt.
2. Im linken Vorhof der Maus hat die smMLCK 130 kDa den größten Anteil an der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge. Weiterhin konnten auch die smMLCK 220 kDa und skMLCK mittels quantitativer RT-PCR in geringer Menge detektiert werden. In der Herzkammer scheinen die smMLCK 220 kDa und skMLCK in noch geringerer Menge exprimiert zu werden als im Vorhof.

3. Es wurde ein adeno- und ein lentivirales shRNA-System zum *Knockdown* der smMLCK entwickelt. Mit dem adenoviralen System konnte die smMLCK 220 kDa in NMCM und NRCM spezifisch herunterreguliert werden. Allerdings erwies sich das adenovirale System im Modell der künstlichen Herzgewebe (EHT) als zu gering effektiv. Mit dem lentiviralen System konnte die smMLCK 130 kDa bzw. Gesamt-MLCK (vgl. 2.3.1) in NIH3T3-Zellen, NRCM und EHTs reduziert werden. Mittels Kontraktionsexperimenten an den lentiviral-infizierten EHTs zeigte sich ein deutlich abgeschwächter α_1 -adrenerger positiv inotroper Effekt. Die Calcium-vermittelte Kontraktionskraft war dagegen unbeeinflusst.

Damit haben die Versuche erstmalig einen molekularen Beweis für die Rolle der MLCK in der Vermittlung des α_1 -adrenergen positiv inotropen Effektes im Herzmuskel erbracht.

4.1 Charakterisierung des Signalweges zur Aktivierung der MLCK

4.1.1 Modellfindung

Um den Signalweg, der die α_1 -adrenergen Signale zur Aktivierung der MLCK vermittelt, und die verschiedenen MLCK-Isoformen zu untersuchen, wurde das Tiermodell der Maus gewählt. Es musste zunächst der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt im Vorhof der Maus gezeigt werden, um dieses Modell für die Fragestellung verwenden zu können. Dazu wurden ganze linke Vorhöfe, die im Gegensatz zu den rechten Vorhöfen keine spontanen Kontraktionen aufwiesen, unter isometrischen Bedingungen im Organbad untersucht. Diese Methode ermöglicht stabile, gut reproduzierbare Messungen kontraktiver Parameter über mehrere Stunden. Alle Experimente erfolgten in Gegenwart des unselektiven β -Adrenozeptor-Antagonisten Nadolol, weil zum einen Phenylephrin in höheren Konzentrationen nicht nur α_1 -, sondern auch β -Adrenozeptoren stimuliert (Endoh et al., 1976), und zum anderen durch elektrische Stimulation kardialer Muskeln endogenes Noradrenalin freigesetzt wird. Beides würde durch Stimulation von β -Adrenozeptoren die α_1 -adrenergen Effekte verschleiern.

Der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt konnte anhand des α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Prazosin gezeigt werden (s. Abb. 22). Darüber hinaus gaben Experimente mit α_1 -Adrenozeptor-Subtyp-Antagonisten, wie CEC und WB-4101, Anlass zur Vermutung, dass der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt im linken Vorhof der Maus überwiegend über den α_{1B} -Adrenozeptorsubtyp vermittelt wird (nicht gezeigt). Die Versuche mit dem α_{1A} -

Adrenozeptor-Antagonisten WB-4101 wurden jedoch nur mit einem Vorhof je Interventionsgruppe durchgeführt, sodass diese Daten nur orientierend zu betrachten sind. Diese Ergebnisse würden jedoch in Einklang mit denen der Ratte stehen, dort wird auch überwiegend der α_{1B} -Adrenozeptorsubtyp exprimiert, im menschlichen Herzen hingegen vorwiegend der α_{1A} -Adrenozeptorsubtyp (vgl. 1). Erschwerend für die Bestimmung der Beteiligung von verschiedenen α_1 -Adrenozeptor-Subtypen ist, dass keine hochselektiven Liganden (100-1000-fach höhere Affinität zu einem α_1 -Adrenozeptor-Subtyp) verfügbar sind. WB-4101 ist ein kompetitiver Antagonist mit 25-mal stärkerer Affinität zum α_{1A} - als zum α_{1B} -Adrenozeptor und bindet zusätzlich auch an α_{1D} -Adrenozeptoren (Perez et al., 1994). CEC ist ein alkylierendes Agens, welches primär den α_{1B} -Adrenozeptor irreversibel inaktiviert. In höheren Konzentrationen oder bei langer Expositionszeit werden auch die anderen Adrenozeptor-Subtypen gehemmt (Perez et al., 1994). Außerdem sind sowohl die Expression der Adrenozeptor-Subtypen als auch die funktionell erhobenen Daten stark Spezies- und Modell-abhängig (Nagashima et al., 1996; Taguchi et al. 1998). Über die Bedeutung des α_{1D} -Adrenozeptors ist noch wenig bekannt. Weder eine Kopplung an die PIP₂-Hydrolyse (Seraskeris et al., 2001) noch eine Aktivierung von PKC-Isoformen konnte nachgewiesen werden (Taguchi et al., 1998). Bei der Vermittlung des positiv inotropen Effekts von α_1 -Adrenozeptor-Agonisten scheinen hauptsächlich der α_{1A} - und der α_{1B} -Adrenozeptor beteiligt zu sein (Endoh et al., 1992; Yu und Han, 1994).

4.1.2 MLCK-Inhibition mit pharmakologischen Substanzen

Die MLCK hat nur ein bekanntes Zielprotein, und zwar die MLC2, daher wird die MLCK auch als *dedicated kinase* bezeichnet (Kamm und Stull, 2001). Als Mediator der Kontraktion glatter Muskelzellen ist die MLCK zwar gut charakterisiert, ihre Bedeutung im Herzen ist derzeit aber noch unklar (Opie, 2001; Ohlmann et al. 2005; Zhi et al. 2005). Erste Hinweise auf eine Beteiligung der MLCK an der akuten Regulation der Kontraktilität im Herzen brachte die Arbeit der Gruppe um Andersen et al. (2002), die an Rattenherzen eine Reduktion der Phenylephrin-induzierten Kontraktionskraftzunahme unter MLCK-Inhibition beobachtete. Von unserer Arbeitsgruppe konnte erstmalig an menschlichen Vorhofproben eine über den α_1 -Adrenozeptor vermittelte und MLCK-abhängige positiv inotrope Kontraktionskraftzunahme nach Stimulation mit Phenylephrin gezeigt werden. Diese Kontraktionskraftzunahme war begleitet von einer Zunahme der MLC2 Phosphorylierung (Grimm et al., 2005). Daher sollte zunächst untersucht werden, ob an dem gewählten Modell der Maus auch vergleichbare Effekte mit pharmakologischen MLCK-Inhibitoren (Wortmannin, ML-7 und ML-9) zu erzielen sind.

Dabei war der erste Einsatz von Wortmannin unter nachfolgender PE-KWK schwierig bzw. nicht auswertbar, da 83% der mit Wortmannin behandelten Vorhöfe am Ende des Experimentes Arrhythmien aufwiesen und nicht in die Auswertung miteinbezogen werden konnten (s. Abb. 25). Wurde jedoch nur eine einmalige, maximale Konzentration Phenylephrin verwendet, so blieben die Wortmannin-behandelten Vorhöfe überwiegend stabil (s. Abb. 26). Unerwartet hatte die MLCK-Inhibition durch Wortmannin in einer anderen Versuchsserie einen Einfluss auf die β -adrenerg-vermittelte Kontraktionskraft (s. Abb. 31). Wortmannin hemmt zwar die Phospholipase D und in geringem Ausmaß die PKC, aber keine der cAMP- oder cGMP-abhängigen Kinasen oder die Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (Bonser et al. 1991; Nakanishi et al. 1992). Dass Wortmannin zu Arrhythmien geführt hat, ist möglicherweise über die für viele pharmakologische Inhibitoren typischen unspezifischen Nebeneffekte zu erklären („dirty drugs“). Da aber in einer später durchgeführten Versuchsreihe weniger Vorhöfe Arrhythmien aufwiesen, lässt sich dieses Phänomen evtl. noch mit den tagesabhängigen Versuchsbedingungen, wie persönliche Handhabung aber auch den Mäusen, die ein biologisches System darstellen, erklären. Mit den anderen MLCK-Inhibitoren ML-7 und ML-9 sowie in den Kontrollvorhöfen wurden keine Arrhythmien beobachtet. Wortmannin hemmt die smMLCK mit einer IC_{50} von 260 nM ohne Wirkung auf die skMLCK (Davies et al., 2000) und wurde in einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. In niedriger Konzentration (IC_{50} von 5 nM; Arcaro und Wymann, 1993) ist Wortmannin bereits ein selektiver Inhibitor der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K). Dass die bei 10 μ M erzielten Ergebnisse aber tatsächlich auf einer MLCK-Inhibition beruhen, wurde von Grimm et al. (2005) gezeigt. Dort konnte mit 100 nM Wortmannin kein Einfluss auf den Phenylephrineffekt festgestellt werden, mit 10 μ M kam es jedoch zu einer Rechtsverschiebung und deutlichen Reduzierung des Maximaleffektes von Phenylephrin.

Die pharmakologischen Substanzen ML-7 und ML-9 sind Sulfonamide mit einem guten Penetrationsvermögen in das Zellinnere, die sich nur durch unterschiedliche Halogenierung der Naphthalin-Grundstruktur unterscheiden. Beide Substanzen sind relativ schwache Inhibitoren der sm- und skMLCK, wobei ML-7 im Vergleich zu ML-9 etwas spezifischer zu sein scheint (Bain et al., 2003). ML-7 und ML-9 zeigten einen deutlichen negativ inotropen Effekt am linken Vorhof der Maus, der allerdings nach etwa 10 Minuten ein Plateau erreichte.

Mit ML-7 konnte eine ähnlich starke Reduzierung des Phenylephrin-vermittelten α_1 -adrenergen positiv inotropen Effektes gezeigt werden (s. Abb. 32) wie mit Wortmannin. In einem anderen Experiment zeigte die MLCK-Inhibition durch ML-7 keinen Einfluss auf den Endothelin-Rezeptor-vermittelten positiv inotropen Effekt. Eine nachfolgende, maximale Einmalkonzentration von Phenylephrin führte nur noch zu einem geringen zusätzlichen

positiv inotropen Effekt (s. Abb. 37 und Abb. 38). Auf die β -adrenerg-vermittelte Kontraktionskraft nahm ML-7 keinen Einfluss, somit lassen sich hier generelle toxische Effekte ausschließen (s. Abb. 40).

Mit dem MLCK-Inhibitor ML-9 konnte die stärkste Reduktion des α_1 -adrenergen positiv inotropen Effektes gezeigt werden, hier erreichten die Vorhöfe nur 16,7% des maximalen positiv inotropen Effektes (s. Abb. 41B).

Hier konnte mithilfe dreier MLCK-Inhibitoren auf funktioneller Ebene aufgezeigt werden, dass die MLCK möglicherweise eine zentrale Komponente bei der Vermittlung der α_1 -adrenerg-induzierten akuten Erhöhung der Kontraktionskraft im linken Vorhof der Maus darstellt; gleichzeitig konnten die von menschlichen Herzgewebe erhaltenen Daten bestätigt werden. Dabei scheint es unwahrscheinlich, dass alle drei MLCK-Inhibitoren durch die gleichen unspezifischen Nebeneffekte in ihrer Eigenschaft als *dirty drugs* diesen generellen Befund verwässern. Da aber anhand von pharmakologischen Inhibitoren keine weiteren Erkenntnisse über die Bedeutung der MLCK für den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt zu gewinnen sind, wurden in den folgenden Abschnitten (s. 4.2) dieser Arbeit weitere Hinweise gesammelt, um die Existenz dieses Mechanismus zu überprüfen. Hierbei sollte der Beweis auf molekularer Ebene, mittels smMLCK *Knockdown*, geführt werden.

4.1.3 Calcium-abhängige Aktivierung der MLCK

Calcium ist ein ubiquitärer Botenstoff, der in viele Abläufe regulativ eingreift, von der Fertilisation bis zum Zelltod (Berridge et al., 1998; Bootman et al., 2001). Durch eine Erhöhung der Calciumkonzentration in Kardiomyozyten können Aktin- und Myosinfilamente miteinander agieren, und es kommt nachfolgend zu einer Zellverkürzung sowie zu einer Kontraktionskraftzunahme (vgl. 1). Durch vom Sinoatrialknoten ausgehende Aktionspotentiale kommt es in Folge zu einer Depolarisation der Zellmembranen sowie zu einer Öffnung der spannungsabhängigen Calciumkanäle. In Vorhofzellen spielen die spannungsabhängigen Calciumkanäle jedoch mangels T-Tubulus-System nur eine untergeordnete Rolle (Mackenzie et al., 2004a). Der intrazelluläre Calciumspeicher, das SR, verfügt über einen Calciumkanal, den Ryanodinrezeptor (RyR), welcher in einem Prozess selbst durch Calcium aktiviert werden, die Calcium-induzierte-Calciumfreisetzung. Das SR ist in Kardiomyozyten hoch entwickelt, man unterscheidet aufgrund der Struktur vier verschiedene Typen. Während in den Herzkammer vorwiegend das *network* SR zu finden ist, dominiert im Vorhof das *corbular* SR (Yamasaki et al., 1997; Goldstein und Schroeter, 2002; Franzini-Armstrong et al., 2005).

Zusätzlich zum RyR haben Vorhofzellen die Möglichkeit der Freisetzung von Calcium aus dem intrazellulären Speicher über den IP₃-Rezeptor. Vorhofzellen verfügen im Vergleich zu Herzkammerzellen sogar über verhältnismäßig mehr IP₃-Rezeptoren (Lipp et al., 2000; Mackenzie et al., 2002; Li et al., 2005). Bei manchen Formen der Herzinsuffizienz erhöht sich jedoch die Menge an IP₃-Rezeptoren in den Herzkammerzellen (Go et al., 1995). Diese Form der Calciumfreisetzung wird durch einen PLC-Stimulus reguliert (vgl. 1.2). Doch obwohl IP₃-Rezeptoren im Herzen fast 100-fach weniger exprimiert werden als RyR, scheinen sie die Herzfunktion beeinflussen zu können. Bis heute ist es umstritten, ob das über den IP₃-Rezeptor freigesetzte Calcium an der Kontraktionsregulation beteiligt ist (Roderick und Bootman, 2007; Bers, 2008; Bootman und Roderick, 2008). Es wurde von Mackenzie et al. (2004a) gezeigt, dass eine IP₃-Rezeptor-Aktivierung sowohl die zentripetale Übertragung von Calciumsignalen verstärkt als auch die zelluläre Kontraktion. Von Mackenzie et al. (2004b) und Li et al. (2005) wurden in Vorhofzellen ein Fehlen des Calcium-erhöhenden Effektes von Endothelin-1 nach Inhibition des IP₃-Rezeptors bzw. nach *Knockout* des IP₃-Rezeptors Typ 2 beschrieben. Mit den Experimenten in dieser vorliegenden Arbeit konnte keine Abhängigkeit zwischen der IP₃-Rezeptor-vermittelten Calciumfreisetzung und dem α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt gezeigt werden. Es kam nach Blockade des IP₃-Rezeptors zwar Inhibitor-konzentrationsabhängig zu einer basalen Kontraktionskraftabnahme, der Phenylephrin-induzierte α_1 -adrenerge positiv inotrope Maximaleffekt war jedoch nachfolgend unbeeinflusst (s. Abb. 42 und 44).

Somit konnte mittels dem pharmakologischen Inhibitor 2-APB festgestellt werden, dass die IP₃-Rezeptorblockade im linken Vorhof der Maus keinen Einfluss auf die von Phenylephrin vermittelte Kontraktionskraft hatte. Dieses führt zur Annahme, dass das Calcium zur Aktivierung der MLCK aus einer anderen, bisher noch unbekanntem, Quelle entstammen muss. Hierbei könnte das über den RyR freigesetzte Calcium eine Rolle spielen.

4.2 Funktioneller MLCK *Knockdown* mithilfe der RNA-Interferenz

Da die Charakterisierung des α_1 -adrenergen Signalweges im Hinblick auf die MLCK unter Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren zwar aussagekräftig, dennoch begrenzt war, sollte der Einfluss der MLCK auf den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt im Herzmuskel auf molekularer Ebene mittels adenoviralen- und lentiviralen-shRNA-exprimierenden Vektoren weiter untersucht werden.

4.2.1 Untersuchung der MLCK-Isoformen

Zur Identifizierung der MLCK-Isoform, die für den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt notwendig ist, wurde zunächst die klassische RT-PCR für verschiedene Gene durchgeführt. Sie lieferte ein eindeutiges, mit der Literatur in Einklang stehendes Ergebnis (s. Abb. 47 und vgl. 1.4). Mittels quantitativer RT-PCR konnte überraschenderweise hier eindeutig zum ersten Mal eine Expression der smMLCK 220 kDa in Herzgewebe, sowohl im Vorhof als auch in der Herzkammer, detektiert werden. Die smMLCK 220 kDa hatte im linken Vorhof nahezu ein Fünftel Anteil an der Gesamt-MLCK und könnte somit eine tragende Rolle spielen. Ein smMLCK 220 kDa-*Knockout*-Modell von Ohlmann et al. (2005) zeigte jedoch keinen Einfluss auf die kardiovaskulären Funktionen. Die skMLCK hat nur einen kleinen Anteil an der Gesamt-MLCK-Menge und spielt offenbar an der Regulation der Kontraktion nur eine untergeordnete oder gar keine Rolle. Diese Vermutung wird von einem skMLCK-*Knockout*-Modell von Zhi et al. (2005) unterstützt, welches keinen Einfluss auf kardiovaskuläre Eigenschaften hatte.

Die mittels PCR gewonnenen Daten konnten auf Protein-Ebene unterstützt werden. Auch hier konnte eindeutig erstmalig die Expression der smMLCK 220 kDa in Herzgewebe der Maus und Ratte sowie NRCM gezeigt werden (s. Abb. 53 und 54).

Aufgrund der bisherigen Datenlage und der deutlichen Dominanz der smMLCK 130 kDa im Herzgewebe ist anzunehmen, dass diese MLCK-Isoform die größte, wenn nicht alleinige, Rolle an der Vermittlung des α_1 -adrenergen positiv inotropen Effektes im Herzmuskel spielt. Inwiefern die smMLCK 220 kDa und skMLCK beteiligt sind bleibt zu vermuten. Diese Arbeit beinhaltet einen spezifischen smMLCK 220 kDa *Knockdown* (adenoviral-basiert) und einen smMLCK 130 kDa *Knockdown* (lentiviral-basiert, nicht Isoform-spezifisch, vgl. S. 49).

4.2.2 Virale Systeme

Gemeinsam haben AV und LV, dass sie in der Lage sind, neben proliferierenden Zellen auch primäre und nicht-proliferierende Zellen zu infizieren. Unterschiede treten bezüglich der Integration in das Wirtsgenom auf, denn die AV verbleiben episomal, wohingegen sich die LV stabil in das Genom der Wirtszelle integrieren. Im Vergleich zu LV ist es möglich eine hohe AV-Virustiterproduktion, z. B. über eine Cäsiumchloridgradienten-Aufreinigung, zu erreichen. Dieses führt zu einem konzentrierten Virus, das in einem geringen Volumen eingesetzt werden kann. Bei Einsatz von hohen Viruskonzentrationen kommt es häufig zu zytotoxischen Effekten. In dieser vorliegenden Arbeit traten diese Reaktionen jedoch

ausschließlich bei dem Gebrauch von AV auf, was die Verwendung von LV interessant machte.

4.2.2.1 Adenovirale shRNA-Expression

Es wurden zwei Adenoviren, ein Nonsense shRNA-exprimierender Adenovirus als Kontrollvirus und ein Adenovirus mit einer shRNA gegen die smMLCK 220 kDa der Maus gerichtet, verwendet. Für die Untersuchung der Auswirkung eines smMLCK 220 kDa *Knockdowns* in Kardiomyozyten wurde der adenovirale Gentransfer gewählt, der gegenüber den konventionellen Methoden mit Liposomen, Elektroporation, Calciumphosphat, DEAE-Dextran oder der direkten DNA-Injektion, bei denen höchstens jede zehnte Zelle eine Kopie der DNA erhält, eine sehr hohe Effizienz bei vergleichsweise geringer Toxizität bietet (Kirshenbaum, 1997; Sumbilla et al., 1999). Zudem können mit Adenoviren auch postmitotische, nichtreplizierende Zellen infiziert werden (Kirshenbaum, 1997), die Proteinexpression ist schon nach zwei bis vier Stunden nachweisbar (Dumasius et al., 2003) und erreicht ihr Maximum nach etwa 48 Stunden (Kass-Eisler et al., 1993).

In den Experimenten, die dieser Arbeit zugrunde liegen, wurden Adenoviren verwendet, die bicistronisch *enhanced* GFP (eGFP; Zhang et al., 1996) koexprimieren, wodurch die Infektionseffizienz durch dessen Epifluoreszenz im Mikroskop leicht abgeschätzt werden konnte. Die Expression von eGFP zeigte in NRCM eine Abhängigkeit von der eingesetzten Viruskonzentration (s. u. a. Abb. 69). Um die Effekte von Ad-shRNA-smMLCK220 und Ad-shRNA-NS in differenzierten Zellsystemen zu charakterisieren, wurden primäre Zellkulturen (NMCM und NRCM) infiziert. Die Kardiomyozyten der beiden Spezies zeigten einen von der Viruskonzentration abhängigen Effekt des MLCK *Knockdowns*, sodass weitere Untersuchungen folgen konnten.

Überraschenderweise konnte mit dem Ad-shRNA-smMLCK220 in NRCM auch eine Herunterregulation der smMLCK 130 kDa auf Protein-Ebene beobachtet werden. Allerdings war hier der *Knockdown* der smMLCK 220 kDa um den Faktor zehn stärker als in den NMCM (bei gleicher MOI), in denen keine Beeinflussung der smMLCK 130 kDa Protein-Menge detektiert wurde (s. Abb. 67 und 71). Möglicherweise spielen hier Spezies und *Mismatch* eine Rolle.

Weiterhin schien es so, dass sich NMCM schwerer mit den AV infizieren lassen als NRCM und zum anderen, dass sie eine MOI von 20 auch zytotoxisch gesehen besser vertragen als NRCM mit gleicher MOI. Dieses wäre für eine weitere Anwendung der AV in Zellen der Maus

oder Mausgeweben zu beachten. Dass es in den NMCM durch Infektion mit dem Kontrollvirus Ad-shRNA-NS auch zu einer Reduktion der smMLCK 220 kDa-mRNA-Menge kam, ist vermutlich eher ein unspezifischer Effekt, zumal dieses nicht auf Protein-Ebene beobachtet wurde. Zur Klärung dieser Schwankung wäre die Entwicklung eines anderen quantitativen RT-PCR Assays für die smMLCK 220 kDa ein möglicher, wenngleich nicht unbedingt vielversprechender Ansatz, da die smMLCK 220 kDa nur in sehr geringer Menge im Herzen exprimiert wird, und die Schwankungen innerhalb der quantitativen RT-PCR sehr groß sein können. Eine weitere Möglichkeit wäre die Anzahl der untersuchten Proben deutlich zu steigern, dieses kam hier jedoch nicht in Frage, da das Mausmodell nur der Testung des Adenovirus als solches dienen sollte, und der funktionelle *Knockdown* dann an dem etablierten Modell des EHTs durchgeführt werden sollte. Dieses war im Ansatz möglich und wäre ausbaufähig, da es trotz eines *Mismatch* des Ad-shRNA-smMLCK220 mit der Rattensequenz zu einem deutlichen *Knockdown* in NRCM gekommen ist.

Hingegen scheint es deutlich schwerer EHTs mit einem AV am Tag 11 nach ihrer Herstellung zu infizieren wie erste Versuche zeigten. Trotz einstündiger Infektion mit moderaten MOIs konnte eine Infektion der EHTs nur peripher beobachtet werden (s. Abb. 83). Demzufolge waren auch in dem Kontraktionsexperiment und dem Western Blot keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Die Kontraktionsexperimente wurden aufgrund einer zu geringen Probenanzahl und folglich großer Streuung nicht in die vorliegende Arbeit aufgenommen. Es schien jedoch so, dass die mit der höheren MOI von 39 des Ad-shRNA-smMLCK220 behandelten EHTs ein geringeres Ansprechen auf die Phenylephrin-Konzentrations-Wirkungskurve (0,3-100 μ M) zeigten, als die mit der MOI 20 infizierten oder die mit dem Ad-shRNA-NS behandelten EHTs. Aus den Western Blots ließ sich eine Tendenz gewinnen, dass die smMLCK 130 kDa in den mit dem Ad-shRNA-smMLCK220 behandelten EHTs im Vergleich zu den mit dem Ad-shRNA-NS behandelten EHTs reduziert war. Um die Adenoviren in den EHTs zukünftig einzusetzen sind folgende Punkte noch zu verfeinern: Die Infektionstechnik für einen ähnlich effizienten *Knockdown*, wie er mit dem lentiviralen System erreicht werden konnte, wäre zu verbessern. Der Nachweis großer Proteine, und hier speziell der smMLCK 220 kDa, aus den collagenhaltigen EHTs wäre sicherzustellen, um einen *Knockdown* zuverlässig auf Protein-Ebene detektieren zu können.

Die smMLCK 220 kDa konnte trotz verschiedener Probenpuffer und mechanischer Methoden der Proteinisolierung nicht in EHTs dargestellt werden. Es ist ein bekanntes Problem, dass große Proteine, wie die 220 kDa-große smMLCK, nicht oder nur sehr schlecht aus den collagenhaltigen EHTs mittels Western Blot gezeigt werden können. Ein initialer Versuch der

Fraktionierung nach dem isoelektrischen Punkt (pI) unter Zuhilfenahme einer Apparatur (*Rotofor[®] Cell*) von der Firma Bio-Rad Laboratories (München) konnte zwar im nachfolgenden Western Blot eine Anreicherung der smMLCK 220 kDa in der Fraktion des pH-Bereichs 6,8-7,1 zeigen (s. Abb. 133 im Anhang), doch für eine serielle Aufarbeitung der EHTs bedarf diese Methode noch einiger Optimierung. Die smMLCK 130 kDa konnte zusätzlich sehr gut aus der Fraktion des pH-Bereichs von 5,9-6,2 mittels Western Blot detektiert werden (s. Abb. 132 im Anhang). Der theoretische pI für die smMLCK der Ratte beträgt 5,92. Das verwendete System *Rotofor[®] Cell* (Flüssigphasen Isoelektrische Fokussierung) basiert auf einer pH-Gradienten Bildung mittels eines Ampholytengemisches, welches dann in die Fraktionierkammer gegeben wird. Nach Hinzugabe der Proteinprobe werden die Proteine dann aufgrund ihrer Wanderungseigenschaft bis zum pI hin getrennt und können als isolierte Fraktion entnommen werden. Nachfolgend können diese Fraktionen (zehn verschiedene) dann mittels Western Blot weiter untersucht werden.

Die mRNA-Messung der adenoviral-behandelten NRCM zeigte zum einen untereinander große Schwankungen, zum anderen überraschenderweise auch einen deutlichen Einfluss des Ad-shRNA-NS auf die verschiedenen Gene. Es ist nicht unmittelbar ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen MOI und der Stärke der Regulation zu erkennen. In NMCM konnte hingegen eine Spezifität sowohl auf Protein-Ebene als auch auf mRNA-Ebene gezeigt werden. Vielleicht spielt doch der *Mismatch* von einer Base des Ad-shRNA-smMLCK220 zur Rattensequenz eine entscheidende Rolle. Dieses wiederum gibt noch keine Erklärung für die starken regulativen Effekte des Ad-shRNA-NS, der sowohl zum Maus als auch zum Rattengenom keinerlei Homologie aufweist. Möglicherweise kommen hier unspezifische virale und/oder RNAi-Effekte stärker zum Tragen als bisher angenommen. Es kann jedoch aus den Experimenten geschlossen werden, dass für einen erfolgreichen *Knockdown* der smMLCK 220 kDa in NRCM eine MOI von 2,5 ausreichend war, und sich höhere MOIs eher nachteilig auf die Zellvitalität auswirkten. Vielleicht wäre sogar eine niedrigere MOI von 2,5 für einen effizienten *Knockdown* in NRCM ausreichend. NMCM hingegen lassen sich offenbar schwerer mit den beiden Adenoviren infizieren und scheinen hinsichtlich des zytotoxischen Effektes nicht so empfindlich zu sein, sodass eine MOI von 20 eine gut gewählte war.

Im Allgemeinen ist bei der Betrachtung der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass der Grad zwischen effektivem und zellschädigendem adenoviralem smMLCK *Knockdown* sehr schmal ist und die Gefahr in Form zytotoxischer Nebenwirkungen sehr hoch. Somit bleibt zu berücksichtigen, dass starke Effekte auch von einer alleinigen Adenovirusinfektion herrühren können. Daher wurde für den Neuanatz eines funktionellen smMLCK *Knockdowns*, hier die

smMLCK 130 kDa, bzw. Gesamt-smMLCK, der lentiviral-basierte MLCK *Knockdown* gewählt, da Lentiviren allgemein als weniger bis nicht zytotoxisch gelten und auch keine Immunantwort auslösen sollen (Verma und Somia, 1997). Es zeigte sich u. a., dass LV keinen bedeutenden basalen Einfluss auf die Kontraktionskraft haben (Ermittlung eigener Kontraktionsexperimente mit dem Empty-Lentivirus, s. Abb. 100) und somit diesbezüglich gegenüber den AV klar überlegen sind.

4.2.2.2 Lentivirale shRNA-Expression

Es wurden zwei Kontroll-Lentiviren (Empty und Non-Target) und zwei verschiedene mit einer shRNA gegen die smMLCK 130 kDa gerichtet (E3 und E5) verwendet. Die E3- und E5-shRNA-Sequenzen sind zu 100% homolog mit der smMLCK-Sequenz der Maus, sie weisen jedoch bei der smMLCK-Sequenz der Ratte je einen *Mismatch* auf. Hierbei scheint die E3-Sequenz die spezifischere zu sein, da der *Mismatch* direkt vor der *Loop*sequenz liegt. Trotz des *Mismatch* haben beide Viren in Vorversuchen mit NRCM zu einem erfolgreichem smMLCK *Knockdown* geführt.

Hierbei konnte auf Protein-Ebene die smMLCK 220 kDa mittels RNA-Interferenz nahezu völlig entfernt werden und die smMLCK 130 kDa um 51,2% in der E3-Gruppe bzw. um 66,2% in der E5-Gruppe (s. Abb. 93). Die MLC2a-P-Proteinmengen waren nach 5,5-tägiger Inkubationszeit mit den Lentiviren hingegen nicht verändert (s. Abb. 95). Die E3- und E5-behandelten Zellen wiesen auch mit Beginn der ersten Kontraktionen (~48 h nach Isolation) einen Phänotyp auf, denn sie schlugen mit einer auffallend langsameren Frequenz als die anderen Kontrollzellen, wie Empty oder Non-Target bzw. unbehandelte NRCM. Auch auf mRNA-Ebene zeigte sich eine starke Herunterregulation der smMLCK 220 kDa. Die Reduzierung der smMLCK 130 kDa stand in Einklang mit den Proteinmengen (s. Abb. 98).

4.2.3 Unspezifische Effekte von si/shRNA

Um einen sequenzspezifischen Effekt der siRNA auf die mRNA des Ziel-Gens zu detektieren, ist es sinnvoll Kontrollen mitzuführen. Diese können aus siRNAs bestehen, die sich nur in wenigen Basen von der effektiven siRNA unterscheiden. Dies gibt eine hohe Sicherheit, dass der Effekt der vollständig komplementären siRNA sequenzspezifisch ist (Elbashir et al., 2001c). Jedoch haben Untersuchungen gezeigt, dass ein sogenannter *Mismatch* von nur wenigen Basen dennoch zu einem Effekt auf die mRNA Expression führen kann (Jackson et al., 2003 und eigene Ergebnisse, s. z. B. 4.2.2.2). Eine andere Möglichkeit

ist der Einsatz von *scrambled* siRNA bzw. siRNA, die keine Homologie im speziesspezifischen, z. B. murinen, Genom besitzt (Elbashir et al., 2001a). Dies ermöglicht die Detektion von sequenzspezifischen Effekten der siRNA. Gleichzeitig sollten mehrere siRNAs gegen dieselbe mRNA ausgetestet werden, um den sequenzspezifischen Effekt sicherzustellen. Daher wurden für die lentivirale shRNA-Expression zwei verschiedenen shRNA-Sequenzen verwendet, die zu einem vergleichbaren *Knockdown* geführt haben. Der logistische Arbeitsaufwand ist mit den verschiedenen Virussorten jedoch nicht unerheblich, daher wurde in den EHTs später nur die E3-Sequenz weiterverwendet. Wichtiger war es, unspezifische Effekte durch Lentiviren bzw. lentiviral-vermittelte shRNA-Expression durch die Kontrollviren Empty und Non-Target festzustellen bzw. auszuschließen.

4.2.4 Das EHT-Modell

EHTs bestehen fast ausschließlich aus NRCM, die der Herzkammer entstammen, da die Vorhöfe, soweit möglich, während der Präparation abgetrennt werden (s. 2.6.3). Dass jedoch NRCM vom Herzkammertyp aufgrund ihres Entwicklungsstadiums eher denen der erwachsenen Vorhofzellen entsprechen, wurde von Bootman et al. (2006) beschrieben: Neugeborene Herzmuskelzellen aus der Herzkammer verfügen ebenso wie erwachsene Vorhofzellen über kein transversales Tubulus-System (T-Tubulus-Systems) und sind vielmehr mit den Vorhofzellen als mit den Herzkammerzellen erwachsener Herzmuskelzellen in Einklang zu bringen. Weiterhin verfügen Herzmuskelzellen aus der Herzkammer während einer Herzinsuffizienz fortschreitend über ein vermindertes T-Tubulus-System und entsprechen dann eher den Vorhofzellen. Daher war das Modell der NRCM bzw. der aus NRCM hergestellten EHTs gut geeignet, um einen Einblick in nachgeahmte vorhofspezifische Effekte eines funktionellen smMLCK *Knockdowns* zu bekommen. Dieser Punkt war daher interessant, da α_1 -adrenerg-vermittelte Effekte im Vorhof eine größere Rolle spielen als in der Herzkammer (Opie, 2001).

Es konnte in dieser vorliegenden Arbeit erstmalig der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt am EHT-Modell mithilfe von dem α_1 -Adrenozeptor-Antagonisten Prazosin gezeigt werden (s. Abb. 76). Darüber hinaus zeigte sich auch eine ausgeprägte Abhängigkeit des α_1 -adrenergen positiv inotropen Effektes von der MLCK, was mittels dem MLCK-Inhibitor ML-7 in Kontraktionsexperimenten gezeigt werden konnte (s. Abb. 77). Die β -adrenerg-vermittelte Kontraktionskraft war unter diesen Versuchsbedingungen ebenfalls stark vermindert (s. Abb. 78). Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Daten der isolierten Vorhöfe der Maus, allerdings ist der ausgeprägte Effekt auf die β -adrenerg-vermittelte Kontraktionskraft

überraschend. Möglicherweise spielen hier auch unspezifische Effekte des Inhibitors eine Rolle (vgl. S. 190).

4.2.4.1 Lentiviral-vermittelter smMLCK *Knockdown* in EHTs

EHTs zeigen eine gewisse Variabilität zwischen den einzelnen Serien. Dies mag erklären, warum nicht alle Effekte bei allen Serien in gleichem Ausmaß auftraten. Im Unterschied zu Kardiomyozyten in Monolayerkultur liegen Kardiomyozyten in EHTs im Verband mit anderen Zellen vor, die sie möglicherweise weniger empfindlich gegenüber toxischen Einflüssen machen. Zur klaren Herausarbeitung der Effekte von einem smMLCK *Knockdown* war es daher in einem System wie den EHTs, die einer größeren biologischen Variabilität unterliegen, durch die die Detektion kleiner Effekte erschwert wird, hilfreich, einen smMLCK *Knockdown* über 12 bis 14 Kulturtage durchzuführen, ein sogenannter Langzeit-*Knockdown*. Bei EHTs handelt es sich um ein sich entwickelndes Herzgewebe, in dem Kardiomyozyten differenzieren. EHTs weisen einige Tage nach ihrer Herstellung Charakteristika von differenziertem erwachsenem Herzgewebe auf (Zimmermann et al., 2002). Sie benötigen für ihre Entwicklung „hypertrophe“ Kulturbedingungen, die durch Verwendung von Extrazellulärmatrix (Matrigel™) zur Herstellung des Konstruktes wie auch durch Kultivierung in Medium, dem 10% Pferdeserum sowie 2% Hühnerembryonenextrakt zugesetzt sind, erreicht werden. Die Kultur in dem serumhaltigem Medium bewirkt eine starke Wachstumsförderung (Freshney, 2005). EHTs werden nicht aus aufgereinigten Kardiomyozyten hergestellt, sondern enthalten bei der Herstellung die Zellzusammensetzung des neugeborenen Herzens. Im Laufe der Entwicklung des EHT-Modells zeigte sich, dass EHTs, die aus der nativen Zellpopulation und nicht aus aufgereinigten Kardiomyozyten hergestellt wurden, größere Festigkeit und bessere kontraktile Eigenschaften aufwiesen (Schneiderbanger et al., 2001). Von Naito et al. (2006) konnte im EHT-Modell der Ratte nachgewiesen werden, dass Nicht-Kardiomyozyten bei der Ausbildung kontraktiler Herzmuskelgewebe eine wichtige Rolle spielen. Im Verlauf der Kultur und Entwicklung überlebt in EHTs nur ein Teil der eingesetzten Zellen; von 2,5 Mio. eingesetzten Zellen überleben zwischen 0,5 und 1 Mio. Zellen. Dadurch kann eine Beeinflussung der Zellzusammensetzung während der Kultur nicht ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Fibroblasten nach Untergang von Kardiomyozyten und/oder glatten Muskelzellen verstärkt proliferieren und den zur Verfügung stehenden Raum nutzen. Diesen Effekt kann man beobachten, wenn Kardiomyozyten in Monolayerkultur in geringer Dichte ausgesät sind. In EHTs entstand nach Anfärbung der Zellkerne mit TO-PRO®-3 Iodid jedoch nicht der Eindruck einer erhöhten Anzahl von Zellkernen (s. Abb. 117). Aufgrund der inhomogenen Zellverteilung in den EHTs als Bündel und Zellnester sowie auch als

vereinzelte Zellen ist eine Quantifizierung jedoch schwierig, und nur sehr ausgeprägte Unterschiede sind sicher zu erkennen. Für einen großen Anteil von Nicht-Kardiomyozyten an den erhaltenen Ergebnissen und eine Zunahme der Zellzahl spricht, dass die mRNA-Expression der smMLCK 220 kDa in NRCM, die mit einem Antimetaboliten behandelt wurden, nach 5,5 Tagen Behandlungszeit mit den Lentiviren deutlich reduziert war, während die mRNA-Expression der smMLCK 220 kDa in EHTs nach 12 bis 14 Kulturtagen gleich der Kontrollen war (s. Abb. 98 und 116). Zusätzliche Hinweise auf diese Veränderung geben die aus den NIH3T3-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten gewonnene mRNA-Daten. Nach 48 h kam es zu einer deutlichen Herunterregulation der smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge, die dann nach 7 Tagen jedoch nicht mehr so stark war (s. Abb. 90). Diese Zellen wurden nicht mit einem Antimetaboliten behandelt und unterlagen während der Inkubationszeit mit den Lentiviren ihrem natürlichen Zellwachstum.

Anhand von Kontraktionsexperimenten mit den lentiviral-infizierten EHTs konnte in der E3-Gruppe nicht nur eine geringere basale Kraft gezeigt werden, viele der mit dem E3-Lentivirus infizierten EHTs schlugen gar nicht mehr und konnten weder durch starke elektrische Stimulation noch durch pharmakologische Substanzen wie Phenylephrin, Isoprenalin oder Calcium zum Schlagen gebracht werden. Während der Kulturzeit ließ sich in diesen EHTs auch ein Phänotyp beobachten, sie kondensierten langsamer als die zugehörigen Kontroll-EHTs und schlugen auch auffallend schwächer bzw. immer seltener während der täglichen Kontrolle im Phasenkontrastmikroskop. Die verbleibenden E3-behandelten EHTs zeigten zwar schwache, aber durchweg regelmäßige Kontraktionen über das gesamte Experiment. Sie erreichten nur 20% des maximalen Phenylephrineffektes und zeigten auch einen deutlichen Einfluss auf die β -adrenerge Stimulation (s. Abb. 100 und 101). Die Kontroll-Lentivirus-EHTs hingegen zeigten keine signifikanten Unterschiede zu den unbehandelten EHTs, sodass generelle toxische Effekte durch das Lentivirus oder die lentiviral-vermittelte shRNA-Expression weitgehend ausgeschlossen werden können.

Auf die Calcium-vermittelte, Rezeptor-unabhängige Kontraktionskraft scheint der smMLCK *Knockdown* keinen Einfluss genommen zu haben. Die Calciumkurven unterschieden sich nicht signifikant voneinander (s. Abb. 102). Insgesamt war deutlich, dass die EHTs sehr sensitiv auf Änderungen der extrazellulären Calciumkonzentration ansprachen und früh eine Plateauphase erreichten. Eine ähnlich hohe Sensitivität wurde bereits im EHT-Modell der Ratte und der Maus beobachtet (Zimmermann et al., 2002; Armbrüster, 2007). Grundsätzlich deutet dieser Befund auf eine unphysiologische bzw. unreife Calciumhomöostase in EHTs hin. Gründe für diesen Unterschied zu nativem Herzgewebe könnten eine gesteigerte Funktion sarkolemmaler Calciumtransporter (z. B. Natrium-Calcium-Austauscher), eine

verminderte Calciumspeicher- und Freisetzungskapazität des sarkoplasmatischen Retikulums und/oder Unterschiede in der Calciumsensitivität der Myofibrillen sein. Dass die kontraktile Funktion von unreifem Herzgewebe wesentlich von sarkolemalem Calcium-In- und Efflux abhängt, ist u. a. anderem von Vornanen (1996) beschrieben worden.

Bei der Quantifizierung des erfolgreichen *Knockdowns* (s. Abb. 100) von der smMLCK auf Protein- (s. Abb. 104) und mRNA-Ebene (s. Abb. 116) fällt auf, dass die Suppression auf Protein-Ebene teilweise stärker ausfällt als auf mRNA-Ebene (Reduktion um 56,1% insgesamt, einzelne Serien, n=6, aber um 76,4% auf Protein-Ebene vs. 42,2% auf mRNA-Ebene). Vermutlich ist dies darauf zurückzuführen, dass zusätzlich zum siRNA-Effekt auch ein miRNA-Effekt vorliegt, der zwar zu einer Inhibition der Translation, nicht jedoch zur Degradation der mRNA führt. Die Konsequenz wäre, dass es keine reine siRNA und keine reine miRNA gibt, sondern kurze, komplementäre RNAs immer beide Aspekte in sich vereinen. Die Entscheidung in Richtung miRNA-Effekt scheint durch die Sekundärstruktur der Basenpaarung getroffen zu werden in dem Sinne, dass eine nicht vollständige Basenpaarung, d. h. sterische Unregelmäßigkeit, eine Degradation verhindert (Hutvagner und Zamore, 2002). Es wäre durchaus vorstellbar, dass bestimmte Sekundärstrukturen der dsRNA-Region die Nukleaseaktivität von RISC graduell inhibieren, sodass je nach individueller Sequenz jede reale kleine RNA in ihren Eigenschaften irgendwo zwischen den Extremen „siRNA“ und „miRNA“ steht. Ein weiteres Argument für diese Hypothese ist, dass in einem solchen Szenario nur ein Proteinkomplex, nämlich RISC, für beide Funktionen hinreichend wäre.

Da überraschenderweise ein lentiviraler, shRNA-vermittelter smMLCK *Knockdown* in EHTs zu einer ausgeprägten, sogar stärkeren als smMLCK-, Reduzierung der MLC2v- und MLC2a-P-Proteinmengen führte (s. Abb. 106 und 108), wurden die shRNA-Sequenzen E3 und E5 nochmals auf Spezifität überprüft. Es ergab sich jedoch sowohl für die E3- als auch für E5-shRNA-Sequenz keinerlei Homologie zu der MLC2-Sequenz der Ratte. Darüber hinaus konnte auf mRNA-Ebene auch eine Reduktion der MLC2a-mRNA-Menge nachgewiesen werden (s. Abb. 116). Andere kardiale Strukturproteine wie α -Aktinin, β -Aktin und cMyBP-C waren von dem lentiviral-vermittelten smMLCK *Knockdown* unbeeinflusst, wie auf Protein-Ebene gezeigt werden konnte (s. Abb. 111, 113 und 115). Das heißt, dass generelle toxische Effekte des smMLCK *Knockdowns* ausgeschlossen werden können (s. a. Abb. 117). Eine mögliche Erklärung für den ausgeprägten Effekt auf die Herunterregulation der MLC2-Proteinmenge könnte eine bisher unbekannte Abhängigkeit der Proteine MLCK und MLC2 sein. Wenn die MLCK nicht mehr vorhanden ist, bzw. reduziert wird, wird möglicherweise auch ihr alleiniges Zielprotein, die MLC2 herunterreguliert.

4.2.4.2 Immunfluoreszenz von lentiviral-infizierten EHTs

Die strukturellen Auswirkungen des smMLCK *Knockdowns* wurden mit hochauflösender, konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Bei Aussagen über die Morphologie ist zu bedenken, dass die Kardiomyozyten in EHTs nicht homogen verteilt sind, sondern sich teilweise zu vernetzten Strängen anordnen und zu einem anderen Teil einzeln oder in kleineren Zellverbänden vorliegen. Aufgrund dieser Inhomogenität sind nur sehr deutliche Veränderungen in der Morphologie sicher zu erkennen. Es wurden mehrere Zellen untersucht und die Sarkomerlängen vermessen, hierbei konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Non-Target- und E3-infizierten-Zellen festgestellt werden (s. Abb. 118). Lediglich die Anzahl der Zellen insgesamt erschien in den E3-behandelten EHTs auffallend geringer als in den Non-Target-behandelten EHTs.

4.2.4.3 Lentiviral-vermittelter smMLCK *Knockdown* in SMC-Pseudo-EHTs

Aus E5-lentiviral-stabil transfizierten SMC sowie den dazugehörigen Kontrollzellen wurden SMC-Pseudo-EHTs hergestellt und anhand von Kontraktionsexperimenten untersucht. Dabei wurde zusätzlich zum smMLCK *Knockdown* der Effekt von pharmakologischen MLCK-Inhibitoren und Rho-Kinase-Inhibitoren untersucht.

Die Zugabe des MLCK-Inhibitor ML-7 führte in den SMC-Pseudo-EHTs, im Gegensatz zu den Herzmuskelzell-EHTs und linken Vorhöfen der Maus, zu einer Zunahme der Kontraktionskraft (s. Abb. 120). Eine α_1 -adrenerge Stimulation zeigt in den E5-behandelten SMC-Pseudo-EHTs keinen positiv inotropen Effekt. Der Wechsel auf kaliumreiche Tyrode-Lösung und infolgedessen ausgelöster maximaler Calciumeinstrom führte in den ML-7-behandelten SMC-Pseudo-EHTs zu einer abgeschwächten Zunahme der Kontraktionskraft. Darüber hinaus war die Zunahme der Kontraktionskraft in den lentiviral-stabil transfizierten EHTs geringer als in den Kontroll- SMC-Pseudo-EHTs.

Im glatten Muskel wird die MLCP durch die Rho-Kinase gehemmt. Die Aktivierung der Rho-Kinase durch das kleine G-Protein Rho A führt somit zu einer vermehrten MLC2 Phosphorylierung und zur Kontraktion des Muskels (s. Abb. 7). Dies geschieht im Gegensatz zur Phosphorylierung durch die MLCK, die Calcium/Calmodulin-abhängig ist, auf eine Calcium-unabhängige Weise (Somlyo und Somlyo, 2000). Um den Einfluss der Rho-Kinase zu untersuchen wurde mit einem Rho-Kinase-Inhibitor, Y-27632, in einer Konzentration von 10 μM gearbeitet. Y-27632 hemmt die Rho-Kinase mit einer IC_{50} von 0,7-0,8 μM und wird als sehr spezifischer Inhibitor beschrieben (Uehata et al., 1997; Davies et al., 2000). Daher kann von einer vollständigen Hemmung der Rho-Kinase ausgegangen werden. Der Rho-Kinase-

202

Inhibitor führte basal zu einem besonders ausgeprägten negativ inotropen Effekt in den SMC-Pseudo-EHTs (s. Abb. 122). Eine Zufuhr von Phenylephrin hatte lediglich auf die Kontrollgruppe einen positiv inotropen Effekt. Der durch die kaliumreiche Tyrode-Lösung ausgelöste Calciumeinstrom führte in allen SMC-Pseudo-EHTs zu einer Kontraktionskraftzunahme, wenngleich diese in den Kontroll-EHTs größer war. Im Gegensatz zur MLCK-Inhibition reagierten die mit dem Rho-Kinase-Inhibitor Y-27632 behandelten SMC-Pseudo-EHTs jeweils stärker auf den Calciumeinstrom als die Kontroll-EHTs (s. Abb. 122). Der Effekt von Y-27632 ist ausgeprägter als die Hemmung der MLCK im glatten Muskel. Dieses könnte auch ein Substanz- und/oder Gewebe-typisches Phänomen sein, denn die Gruppe um Andersen et al. (2002) fand an Papillarmuskeln der Ratte den gegenteiligen Effekt. Dort hob eine Hemmung der Rho-Kinase die Phenylephrin-Wirkung weniger effektiv auf, als die Inhibition der MLCK. Diese Ergebnisse konnten von unserer eigenen Arbeitsgruppe an menschlichen Vorhofproben bestätigt werden (Grimm et al., 2005).

Von Sah et al. (1996) konnte bereits eine Verbindung zwischen dem α_1 -adrenergen Signalweg und Rho A in Kardiomyozyten gezeigt werden. Ferner konnte durch Inhibition der Rho-Kinase die Phenylephrin-induzierte Erhöhung der Calcium-Sensitivität an gehäuteten Kardiomyozyten aus insuffizienten Hundeherzen aufgehoben werden (Suematsu et al., 2001). Daher führt möglicherweise eine Stimulation kardialer α_1 -Adrenozeptoren zur Phosphorylierung der MLC2 durch Rho A-vermittelte Aktivierung der Rho-Kinase und einer daraus resultierenden Hemmung der MLCP.

Sowohl ML-7 als auch Y-27632 nahmen in den lentiviral-stabil transfizierten SMC-Pseudo-EHTs einen basalen Einfluss auf die Kontraktionskraft, der Phenylephrineffekt blieb jedoch unbeeinflusst bzw. war nicht detektierbar. Diese Versuche zeigen, dass ein smMLCK *Knockdown* in glatten Muskelzellen den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt nahezu vollständig aufhebt, und ein MLCK-Inhibitor oder ein Rho-Kinase Inhibitor keinen zusätzlichen Einfluss ausübt. Dieses unterstützt die Schlüsselfunktion der MLCK in der α_1 -adrenergen Signalkaskade der glatten Muskulatur und liefert Rückschlüsse auf den Herzmuskel. Bezüglich der durch die kaliumreiche Tyrode-Lösung-vermittelte Calciumfreisetzung konnte sowohl ML-7 als auch Y-27632 noch additive Effekte zum smMLCK *Knockdown* zeigen, dieses spricht für die Beteiligung weiterer Faktoren an der Calciumfreisetzung im glatten Muskel. Somit konnte das Modell der glatten Muskelzellen eine zusätzliche Information über einen smMLCK *Knockdown* in einem anderen Gewebe liefern und dieses mit gleicher Deutlichkeit wie in den aus NRCM hergestellten EHTs.

4.3 Einschränkungen und offene Fragen

An erster Stelle steht sicherlich die Frage der Übertragbarkeit auf die *in vivo* Situation im Menschen oder auch im Tier. Um die Frage einer Beeinflussung der kontraktile Funktion durch einen MLCK *Knockdown* definitiver zu klären, wäre es hilfreich, adulte Ratten oder Mäuse mit shRNA-exprimierenden Lentiviren zu behandeln und an isolierten Vorhöfen Kontraktionsmessungen durchzuführen. Damit könnten Einflüsse von einem MLCK *Knockdown* auf die Entwicklung des Herzgewebes, wie das bei EHTs mit Sicherheit der Fall ist, ausgeschlossen werden. Dagegen spricht, dass ein smMLCK-Langzeit-*Knockdown* nicht möglich ist, da die smMLCK ubiquitär, d. h. auch in glatter Muskulatur (wie z. B. Blutgefäßen), vorkommt. Somit wäre mit einer Veränderung des ganzen Körpers des Tieres während des Langzeit-smMLCK-*Knockdowns* zu rechnen. Des Weiteren wäre die erfolgreiche Art der Applikation und die folgende Effizienz der Infektion fraglich. Dahingegen gibt es von Somlyo et al. (2004) ein nicht näher beschriebenes smMLCK-*Knockout*-Mausmodell, bei dem die kurze und die lange smMLCK-Isoform sowie Telokin ausgeschaltet wurden. Überraschenderweise trat lediglich eine Deformation der Köpfe bei einigen Mäusen als Phänotyp des *Knockouts* auf. Allerdings verstarben Mäuse mit einem smMLCK *Knockout* 1-5 h nach ihrer Geburt. Somit wären Kontraktionsexperimente oder ähnliche Untersuchungen ausgeschlossen. Es ist auch nicht möglich, einen Vorhof zu entnehmen und mit dem Virus zu infizieren, da der *Knockdown* mehrere Tage benötigt. Anschließend könnten keine Kontraktionsexperimente mehr durchgeführt werden, da die Vorhöfe nicht wieder zum Schlagen gebracht werden können (eigene orientierende Experimente bestätigten diese Vermutung). Eine völlige Unabhängigkeit auch von anderen Zelltypen könnte bei Kontraktionsexperimenten mit isolierten adulten Kardiomyozyten erreicht werden, bei denen aber die Interventionsdauer durch die nur für kurze Zeit mögliche Kultur eingeschränkt ist. Auch lassen sich insbesondere die für α_1 -adrenergen Effekte eher interessanten Vorhofzellen bisher nicht in einer ausreichenden Menge für einen geeigneten Zeitraum isolieren.

Von den Arbeitsgruppen Seguchi et al. (2007) und Chan et al. (2008) wurde vor kurzem erstmalig eine neue MLCK-Isoform, die kardiale MLCK (cMLCK), beschrieben. Sie wird offenbar von einem weiteren MLCK-Gen, dem MYLK3, codiert, welches äußerst spezifisch in Herzmuskelgewebe und in geringer Menge im Skelettmuskel zu finden ist. Patienten mit einer Herzinsuffizienz wiesen erhöhte Mengen des MYLK3-Gens auf, und in kultivierten NRCM konnte mittels siRNA ein *Knockdown* der cMLCK sowie infolgedessen eine Abnahme der MLC2v Phosphorylierung gezeigt werden. Ein weiteres *Knockdown*-Modell der cMLCK im Zebrafisch zeigte dilatierete Herzkammern sowie unreife Sarkomerstrukturen. Die Vorhöfe schienen jedoch von dem cMLCK *Knockdown* unbeeinflusst zu bleiben.

Die in dieser vorliegenden Arbeit verwendeten shRNA-Sequenzen gegen die smMLCK (sowohl adeno- als auch lentiviral) zeigten keinerlei Homologie zu der von Seguchi et al. (2007) beschriebenen, neuen cMLCK. Da aber durch den lentiviralen smMLCK *Knockdown* drastische Effekte auf die Kontraktionskraft erzielt wurden, und auch auf Protein- sowie mRNA-Ebene der smMLCK *Knockdown* nachgewiesen wurde, scheint es mehrere an der Kontraktilität des Herzens beteiligte MLCK-Isoformen zu geben. Eine der drängendsten Fragen ist, ob die smMLCK 220 kDa einen Anteil an der α_1 -adrenerg-vermittelten Kontraktionskraft im Herzen trägt. Dazu könnten z. B. Kontraktionsexperimente mit adenoviral-infizierten EHTs angefertigt werden. Da jedoch die smMLCK 220 kDa im linken Vorhof der Maus nur 18,8% Anteil an der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge trägt (diese Daten lassen allerdings nur eine Abschätzung auf die Verteilung der Anteile in NRCM bzw. EHTs zu), ist es wie bereits zuvor diskutiert unwahrscheinlich, dass die smMLCK 220 kDa oder die skMLCK einen bedeutenden Anteil an dem α_1 -adrenerg positiv inotropen Effekt tragen. Dieses unterstützen auch die Knockout-Modelle von Ohlmann et al. (2005) und Zhi et al. (2005). Daher bleiben die smMLCK 130 kDa der vorliegenden Arbeit sowie die neuen Daten der cMLCK als wahrscheinliche Protagonisten für die Phosphorylierung der MLC2 und nachfolgende Zunahme der Kontraktionskraft. Es ist durchaus denkbar, dass zwei verschiedene MLCK-Isoformen, möglicherweise auf unterschiedliche Art, an der α_1 -adrenergen Signalkaskade beteiligt sind. Von Somlyo et al. (2004) wurde beschrieben, dass scheinbar die smMLCK-Aktivität zwar ausreicht, jedoch nicht unbedingt nötig ist, um während der embryonalen Entwicklung die MLC2 zu phosphorylieren und kardiale Kontraktionen auszulösen. Bekannt ist, dass der Herzmuskel im Gegensatz zum Skelettmuskel über mehrere Phosphorylierungswege positiv inotrop beeinflusst wird, wie z. B. unter PKC-Beteiligung. Darüber hinaus wäre eine klare Differenzierung zwischen smMLCK und cMLCK bezüglich Lokalisation und Funktion für weitere Untersuchungen wünschenswert. Insgesamt sind für die verschiedenen MLCK-Isoformen mannigfaltige Funktionen/Beteiligungen beschrieben worden, wie z. B. Endothelzellpermeabilität, kontraktile Aktivität und Proliferation, Zytokinese, Sekretion, Modulation von Ionenkanalströmen, Neuritenwachstum, Signaltransduktionswege die zur Apoptose von Fibroblasten führen und Aufrechterhaltung von normaler Herzfunktion (Somlyo et al., 2004).

Für die Zukunft stellen sich folgende Fragen:

- Wenn nicht IP₃-Rezeptor-vermittelt, woher kommt dann das Calcium für die MLCK-Aktivierung?
- Welchen Einfluss hat der RyR in Bezug auf die Calcium-vermittelte MLCK-Aktivierung? Wird seine Bedeutung in Vorhofzellen, wo α_1 -adrenerge Effekte im Vergleich zur Herzkammer eine wichtigere Rolle spielen, trotz seiner nur peripheren Expression an den Kardiomyozyten möglicherweise unterschätzt?
- Bleibt ein adenoviraler *Knockdown* der smMLCK 220 kDa in EHTs ohne Effekt auf die Phenylephrin-vermittelte Kontraktilität, und ist somit die smMLCK 130 kDa als wichtigste smMLCK-Isoform für den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt identifiziert?
- Zeigt der lentivirale *Knockdown* der smMLCK 130 kDa in erwachsenen Herzmuskelzellen ähnliche Ergebnisse wie in neugeborenen Herzmuskelzellen?
- Ist dieses Protein in der menschlichen und/oder experimentellen Herzinsuffizienz reguliert?
- Kann die MLCK ein potentielles Target für Therapien in der Herzinsuffizienz sein?
- Welche Rolle spielt die vor kurzem beschriebene cMLCK? Welche Gemeinsamkeiten und Unterschiede gibt es zur smMLCK 130 kDa in Bezug auf den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt im Vorhof und auch in EHTs?

Ein potentielles Modell zur Beantwortung dieser Fragen könnten u. a. transgene Mäuse mit einer konditionalen herzspezifischen Ausschaltung der smMLCK 130 kDa und im Vergleich der cMLCK sein. Die Generierung solcher Tiermodelle wurde in der Folge der vorliegenden Arbeit gerade initiiert.

5 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziele:

Katecholamine vermitteln ihre Wirkungen am Herzen über die Aktivierung von sowohl α_1 - als auch β -Adrenozeptoren. Durch Stimulation der Gq-gekoppelten α_1 -Adrenozeptoren wird neben der längerfristigen hypertrophen Wirkung akut ein positiv inotroper Effekt ausgelöst. Der genaue Mechanismus der α_1 -adrenergen Signalkaskade ist seit ~30 Jahren umstritten. Es gibt pharmakologische Hinweise auf eine Schlüsselrolle des Proteins Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK), wie erstmalig Daten von menschlichem Herzgewebe zeigten (Grimm et al., 2005). Diese sind zwar spannend und richtungsweisend, dennoch nicht beweisend, daher sollte in dieser Arbeit die MLCK und ihre Bedeutung für den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt auf molekularer Ebene untersucht werden.

Die vorliegende Arbeit hatte folgende Ziele:

1. Die Charakterisierung des Signalweges, der die α_1 -adrenergen Signale zur Aktivierung der MLCK vermittelt.
2. Die Identifizierung der MLCK-Isoform, die für den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt notwendig ist.
3. Die Untersuchung eines funktionellen MLCK *Knockdowns* mithilfe der RNA-Interferenz und dessen Auswirkung auf den α_1 -adrenergen Effekt.

Methoden:

1. Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurde als Modell die funktionelle Messung an isolierten linken Vorhöfen der Maus unter isometrischen Bedingungen im Organbad herangezogen. Diese Methode ermöglicht eine stabile, gut reproduzierbare Messung von kontraktile Parametern über mehrere Stunden. Um die α_1 -adrenerge Signalkaskade im Hinblick auf die MLCK zu charakterisieren, wurden Konzentrations-Wirkungs-Kurven des α_1 -Adrenozeptor-Agonisten Phenylephrin in Anwesenheit des β -Adrenozeptor-Antagonisten Nadolol sowie in An- und Abwesenheit von verschiedenen pharmakologischen Inhibitoren erstellt. Zusätzlich wurde mittels Inhibitor die IP_3 -Rezeptor-vermittelte Calciumfreisetzung und deren Auswirkung auf den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt ermittelt.
2. Die MLCK-Isoformen wurden anhand von biochemischen Methoden auf Protein- und mRNA-Ebene mithilfe von Western Blot, nicht-quantitativer Reverser Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) und quantitativer RT-PCR untersucht.

3. Für die Untersuchung des Einflusses von einem Langzeit-smMLCK-*Knockdown* und dessen Auswirkung auf die kontraktile Funktion von Kardiomyozyten wurde das Modell des *Engineered Heart Tissue* (EHT) gewählt, da es eine längere Behandlungszeit ermöglicht und Kontraktionsparameter relativ einfach zu erheben sind. Weiterhin wurde die Form des lentiviralen Gentransfers angewandt, da sich zeigte, dass es zu keinen unspezifischen toxischen Effekten, wie etwa mit Adenoviren, kommt.

Ergebnisse:

1. Der α_1 -adrenerge positiv inotrope Effekt nach MLCK-Inhibition durch verschiedene pharmakologische Substanzen war deutlich reduziert. Teilweise war auch die β -adrenerg-vermittelte Kontraktionskraftzunahme durch eine MLCK-Hemmung beeinflusst. Eine Hemmung des IP₃-Rezeptors hatte keinen Einfluss auf den α_1 -adrenergen positiv inotropen Effekt.
2. Die smMLCK 130 kDa hat den größten Anteil an der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge im linken Vorhof der Maus (76,7%), gefolgt von der smMLCK 220 kDa (18,8%) und der skMLCK (4,5%). Diese Daten und zwei verschiedene Knockout-Mausmodelle (Ohlmann et al., 2005; Zhi et al., 2005) führten zu der Vermutung, dass die smMLCK 130 kDa die wichtigste Rolle bei der α_1 -adrenerg-vermittelten Kontraktionskraftentwicklung spielt.
3. Ein smMLCK *Knockdown* führte in EHTs zu einer massiven Verschlechterung der Kontraktionskraft und einem verminderten Ansprechen auf den α_1 -adrenergen-Agonisten Phenylephrin. Auch die von Isoprenalin vermittelte β -adrenerge Kontraktionskraftzunahme war durch den smMLCK *Knockdown* beeinflusst. Darüber hinaus war neben der Herunterregulation der smMLCK auch eine massive Reduktion des Zielproteins, der MLC2, mittels Western Blot festzustellen. Andere kardiale Strukturproteine blieben von dem smMLCK *Knockdown* unbeeinflusst.

Schlussfolgerung:

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die smMLCK 130 kDa die dominante MLCK-Isoform im Herzen ist, wobei die cMLCK noch unbetrachtet geblieben ist. Die ausgeprägte Reduktion des Phenylephrineffektes in smMLCK *Knockdown*-EHTs ist ein molekularer Beleg für die Bedeutung dieses Proteins in der α_1 -adrenergen Signalkaskade. Die drastische Abnahme der basalen Kraft spricht aber für eine konstitutive Rolle der smMLCK für den basalen Kontraktionsmechanismus und könnte durch den Verlust von MLC2 erklärt werden, dieser Zusammenhang muss zukünftig untersucht werden.

5.1 Summary

Background:

The effect of catecholamines is mediated by activation of α_1 - as well as by β -adrenoceptors. Stimulation of Gq-coupled α_1 -adrenoceptors causes a long-term hypertrophy outcome and an acute positive inotropic effect. The exact mechanisms of the α_1 -adrenergic positive inotropic effect have been enigmatic and controversial for more than 30 years. Pharmacological evidence suggested involvement of myosin light chain kinase (MLCK), as for the first time shown in human heart muscle by Grimm et al. (2005). These results are fascinating and trend-setting but not evidentiary. Therefore, this thesis focuses on MLCK and their role in the α_1 -adrenergic positive inotropic effect at molecular level.

The present thesis had following aims:

1. Characterisation of the signalling pathway, which imparts the α_1 -adrenergic signals for MLCK activation.
2. Identification of the MLCK-isoform, which is essential for the α_1 -adrenergic positive inotropic effect.
3. Investigation of a functional MLCK knockdown by RNA interference and its consequence on the α_1 -adrenergic positive inotropic effect.

Methods:

1. To study this question the model of functional force measurement on isolated left mice atria under isometric conditions in organ baths was used. This method allows a stable and reproducible measurement of contractile parameters for several hours. In presence of the β -adrenoceptor-antagonist nadolol the α_1 -adrenoceptor-agonist phenylephrine was used in a dose-response-relationship with or without different pharmacological inhibitors to distinguish the α_1 -adrenergic signalling cascade with regard to MLCK. In addition, the IP_3 -receptor-mediated calcium release and its implication on the α_1 -adrenergic positive inotropic effect was determined.
2. The MLCK-isoforms were analyzed by biochemical methods on protein- and mRNA-level through western blots, non-quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and quantitative RT-PCR.

3. The model of “Engineered Heart Tissue” (EHT) was chosen for the investigation of the influence of a long-term-smMLCK-knockdown and its consequence on the contractile function of cardiac myocytes. This model offers a long treatment period and the contractile parameters are easy to measure. Moreover a lentiviral-based gene transfer was used, since it shows no unspecific toxic effects as the adenoviruses.

Results:

1. After MLCK-inhibition with different pharmacological matters the α_1 -adrenergic positive inotropic effect was reduced distinctly. The β -adrenergic-mediated increase in force was partly affected, as well. The IP_3 -receptor-inhibitor had no influence on the α_1 -adrenergic positive inotropic effect. This leads to the assumption that the calcium for the calcium/calmodulin-dependent MLCK derives from another, so far unknown, source.
2. The smMLCK 130 kDa shares the biggest part of the total-MLCK-mRNA-amount in the mouse left atrium (76.7%), followed by smMLCK 220 kDa (18.8%) and the skMLCK (4.5%). The basis of these data in combination with two different knockout-mouse-models (Ohlmann et al., 2005; Zhi et al., 2005) induced the presumption that the smMLCK 130 kDa plays the major role in the α_1 -adrenergic-mediated development of contractile force.
3. In EHTs the smMLCK knockdown caused a massive impairment of the force of contraction and a diminished reaction to the α_1 -adrenoceptor-agonist phenylephrine. Also the β -adrenergic-mediated increase in force by isoprenaline was affected by the smMLCK knockdown. Beyond downregulation of smMLCK an enormous reduction of the target-protein, the MLC2, was detectable by western blot. Other cardiac structure proteins were unaffected by the smMLCK knockdown.

Conclusion:

The smMLCK 130 kDa is the dominant MLCK-isoform in the heart; however, the cMLCK was not investigated. The distinct reduction of the phenylephrine effect in smMLCK knockdown-EHTs is a molecular evidence for the importance of this protein in the α_1 -adrenergic signalling cascade. The dramatic decrease of the basal force indicates a constitutive role of the smMLCK for the basal contractile mechanism. The loss of MLC2 could be an explanation for these results, and this context should be explored in the future.

6 Abkürzungsverzeichnis

6.1 Fachsprachliche Abkürzungen und Bezeichnungen

Für internationale Einheiten (SI = französisch: *Système international d'unités*) wurden in der Regel die international gültigen Abkürzungen verwendet.

2-APB	2-Aminoethoxy-diphenylborat
A	Absorption
A	Adenin
Abb.	Abbildung
Ad5	Adenoviren vom Serotyp 5
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Ak-Lösung	Antikörper-Lösung
ALC-2	Atriale Isoform der regulatorischen Myosin-Leichtkette
Amp	Ampicillin
AmpR	Ampicillin-Resistenz
An	Polyadenylierungsstelle
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> = Varianzanalyse
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
Ara-C	Cytosin β -D-arabinofuranosid
ASO	<i>Antisense</i> Oligonukleotide
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Ein am Energiestoffwechsel beteiligtes Enzym (Hydrolase)
AV	Adenoviren
$\beta\gamma$ -Komplex	Komplex aus β - und γ -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine
BDM	2,3-Butandionmonoxim
bp	Basenpaare
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
cAMP	Zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat
CBFHH	Calcium- und bicarbonatfreier Hanks Puffer mit HEPES
CD4	<i>Cluster of differentiation</i> = Proteinerkennungsmolekül in Zellmembran der T-Helferzellen
cDNA	<i>copyDNA</i> = revers transkribierte mRNA

Abkürzungsverzeichnis

CEC	Chloroethylclonidin
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
cMLCK	Kardiale Isoform der Myosin-Leichtketten-Kinase
CMV	Zytomegalie-Virus
CO ₂	Kohlendioxid
cPPT	Zentraler Polypurin Teil
CSQ	Calsequestrin
C-terminal	COOH-terminal = Carboxy-terminal
ct-Wert	<i>Threshold Cycle</i>
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
dATP	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosid-Triphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGK	Deutsche Gesellschaft für Kardiologie
DGPT	Deutsche Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
DMEM	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Desoxyribonucleic acid</i> = Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid-5'-triphosphat
ds	Doppelsträngig
dsDNA	Doppelsträngige DNA
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	1,4-Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5'-triphosphat
Ø	Durchmesser
E1-4	<i>Early Genes</i> 1-4 des Adenovirus
E3	Lentivirus mit einer shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 130 kDa der Maus und Ratte gerichtet
E5	Lentivirus mit einer shRNA-Sequenz gegen die smMLCK 130 kDa der Maus gerichtet

Abkürzungsverzeichnis

<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	<i>enhanced GFP</i> = verstärktes Grün Fluoreszierendes Protein
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i> = rekonstituiertes Herzgewebe
EIA	Enzymimmunoassay
ELC	<i>Essential Myosin Light Chain</i> = essenzielle Myosin-Leichtkette
ELISA	<i>Enzym linked immunosorbent assay</i>
Empty	Lentivirus mit pLKO.1 Vektor ohne eine shRNA-Sequenz
<i>env</i>	<i>Envelope</i>
ET-1	Endothelin-1
f1 ori	<i>f1 origin of replication</i> = Replikationsstart
FAM	6-Carboxyfluorescein
FKS	Fetales Kälberserum
FKS-M	Fetales Kälberserum für die Präparation neugeborener Mäuse
FKS-R	Fetales Kälberserum für die Präparation neugeborener Ratten
fmol	Femtomol/Liter
°	Grad
g (bei Lösungen und Puffer)	Gramm
g (bei der Zentrifugation)	Erdbeschleunigung (9,81m/s ²)
G	Guanin
G α	α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine
<i>gag</i>	<i>Groupspecific-antigen</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
G _i	Adenylylcyclase-inhibierendes G-Protein
G-Protein	Guaninnukleotidbindendes Protein
gpt	Guaninphosphoryltransferase
G _q	PLC-stimulierendes G-Protein
G _s	Adenylylcyclase-stimulierendes G-Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
H ₂ O	Wasser
H ₃ PO ₄	Phosphorsäure
h	Stunde(n)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HCl	Salzsäure
HEK 293	Menschliche embryonale Nierenzelllinie mit stabil transfizierter adenoviraler E1-Genregion

Abkürzungsverzeichnis

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
hPGK	Menschlicher Phosphoglycerat Kinase Promotor
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i> = Menschliches Immundefizienzvirus
HRP	<i>Horse radish peroxidase</i> = Meerrettich-Peroxidase
Hz	Hertz (1 Hz = 60/min)
IC ₅₀	Halbmaximale Inhibitorkonzentration
IgG	Immunglobulin G
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
ISO	Isoprenalin
IV	Intervention
K-Acetat	Kaliumacetat
Kan	Kanamycin
KanR	Kanamycin-Resistenz
kb	Kilobasen (= 1000 bp)
K _d	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KM-Medium	Kardiomyozyten Medium (für NRCM)
Ktr	Unbehandelte Kontrolle/Negativkontrolle
K-Tyr	Kaliumreiche Tyrode-Lösung
kV	Kilovolt
KWK	Konzentrations-Wirkungs-Kurve
l	Liter
LB	<i>Lysogeny Broth</i>
LITR/RITR	Linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz,
L _{max}	Vorhof, EHT oder SMC-Pseudo-EHT maximal gedehnt
L _o	Vorhof, EHT oder SMC-Pseudo-EHT ohne Vordehnung
log	Dekadischer Logarithmus zur Basis 10
LS	<i>Low Salt</i>
LSM	<i>Laserscanning</i> -Mikroskopie
LTR	<i>Long terminal repeat</i> = lange terminale Wiederholungen
L-Typ	Spannungsabhängige Calciumkanäle
LV	Lentiviren
µF	Mikrofarad
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer

Abkürzungsverzeichnis

μM	Mikromol/Liter
M	Molar, Mol/Liter
mA	Milliampere
m/V	Masse pro Volumen
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i> = multiple Klonierungsstelle
MEM	Minimum Essential Medium
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
Mg-Acetat	Magnesiumacetat
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i> = Myosin-Schwerkette
min	Minute
Mio.	Million
miRNA	<i>micro</i> RNA
MIT	Technische Hochschule Massachusetts
ml	Milliliter
MLC	<i>Myosin Light Chain</i> = Myosin-Leichtkette
MLC1	<i>Essential Myosin Light Chain</i> = essenzielle Myosin-Leichtkette
MLC2	<i>Regulatory Myosin Light Chain</i> = regulatorische Myosin-Leichtkette
MLC2a	<i>Atrial regulatory Myosin Light Chain</i> = vorhofspezifische Myosin-Leichtkette
MLC2a-P	Phosphorylierte Form der MLC2a
MLC2v	<i>Ventricular regulatory Myosin Light Chain</i> = herzkammerspezifische regulatorische Myosin-Leichtkette
MLCK	<i>Myosin Light Chain Kinase</i> = Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCK-A	<i>Unconventional Myosin Light Chain Kinase</i> = unkonventionelle Myosin-Leichtketten-Kinase
MLCP	Myosin-Leichtketten-Phosphatase
mm	Millimeter
mM	Millimol
mN	Millinewton (1 mN = 1 g·m/s ² = 100 Dyn)
MOI	<i>Multiplicity of infection</i> = Multiplizität der Infektion
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
ms	Millisekunden

Abkürzungsverzeichnis

m/V	Masse pro Volumen
MW	Arithmetischer Mittelwert
n	Anzahl der Proben
N	Normalität (Mol/Liter)
N ₂	Flüssiger Stickstoff
NA	Noradrenalin
NaCl	Natriumchlorid
NaN ₃	Natriumazid
NaOH	Natriumhydroxid
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NCX	Natrium-Calcium-Austauscher
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
NHE1	Kardiale Isoform des Natrium-Protonen-Austauschers
NIH3T3	Stabile adhärenente Mausfibroblastenzelllinie
NKM	Nicht-Kardiomyozyten-Medium
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NMCM	<i>Neonatal Mouse Cardiomyocytes</i> = Neugeborene Maus-Kardiomyozyten
Non-Target	Lentivirus mit einer <i>scrambled</i> -shRNA-Sequenz
NRCM	<i>Neonatal Rat Cardiomyocytes</i> = Neugeborene Ratten-Kardiomyozyten
ns.	Nicht signifikant
NTC	<i>No Template Control</i> = Kontrolle ohne cDNA, Wasser-Kontrolle
N-terminal	NH ₂ -terminal = Amino-terminal
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
Ω	Ohm
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
Ori	<i>Origin of replication</i> = Replikationsstart
p	Wahrscheinlichkeit
pA	Polyadenylierungssignal
P/S	Penicillin und Streptomycin
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> = Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phenylephrin

Abkürzungsverzeichnis

pg	Picogramm
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der H_3O^+ -Konzentration
P_i	Anorganisches Phosphat
pI	Isoelektrischer Punkt
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositoldiphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C
pmol	Picomol/Liter
<i>pol</i>	<i>Polymerase</i>
PP	<i>Physical particles</i>
PuroR	Puromycin-Resistenz
®	Eingetragene Marke
RISC	<i>RNA induced silencing complex</i>
RLC	<i>Regulatory Myosin Light Chain</i> = regulatorische Myosin-Leichtkette
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> = Ribonukleinsäure
RNAi	<i>RNA interference</i> = RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
ROX	Passives Referenzfluorophor für die quantitative RT-PCR
rpm	<i>Rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RRE	<i>Rev response element</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
RyR	Ryanodinrezeptor
s	Sekunde
S	Svedberg
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i> = Standardfehler des Mittelwertes
shRNA	<i>short hairpin RNA</i>
<i>SIN</i>	<i>Self inactivating</i>
siRNA	<i>short</i> oder <i>small interfering RNA</i>
skMLCK	Skelettale Isoform der Myosin-Leichtketten-Kinase
SMC	<i>Smooth Muscle Cells</i> = Glatte Muskelzellen
smMLCK	Glattmuskuläre Isoform der Myosin-Leichtketten-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
SOC	Derivat von SOB
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
SV 40	Simianvirus Typ 40
SV40 P/E	Promotor/ <i>Enhancer</i> vom Simianvirus Typ 40
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-tetramethylrhodamin
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	<i>Thermophilus aquaticus</i> -DNA-Polymerase
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBST	TBS mit Tween [®] 20
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TFB	<i>Transformation Buffer</i>
™	Eine nicht beim amerikanischen Markenamt (<i>Trademark Office</i>) eingetragene Marke
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TU	<i>Transducing unit</i>
Tween [®] 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
T-Zellen	T-Lymphozyten, Subpopulation der weißen Blutkörperchen
U	<i>Unit</i> (Enzymaktivität)
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UTR	<i>Untranslated region</i> = untranslatierte Region
V	Volt
VSB	<i>Virus Storage Buffer</i>
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
V/V	Volumen pro Volumen
V/V/V	Volumen pro Volumen pro Volumen
WHO	<i>World Health Organization</i> = Weltgesundheitsorganisation
Wort	Wortmannin
WPRE	Postranskriptionales Regulationselement des Woodchuck Hepatitis Virus
x	-fach (z. B. 10x Reaktionspuffer 2 = 10-facher Reaktionspuffer 2) oder auch „mal“
YFG	<i>Your Favourite Gene</i>

6.2 Weitere Abkürzungen

bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
d. h.	das heißt
ggf.	gegebenenfalls
inkl.	inklusive
n. b.	nicht bestimmbar
s.	siehe
S.	Seite
s. a.	siehe auch
s. o.	siehe oben
s. u.	siehe unten
u. a.	unter anderem
usw.	und so weiter
vgl.	vergleiche
vs.	versus
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

6.3 Präfixe

Mega (M)	10^6
Kilo (k)	10^3
Centi (c)	10^{-2}
Milli (m)	10^{-3}
Mikro (μ)	10^{-6}

7 Literaturverzeichnis

- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P (2002) Molecular biology of the cell. Garland Science, New York. Fourth edition.
- Alizon M, Sonigo P, Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Tiollais P, Montagnier L und Wain-Hobson S (1984) Molecular cloning of lymphadenopathy-associated virus. *Nature* 312:757-60.
- ALLHAT (2000) Major cardiovascular events in hypertensive patients randomized to doxazosin vs chlorthalidone: the antihypertensive and lipid-lowering treatment to prevent heart attack trial (ALLHAT). ALLHAT Collaborative Research Group. *Jama* 283:1967-75.
- Alvarez BV, Perez NG, Ennis IL, Camilion de Hurtado MC und Cingolani HE (1999) Mechanisms underlying the increase in force and Ca(2+) transient that follow stretch of cardiac muscle: a possible explanation of the Anrep effect. *Circ Res* 85:716-22.
- Andersen GO, Qvigstad E, Schiander I, Aass H, Osnes JB und Skomedal T (2002) Alpha(1)-AR-induced positive inotropic response in heart is dependent on myosin light chain phosphorylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283:H1471-80.
- Aoki H, Sadoshima J und Izumo S (2000) Myosin light chain kinase mediates sarcomere organization during cardiac hypertrophy in vitro. *Nat Med* 6:183-8.
- Arcaro A und Wymann MP (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem J* 296 (Pt 2):297-301.
- Armbrüster I (2007) Entwicklung von einem murinen künstlichen Herzmuskelmodell. Dissertation, Universität Hamburg.
- Bain J, McLauchlan H, Elliott M und Cohen P (2003) The specificities of protein kinase inhibitors: an update. *Biochem J* 371(Pt 1):199-204.
- Bantounas I, Phylactou LA und Uney JB (2004) RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. *J Mol Endocrinol* 33:545-57.
- Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W und Montagnier L (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:868-71.
- Benihoud K, Yeh P und Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10:440-7.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM und Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409:363-6.
- Berridge MJ (1993) Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* 361:315-25.

- Berridge MJ, Bootman MD und Lipp P (1998) Calcium - a life and death signal. *Nature* 395:645-8.
- Bers DM (2008) Calcium cycling and signaling in cardiac myocytes. *Annu Rev Physiol* 70:23-49.
- Bertrand JR, Pottier M, Vekris A, Opolon P, Maksimenko A und Malvy C (2002) Comparison of antisense oligonucleotides and siRNAs in cell culture and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* 296:1000-4.
- Bett AJ, Prevec L und Graham FL (1993) Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* 67:5911-21.
- Blue EK, Goeckeler ZM, Jin Y, Hou L, Dixon SA, Herring BP, Wysolmerski RB und Gallagher PJ (2002) 220- and 130-kDa MLCKs have distinct tissue distributions and intracellular localization patterns. *Am J Physiol Cell Physiol* 282:C451-60.
- Bonser RW, Thompson NT, Randall RW, Tateson JE, Spacey GD, Hodson HF und Garland LG (1991) Demethoxyviridin and wortmannin block phospholipase C and D activation in the human neutrophil. *Br J Pharmacol* 103(1):1237-1241.
- Bootman MD, Higazi DR, Coombes S und Roderick HL (2006) Calcium signalling during excitation-contraction coupling in mammalian atrial myocytes. *J Cell Sci* 119:3915-25.
- Bootman MD, Lipp P und Berridge MJ (2001) The organisation and functions of local Ca(2+) signals. *J Cell Sci* 114:2213-22.
- Bootman MD und Roderick HL (2008) Why, where, and when do cardiac myocytes express inositol 1,4,5-trisphosphate receptors? *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294:H579-81.
- Bowditch HP (1871) Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. Berichte über die Verhandlungen der Königlich Sächsischen Gesellschaft zu Leipzig. Mathematisch-Physische Classe 23:652-689.
- Bowman BF, Peterson JA und Stull JT (1992) Pre-steady-state kinetics of the activation of rabbit skeletal muscle myosin light chain kinase by Ca²⁺/calmodulin. *J Biol Chem* 267:5346-54.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Bristow MR (1993) Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 22:61A-71A.
- Brodde OE (1991) Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol Rev* 43:203-42.
- Brodde OE und Michel MC (1999) Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol Rev* 51:651-90.

- Brückner R, Meyer W, Mugge A, Schmitz W und Scholz H (1984) Alpha-adrenoceptor-mediated positive inotropic effect of phenylephrine in isolated human ventricular myocardium. *Eur J Pharmacol* 99(4):345-347.
- Brückner R, Mügge A und Scholz H (1985) Existence and functional role of alpha 1-adrenoceptors in the mammalian heart. *J Mol Cell Cardiol* 17:639-645.
- Brückner R und Scholz H (1984) Effects of alpha-adrenoceptor stimulation with phenylephrine in the presence of propranolol on force of contraction, slow inward current and cyclic AMP content in the bovine heart. *Br J Pharmacol* 82:223-32.
- Brummelkamp TR, Bernards R und Agami R (2002) A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-3.
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112:195-203.
- Chan JY, Takeda M, Briggs LE, Graham ML, Lu JT, Horikoshi N, Weinberg EO, Aoki H, Sato N, Chien KR und Kasahara H (2008) Identification of cardiac-specific myosin light chain kinase. *Circ Res* 102:571-80.
- Chiu YL und Rana TM (2003) siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis. *Rna* 9:1034-48.
- Chomczynski P und Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-9.
- Clayton J (2004) RNA interference: the silent treatment. *Nature* 431:599-605.
- Cogoni C und Macino G (1999) Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: a number of variations on the same theme. *Curr Opin Microbiol* 2:657-62.
- Cohen SN, Chang AC und Hsu L (1972) Nonchromosomal antibiotic resistance in bacteria: genetic transformation of *Escherichia coli* by R-factor DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 69:2110-4.
- Conti MA und Adelstein RS (1981) The relationship between calmodulin binding and phosphorylation of smooth muscle myosin kinase by the catalytic subunit of 3':5' cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 256:3178-81.
- Cosloy SD und Oishi M (1973) The nature of the transformation process in *Escherichia coli* K12. *Mol Gen Genet* 124:1-10.
- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ und Ciccarone VC (2004) Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33:95-103.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M und Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* 351(Pt 1):95-105.

- Davis JS, Hassanzadeh S, Winitzky S, Lin H, Satorius C, Vemuri R, Aletras AH, Wen H und Epstein ND (2001) The overall pattern of cardiac contraction depends on a spatial gradient of myosin regulatory light chain phosphorylation. *Cell* 107:631-41.
- Davis JS, Satorius CL und Epstein ND (2002) Kinetic effects of myosin regulatory light chain phosphorylation on skeletal muscle contraction. *Biophys J* 83:359-70.
- Dumasius V, Jameel M, Burhop J, Meng FJ, Welch LC, Mutlu GG und Factor P (2003) In vivo timing of onset of transgene expression following adenoviral-mediated gene transfer. *Virology* 308:243-9.
- Dykxhoorn DM, Novina CD und Sharp PA (2003) Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:457-67.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K und Tuschl T (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411:494-8.
- Elbashir SM, Lendeckel W und Tuschl T (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15:188-200.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W und Tuschl T (2001c) Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* 20:6877-88.
- Endoh M (1996) Cardiac alpha(1)-adrenoceptors that regulate contractile function: subtypes and subcellular signal transduction mechanisms. *Neurochem Res* 21:217-29.
- Endoh M und Blinks JR (1988) Actions of sympathomimetic amines on the Ca²⁺ transients and contractions of rabbit myocardium: reciprocal changes in myofibrillar responsiveness to Ca²⁺ mediated through alpha- and beta-adrenoceptors. *Circ Res* 62:247-65.
- Endoh M, Brodde OE und Schümann HJ (1976) Relationship between the level of cAMP and the contractile force under stimulation of alpha- and beta-adrenoceptors by phenylephrine in the isolated rabbit papillary muscle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 295:109-15.
- Endoh M, Norota I, Takanashi M und Kasai H (1993) Inotropic effects of staurosporine, NA 0345 and H-7, protein kinase C inhibitors, on rabbit ventricular myocardium: selective inhibition of the positive inotropic effect mediated by alpha 1-adrenoceptors. *Jpn J Pharmacol* 63:17-26.
- Endoh M und Schümann HJ (1975) Frequency-dependence of the positive inotropic effect of methoxamine and naphazoline mediated by alpha-Adrenoceptors in the isolated rabbit papillary muscle. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 287:377-89.

- Endoh M, Takanashi M und Norota I (1992) Role of alpha 1A adrenoceptor subtype in production of the positive inotropic effect mediated via myocardial alpha 1 adrenoceptors in the rabbit papillary muscle: influence of selective alpha 1A subtype antagonists WB 4101 and 5-methylurapidil. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 345(5):578-585.
- Endou M, Hattori Y, Tohse N und Kanno M (1991) Protein kinase C is not involved in alpha 1-adrenoceptor-mediated positive inotropic effect. *Am J Physiol* 260:H27-36.
- Engvall E und Perlman P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8(9):871-874.
- Engvall E und Perlmann P (1972) Enzyme-linked immunosorbent assay, Elisa. 3. Quantitation of specific antibodies by enzyme-labeled anti-immunoglobulin in antigen-coated tubes. *J Immunol* 109(1):129-135.
- Erdbrugger W, Keffel J, Knocks M, Otto T, Philipp T und Michel MC (1997) Protein kinase C isoenzymes in rat and human cardiovascular tissues. *Br J Pharmacol* 120:177-86.
- Eschenhagen T, Fink C, Remmers U, Scholz H, Wattchow J, Weil J, Zimmermann W, Dohmen HH, Schafer H, Bishopric N, Wakatsuki T und Elson EL (1997) Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb J* 11:683-94.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE und Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-11.
- Fitzsimons DP, Bodell PW und Baldwin KM (1990) Myocardial functional correlates of cardiac myosin light chain 2 phosphorylation. *J Appl Physiol* 68:2426-33.
- Franzini-Armstrong C, Protasi F und Tijskens P (2005) The assembly of calcium release units in cardiac muscle. *Ann N Y Acad Sci* 1047:76-85.
- Freshney RI (2005) Culture of Animal Cells: A manual of basic technique, Fifth edition. Wiley-Liss, Inc., Hoboken, New Jersey. *Chapter* 9 und 12.
- Gallagher PJ, Garcia JG und Herring BP (1995) Expression of a novel myosin light chain kinase in embryonic tissues and cultured cells. *J Biol Chem* 270:29090-5.
- Gallagher PJ und Herring BP (1991) The carboxyl terminus of the smooth muscle myosin light chain kinase is expressed as an independent protein, telokin. *J Biol Chem* 266:23945-52.
- Gallagher PJ, Herring BP, Griffin SA und Stull JT (1991) Molecular characterization of a mammalian smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 266:23936-44.
- Gallagher PJ, Herring BP und Stull JT (1997) Myosin light chain kinases. *J Muscle Res Cell Motil* 18:1-16.

- Gallo RC, Sarin PS, Gelmann EP, Robert-Guroff M, Richardson E, Kalyanaraman VS, Mann D, Sidhu GD, Stahl RE, Zolla-Pazner S, Leibowitch J und Popovic M (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220:865-7.
- Garcia JG, Lazar V, Gilbert-McClain LI, Gallagher PJ und Verin AD (1997) Myosin light chain kinase in endothelium: molecular cloning and regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 16:489-94.
- Gibson TJ und Higgins DG (1993) Non-muscle and smooth muscle myosin light chain kinases: no end in sight. *DNA Seq* 3:333-5.
- Goldstein MA und Schroeter JP (2002) Ultrastructure of the heart. In: Handbook of physiology. Page E, Fozzard HA, Solaro RJ, editors. Oxford University Press. Section 2: The Cardiovascular System, Volume I, The Heart, *chapter* 1 und 8.
- Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS und Marks AR (1995) Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J Clin Invest* 95:888-94.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC und Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.
- Graham RM, Perez DM, Hwa J und Piascik MT (1996) alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling. *Circ Res* 78:737-49.
- Grimm M, Haas P, Willipinski-Stapelfeldt B, Zimmermann WH, Rau T, Pantel K, Weyand M und Eschenhagen T (2005) Key role of myosin light chain (MLC) kinase-mediated MLC2a phosphorylation in the alpha 1-adrenergic positive inotropic effect in human atrium. *Cardiovasc Res* 65:211-20.
- Grimm M, Mahnecke N, Soja F, El-Armouche A, Haas P, Treede H, Reichenspurner H und Eschenhagen T (2006) The MLCK-mediated alpha1-adrenergic inotropic effect in atrial myocardium is negatively modulated by PKCepsilon signaling. *Br J Pharmacol* 148:991-1000.
- Haas P (2004) Charakterisierung des alpha1-adrenergen positiv inotropen Effekts im menschlichen Herzen. Dissertation, Universität Erlangen-Nürnberg.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-80.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW und Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:2509-14.
- Herring BP, Dixon S und Gallagher PJ (2000) Smooth muscle myosin light chain kinase expression in cardiac and skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol* 279:C1656-64.

- Herring BP, El-Mounayri O, Gallagher PJ, Yin F und Zhou J (2006) Regulation of myosin light chain kinase and telokin expression in smooth muscle tissues. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C817-27.
- Herring BP, Nunnally MH, Gallagher PJ und Stull JT (1989) Molecular characterization of rat skeletal muscle myosin light chain kinase. *Am J Physiol* 256:C399-404.
- Horejsh D, Ruckwardt TJ und David Pauza C (2002) CXCR4-dependent HIV-1 infection of differentiated epithelial cells. *Virus Res* 90:275-86.
- Huesken D, Lange J, Mickanin C, Weiler J, Asselbergs F, Warner J, Melloon B, Engel S, Rosenberg A, Cohen D, Labow M, Reinhardt M, Natt F und Hall J (2005) Design of a genome-wide siRNA library using an artificial neural network. *Nat Biotechnol* 23:995-1001.
- Hutvagner G und Zamore PD (2002) A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297:2056-60.
- Huxley AF (2000) Cross-bridge action: present views, prospects, and unknowns. *J Biomech* 33:1189-95.
- Ikebe M, Hartshorne DJ und Elzinga M (1986) Identification, phosphorylation, and dephosphorylation of a second site for myosin light chain kinase on the 20,000-dalton light chain of smooth muscle myosin. *J Biol Chem* 261:36-9.
- Ito M, Dabrowska R, Guerriero V, Jr. und Hartshorne DJ (1989) Identification in turkey gizzard of an acidic protein related to the C-terminal portion of smooth muscle myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 264:13971-4.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G und Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 21:635-7.
- Jahnel U, Jakob H und Nawrath H (1992) Electrophysiologic and inotropic effects of alpha-adrenoceptor stimulation in human isolated atrial heart muscle. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 346:82-7.
- Johnson JD, Holroyde MJ, Crouch TH, Solaro RJ und Potter JD (1981) Fluorescence studies of the interaction of calmodulin with myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 256:12194-8.
- Kafri T, van Praag H, Ouyang L, Gage FH und Verma IM (1999) A packaging cell line for lentivirus vectors. *J Virol* 73:576-84.
- Kahl CA, Marsh J, Fyffe J, Sanders DA und Cornetta K (2004) Human immunodeficiency virus type 1-derived lentivirus vectors pseudotyped with envelope glycoproteins derived from Ross River virus and Semliki Forest virus. *J Virol* 78:1421-30.
- Kamm KE und Stull JT (1985) The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 25:593-620.

- Kamm KE und Stull JT (2001) Dedicated myosin light chain kinases with diverse cellular functions. *J Biol Chem* 276:4527-30.
- Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, Rivera J, Buttrick PM, Wittenberg BA, Cipriani L und Leinwand LA (1993) Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:11498-502.
- Kasturi R, Vasulka C und Johnson JD (1993) Ca²⁺, caldesmon, and myosin light chain kinase exchange with calmodulin. *J Biol Chem* 268:7958-64.
- Kemp BE, Parker MW, Hu S, Tiganis T und House C (1994) Substrate and pseudosubstrate interactions with protein kinases: determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* 19:440-4.
- Kemp BE und Pearson RB (1991) Intrasteric regulation of protein kinases and phosphatases. *Biochim Biophys Acta* 1094:67-76.
- Kimura K, Ito M, Amano M, Chihara K, Fukata Y, Nakafuku M, Yamamori B, Feng J, Nakano T, Okawa K, Iwamatsu A und Kaibuchi K (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* 273:245-8.
- Kirshenbaum LA (1997) Adenovirus mediated-gene transfer into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 172:13-21.
- Kittler R, Putz G, Pelletier L, Poser I, Heninger AK, Drechsel D, Fischer S, Konstantinova I, Habermann B, Grabner H, Yaspo ML, Himmelbauer H, Korn B, Neugebauer K, Pisabarro MT und Buchholz F (2004) An endoribonuclease-prepared siRNA screen in human cells identifies genes essential for cell division. *Nature* 432:1036-40.
- Kobe B und Kemp BE (1999) Active site-directed protein regulation. *Nature* 402:373-6.
- Kohl C, Schmitz W, Scholz H und Scholz J (1990) Evidence for the existence of inositol tetrakisphosphate in mammalian heart. Effect of alpha 1-adrenoceptor stimulation. *Circ Res* 66:580-3.
- Laatsch A, Ragozin S, Grewal T, Beisiegel U und Joerg H (2004) Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Eur J Cell Biol* 83:113-20.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-5.
- Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S und Chien KR (2005) Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. *Nature* 433:647-53.
- Layzer JM, McCaffrey AP, Tanner AK, Huang Z, Kay MA und Sullenger BA (2004) In vivo activity of nuclease-resistant siRNAs. *Rna* 10:766-71.

- Li X, Zima AV, Sheikh F, Blatter LA und Chen J (2005) Endothelin-1-induced arrhythmogenic Ca²⁺ signaling is abolished in atrial myocytes of inositol-1,4,5-trisphosphate(IP₃)-receptor type 2-deficient mice. *Circ Res* 96:1274-81.
- Lipp P, Laine M, Tovey SC, Burrell KM, Berridge MJ, Li W und Bootman MD (2000) Functional InsP₃ receptors that may modulate excitation-contraction coupling in the heart. *Curr Biol* 10:939-42.
- Liu SJ und Kennedy RH (1998) alpha1-Adrenergic activation of L-type Ca current in rat ventricular myocytes: perforated patch-clamp recordings. *Am J Physiol* 274:H2203-7.
- Louis N, Eveleigh C und Graham FL (1997) Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 233:423-9.
- Mackay K und Mochly-Rosen D (2001) Localization, anchoring, and functions of protein kinase C isozymes in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 33:1301-7.
- Mackenzie L, Bootman MD, Laine M, Berridge MJ, Thuring J, Holmes A, Li WH und Lipp P (2002) The role of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in Ca(2+) signalling and the generation of arrhythmias in rat atrial myocytes. *J Physiol* 541:395-409.
- Mackenzie L, Roderick HL, Berridge MJ, Conway SJ und Bootman MD (2004a) The spatial pattern of atrial cardiomyocyte calcium signalling modulates contraction. *J Cell Sci* 117:6327-37.
- Mackenzie L, Roderick HL, Proven A, Conway SJ und Bootman MD (2004b) Inositol 1,4,5-trisphosphate receptors in the heart. *Biol Res* 37:553-7.
- Manche L, Green SR, Schmedt C und Mathews MB (1992) Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol* 12:5238-48.
- Meister G und Tuschl T (2004) Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431:343-9.
- Michel MC, Hanft G und Gross G (1994) Radioligand binding studies of alpha 1-adrenoceptor subtypes in rat heart. *Br J Pharmacol* 111:533-8.
- Michel MC, Kenny B und Schwinn DA (1995) Classification of alpha 1-adrenoceptor subtypes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 352:1-10.
- Mills JC, Stone NL, Erhardt J und Pittman RN (1998) Apoptotic membrane blebbing is regulated by myosin light chain phosphorylation. *J Cell Biol* 140:627-36.
- Mittmann C, Eschenhagen T, Hirt S, Magnussen O, Münstermann U, Remmers U, Scholz H, Weil J (1998) The alpha 1-adrenergic positive inotropic effect of noradrenaline in human ventricular myocardium is independent of protein kinase C. *Zeitschrift für Kardiologie* 87 (Supplement 1):78.
- Molkentin JD und Dorn IG, 2nd (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 63:391-426.

- Morano I (1999) Tuning the human heart molecular motors by myosin light chains. *J Mol Med* 77:544-55.
- Morano I, Hofmann F, Zimmer M und Ruegg JC (1985) The influence of P-light chain phosphorylation by myosin light chain kinase on the calcium sensitivity of chemically skinned heart fibres. *FEBS Lett* 189:221-4.
- Morano I, Wiesner R, Rösen P, Róegg J (1987) Alpha 1-Adrenergic stimulation of the rat heart does not influence the level of myosin P-light chain phosphorylation. *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 8:90.
- Mügge A, Brückner R, Meyer W, Schmitz W, Scholz H (1983) Effects of alpha-adrenoceptor stimulation on mechanical and electrophysiological properties in human ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 324 (Supplement):R33.
- Nagashima M, Hattori Y, Akaishi Y, Tohse N, Sakuma I, Kitabatake A und Kanno M (1996) Alpha 1-adrenoceptor subtypes mediating inotropic and electrophysiological effects in mammalian myocardium. *Am J Physiol* 271(4 Pt 2):H1423-1432.
- Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T und Zimmermann WH (2006) Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle. *Circulation* 114:172-8.
- Nakanishi S, Kakita S, Takahashi I, Kawahara K, Tsukuda E, Sano T, Yamada K, Yoshida M, Kase H, Matsuda Y und et al. (1992) Wortmannin, a microbial product inhibitor of myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 267(4):2157-2163.
- Naldini L, Blomer U, Gallay P, Ory D, Mulligan R, Gage FH, Verma IM und Trono D (1996) In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272:263-7.
- Napoli C, Lemieux C und Jorgensen R (1990) Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2:279-289.
- Noland TA, Jr. und Kuo JF (1993) Phosphorylation of cardiac myosin light chain 2 by protein kinase C and myosin light chain kinase increases Ca(2+)-stimulated actomyosin MgATPase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 193:254-60.
- O'Connell TD, Ishizaka S, Nakamura A, Swigart PM, Rodrigo MC, Simpson GL, Cotecchia S, Rokosh DG, Grossman W, Foster E und Simpson PC (2003) The alpha(1A/C)- and alpha(1B)-adrenergic receptors are required for physiological cardiac hypertrophy in the double-knockout mouse. *J Clin Invest* 111:1783-91.
- Obinata T, Reinach FC, Bader DM, Masaki T, Kitani S und Fischman DA (1984) Immunochemical analysis of C-protein isoform transitions during the development of chicken skeletal muscle. *Dev Biol* 101:116-24.

- Ohlmann P, Tesse A, Loichot C, Ralay Ranaivo H, Roul G, Philippe C, Watterson DM, Haiech J und Andriantsitohaina R (2005) Deletion of MLCK210 induces subtle changes in vascular reactivity but does not affect cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289(6):H2342-2349.
- Opie L (2001) Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. In: Heart disease: a textbook of cardiovascular medicine. Braunwald E, Zipes D, Libby P, editors. Philadelphia, PA: W.B. Saunders. Page 443-78.
- Osnes J und Oye I (1975) Relationship between cyclic AMP metabolism and inotropic response of perfused rat hearts to phenylephrine and other adrenergic amines. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 5:415-33.
- Ovcharenko D, Jarvis R, Hunicke-Smith S, Kelnar K und Brown D (2005) High-throughput RNAi screening in vitro: from cell lines to primary cells. *Rna* 11:985-93.
- Paddison PJ, Caudy AA und Hannon GJ (2002) Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:1443-8.
- Perez DM, Piascik MT, Malik N, Gaivin R und Graham RM (1994) Cloning, expression, and tissue distribution of the rat homolog of the bovine alpha 1C-adrenergic receptor provide evidence for its classification as the alpha 1A subtype. *Mol Pharmacol* 46(5):823-831.
- Potier MC, Chelot E, Pekarsky Y, Gardiner K, Rossier J und Turnell WG (1995) The human myosin light chain kinase (MLCK) from hippocampus: cloning, sequencing, expression, and localization to 3qcen-q21. *Genomics* 29:562-70.
- Price DT, Lefkowitz RJ, Caron MG, Berkowitz D und Schwinn DA (1994) Localization of mRNA for three distinct alpha 1-adrenergic receptor subtypes in human tissues: implications for human alpha-adrenergic physiology. *Mol Pharmacol* 45:171-5.
- Puceat M, Hilal-Dandan R, Strulovici B, Brunton LL und Brown JH (1994) Differential regulation of protein kinase C isoforms in isolated neonatal and adult rat cardiomyocytes. *J Biol Chem* 269:16938-44.
- Puceat M und Vassort G (1996) Signalling by protein kinase C isoforms in the heart. *Mol Cell Biochem* 157:65-72.
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70:281-312.
- Roderick HL und Bootman MD (2007) Pacemaking, arrhythmias, inotropy and hypertrophy: the many possible facets of IP3 signalling in cardiac myocytes. *J Physiol*. 581:883-4.
- Romano G (2005) Current development of lentiviral-mediated gene transfer. *Drug News Perspect* 18:128-34.

- Rossmann GH, Hoh JF, Turnbull L und Ludowyke RI (1997) Mechanism of action of endothelin in rat cardiac muscle: cross-bridge kinetics and myosin light chain phosphorylation. *J Physiol* 505 (Pt 1):217-27.
- Roush CL, Kennelly PJ, Glaccum MB, Helfman DM, Scott JD und Krebs EG (1988) Isolation of the cDNA encoding rat skeletal muscle myosin light chain kinase. Sequence and tissue distribution. *J Biol Chem* 263:10510-6.
- Ruffolo RR, Jr. und Hieble JP (1994) Alpha-adrenoceptors. *Pharmacol Ther* 61:1-64.
- Sah VP, Hoshijima M, Chien KR und Brown JH (1996) Rho is required for Galphaq and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *J Biol Chem* 271(49):31185-31190.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB und Erlich HA (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA und Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-4.
- Sambrooke J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning – a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. Second edition. *Chapter 1.74 und 7.*
- Sanbe A, Fewell JG, Gulick J, Osinska H, Lorenz J, Hall DG, Murray LA, Kimball TR, Witt SA und Robbins J (1999) Abnormal cardiac structure and function in mice expressing nonphosphorylatable cardiac regulatory myosin light chain 2. *J Biol Chem* 274:21085-94.
- Sanger F, Nicklen S und Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-7.
- Schneiderbanger K, Schubert P, Zimmermann WH, El-Armouche A, Münzel F, Eschenhagen T (2001). Non-myocytes enhance contractile function of three-dimensionally reconstituted cardiac myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Supplement):R107.
- Scholz H, Brückner R, Mügge A und Reupcke C (1986) Myocardial alpha-adrenoceptors and positive inotropy. *J Mol Cell Cardiol* 18 Suppl 5:79-87.
- Schümann HJ, Wagner J, Knorr A, Reidemeister JC, Sadony V, Schramm G (1978) Demonstration in human atrial preparations of alpha-adrenoceptors mediating positive inotropic effects. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 302:333-6.
- Schultheiss T, Lin ZX, Lu MH, Murray J, Fischman DA, Weber K, Masaki T, Imamura M und Holtzer H (1990) Differential distribution of subsets of myofibrillar proteins in cardiac nonstriated and striated myofibrils. *J Cell Biol* 110:1159-72.

- Seguchi O, Takashima S, Yamazaki S, Asakura M, Asano Y, Shintani Y, Wakeno M, Minamino T, Kondo H, Furukawa H, Nakamaru K, Naito A, Takahashi T, Ohtsuka T, Kawakami K, Isomura T, Kitamura S, Tomoike H, Mochizuki N und Kitakaze M (2007) A cardiac myosin light chain kinase regulates sarcomere assembly in the vertebrate heart. *J Clin Invest* 117:2812-24.
- Sen GC und Sarkar SN (2005) Transcriptional signaling by double-stranded RNA: role of TLR3. *Cytokine Growth Factor Rev* 16:1-14.
- Seraskeris S, Gaitanaki C und Lazou A (2001) alpha(1D)-Adrenoceptors do not contribute to phosphoinositide hydrolysis in adult rat cardiac myocytes. *Arch Biochem Biophys* 392(1):117-122.
- Shenk TE (2001) Adenoviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields Virology. Knipe DM, Howley PM, editors. Lippincott Williams & Wilkins. Fourth edition, Volume 2, page 2266.
- Shin HG, Barnett JV, Chang P, Reddy S, Drinkwater DC, Pierson RN, Wiley RG und Murray KT (2000) Molecular heterogeneity of protein kinase C expression in human ventricle. *Cardiovasc Res* 48:285-99.
- Shirinsky VP, Vorotnikov AV, Birukov KG, Nanaev AK, Collinge M, Lukas TJ, Sellers JR und Watterson DM (1993) A kinase-related protein stabilizes unphosphorylated smooth muscle myosin minifilaments in the presence of ATP. *J Biol Chem* 268:16578-83.
- Shoemaker MO, Lau W, Shattuck RL, Kwiatkowski AP, Matrisian PE, Guerra-Santos L, Wilson E, Lukas TJ, Van Eldik LJ und Watterson DM (1990) Use of DNA sequence and mutant analyses and antisense oligodeoxynucleotides to examine the molecular basis of nonmuscle myosin light chain kinase autoinhibition, calmodulin recognition, and activity. *J Cell Biol* 111:1107-25.
- Silveira LA, Smith JL, Tan JL und Spudich JA (1998) MLCK-A, an unconventional myosin light chain kinase from Dictyostelium, is activated by a cGMP-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:13000-5.
- Simpson P (1983) Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin Invest* 72:732-8.
- Skomedal T, Aass H, Osnes JB, Fjeld NB, Klingen G, Langslet A und Semb G (1985) Demonstration of an alpha adrenoceptor-mediated inotropic effect of norepinephrine in human atria. *J Pharmacol Exp Ther* 233:441-6.
- Somlyo AP und Somlyo AV (2000) Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and protein phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol* 522 Pt 2:177-185.
- Somlyo AV, Wang H, Choudhury N, Khromov AS, Majesky M, Owens GK und Somlyo AP (2004) Myosin light chain kinase knockout. *J Muscle Res Cell Motil* 25:241-2.

- Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH und Schreiber RD (1998) How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67:227-64.
- Starling EH und Visscher MB (1927) The regulation of the energy output of the heart. *J Physiol* 62:243-61.
- Steinfath M, Chen YY, Lavicky J, Magnussen O, Nose M, Rosswag S, Schmitz W und Scholz H (1992) Cardiac alpha 1-adrenoceptor densities in different mammalian species. *Br J Pharmacol* 107:185-8.
- Stull JT, Hsu LC, Tansey MG und Kamm KE (1990) Myosin light chain kinase phosphorylation in tracheal smooth muscle. *J Biol Chem* 265:16683-90.
- Suematsu N, Satoh S, Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, Nakamura R, Egashira K, Makino N und Takeshita A (2001) Alpha1-adrenoceptor-Gq-RhoA signaling is upregulated to increase myofibrillar Ca²⁺ sensitivity in failing hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281(2):H637-646.
- Sui G, Soohoo C, Affar el B, Gay F, Shi Y und Forrester WC (2002) A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:5515-20.
- Sumbilla C, Cavagna M, Zhong L, Ma H, Lewis D, Farrance I und Inesi G (1999) Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes. *Am J Physiol* 277:H2381-91.
- Sweeney HL, Bowman BF und Stull JT (1993) Myosin light chain phosphorylation in vertebrate striated muscle: regulation and function. *Am J Physiol* 264:C1085-95.
- Sweeney HL, Yang Z, Zhi G, Stull JT und Trybus KM (1994) Charge replacement near the phosphorylatable serine of the myosin regulatory light chain mimics aspects of phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:1490-4.
- Taguchi K, Yang M, Goepel M und Michel MC (1998) Comparison of human alpha1-adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357(2):100-110.
- Terzic A, Puceat M, Clement O, Scamps F und Vassort G (1992) Alpha 1-adrenergic effects on intracellular pH and calcium and on myofilaments in single rat cardiac cells. *J Physiol* 447:275-92.
- Terzic A, Puceat M, Vassort G und Vogel SM (1993) Cardiac alpha 1-adrenoceptors: an overview. *Pharmacol Rev* 45:147-75.
- Towbin H, Staehelin T und Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4.
- Tuschl T (2002) Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol* 20:446-8.

- Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Maekawa M und Narumiya S (1997) Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension. *Nature* 389(6654):990-994.
- Vandenboom R und Metzger JM (2002) A "wringing" endorsement for myosin phosphorylation in the heart. *Mol Interv* 2:422-4.
- Venema RC, Raynor RL, Noland TA, Jr. und Kuo JF (1993) Role of protein kinase C in the phosphorylation of cardiac myosin light chain 2. *Biochem J* 294 (Pt 2):401-6.
- Verma IM und Somia N (1997) Gene therapy - promises, problems and prospects. *Nature* 389:239-42.
- Vites AM und Pappano A (1990) Inositol 1,4,5-trisphosphate releases intracellular Ca²⁺ in permeabilized chick atria. *Am J Physiol* 258:H1745-52.
- Vogelstein B und Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:615-9.
- Vornanen M (1996) Excitation-contraction coupling of the developing rat heart. *Mol Cell Biochem* 163-164:5-11.
- Wainwright MS, Rossi J, Schavocky J, Crawford S, Steinhorn D, Velentza AV, Zasadzki M, Shirinsky V, Jia Y, Haiech J, Van Eldik LJ und Watterson DM (2003) Protein kinase involved in lung injury susceptibility: evidence from enzyme isoform genetic knockout and in vivo inhibitor treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6233-8.
- Walsh MP, Vallet B, Autric F und Demaille JG (1979) Purification and characterization of bovine cardiac calmodulin-dependent myosin light chain kinase. *J Biol Chem* 254:12136-44.
- Webster KA, Discher DJ und Bishopric NH (1993) Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes. *J Biol Chem* 268:16852-8.
- Weinberg DH, Trivedi P, Tan CP, Mitra S, Perkins-Barrow A, Borkowski D, Strader CD und Bayne M (1994) Cloning, expression and characterization of human alpha adrenergic receptors alpha 1a, alpha 1b and alpha 1c. *Biochem Biophys Res Commun* 201:1296-304.
- White SM, Renda M, Nam NY, Klimatcheva E, Zhu Y, Fisk J, Halterman M, Rimel BJ, Federoff H, Pandya S, Rosenblatt JD und Planelles V (1999) Lentivirus vectors using human and simian immunodeficiency virus elements. *J Virol* 73:2832-40.
- Wiznerowicz M und Trono D (2003) Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J Virol* 77:8957-61.
- Wolf H und Hofmann F (1980) Purification of myosin light chain kinase from bovine cardiac muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77:5852-5.

- Wolff DW, Dang HK, Liu MF, Jeffries WB und Scofield MA (1998) Distribution of alpha1-adrenergic receptor mRNA species in rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 32:117-22.
- Woo SH und Lee CO (1999) Effects of endothelin-1 on Ca²⁺ signaling in guinea-pig ventricular myocytes: role of protein kinase C. *J Mol Cell Cardiol* 31:631-43.
- Yamasaki Y, Furuya Y, Araki K, Matsuura K, Kobayashi M und Ogata T (1997) Ultra-high-resolution scanning electron microscopy of the sarcoplasmic reticulum of the rat atrial myocardial cells. *Anat Rec* 248:70-5.
- Yu JY, DeRuiter SL und Turner DL (2002) RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6047-52.
- Yu GS und Han C (1994) Role of alpha 1A- and alpha 1B-adrenoceptors in phenylephrine-induced positive inotropic response in isolated rat left atrium. *J Cardiovasc Pharmacol* 24(5):745-752.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA und Bartel DP (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101:25-33.
- Zhang G, Gurtu V und Kain SR (1996) An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 227:707-11.
- Zhi G, Ryder JW, Huang J, Ding P, Chen Y, Zhao Y, Kamm KE und Stull JT (2005) Myosin light chain kinase and myosin phosphorylation effect frequency-dependent potentiation of skeletal muscle contraction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:17519-24.
- Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL und Eschenhagen T (2002) Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90:223-30.

7.1 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit und weitere Forschungsprojekte wurden bereits wie folgt publiziert:

I Originalarbeiten

Grimm M., **Mahnecke N.**, Soja F., El-Armouche A., Haas P., Treede H., Reichenspurner H. und Eschenhagen T. (2006) The MLCK-mediated alpha1-adrenergic inotropic effect in atrial myocardium is negatively modulated by PKCepsilon signaling. *Br J Pharmacol* 148:991-1000.

II Vorträge mit publiziertem Abstract

Mahnecke N., Grimm M., Haas P., Eschenhagen T. (2005) Myosin Light Chain Kinase: A key player in the alpha-adrenergic positive inotropic effect in atrial myocardium. 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie (DGPT), Mainz. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 371 (Supplement 1):109.

III Poster mit publiziertem Abstract

Schmechel A., **Mahnecke N.**, Grimm M., Rau T., Sultan K., Eschenhagen T. (2008) Role of the myosin-light-chain-kinase for the α_1 -adrenergic inotropic effect. 49. Jahrestagung der DGPT, Mainz. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 377 (Supplement 1):46.

Aufgrund eines Druckfehlers veröffentlicht als: Schmechel A., Palinkiewicz W, Grube M, Kroemer H, Eschenhagen T...

Grimm M, **Mahnecke N.**, Soja F, Eschenhagen T. (2006) The α_1 -adrenergic inotropic effect in mouse atrium is MLCK-mediated and negatively modulated by PKC ϵ . 72. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), Mannheim. *Clin Res Cardiol*, 95 (Suppl 5).

8 Anhang

8.1 Chemikalien

Soweit nicht bereits im Text angegeben, sind für die Erstellung der vorliegenden Arbeit die nachfolgend aufgeführten Substanzen verwendet worden. Alle Chemikalien wurden mit dem höchsten im Handel erhältlichen Reinheitsgrad bezogen.

Rotiphorese [®] Gel 30 (37, 5:1) (Acrylamid 30%)	Roth (Karlsruhe)
Adenosin-5'-triphosphat (ATP)	Sigma (Steinheim)
Bacto [™] Agar	Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA)
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
2-Aminoethoxy-diphenylborat (2-APB)	Calbiochem (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad Laboratories (München)
Ampicillin Trihydrat	Serva (Heidelberg)
AmpliTaq Gold [®] DNA Polymerase	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Antikörper für Immunoblot s. Tab. 10	s. Tab. 10
Antikörper und Farbstoffe für die Immunhistologie s. Tab. 16	s. Tab. 16
Aqua ad iniectabilia	Baxter (Unterschleißheim)
Aqua bidest.	Aus der eigenen Wasseraufbereitungsanlage Millipore (Schwalbach)
L-(+)-Ascorbinsäure	JT Baker (Deventer, Niederlande)
β-Mercaptoethanol	Sigma (Steinheim)
<i>BigDye Terminator Cycle Sequencing Mix</i>	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Bio-Rad Protein Assay Kit 1 Farbstoff- Konzentrat (Bradford-Reagenz)	Bio-Rad Laboratories (München)
Bio-Rad Protein Assay Standard I	Bio-Rad Laboratories (München)
Borsäure (MG 61,83 g/mol)	Merck (Darmstadt)
5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU)	Sigma (Steinheim)
Bromphenolblau	Sigma (Steinheim)
2,3-Butandionmonoxim (BDM)	Sigma (Steinheim)
Calciumchlorid (CaCl ₂ • 2 (H ₂ O)), (MG 147,02 g/mol)	Roth (Karlsruhe)

Anhang

Carbenicillin Dinatriumsalz	Roth (Karlsruhe)
Carbogen	Linde Gas (Pullach)
Cäsiumchlorid	Chemetall (Langelsheim)
CASY [®] ton-Lösung	Schärfe System (Reutlingen)
Chloroethylclonidin Dihydrochlorid (CEC)	Sigma (Steinheim)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Citronensäure (zur Reinigung der Organbäder)	JT Baker (Deventer, Niederlande)
Collagen Typ I, flüssig (ausschließlich für die Beschichtung von Zellkulturschalen verwendet)	Upstate (Billerica, MA, USA)
Collagenase II (100mg/ml, 265 U/mg)	Worthington (Lakewood, NJ, USA)
Coomassie Brilliantblau G250	Merck (Darmstadt)
Cytosin β -D-arabinofuranosid (Ara-C)	Sigma (Steinheim)
Deionisiertes Formamid	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt vom Arbeitsbereich Klinische Pharmakologie, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Deoxyribonuklease (DNase) II, Typ V	Sigma (Steinheim)
Desoxyribonukleotid-5'-triphosphate (dNTPs)	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma (Steinheim)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dinatriumhydrogenphosphat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 (\text{H}_2\text{O})$), (MG 177,99 g/mol)	Merck (Darmstadt)
6x DNA-Ladepuffer (6x Loading Dye Solution)	Fermentas (Ontario, Kanada)
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Flüssig (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO_3)	Biowest (Nuaille, Frankreich)
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Flüssig (1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO_3 , 584 mg/l stabiles Glutamin)	Biowest (Nuaille, Frankreich)

Anhang

Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Flüssig (4,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃ , 584 mg/l stabiles Glutamin)	Biowest (Nuaille, Frankreich)
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Flüssig (4,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃ , 862 mg/l stabiles Glutamin, ohne Natriumpyruvat)	Invitrogen (Karlsruhe)
Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) Pulver (4,5 g/l D-Glucose, ohne Natriumpyruvat, ohne NaHCO ₃)	Invitrogen (Karlsruhe)
<i>E. coli</i> BJ5183, <i>E. coli</i> DH10B und <i>E. coli</i> TOP10F'	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Herr Dr. T. Rau, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Endothelin-1	Sigma (Steinheim)
Essigsäure	Roth (Karlsruhe)
Ethanol 99%, vergällt mit 1% Methylalkohol	Walter-CMP (Kiel)
Ethanol absolut	JT Baker (Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid	Fluka (Steinheim)
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na ₂ EDTA, EDTA), (MG 372,24 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Fetales Kälberserum (FKS)	Biowest (Nuaille, Frankreich)
Fetales Kälberserum für die Präparation neugeborener Maus-Kardiomyozyten (FKS-M)	Biochrom (Berlin)
Fetales Kälberserum für die Präparation neugeborener Ratten-Kardiomyozyten (FKS-R)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Flüssiger Stickstoff (N ₂)	Linde Gas (Pullach)
Flüssiges Silikon	Dow Corning (Wiesbaden)
Säurefreies Formaldehyd 37%	Merck (Darmstadt)
Fujifilm <i>Medical</i> 18x24 Super RX	Fuji (Düsseldorf)

Anhang

G150 <i>Developer</i> und G354 <i>Fixing</i>	Agfa-Gevaert (Mortsel, Belgien)
Gelatine	Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA)
D(+)-Glucose-Monohydrat (MG 198,17 g/mol)	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin 100x = 200 mM	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
<i>Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)</i> ohne Calcium und Magnesium	Invitrogen (Karlsruhe)
Bacto™ Hefe-Extrakt	Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA)
HEK 293T-Zelllinie	GenHunter (Nashville, TN, USA)
4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- ethansulfonsäure (HEPES), (MG 238,30 g/mol)	Roth (Karlsruhe)
Immersionsöl, Immersol™ 518 N	Carl Zeiss (Oberkochen)
(±)-Isoprenalin Hydrochlorid	Sigma (Steinheim)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumacetat (CH ₃ COOK), (MG 98,15 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl), (MG 74,56 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄), (MG 136,09 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Kanamycin Sulfat	Invitrogen (Karlsruhe)
Kohlendioxid (CO ₂)	Linde Gas (Pullach)
Laminin	Roche Diagnostics (Mannheim)
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂ • 6 (H ₂ O)), (MG 203,30 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Magnesiumsulfat (MgSO ₄ • 7 (H ₂ O)), (MG 246,48 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid (MnCl ₂ • 2 (H ₂ O)), (MG 161,87 g/mol)	Merck (Darmstadt)
<i>BD Matrigel™</i> <i>Basement Membrane Matrix</i>	Becton, Dickinson and Company (Bedford, MA, USA)

Anhang

Medium M 199	Invitrogen (Karlsruhe)
Methanol	JT Baker (Deventer, Niederlande)
Minimum Essential Medium-Earle (MEM-Earle) Flüssig (1 g/l D-Glucose, 2,2 g/l NaHCO ₃ , ohne Glutamin)	Biowest (Nuaille, Frankreich)
ML-7 Hydrochlorid	Alexis (Lausen, Schweiz)
ML-9 Hydrochlorid	Alexis (Lausen, Schweiz)
Molekulargewichtsmarker, 100bp DNA Ladder, <i>GeneRuler</i> TM	Fermentas (Ontario, Kanada)
Molekulargewichtsmarker, 1kb DNA Ladder, <i>GeneRuler</i> TM	Fermentas (Ontario, Kanada)
Molekulargewichtsmarker, 1 Kb DNA Extension Ladder	Invitrogen (Karlsruhe)
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS), (MG 209,3 g/mol)	Sigma (Steinheim)
Mowiol 4-88	Calbiochem (Darmstadt)
Nadolol	Sigma (Steinheim)
Natriumacetat (MG 82,03 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Natriumazid (NaN ₃)	Serva (Heidelberg)
Natriumchlorid (NaCl), (MG 58,44 g/mol)	JT Baker (Deventer, Niederlande)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄ • (H ₂ O)), (MG 137,99 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Roth (Karlsruhe)
Natriumfluorid (MG 41,99 g/mol)	Roth (Karlsruhe)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃), (MG 84,01 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Natriumhydroxid (NaOH), 0,1 M	Merck (Darmstadt)
Natriumpyruvat	Sigma (Steinheim)
NEBuffer 1-4	NEB (Frankfurt)
OptiMEM [®] + GlutaMAX TM	Invitrogen (Karlsruhe)
pAdTrack-CMV Vektor	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Herr Dr. A. El-Armouche, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)

Anhang

pALsh Vektor	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Alexander Laatsch, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, UKE (Hamburg)
Paraformaldehyd	Sigma (Steinheim)
Penicillin/Streptomycin 100x (P/S)	Invitrogen (Karlsruhe)
Bacto™ Pepton	Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA)
Pferdeserum für die Präparation neugeborener Ratten-Kardiomyozyten	Cambrex (Walkersville, MD, USA)
Pferdeserum-M für die Präparation neugeborener Maus-Kardiomyozyten	Biochrom (Berlin)
Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1; V/V/V)	Fluka (Steinheim)
(R)-(-)-Phenylephrin Hydrochlorid	Sigma (Steinheim)
Phosphatgepufferte Kochsalzlösung ohne Calciumchlorid und ohne Magnesiumchlorid (PBS; -CaCl ₂ , -MgCl ₂), 10x	Invitrogen (Karlsruhe)
pHR CEW Vektor	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. W.-H. Zimmermann, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
pLKO.1 Vektoren mit E3- und E5-shRNA-Sequenzen	Open Biosystems (Huntsville, AL, USA)
pLKO.1 Vektoren mit Non-Target-shRNA-Sequenz und Empty Vektor	Sigma (Steinheim)
pMD2.G Vektor	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. W.-H. Zimmermann, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Polyfect®	Qiagen (Hilden)
Ponceau S	Sigma (Steinheim)
Prazosin Hydrochlorid	Sigma (Steinheim)

Anhang

Precision Plus Protein Dual Color Standard (Proteinmarker für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese)	Bio-Rad Laboratories (München)
Primer für die nicht-quantitative RT-PCR und Sequenzierung	MWG Biotech (Ebersberg)
Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR	TIB MOLBIOL (Berlin)
psPAX2 Vektor	Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von der Arbeitsgruppe Herr Prof. Dr. W.-H. Zimmermann, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Puromycin-Dihydrochlorid	Roth (Karlsruhe)
QBI-HEK 293A-Zelllinie	Qbiogene (Morgan Irvine, CA, USA)
Restriktionsenzyme s. Tab. 2	NEB (Frankfurt am Main)
Rinderserumalbumin (BSA), flüssig, 100x	NEB (Frankfurt am Main)
Rinderserumalbumin, <i>Albumin bovine serum Fraction V</i> (pulverisiert)	Sigma (Steinheim)
RNAzol B [®]	WAK-Chemie Medical (Steinbach)
ROX, <i>Reference Dye</i> für die quantitative RT-PCR, flüssig, 100x	Sigma (Steinheim)
Rubidiumchlorid (RbCl), (MG 120,92 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Salzsäure rauchend 37% (HCl)	Merck (Darmstadt)
Salzsäure, 0,01 N (HCl)	Roth (Karlsruhe)
Salzsäure, 1 N (HCl)	Merck (Darmstadt)
<i>2,5x Sequencing Buffer</i>	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
shRNA-Oligonukleotide (<i>Sense-</i> und <i>Antisense</i> -Sequenzen)	MWG Biotech (Ebersberg)
<i>SuperSignal[®] West Dura Extended Duration Substrate</i>	Pierce (Rockford, IL, USA)
T4-DNA-Ligase	NEB (Frankfurt am Main)
10x T4-DNA-Ligasepuffer	NEB (Frankfurt am Main)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio-Rad (München)
Thimerosal	Sigma (Steinheim)

Anhang

1,1,2-Trichlortrifluorethan	Merck (Darmstadt)
Trinatriumcitratdihydrat (Na ₃ Citrat • 2 H ₂ O), (MG 294,10 g/mol)	Merck (Darmstadt)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Trizma [®] base, Tris Base)	Sigma (Steinheim)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochlorid (Tris HCl)	Promega (Madison, WI, USA)
Triton-X 100	Sigma (Steinheim)
Trockenmilchpulver	Roth (Karlsruhe)
Trypanblau Lösung	Sigma (Steinheim)
Difco [™] Trypsin 1:250	Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA)
Trypsin-EDTA (1X), flüssig (0,05% Trypsin, 0,53 mM EDTA • 4 Na)	Invitrogen (Karlsruhe)
Bacto [™] Trypton	Becton, Dickinson and Company (Sparks, MD, USA)
Polyoxyethylensorbitanmonolaurat (Tween [®] 20)	Sigma (Steinheim)
WB-4101 Hydrochlorid	Sigma (Steinheim)
Wortmannin	Alexis (Lausen, Schweiz)
Y-27632 Dihydrochlorid Monohydrat	Sigma (Steinheim)

8.2 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden, wenn nicht anders im Text angegeben, bei 4 °C gelagert.

Agarosegel x%:	Agarose	x g
	TBE	100 ml

Das Gemisch wurde in der Mikrowelle aufgeköcht, bis eine klare Lösung entstand. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C wurde 1 µl Ethidiumbromidlösung hinzupipettiert, gut gemischt und die Lösung umgehend in einen vorbereiteten Träger einer Flachbett–Elektrophoresekammer gegossen.

Ak-Lösung:	BSA	1,00% (V/V)
	Triton X-100	0,50% (V/V)
	Thimerosal	0,05% (V/V)
	in TBS 0,05 M	

Lagerung bei -20 °C.

Ammoniumpersulfat 10%:	Ammoniumpersulfat	100 mg
	Aqua ad iniectabilia	1 ml

Lagerung bei -20 °C, nur 1 Monat verwendet.

Ampicillin: (25mg/ml)	Ampicillin Trihydrat	1,25 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 50 ml

Zum Lösen des Ampicillins wurden 300-350 µl einer 10 M NaOH-Lösung hinzugefügt. Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert. Lagerung bei -20 °C.

10x Annealing-Puffer:	Tris HCl (1 M, pH 7,5)	100 mM
	MgCl ₂	100 mM
	DTT	10 mM
	in Aqua ad iniectabilia	

Die Lösung wurde frisch hergestellt und sofort verbraucht.

Ara-C 25 mM:	Cytosin β -D-arabino-	
	furanosid	608 mg
	Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 μ m Filter steril filtriert und bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

ATP-Lösung 10 mM:	ATP	5 mg
	Aqua ad iniectabilia	1 ml

Lagerung bei -20 °C.

BDM-Lösung 30 mM:	BDM	152 mg
	Aqua bidest.	ad 50 ml

Das BDM wurde unter leichtem Erwärmen gelöst, Lagerung bei RT.

Block-Lösung-IH:	FKS (inaktiviert)	10,00%(V/V)
	BSA (Pulver)	1,00% (V/V)
	Triton X-100	0,50% (V/V)
	Thimerosal	0,05% (V/V)
	in TBS 0,05 M	

Lagerung bei -20 °C.

Block-Lösung-WB:	Trockenmilchpulver	4 g
	BSA (Pulver)	2 g
	TBST	ad 100 ml

Die Lösung wurde nur 48 h verwendet.

BrdU 10mM:	BrdU	307,4 mg
	Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 μ m Filter steril filtriert und bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

CaCl₂-Stammlösung 2,25 M:	CaCl ₂ • 2 (H ₂ O)	165,57 g
	Aqua bidest.	ad 500 ml

Carbenicillin: (25mg/ml)	Carbenicillin Dinatriumsalz	1,25 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 50 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert. Lagerung bei -20 °C.

CBFHH:	NaCl	136,90 mM
	KCl	5,36 mM
	MgSO ₄ • 7 (H ₂ O)	70,81 mM
	Glucose	5,55 mM
	KH ₂ PO ₄	0,44 mM
	Na ₂ HPO ₄ • (H ₂ O)	70,34 mM
	HEPES	20,00 mM
	in Aqua ad iniectabilia	

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,5 wurde die Lösung durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert. Zur Herstellung wurden Stammlösungen benutzt, die mit Aqua ad iniectabilia angesetzt und autoklaviert wurden. Die Glucose- und HEPES-Stämme, die nicht autoklavierbar sind, wurden durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert.

Citrat-Salz-Lösung:	KCl	10,06 g (0,135 M)
	Na ₃ Citrat • 2 (H ₂ O)	4,40 g (0,015 M)
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die gemischte Lösung wurde durch einen Faltenfilter gegeben und autoklaviert.

Collagenase II-Lösung:	Collagenase II (100mg/ml)	36 µl
	HBSS	40 ml

Die Lösung wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Collagen Typ I-Lösung:	Collagen Typ I (3,5 mg/ml)	714 µl
	PBS	50 ml

Die Lösung wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Coomassie Brilliantblau-Lösung:	Coomassie Brilliantblau	2 g
	G250	(0,2%)
	Isopropanol	250 ml (25%)
	Essigsäure (100%)	100 ml (10%)
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die gemischte Lösung wurde durch einen Faltenfilter gegeben.

Schwere CsCl-Lösung:	CsCl	42,2 g
	VSB	ad 100 g

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Leichte CsCl-Lösung:	CsCl	22,4 g
	VSB	ad 100 g

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Dark Medium:	<i>Light Medium</i>	70,0 ml
	Pferdeserum-M (inaktiv)	8,3 ml
	FKS-M (inaktiv)	4,1 ml

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Denaturierungspuffer:	Deionisiertes Formamid	633 µl
	10x MOPS	133 µl
	Säurefreies Formaldehyd	234 µl
	(37%)	

Die Lösung war bei -20 °C-Lagerung eine Woche haltbar.

Anhang

Diethylpyrocarbonat-Wasser 0,1%: (DEPC-H ₂ O)	Diethylpyrocarbonat Aqua ad iniectabilia	1 ml ad 1000 ml
--	---	--------------------

Das DEPC wurde über Nacht bei Raumtemperatur unter Rühren gelöst und anschließend autoklaviert. Lagerung bei RT.

10x DMEM:	10x DMEM Pulver Aqua ad iniectabilia	665 mg 5 ml
------------------	---	----------------

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

DNase-Arbeitslösung:	FKS-R (aktiv) DNase-Stammlösung P/S CBFHH	1,7 ml 0,6 ml 0,5 ml ad 50 ml
-----------------------------	--	--

Die Lösung wurde an jedem Zellpräparationstag frisch hergestellt (unter sterilen Bedingungen) und auf Eis gelagert.

DNase-Stammlösung:	DNase (806 U/mg) PBS (-Ca ²⁺ , -Mg ²⁺)	100 mg 50 ml
---------------------------	--	-----------------

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

EDTA 0,5 M:	EDTA Aqua bidest.	18,6 g ad 100 ml
--------------------	----------------------	---------------------

Der pH-Wert wurde mit einer 10 M NaOH-Lösung auf 8,0 eingestellt. Lagerung bei RT.

EHT-Medium:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃) 10% (V/V) Pferdeserum (inaktiviert) 2% (V/V) Hühnerembryonenextrakt 1% (V/V) P/S	
--------------------	---	--

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Anhang

Zweifach konzentriertes EHT-Medium:	10x DMEM	1,0 ml
	Pferdeserum (inaktiviert)	1,0 ml
	Hühnerembryonenextrakt	0,2 ml
	P/S	0,1 ml
	Aqua ad iniectabilia	ad 5,0 ml

Die Lösung wurde an jedem Zellpräparationstag frisch hergestellt (unter sterilen Bedingungen) und auf Eis gelagert.

Endothelin-1-Lösung 1 mM:	Endothelin-1	2,492 mg
	Aqua bidest.	ad 1,0 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch immer frisch angesetzt, dann Lagerung bei RT.

Entfärber 2:	Methanol	50 ml
	Essigsäure (100%)	50 ml
	Aqua bidest.	ad 500 ml

Lagerung bei RT.

Essigsäure 0,1% (V/V):	Essigsäure 100%	1 ml
	Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Essigsäure 5% (V/V):	Essigsäure 100%	50 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Verwendung als Zwischenbad für die Entwicklung von Fotofilmen. Lagerung bei RT.

Ethanol 70% (V/V):	Ethanol 100%	70 ml
	Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Lagerung bei RT.

Ethanol 70% (V/V) zur Desinfektion:

Ethanol 99%, vergällt mit 1%	
Methylethylketon	70 ml
Aqua bidest.	ad 100 ml

Lagerung bei RT.

Ethanol 75% (V/V):

Ethanol 100%	75 ml
Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Lagerung bei RT.

Fetales Kälberserum (FKS, FKS-M und FKS-R), inaktiv:

Aktives FKS wurde bei mehrmaligem Umschwenken 1 h im Wasserbad auf 56 °C erhitzt. Nach Aliquotierung unter sterilen Bedingungen Lagerung bei -20 °C.

Gelatine 1% (V/V):

Gelatine	1 g
Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch autoklaviert, dadurch Lösung der Gelatine. Vor Verwendung Anwärmung auf 37 °C.

Glucose-Lösung 1 M:

D(+)-Glucose-Monohydrat	19,8 g
Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Glycerol 10% (m/V):

Glycerol	10 g
Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Glycerol 10% (V/V):

Glycerol	10 ml
Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch 30 min auf einem Rollmischer vermengt.

Anhang

Glycerol 50% (V/V):	Glycerol	25 ml
	Aqua bidest.	25 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch 30 min auf einem Rollmischer vermenget.

HCl 0,4 N:	HCl 1 N	40 ml
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Lagerung bei RT.

HEK 293T-Medium:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	
	(DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃ ,	
	584 mg/l stabiles Glutamin)	
	10% (V/V) FKS (inaktiviert)	
	1% (V/V) P/S	

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

HEK 293T-Zell-Einfriermedium:	FKS aktiv	1,00 ml
	DMSO	0,05 ml
		(5% V/V)

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

HEPES 1 M:	HEPES	26,0 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Isoprenalin-Stammlösung 10⁻² M:	Isoprenalin	12,35 mg
	Aqua ad iniectabilia	ad 10 ml

Die Lösung wurde unmittelbar vor dem Gebrauch immer frisch angesetzt, dann Lagerung bei RT.

Kaliumreiche Tyrode-Lösung:	Stamm I-K	40 ml
	Stamm II	38 ml
	Stamm III	10 ml
	Glucose	1000,0 mg
	Ascorbinsäure	50,0 mg
	Na ₂ EDTA	18,6 mg
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die Lösung wurde immer frisch angesetzt und dann bei RT gelagert. Es wurde noch eine entsprechende Menge der CaCl₂-Stammlösung 2,25 M hinzugesetzt (Endkonzentration Calcium 1,2 mM).

Zusammensetzung der Kaliumreichen Tyrode-Lösung:	KCl	125,20 mM
	CaCl ₂	0,20 mM
	MgCl ₂	1,05 mM
	NaHCO ₃	22,60 mM
	NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
	Glucose	5,05 mM
	Ascorbinsäure	0,28 mM
	Na ₂ EDTA	0,05 mM
	in Aqua bidest.	

Es wurde noch eine entsprechende Menge der CaCl₂-Stammlösung 2,25 M hinzugesetzt (Endkonzentration Calcium 1,2 mM).

Kanamycin: (10mg/ml)	Kanamycin Sulfat	500 mg
	Aqua ad iniectabilia	ad 50 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

KCl 250 mM:	KCl	18,64 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

KM-Medium:	Minimum Essential Medium (MEM-Earle; 2,2 g/l NaHCO ₃) 10% (V/V) FKS-R (inaktiviert) 1% (V/V) P/S 1% (V/V) BrdU (10mM)
-------------------	---

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Kranias-Puffer:	Tris (pH 8,8)	30 mM
	EDTA (pH 8,0)	5 mM
	NaF	30 mM
	SDS	3% (V/V)
	Glycerol	10% (V/V)
	in Aqua bidest.	

Lagerung bei RT.

Ladungsmix:	Glycerol 50% (V/V)	20 ml
	Bromphenolblau	20 mg
	Aqua bidest.	ad 40 ml

Laminin-Lösung:	Laminin (0,5 mg/ml)	108 µl
	PBS	5,4 ml

Die Lösung wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Laufpuffer:	10x Tris-Glycin Puffer	100 ml
	SDS 20% (m/V)	5 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Anhang

LB-Agarplatten:	LB-Medium	1000 ml
(festes Nährmedium für Bakterienkulturen)	Agar	15 g
		(1,5% m/V)

Das Gemisch wurde autoklaviert und jeweils 20 ml Lösung für eine 10 cm-Ø-Platte verwendet. Die gegossenen Platten wurden zum Aushärten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Bei der Herstellung antibiotikahaltiger Platten wurde nach dem Autoklavieren der Lösung und Abkühlen auf ca. 45 °C entweder Ampicillin (100 µg/ml) oder Kanamycin (50 µg/ml) hinzugefügt und vor dem Gießen der Platten sorgfältig gemischt.

LB-Medium:	Trypton	10 g
LB-Miller Formulierung		(1,0% m/V)
	NaCl	10 g
		(1,0% m/V, 170 mM)
	Hefe-Extrakt	5 g
		(0,5% m/V)
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurde die Lösung autoklaviert.

Light Medium:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; 4,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃ , 862 mg/l stabiles Glutamin, ohne Natriumpyruvat)	75 ml
	Medium M 199	25 ml
	P/S	1 ml
	HEPES (1 M)	1 ml

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Loading Buffer (LB):	DEPC-H ₂ O	500 µl
	Bromphenolblau	gesättigt
	Glycerol (100%)	500 µl

Anhang

Lower Tris:	Tris Base	18,17 g
		(1,5 M)
	SDS 20% (m/V)	2 ml
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Der pH-Wert wurde auf 8,8 mit rauchender HCl eingestellt. Verwendung des *Lower Tris* für maximal 3 Wochen.

2x LS-LB: (<i>Low salt LB</i>)	Pepton	20 g
	Hefe-Extrakt	10 g
	NaCl	5 g
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,4 wurde die Lösung autoklaviert. Vor Verwendung wurde der Lösung 100 µg/ml Carbenicillin zugesetzt.

2x LS-LB-Agarplatten: (festes Nährmedium für Bakterienkulturen)	2x LS-LB-Medium	1000 ml
	Agar	15 g
		(1,5% m/V)

Das Gemisch wurde autoklaviert, und nach Abkühlen auf ca. 45 °C wurde Carbenicillin (100 µg/ml) hinzugefügt sowie vor dem Gießen der Platten sorgfältig gemischt. Es wurden jeweils 20 ml Lösung für eine 10 cm-Ø-Platte verwendet. Die gegossenen Platten wurden zum Aushärten bei Raumtemperatur stehen gelassen.

MgCl₂-Stammlösung 1,05 M:	MgCl ₂ • 6 (H ₂ O)	106,83 g
	Aqua bidest.	ad 500 ml

MgSO₄-Lösung 1 M:	MgSO ₄ • (7 H ₂ O)	24,6 g
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor Gebrauch autoklaviert.

Herstellung der modifizierten Tyrode-Lösung: Für EHTs	Stamm I	40 ml
	Stamm II	38 ml
	Stamm III	10 ml
	Glucose	1000,0 mg
	Ascorbinsäure	50,0 mg
	Na ₂ EDTA	18,6 mg
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die Lösung wurde immer frisch angesetzt und dann bei RT gelagert. Für die SMC-Pseudo-EHTs wurde noch eine entsprechende Menge der CaCl₂-Stammlösung 2,25 M hinzugesetzt (Endkonzentration Calcium 1,2 mM).

Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung: Für EHTs	NaCl	119,80 mM
	KCl	5,40 mM
	CaCl ₂	0,20 mM
	MgCl ₂	1,05 mM
	NaHCO ₃	22,60 mM
	NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
	Glucose	5,05 mM
	Ascorbinsäure	0,28 mM
	Na ₂ EDTA	0,05 mM
	in Aqua bidest.	

Für die SMC-Pseudo-EHTs wurde noch eine entsprechende Menge der CaCl₂-Stammlösung 2,25 M hinzugesetzt (Endkonzentration Calcium 1,2 mM).

Herstellung der modifizierten Tyrode-Lösung: Für Mausvorhöfe	Stamm I	40 ml
	Stamm II	38 ml
	Stamm III	10 ml
	Glucose	1980,0 mg
	Ascorbinsäure	88,0 mg
	Natriumpyruvat	550,0 mg
	Na ₂ EDTA	18,6 mg
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Die Lösung wurde immer frisch angesetzt und dann bei RT gelagert.

Anhang

Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung: Für Mausvorhöfe	NaCl	119,80 mM
	KCl	5,40 mM
	CaCl ₂	1,80 mM
	MgCl ₂	1,05 mM
	NaHCO ₃	22,60 mM
	NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
	Glucose	10,00 mM
	Natriumpyruvat	5,00 mM
	Ascorbinsäure	0,50 mM
	Na ₂ EDTA	0,05 mM
	in Aqua bidest.	

MOPS 1 M:	MOPS	20,9 g
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Lagerung bei RT.

1x MOPS:	10x MOPS	100 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Lagerung bei RT.

10x MOPS:	MOPS	41,86 g
	Natriumacetat	4,10 g
	EDTA (0,5 M)	20 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde kontrolliert und ggf. korrigiert (5,5-7,5). Die Lösung wurde anschließend autoklaviert. Lagerung bei RT.

Mowiol 4-88:	Mowiol 4-88	12 g
	Aqua bidest.	30 ml
	Tris HCl (0,2 M, pH 8,5)	60 ml

Das Mowiol 4-88 wurde über Nacht unter Rühren gelöst, anschließend auf 90 °C erwärmt und 45 min weitergerührt. Diese Lösung wurde langsam auf 50 °C abgekühlt und 30 g Glycerol (100%) vorsichtig eingerührt; der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt.

Anhang

NaCl 25% (m/V):	NaCl	25 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Nadolol-Stammlösung 10⁻³ M:	Nadolol	3 mg
	Aqua bidest.	ad 10 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch immer frisch angesetzt, dann Lagerung bei RT.

Natriumacetat 0,3 M:	Natriumacetat	4,08 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 100 ml

Der pH-Wert wurde auf 5,2 eingestellt.

Natriumacetat 3 M:	Natriumacetat	40,8 g
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Der pH-Wert wurde auf 5,2 eingestellt.

NKM:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃) 10% (V/V) FKS-R (inaktiviert) 1% (V/V) P/S 1% (V/V) L-Glutamin
-------------	---

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Paraformaldehyd-Lösung 4%:	Paraformaldehyd	4 g
	PBS	100 ml

Das Paraformaldehyd wurde bei 60 °C (Magnetrührer) in 1 h gelöst, und anschließend wurde tropfenweise 10 M NaOH hinzugegeben, bis die Paraformaldehyd-Polymere in Lösung gegangen sind sowie der pH-Wert 7,4 betrug. Lagerung bei -20 °C.

Anhang

PBS:	10x PBS	100 ml
	Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Pferdeserum und Pferdeserum-M, inaktiv:

Aktives Pferdeserum wurde bei mehrmaligem Umschwenken 1 h im Wasserbad auf 56 °C erhitzt. Nach Aliquotierung unter sterilen Bedingungen Lagerung bei -20 °C.

Phenylephrin-Stammlösung 10⁻² M:	Phenylephrin	10,19 mg
	Aqua ad iniectabilia	ad 10 ml

Die Lösung wurde vor dem Gebrauch immer frisch angesetzt, dann Lagerung bei RT.

Ponceau S-Lösung:	Ponceaurot S	0,5 g
	Essigsäure (100%)	1 ml
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Die Lösung wurde durch einen Faltenfilter gegeben.

Probenpuffer:	Glycerol 50% (V/V)	2,00 ml
	SDS 20% (m/V)	1,50 ml
	<i>Upper</i> Tris	1,25 ml
	β-Mercaptoethanol	0,50 ml
	Aqua bidest.	ad 10,00 ml

Lagerung nach Aliquotierung bei -20 °C. Vor dem Gebrauch für 10 min bei 37 °C erwärmt und anschließend durchmischt.

Puromycin:	Puromycin	5 mg
	Aqua ad iniectabilia	ad 25 ml

Die Lösung wurde durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert und bei -20 °C gelagert.

QBI-HEK 293A-Medium: Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
(DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃,
584 mg/l stabiles Glutamin)
10% (V/V) FKS (inaktiviert)
1% (V/V) P/S

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

QBI-HEK 293A-Medium-V: Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium
(DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃,
584 mg/l stabiles Glutamin)
2% (V/V) FKS (inaktiviert)
1% (V/V) P/S

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

QBI-HEK 293A-Zell-Einfriermedium:	FKS aktiv	1,00 ml
	DMSO	0,05 ml
		(5% V/V)

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

Sammelgel 4% (V/V):	Aqua bidest.	2,44 ml
Menge für 2 Minigele	Acrylamid	
	(30%, Mix 37, 5 : 1)	0,53 ml
	<i>Upper</i> Tris	1,00 ml
	N,N,N',N'-Tetramethyl- Ammoniumpersulfat	
	10% (m/V)	30,0 µl

Zur langsamen Auspolymerisierung wurden alle Lösungen eisgekühlt eingesetzt.

SDS 20% (m/V):	SDS	20 g
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Das SDS wurde unter leichter Erwärmung gelöst.

SMC-Einfriermedium:	FKS aktiv	1,00 ml
	DMSO	0,05 ml
		(5% V/V)

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

SMC-Medium-1:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	
	(DMEM; 4,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l	
	NaHCO ₃ , 584 mg/l stabiles Glutamin)	
	10% (V/V) FKS (inaktiviert)	
	2% (V/V) P/S	

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

SMC-Medium-2:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	
	(DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃ ,	
	584 mg/l stabiles Glutamin)	
	15% (V/V) FKS (inaktiviert)	
	1% (V/V) P/S	

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

SMC-Medium-3:	Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium	
	(DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO ₃ ,	
	584 mg/l stabiles Glutamin)	
	10% (V/V) FKS (inaktiviert)	
	1% (V/V) P/S	

Das Medium wurde unter sterilen Bedingungen hergestellt.

SOB-Medium:	Trypton	20,0 g
	Hefe-Extrakt	5,0 g
	NaCl	0,5 g
	KCl (250 mM)	10 ml
	Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 wurde die Lösung autoklaviert. Vor der Verwendung wurden der Lösung 10 ml einer sterilen 1 M MgSO₄-Lösung zugesetzt.

Anhang

SOC-Medium:	SOB-Medium	980 ml
	Glucose-Lösung (1 M)	20 ml

Alle verwendeten Lösungen wurden steril eingesetzt.

Stamm I für Tyrode-Lösung: Für EHTs (0,2 mM Ca²⁺)	NaCl	175 g
	KCl	10 g
	CaCl ₂ -Stamm	2,22 ml
	MgCl ₂ -Stamm	25 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Stamm I für Tyrode-Lösung: Für Mausvorhöfe (1,8 mM Ca²⁺)	NaCl	175 g
	KCl	10 g
	CaCl ₂ -Stamm	20 ml
	MgCl ₂ -Stamm	25 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Stamm I-K für Kaliumreiche Tyrode-Lösung: Für SMC-Pseudo-EHTs (0,2 mM Ca²⁺)	KCl	233,27 g
	CaCl ₂ -Stamm	2,22 ml
	MgCl ₂ -Stamm	25 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Stamm II für Tyrode-Lösung:	NaHCO ₃	50 g
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Stamm III für Tyrode-Lösung:	NaH ₂ PO ₄ (H ₂ O)	5,8 g
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

TBE:	Tris base	10,8 g
	Borsäure	5,5 g
	EDTA (0,5M)	4 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Anhang

10x TBS:	Tris Base	24,2 g (0,2 M)
	NaCl	80,0 g (1,37 M)
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,6 mit rauchender HCl eingestellt.

TBS:	10x TBS	100 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

TBS 0,05 M:	Tris-Cl (1M)	25 ml (0,05 M)
	NaCl	4,5 g (0,9% m/V)
	Aqua bidest.	ad 500 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,2-7,4 eingestellt.

TBST:	10x TBS	100 ml
	Tween® 20	1 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Lagerung bei RT.

Anhang

TFB 1-Lösung:	CH ₃ COOK	0,294 g (30 mM)
	MnCl ₂ • 2(H ₂ O)	0,809 g (50 mM)
	RbCl	1,200 g (100 mM)
	CaCl ₂ • 2(H ₂ O)	0,150 g (10 mM)
	Glycerol	18,9 g (15% m/V)
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 5,8 wurde die Lösung durch einen 0,22 µM Filter steril filtriert.

TFB 2-Lösung:	MOPS (1M)	0,1 ml (10 mM)
	RbCl	12 mg (10 mM)
	CaCl ₂ • 2(H ₂ O)	0,110 g (75 mM)
	Glycerol (100%)	1,89 g (15%)
	Aqua bidest.	ad 10 ml

Nach Einstellung des pH-Wertes auf 7,0 wurde die Lösung durch eine 0,22 µM Filter steril filtriert.

Transfer Puffer:	10x Tris-Glycin Puffer	100 ml
	Methanol	200 ml
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Anhang

Trenngel 7,5% (V/V): Menge für 2 Minigele	Glycerol 50% (V/V)	6,20 ml
	Acrylamid	
	(30%, Mix 37, 5 : 1)	3,16 ml
	Lower Tris	3,16 ml
	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	4,0 µl
	Ammoniumpersulfat 10% (m/V)	64,0 µl

Zur langsamen Auspolymerisierung wurden alle Lösungen eisgekühlt eingesetzt.

Trenngel 15% (V/V): Menge für 2 Minigele	Glycerol 50% (V/V)	3,10 ml
	Acrylamid	
	(30%, Mix 37, 5 : 1)	6,32 ml
	Lower Tris	3,16 ml
	N,N,N',N'-Tetramethyl- ethylendiamin (TEMED)	4,0 µl
	Ammoniumpersulfat 10% (m/V)	64,0 µl

Zur langsamen Auspolymerisierung wurden alle Lösungen eisgekühlt eingesetzt.

Tris:	Tris Base	60,6 g
	Aqua bidest.	ad 500 ml

Der pH-Wert wurde auf 8,8 eingestellt.

Tris-Cl (1 M):	Tris Base	60,6 g
	Aqua bidest.	ad 500 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,6 eingestellt.

Tris HCl (0,2 M):	Tris Base	2,42 g
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Der pH-Wert wurde auf 8,5 eingestellt.

Anhang

Tris-HCl (1 M):	Tris Base	60,6 g
	Aqua bidest.	ad 500 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,4 eingestellt.

Tris-HCl (1 M):	Tris Base	6,06 g
	Aqua ad iniectabilia	ad 50 ml

Der pH-Wert wurde auf 7,5 eingestellt.

10x Tris-Glycin Puffer:	Tris Base	30 g (25 mM)
	Glycin	144 g (0,2 M)
	Aqua bidest.	ad 1000 ml

Trypsin-Arbeitslösung:	Trypsin-Stammlösung	1,3 ml
	DNase-Stammlösung	0,6 ml
	P/S	0,5 ml
	CBFHH	ad 50 ml

Die Lösung wurde an jedem Zellpräparationstag frisch hergestellt (unter sterilen Bedingungen) und auf Eis gelagert.

Trypsin-HBSS-Lösung:	Trypsin	19,2 mg
	HBSS ohne Calcium und Magnesium	40 ml

Die Lösung wurde an jedem Zellpräparationstag frisch hergestellt und vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Trypsin-Stammlösung:	Trypsin	700 mg
	CBFHH	7 ml

Das Trypsin wurde bei 4 °C mindestens 12 h rotierend gelöst und vor dem Gebrauch durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert.

Upper Tris:	Tris Base	6,06 g (0,5 M)
	SDS 20% (m/V)	2 ml
	Aqua bidest.	ad 100 ml

Der pH-Wert wurde auf 6,8 mit rauchender HCl eingestellt. Verwendung des *Upper Tris* für maximal 3 Wochen.

Virus Storage Buffer (VSB):	NaCl	8,000 g
	KCl	372 mg
	MgCl ₂ • 6 (H ₂ O)	204 mg
	1 M Tris-HCl (pH 7,4)	10 ml
	Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Der VSB wurde anschließend autoklaviert.

2x Virus Storage Buffer (VSB):	NaCl	16,000 g
	KCl	744 mg
	MgCl ₂ • 6 (H ₂ O)	408 mg
	1 M Tris-HCl (pH 7,4)	20 ml
	Aqua ad iniectabilia	ad 1000 ml

Der 2x VSB wurde anschließend autoklaviert.

8.3 Kits

<i>E.Z.N.A.[®] Cycle-Pure Kit</i>	peqLab (Erlangen)
<i>Nucleobond[®] AX 500</i>	Machery-Nagel (Düren)
<i>NucleoSpin[®] Plasmid</i>	Machery-Nagel (Düren)
<i>QIAquick[®] Gel Extraction Kit</i>	Qiagen (Hilden)
<i>QuickTiter[™] Lentivirus Quantitation Kit (HIV p24 ELISA)</i>	Cell Biolabs (San Diego, CA, USA)
<i>Sircol[™] Collagen Assay</i>	Biocolor (Newtownabbey, Vereinigtes Königreich)
<i>SuperScript[™] First Strand Synthesis System for RT-PCR</i>	Invitrogen (Karlsruhe)

8.4 Hilfsmittel und Geräte

<i>ABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System</i>	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
Abstandhalter	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Adhäsive Folien für die Bioanalytik, Material: Polyolefin	Sarstedt (Nümbrecht)
<i>Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT</i>	Bio-Rad Laboratories (München)
Analysenwaage, Modell <i>Genius</i>	Sartorius (Göttingen)
<i>Bio Imaging System, Chemi Genius²</i>	Syngene (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
Biosphere [®] Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt (Nümbrecht)
Brutschrank (Bakterien)	Heraeus (Hanau)
Brutschränke mit CO ₂ -Zufuhr (Zellkultur), Modell <i>Hera Cell 240</i>	Heraeus (Hanau)
CASY [®] cups (Messbecher)	Schärfe System (Reutlingen)
<i>Cell Counter CASY</i>	Schärfe System (Reutlingen)
Chirurgisches Nahtmaterial 6/0 USP, 0,7 metric Seidenfaser, ad usum veterinarium	Resorba (Nürnberg)
Chromatographiepapier 3MM Whatman	Schleicher & Schuell (Dassel)
CO ₂ -Betäubungsglocke	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Cryoaufbewahrungsbehälter	VWR (Darmstadt)
<i>CryoPure</i> (Plastikgefäße zum Einfrieren in flüssigem Stickstoff und -80 °C)	Sarstedt (Nümbrecht)
Curix Cassette 18x24 cm	Agfa-Gevaert (Mortsel, Belgien)
Dampfsterilisator, Modell <i>Varioklav 135 S</i>	H+P Labortechnik (Oberschleißheim)
Deckgläser 24x60 mm und Ø 13 mm	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Dialyseschläuche Servapor [®] Ø 50 mm	Serva (Heidelberg)
Dialyseschlauch-Klammerverschlüsse	Reichert Chemietechnik (Heidelberg)
Digital-pH-Meter	Knick (Berlin)

Anhang

Digitalwaage, Modell Ohaus <i>Precision Advanced</i>	Ohaus (Pine Brook, NJ, USA)
Eismaschine, Modell <i>Scotsman AF-10</i>	Scotsman Ice Systems (Vernon Hills, IL, USA)
Elektrischer Stimulator, Modell ST.8.2	Ingenieurbüro G. Jäckel (Hanau)
Elektrophorese-Spannungsgerät, Modell <i>PowerPac Basic</i>	Bio-Rad Laboratories (München)
Elektroporationsküvetten	Bio-Rad Laboratories (München)
Elektrotransformationskammer, Modell <i>MicroPulser™</i>	Bio-Rad Laboratories (München)
ELISA Plattenleser, Modell <i>Tecan Sunrise</i>	Tecan (Crailsheim)
Faltenfilter Ø 240 mm	Schleicher & Schuell (Dassel)
Fluoreszenzmikroskop, Modell <i>Axioplan</i> mit Kamera	Carl Zeiss (Jena)
Fotometer, Modell <i>Smart Spec™ 3000</i>	Bio-Rad Laboratories (München)
Gewebekulturplatte, 12 Vertiefungen = 12-well	Nunc (Roskilde, Dänemark)
Glasgefäße	Schott (Mainz)
Glaskapillaren, <i>Borosilicate Glass Capillaries</i>	World Precision Instruments (Sarasota, FL, USA)
Glasschalen	Roth (Karlsruhe)
Halb-Mikro-Küvette aus Polystyrol, Einmalverwendung	Sarstedt (Nümbrecht)
Horizontalschüttler, Modell <i>Polymax 1040</i>	Heidolph (Kelheim)
Hybrid PCR-Gerät <i>Sprint</i>	Fisher Scientific (Schwerte)
Innova 4230 <i>Incubator Shaker</i>	New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA)
Instrumentenschale mit Deckel	Roth (Karlsruhe)
Kippwippe, Modell <i>SM</i>	Sarstedt (Nümbrecht)
Kolbenhubpipetten	Eppendorf (Hamburg)
Konfokales <i>Scanning</i> Mikroskop, Modell <i>LSM 510 Meta auf Axiovert 200 M</i>	Carl Zeiss (Jena)
Kraftaufnehmer	Ingenieurbüro G. Jäckel (Hanau)
Kühlschrank +4 bis +8 °C, Modell <i>profiline</i>	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühltruhe -20 °C, Modell <i>Economy</i>	Liebherr (Ochsenhausen)
Kühltruhe -80 °C	Kryotec (Hamburg)
Kunststoffschläuche	Roth (Karlsruhe)
Kurzzeitmesser, mechanisch	Roth (Karlsruhe)

Anhang

Laserdruck (schwarz-weiß), Modell <i>HP LaserJet 4300 PCL 6</i>	Hewlett-Packard (Wilmington, DE, USA)
Magnetrührer, Modell <i>COMBIMAG RET</i>	Janke & Kunkel (Staufen)
Metallhaken	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Metallmörser	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Mikroskop für Phasenkontrastaufnahmen mit Kamera, Modell <i>Axioplan</i>	Carl Zeiss (Jena)
Mikrotiterplattenwaschgerät, Modell <i>MRW™</i>	Dynex Technologies (Berlin)
Mikrowelle, Modell R-212	Sharp (Hamburg)
Multiply® PCR-Einzelgefäße 0,2 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Neubauer-Zählkammer, Modell Assistent	Glaswarenfabrik Karl Hecht (Sondheim/Rhön)
Nitrocellulose Membran	Pierce (Rockford, IL, USA)
Objektträger	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Objektträgerkasten	Roth (Karlsruhe)
Organbäder	Glasbläserei Brunswieg (Hamburg)
Parafilm	American National (Menasha, WI, USA)
Pasteurpipetten, Glas	BRAND (Wertheim)
PCR-Gerät <i>GeneAmp® PCR System 9700</i>	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
96 und 384 <i>Well Multiply®</i> -PCR-Platten	Sarstedt (Nümbrecht)
Personal Computer, Modell <i>Professional Notebook MD 98300</i> , für die Anfertigung der vorliegenden Arbeit	Medion (Essen)
Personal Computer, für die Laborgeräte und Schreibtätigkeiten der vorliegenden Arbeit	Fujitsu Siemens (München)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipettierhilfen, Modell <i>accu-jet® pro</i>	BRAND (Wertheim)
Plastikreaktionsgefäße (0,5, 1,5 und 2,0 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Plastik-Zellsieb (<i>Cell Strainer</i>)	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ USA)
Polytron® Stativ-Dispergiergerät	Kinematica (Littau-Luzern, Schweiz)

Anhang

Präparationsbesteck	Hammacher (Solingen)
Quarzglasküvette	Hellma (Müllheim)
Reaktionsgefäßständer	Roth (Karlsruhe)
Reizelektroden	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Rollen Mixer, Modell <i>SRT1</i>	Stuart (Staffordshire, Vereinigtes Königreich)
Schüttelrad	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Schwimmer aus Styropor	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Serologische Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht)
Sicherheitswerkbank Klasse 2, Modell <i>Herasafe[®] HS 18</i>	Heraeus (Hanau)
Silikondocht	Roth (Karlsruhe)
Skalpelli, sterile Skalpellklingen	Bayha (Tuttlingen)
Slide-A-Lyzer [®] Dialysis Cassette, Typ 10.000 MWCO, 0,5-3 ml	Pierce (Rockford, IL, USA)
Spritzen (Plastik)	B. Braun (Melsungen)
<i>Stainless Steel Beads</i> , 5 mm	Qiagen (Hilden)
Stecknadeln	Haushaltswarengeschäft (Hamburg)
Sterican [®] -Kanülen	B. Braun (Melsungen)
Sterilfilter (alle Größen)	Sarstedt (Nümbrecht)
Suspensionskulturschalen (u. a. für die Herstellung von LB-Agarplatten)	Sarstedt (Nümbrecht)
Teflonscheiben	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Teflonzylinder	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Thermoblöcke, Modell Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg)
Tintenpatronendrucker (farbig), Modell <i>HP Officejet Pro K550</i>	Hewlett-Packard (Wilmington, DE, USA)

Anhang

<i>TissueLyser</i>	Qiagen (Hilden)
Ultrazentrifugationsröhrchen 16x76 cm	Beckman Coulter (Krefeld)
Ultrazentrifuge, Modell <i>Optima L-90K</i> mit Rotor <i>SW40 Ti</i>	Beckman Coulter (Krefeld)
UV-Lampen-Tisch	Bachofer (Reutlingen)
Vortex, Typ <i>Reax 200</i>	Heidolph (Kelheim)
Wärmeschrank (zur Anwärmung von Zellkulturmedien usw.)	Eigenanfertigung, Werkstatt des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie im UKE (Hamburg)
Wasserbad, Modell <i>C20 CS</i> , für die Kontraktionsexperimente	Lauda (Lauda-Königshofen)
Wasserbad, Modell <i>Certomat[®] WR</i> , für die Isolierung von NMCM	B. Braun (Melsungen)
Western Blot-System, Modell <i>Mini-PROTEAN 3</i>	Bio-Rad Laboratories (München)
Zellkulturschalen, Cell ⁺ Qualität (Ø 3,5 cm, 6 cm, 10 cm, 15 cm)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellkulturflaschen, Cell ⁺ Qualität (T-25, T-75, und T-175)	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellschaber	Sarstedt (Nümbrecht)
Zellsieb, 60 mesh (250 µm)	Sigma (Steinheim)
Zentrifuge, Modell <i>5810 R</i>	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge, Modell <i>Centrifuge 5415 C</i>	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge, Modell <i>EBA 12 R</i>	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge, Modell <i>J2-21</i> mit Schwenkbecherrotor <i>JA-25.50</i>	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge, Modell <i>J-6B</i> mit Schwenkbecherrotor <i>JS-5.2</i>	Beckman Coulter (Krefeld)
Zentrifuge, Modell <i>Rotina 35 R</i>	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifuge, Modell <i>Universal 30 RT</i>	Hettich (Tuttlingen)
Zentrifugenbecher <i>wide-mouth</i> (250 ml)	Nalgene [®] Labware Nunc (Rochester, NY, USA)
Zentrifugenröhrchen 15 und 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)
Zentrifugenröhrchen 250 ml	Becton, Dickinson and Company (Franklin Lakes, NJ USA)

8.5 Software

<i>ABI Primer Express</i> [®]	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
<i>ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System</i> Software Version 2.1.1	Applied Biosystems (Foster City, CA, USA)
<i>Adobe Photoshop CS</i>	Adobe Systems (München)
<i>BLAST</i>	Frei verfügbare Datenbank auf der Internetseite: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ des <i>National Center for Biotechnology Information</i> = NCBI (Bethesda, MD, USA)
BMON	Ingenieurbüro G. Jäckel (Hanau)
Datenbank auf der Internetseite des <i>Whitehead Instituts</i>	Frei verfügbare Datenbank auf der Internetseite: http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/ des <i>Whitehead Institute for Biomedical Research</i> (Cambridge, MA, USA)
<i>GeneTools</i>	Syngene (Cambridge, Vereinigtes Königreich)
<i>LSM 5 Image Browser</i>	Carl Zeiss (Jena)
Microsoft [®] Excel [®] 2007	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft [®] Windows XP und Windows Vista [™]	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft [®] Word 2007	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Netscape Navigator 7.1	AOL (Dulles, VA, USA)
Primer3	Frei verfügbare Software auf der Internetseite: https://sourceforge.net/ (Fremont, CA, USA)
Prism4	GraphPad Software Inc. (San Diego, CA, USA)
<i>StatView</i> -Software	SAS (Cary, NC, USA)

8.6 Ergebnistabellen

Zu Abbildung 22:

	Abb. 22 links						Abb. 22 rechts					
	Ktr			Prazosin			Ktr			Prazosin		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	5	0,00	0,00	6	0,00	0,00	5	0,00	0,00	6
IV	-0,01	0,05	5	-0,06	0,03	6	-0,71	2,89	5	-4,64	2,01	6
PE 0,3 µM	0,10	0,07	5	-0,05	0,04	6	5,61	3,60	5	-2,99	2,60	6
PE 1 µM	0,19	0,18	5	-0,12	0,02	6	10,62	8,53	5	-8,10	1,97	6
PE 3 µM	0,37	0,22	5	-0,13	0,03	6	21,21	9,84	5	-9,01	2,37	6
PE 10 µM	0,61	0,24	5	-0,17	0,03	6	35,38	10,64	5	-11,35	2,70	6
PE 30 µM	0,59	0,23	5	-0,19	0,04	6	34,75	10,33	5	-12,49	2,53	6
PE 100 µM	0,50	0,25	5	-0,21	0,07	6	27,58	11,22	5	-11,96	3,60	6

Zu Abbildung 23:

Abb. 23A					
Ktr			Prazosin		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
153,88	19,45	5	182,12	36,86	6

Abb. 23B					
Ktr			Prazosin		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
101,13	12,01	5	225,18	47,86	6

Zu Abbildung 25:

	Abb. 25A			
	Ktr		Wort	
	MW (%)	n	MW (%)	n
Basal	0,00	13	0,00	18
Nadolol	0,00	13	0,00	18
IV	0,00	13	11,11	18
PE 0,3 µM	0,00	13	27,78	18
PE 1 µM	0,00	13	55,56	18
PE 3 µM	0,00	13	77,78	18
PE 10 µM	0,00	13	83,33	18
PE 30 µM	0,00	13	83,33	18
PE 100 µM	0,00	13	83,33	18

Zu Abbildung 26:

Abb. 26A					
Ktr			Wort		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
0,17	3,24	8	-1,14	3,65	8

Abb. 26B					
Ktr			Wort		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
59,47	8,96	8	16,99	4,81	8

Zu Abbildung 28:

	Abb. 28 links						Abb. 28 rechts					
	Ktr			Wort			Ktr			Wort		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	12	0,00	0,00	10	0,00	0,00	12	0,00	0,00	10
IV	-0,12	0,02	12	-0,19	0,04	10	-9,97	1,58	12	-14,71	2,66	10
PE 0,3 µM	0,09	0,05	12	-0,07	0,06	10	7,01	3,69	12	-6,92	5,11	10
PE 1 µM	0,44	0,13	12	-0,01	0,09	10	36,03	9,78	12	-2,04	7,14	10
PE 3 µM	0,85	0,20	12	0,01	0,11	10	70,43	15,27	12	1,64	9,20	10
PE 10 µM	1,49	0,30	12	0,14	0,09	10	122,94	23,34	12	12,74	8,37	10
PE 30 µM	1,72	0,33	12	0,38	0,16	10	141,84	25,16	12	33,52	15,74	10
PE 100 µM	1,70	0,31	12	0,68	0,34	10	141,16	24,72	12	51,85	23,89	10

Zu Abbildung 29:

Abb. 29					
Ktr Minimum			Wort Minimum		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
-27,31	2,27	12	-26,53	6,12	10

Abb. 29					
Ktr Maximum			Wort Maximum		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
57,27	5,54	12	43,53	16,09	10

Abb. 29					
Ktr Differenz			Wort Differenz		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
84,58	5,89	12	70,05	11,80	10

Zu Abbildung 30:

Abb. 30A					
Ktr			Wort		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
395,06	43,38	12	192,25	23,45	10

Abb. 30B					
Ktr			Wort		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
34,75	5,74	12	56,32	12,90	10

Zu Abbildung 31:

	Abb. 31 links						Abb. 31 rechts					
	Ktr			Wort			Ktr			Wort		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	6	0,00	0,00	9	0,00	0,00	6	0,00	0,00	9
IV	-0,03	0,06	6	0,39	0,15	9	0,97	5,74	6	29,71	11,80	9
ISO 0,01 µM	0,26	0,23	6	1,08	0,34	9	19,25	13,64	6	82,44	27,68	9
ISO 0,1 µM	0,65	0,32	6	1,66	0,27	9	48,91	19,52	6	129,94	23,50	9
ISO 1 µM	3,64	0,59	6	2,01	0,28	9	269,41	37,39	6	156,65	22,19	9
ISO 10 µM	4,60	0,58	6	0,96	0,33	9	347,30	41,42	6	88,76	32,05	9

Zu Abbildung 32:

	Abb. 32 links						Abb. 32 rechts					
	Ktr			ML-7			Ktr			ML-7		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	9	0,00	0,00	7	0,00	0,00	9	0,00	0,00	7
IV	-0,21	0,04	9	-0,40	0,07	7	-18,43	3,32	9	-30,35	3,79	7
PE 0,3 µM	-0,10	0,05	9	-0,40	0,07	7	-9,71	4,05	9	-29,79	4,05	7
PE 1 µM	0,03	0,08	9	-0,36	0,07	7	1,92	5,65	9	-27,26	4,06	7
PE 3 µM	0,29	0,11	9	-0,26	0,07	7	25,44	9,03	9	-19,36	5,35	7
PE 10 µM	0,76	0,23	9	-0,14	0,08	7	64,51	15,07	9	-8,98	6,50	7
PE 30 µM	1,01	0,19	9	0,06	0,11	7	92,58	19,76	9	7,21	9,30	7
PE 100 µM	1,25	0,21	9	0,30	0,14	7	114,89	22,40	9	26,92	12,66	7

Zu Abbildung 33:

Abb. 33A					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
385,57	94,78	9	298,46	63,73	7

Abb. 33A					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
115,26	23,01	9	215,07	41,67	7

Zu Abbildung 34:

	Abb. 34 links						Abb. 34 rechts					
	Ktr			ML-7			Ktr			ML-7		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	8	0,00	0,00	7	0,00	0,00	8	0,00	0,00	7
IV	-0,22	0,08	8	-0,21	0,10	7	-12,33	4,01	8	-12,35	5,68	7
PE 0,3 µM	-0,16	0,07	8	-0,19	0,09	7	-8,43	3,93	8	-10,65	5,67	7
PE 1 µM	-0,08	0,07	8	-0,18	0,09	7	-2,77	4,80	8	-10,33	5,94	7
PE 3 µM	0,13	0,08	8	-0,15	0,08	7	9,96	6,33	8	-9,11	5,09	7
PE 10 µM	0,45	0,12	8	-0,07	0,10	7	31,60	8,98	8	-3,78	6,50	7
PE 30 µM	0,75	0,15	8	0,11	0,13	7	51,41	10,98	8	8,70	8,34	7
PE 100 µM	0,94	0,16	8	0,29	0,18	7	63,79	11,59	8	20,47	11,27	7

Zu Abbildung 35:

Abb. 35					
Ktr Minimum			ML-7 Minimum		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
-27,67	3,63	8	0,77	0,79	7

Abb. 35					
Ktr Maximum			ML-7 Maximum		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
56,62	13,54	8	92,20	14,06	7

Abb. 35					
Ktr Differenz			ML-7 Differenz		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
84,29	12,46	8	91,43	14,65	7

Zu Abbildung 36:

Abb. 36A					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
189,38	25,98	4	255,73	78,17	3

Abb. 36B					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
59,43	28,06	4	46,43	8,33	3

Zu Abbildung 37:

	Abb. 37 links						Abb. 37 rechts					
	Ktr			ML-7			Ktr			ML-7		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	11	0,00	0,00	12	0,00	0,00	11	0,00	0,00	12
IV	-0,26	0,03	11	-0,23	0,04	12	-17,65	1,99	11	-15,90	2,54	12
ET-1 0,3 µM	-0,26	0,05	11	-0,17	0,05	12	-17,64	2,97	11	-11,52	3,36	12
ET-1 1 µM	-0,25	0,07	11	-0,16	0,06	12	-16,23	4,40	11	-10,34	3,78	12
ET-1 3 µM	-0,22	0,10	11	-0,13	0,06	12	-13,82	6,80	11	-8,57	4,04	12
ET-1 10 µM	0,21	0,24	11	0,50	0,20	12	18,29	18,46	11	39,50	17,02	12
ET-1 30 µM	0,85	0,31	11	0,98	0,21	12	67,98	27,06	11	74,38	18,09	12
ET-1 100 µM	2,35	0,20	11	2,04	0,21	12	170,37	21,12	11	151,18	20,56	12

Zu Abbildung 38:

Abb. 38					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
5,99	2,09	11	6,02	2,80	12

Zu Abbildung 39:

Abb. 39A					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
290,71	41,46	11	291,44	34,87	12

Abb. 39B					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
34,02	2,60	11	48,01	6,90	12

Zu Abbildung 40:

	Abb. 40 links						Abb. 40 rechts					
	Ktr			ML-7			Ktr			ML-7		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	7	0,00	0,00	7	0,00	0,00	7	0,00	0,00	7
IV	-0,20	0,06	7	-0,33	0,08	7	-14,04	3,45	7	-21,40	3,86	7
ISO 0,01 µM	-0,20	0,06	7	-0,32	0,08	7	-14,03	3,13	7	-20,90	4,35	7
ISO 0,03 µM	-0,15	0,08	7	-0,27	0,08	7	-8,34	5,71	7	-17,76	4,85	7
ISO 0,1 µM	0,08	0,17	7	0,13	0,06	7	12,32	16,00	7	8,89	4,33	7
ISO 0,3 µM	0,74	0,39	7	1,01	0,09	7	69,89	41,57	7	69,78	7,05	7
ISO 1 µM	2,00	0,57	7	2,50	0,30	7	168,78	66,00	7	178,12	28,52	7
ISO 3 µM	2,97	0,52	7	3,28	0,32	7	252,44	72,98	7	238,17	39,04	7
ISO 10 µM	3,38	0,48	7	3,49	0,32	7	290,71	79,70	7	254,22	42,46	7

Zu Abbildung 41:

Abb. 41A					
Ktr			ML-9		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
-15,78	2,86	12	-39,70	2,54	14

Abb. 41B					
Ktr			ML-9		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
84,24	12,28	12	14,09	7,13	14

Abb. 41C					
Ktr			ML-9		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
526,50	56,79	12	319,70	49,00	14

Zu Abbildung 42:

	Abb. 42 links						Abb. 42 rechts					
	Ktr			2-APB			Ktr			2-APB		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	9	0,00	0,00	9	0,00	0,00	9	0,00	0,00	9
IV	-0,22	0,05	9	-0,35	0,05	9	-15,14	4,36	9	-22,50	3,15	9
PE 0,3 µM	-0,25	0,04	9	-0,35	0,06	9	-16,09	3,96	9	-21,94	3,56	9
PE 1 µM	-0,19	0,05	9	-0,29	0,09	9	-13,01	4,45	9	-17,21	4,95	9
PE 3 µM	-0,09	0,06	9	-0,14	0,12	9	-6,02	5,42	9	-6,12	7,75	9
PE 10 µM	0,09	0,09	9	0,02	0,15	9	5,28	7,21	9	4,80	11,74	9
PE 30 µM	0,33	0,14	9	0,29	0,20	9	19,90	10,94	9	22,51	16,40	9
PE 100 µM	0,40	0,18	9	0,42	0,23	9	24,68	13,53	9	31,79	19,33	9

Zu Abbildung 43:

Abb. 43A					
Ktr			2-APB		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
183,25	43,89	9	224,39	45,47	9

Abb. 43B					
Ktr			2-APB		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
132,33	27,83	9	153,71	23,05	9

Zu Abbildung 44:

	Abb. 44 links						Abb. 44 rechts					
	Ktr			2-APB			Ktr			2-APB		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	7	0,00	0,00	6	0,00	0,00	7	0,00	0,00	6
IV	-0,21	0,04	7	-0,63	0,04	6	-12,90	2,14	7	-39,78	2,19	6
PE 0,3 µM	-0,11	0,03	7	-0,70	0,05	6	-7,99	2,21	7	-33,90	2,75	6
PE 1 µM	0,04	0,06	7	-0,59	0,08	6	0,54	2,86	7	-29,03	4,07	6
PE 3 µM	0,26	0,11	7	-0,41	0,13	6	14,57	5,29	7	-20,66	7,04	6
PE 10 µM	0,64	0,18	7	-0,06	0,18	6	38,58	9,10	7	-3,81	8,62	6
PE 30 µM	1,00	0,22	7	0,26	0,19	6	61,05	13,75	7	11,99	8,84	6
PE 100 µM	1,18	0,25	7	0,50	0,18	6	72,47	18,74	7	24,20	7,94	6

Zu Abbildung 45:

Abb. 45A					
Ktr			2-APB		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
222,13	53,12	7	147,12	29,09	6

Abb. 45B					
Ktr			2-APB		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
83,70	12,80	7	101,45	25,14	6

Zu Abbildung 49:

	Abb. 49		
	MW (%)	SEM (%)	n
Harnblase	100,00	29,24	4
Vorhof	0,99	0,22	4
Herzkammer	0,31	0,04	4
Skelettmuskel	0,85	0,29	4

Zu Abbildung 50:

	Abb. 50		
	MW (%)	SEM (%)	n
Harnblase	100,00	31,25	4
NIH3T3	0,41	0,05	4
Linker Vorhof	1,76	0,17	4

Zu Abbildung 51:

	Abb. 51		
	MW (%)	SEM (%)	n
Harnblase	2,71	0,78	12
Vorhof	1,44	0,77	9
Herzkammer	0,35	0,26	9
Skelettmuskel	100,00	14,29	11

Zu Abbildung 52:

	Abb. 52					
	Harnblase			Linker Vorhof		
	MW (Rohdaten)	MW (%)	n	MW (Rohdaten)	MW (%)	n
smMLCK 220 kDa	592,99	30,69	4	5,75	18,82	4
smMLCK 130 kDa	1334,23	69,06	4	23,43	76,66	4
skMLCK	4,78	0,25	12	1,38	4,52	9

Zu Abbildung 67:

	Abb. 67					
	smMLCK 220 kDa			smMLCK 130 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Negativkontrolle	100,00	3,36	2	100,00	11,39	2
Ad-shRNA-NS	91,46	7,43	3	97,85	15,44	3
Ad-shRNA-smMLCK220	33,35	7,18	3	110,47	8,17	3

Zu Abbildung 68:

	Abb. 68					
	smMLCK 220 kDa			smMLCK 130 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Negativkontrolle	100,00	30,68	3	100,00	21,30	5
Ad-shRNA-NS	53,72	5,27	3	88,14	15,46	6
Ad-shRNA-smMLCK220	17,83	2,08	3	97,58	19,36	6

Zu Abbildung 71:

	Abb. 71					
	smMLCK 220 kDa			smMLCK 130 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Negativkontrolle	100,00	16,04	2	100,00	3,22	2
Ad-shRNA-NS	106,15	17,59	3	101,66	11,27	3
Ad-shRNA-smMLCK220	1,09	1,09	3	66,46	6,73	3

Zu Abbildung 73:

	Abb. 73					
	smMLCK 220 kDa			smMLCK 130 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Ad-shRNA-NS	100,00	21,70	2	100,00	4,00	2
Ad-shRNA-smMLCK220	31,43	3,29	2	115,91	5,80	2

Zu Abbildung 75:

	Abb. 75		
	MLC2a-P		
	MW (%)	SEM (%)	n
Negativkontrolle	100,00	17,48	2
Ad-shRNA-NS	93,67	19,42	3
Ad-shRNA-smMLCK220	80,69	13,53	3

Zu Abbildung 77:

	Abb. 77 links						Abb. 77 rechts					
	Ktr			ML-7			Ktr			ML-7		
	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (mN)	SEM (mN)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	8	0,00	0,00	8	0,00	0,00	8	0,00	0,00	8
IV	0,02	0,00	8	-0,02	0,01	8	11,91	3,93	8	-16,61	6,18	8
PE 0,003 µM	0,02	0,00	8	-0,02	0,01	8	13,47	3,50	8	-16,30	5,28	8
PE 0,01 µM	0,04	0,01	8	-0,03	0,01	8	30,87	4,49	8	-18,96	7,51	8
PE 0,03 µM	0,06	0,01	8	-0,03	0,01	8	48,36	9,11	8	-21,78	9,40	8
PE 0,1 µM	0,09	0,02	8	-0,04	0,01	8	63,68	10,18	8	-28,06	7,64	8
PE 0,3 µM	0,10	0,02	8	-0,03	0,01	8	67,75	11,06	8	-23,63	9,58	8
PE 1 µM	0,11	0,02	8	-0,03	0,01	8	76,02	12,58	8	-15,47	9,68	8
PE 3 µM	0,12	0,02	8	-0,01	0,02	8	80,90	11,42	8	-11,60	11,38	8
PE 10 µM	0,11	0,03	8	0,00	0,03	8	77,67	11,49	8	-12,29	10,81	8
PE 30 µM	0,12	0,03	8	-0,02	0,03	8	82,14	13,65	8	-20,24	12,97	8

Zu Abbildung 78:

Abb. 78A					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
109,59	14,24	8	7,35	19,94	8

Abb. 78B					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
15,57	3,17	8	35,13	13,13	8

Zu Abbildung 80:

Abb. 80					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
100,00	17,34	4	83,13	8,37	4

Zu Abbildung 82:

Abb. 82					
Ktr			ML-7		
MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
100,00	5,14	4	65,96	11,57	4

Zu Abbildung 85:

	Abb. 85		
	MW (arbitrary units)	SEM (arbitrary units)	n
Ad-shRNA-NS-MOI77	2,41	0,22	2
Ad-shRNA-smMLCK220-MOI39	2,07	0,43	2
Ad-shRNA-NS-MOI39	3,03	0,91	2
Ad-shRNA-smMLCK220-MOI20	2,07	0,07	2

Zu Abbildung 90:

	Abb. 90		
	24 h		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle 24 h	100,02	0,02	3
E3 24 h	73,30	11,61	3
E5 24 h	66,03	21,63	3

	Abb. 90		
	48 h		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle 48 h	100,03	0,02	2
E3 48 h	14,99	4,89	2
E5 48 h	28,02	23,05	2

	Abb. 90		
	7 Tage		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle 7 Tage	100,00	12,27	2
E3 7 Tage	61,63	16,49	3
E5 7 Tage	34,29	9,52	3

Zu Abbildung 93:

	Abb. 93					
	smMLCK 220 kDa			smMLCK 130 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	n. b.	1	100,00	n. b.	1
Empty	71,50	n. b.	1	109,84	n. b.	1
Non-Target	76,42	3,58	2	92,69	3,77	2
E3	5,54	0,42	2	48,75	5,11	2
E5	0,61	0,61	2	33,83	2,48	2

Zu Abbildung 95:

	Abb. 95		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	n. b.	1
Empty	145,92	n. b.	1
Non-Target	111,44	3,66	2
E3	100,22	13,14	2
E5	97,29	7,76	2

Zu Abbildung 96:

	Abb. 96					
	Kontrolle			E3		
	MW (arbitrary units)	SEM (arbitrary units)	n	MW (arbitrary units)	SEM (arbitrary units)	n
Vorwärtsprimer-1	0,63	0,02	2	0,17	0,02	2
Vorwärtsprimer-2	0,68	0,09	2	0,20	0,01	2
Vorwärtsprimer-3	0,70	0,07	2	0,19	0,02	2

Zu Abbildung 97:

	Abb. 97		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	5,32	7
3,0	29,02	n. b.	1
1,5	41,27	n. b.	1
1,05	69,62	n. b.	1
0,3	90,48	n. b.	1
0,15	142,65	n. b.	1
0,03	128,20	3,80	2

Zu Abbildung 98:

	Abb. 98A		
	smMLCK 130 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	15,46	11
Empty	119,58	21,35	9
Non-Target	109,87	20,63	9
E3	50,85	13,07	12
E5	49,12	9,04	10

	Abb. 98B		
	smMLCK 220 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	22,62	9
Empty	78,02	23,61	6
Non-Target	64,03	17,72	7
E3	18,05	5,03	9
E5	19,50	7,19	8

	Abb. 98C		
	MLC2a		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	17,06	11
Empty	90,62	19,64	9
Non-Target	78,50	14,85	11
E3	66,03	16,51	12
E5	63,78	15,67	11

	Abb. 98D		
	MLC2v		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	17,04	11
Empty	106,66	18,87	9
Non-Target	97,80	17,43	11
E3	108,96	23,09	12
E5	76,83	21,97	11

Zu Abbildung 100:

	Abb. 100											
	Kontrolle			Empty			Non-Target			E3		
	MW (µN)	SEM (µN)	n	MW (µN)	SEM (µN)	n	MW (µN)	SEM (µN)	n	MW (µN)	SEM (µN)	n
Basal	0,00	0,00	11	0,00	0,00	11	0,00	0,00	9	0,00	0,00	10
PE 0,001 µM	-4,55	2,07	11	0,00	1,35	11	1,11	2,00	9	1,00	1,00	10
PE 0,01 µM	3,64	3,38	11	4,55	2,07	11	6,67	1,67	9	1,00	1,00	10
PE 0,1µM	25,45	4,93	11	22,73	3,04	11	22,22	2,22	9	6,00	2,21	10
PE 1 µM	45,45	5,93	11	35,45	3,90	11	32,22	2,22	9	11,00	2,77	10
PE 10 µM	45,45	6,79	11	40,91	3,92	11	34,44	1,76	9	11,00	2,77	10

	Abb. 100		
	E3†		
	MW (µN)	SEM (µN)	n
Basal	0,00	0,00	18
PE 0,001 µM	0,00	0,00	18
PE 0,01 µM	0,00	0,00	18
PE 0,1µM	0,00	0,00	18
PE 1 µM	0,00	0,00	18
PE 10 µM	0,00	0,00	18

Zu Abbildung 101:

	Abb. 101A		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	59,31	7,65	11
Empty	62,15	10,15	11
Non-Target	54,32	6,65	9
E3	45,48	11,58	10

	Abb. 101B		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	26,42	3,93	11
Empty	16,41	2,36	11
Non-Target	19,85	4,47	9
E3	8,00	7,08	10

Zu Abbildung 102:

	Abb. 102											
	Kontrolle			Empty			Non-Target			E3		
	MW (μ N)	SEM (μ N)	n	MW (μ N)	SEM (μ N)	n	MW (μ N)	SEM (μ N)	n	MW (μ N)	SEM (μ N)	n
Basal	0,00	0,00	16	0,00	0,00	16	0,00	0,00	11	0,00	0,00	9
Calcium 0,5 mM	28,75	5,54	16	18,75	5,62	16	16,36	3,88	11	18,89	3,09	9
Calcium 1,0 mM	43,75	7,63	16	28,13	7,26	16	26,36	4,32	11	24,44	4,12	9
Calcium 1,5 mM	46,88	7,57	16	30,63	8,14	16	25,45	4,74	11	31,11	3,51	9
Calcium 2,0 mM	45,63	7,19	16	33,13	9,07	16	25,45	6,08	11	33,33	3,73	9
Calcium 2,5 mM	41,25	7,85	16	33,75	8,89	16	29,09	6,94	11	36,67	6,24	9
Calcium 3,0 mM	43,75	7,63	16	33,13	8,74	16	30,91	8,99	11	35,56	3,77	9
Calcium 3,5 mM	44,38	8,16	16	30,63	9,01	16	24,55	7,18	11	38,89	4,55	9
Calcium 4,0 mM	45,00	8,27	16	31,25	9,30	16	23,64	6,64	11	35,56	3,77	9

Zu Abbildung 104:

	Abb. 104		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	4,67	12
Empty	85,94	11,84	7
Non-Target	73,34	14,34	9
E3	43,90	9,64	10

Zu Abbildung 106:

	Abb. 106		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,01	8,56	6
Empty	83,99	12,26	7
Non-Target	56,58	11,19	6
E3	27,73	8,10	9

Zu Abbildung 108:

	Abb. 108		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	112,48	24,36	7
Empty	86,12	14,47	10
Non-Target	54,27	11,36	7
E3	8,47	3,10	10

Zu Abbildung 111:

	Abb. 111		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	17,40	6
Empty	102,42	17,71	6
Non-Target	71,88	14,83	6
E3	82,54	19,41	6

Zu Abbildung 113:

	Abb. 113		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	12,82	4
Empty	110,55	30,01	4
Non-Target	81,58	14,59	4
E3	106,78	10,01	4

Zu Abbildung 115:

	Abb. 115		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	11,83	7
Empty	112,42	16,85	9
Non-Target	89,69	25,39	7
E3	80,60	23,17	9

Zu Abbildung 116:

	Abb. 116A		
	smMLCK 130 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	12,31	7
Empty	102,58	23,81	7
Non-Target	118,32	29,26	7
E3	57,50	14,98	6

	Abb. 116B		
	smMLCK 220 kDa		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	19,18	7
Empty	101,18	30,48	7
Non-Target	118,28	27,75	7
E3	143,74	38,07	5

	Abb. 116C		
	MLC2a		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	16,04	7
Empty	85,76	12,01	7
Non-Target	107,98	12,65	7
E3	37,47	5,72	6

	Abb. 116D		
	MLC2v		
	MW (%)	SEM (%)	n
Kontrolle	100,00	14,57	7
Empty	134,66	24,18	7
Non-Target	93,27	9,40	7
E3	72,70	4,79	6

Zu Abbildung 118:

	Abb. 118		
	MW (μm)	SEM (μm)	n
Non-Target	1,91	0,12	13
E3	2,20	0,14	10

Zu Abbildung 120:

	Abb. 120											
	Kontrolle: DMSO			Kontrolle: ML-7			E5: DMSO			E5: ML-7		
	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	5	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4	0,00	0,00	5
IV	-9,51	1,44	5	14,62	4,87	4	-8,44	4,56	4	11,98	3,79	5
PE 100 μ M	-0,60	2,68	5	28,54	3,95	4	-7,90	4,86	4	11,93	4,09	5
K-Tyr	68,71	8,61	5	70,14	5,02	4	26,69	9,72	4	28,78	10,39	5

Zu Abbildung 122:

	Abb. 122											
	Kontrolle: Wasser			Kontrolle: Y-27632			E5: Wasser			E5: Y-27632		
	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n	MW (%)	SEM (%)	n
Basal	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4	0,00	0,00	4	0,00	0,00	3
IV	-2,81	2,84	4	-51,75	6,35	4	-1,96	1,73	4	-48,63	1,89	3
PE 100 μ M	12,16	2,53	4	-55,02	6,66	4	-3,52	3,21	4	-52,05	0,56	3
K-Tyr	91,43	4,97	4	7,76	14,21	4	27,39	10,01	4	-17,20	5,58	3

8.7 Vektoren

pALsh 3185 bp:

*Ava*I: 2899, 3165
*Bgl*II: schneidet nicht
*Bse*RI: 3142, 3148C
*Sal*I: schneidet nicht
H1 Promotor: 2917-3131
AmpR

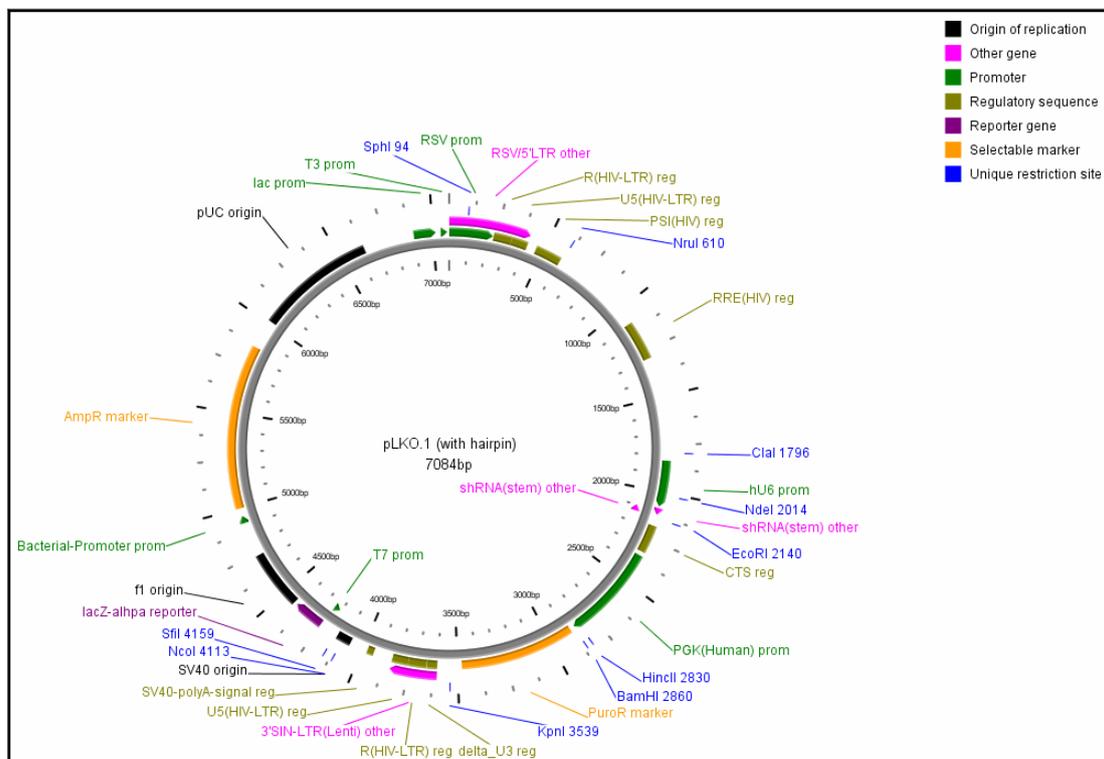


Abbildung 123: Vektorkarte des pLKO.1 Plasmids

(nach <http://www.openbiosystems.com/RNAi/shRNALibraries>)

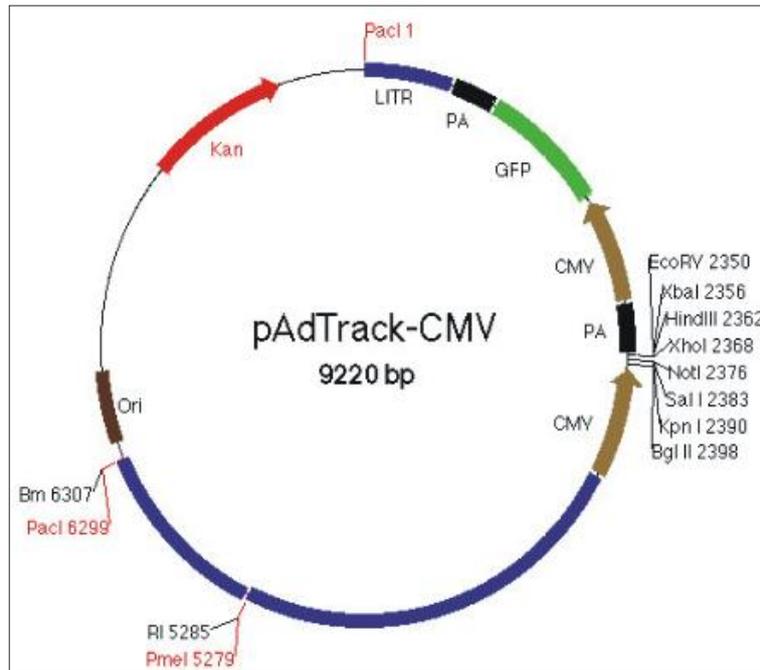


Abbildung 124: Vektorkarte des pAdTrack-CMV Plasmids

(nach <http://www.coloncancer.org/adeasy.htm>), KanR

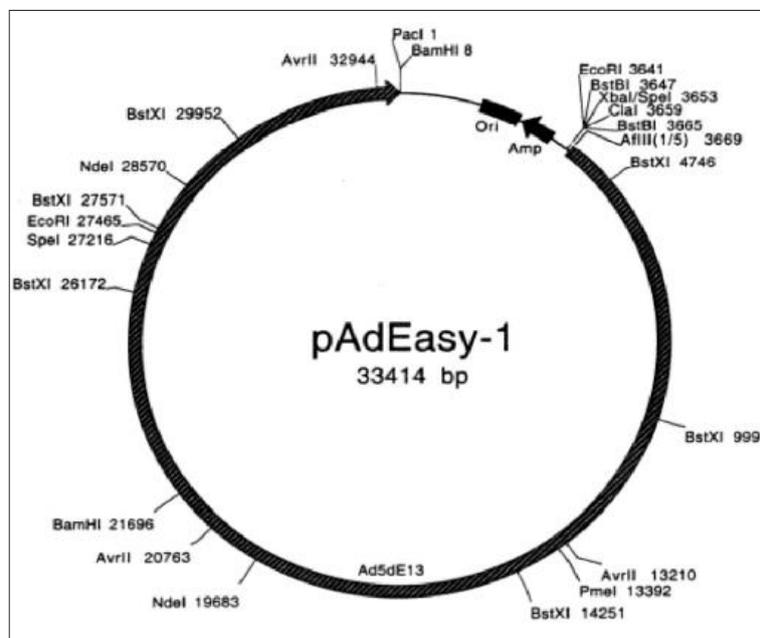


Abbildung 125: Vektorkarte des pAdEasy-1 Plasmids

(nach <http://www.coloncancer.org/adeasy.htm>), AmpR

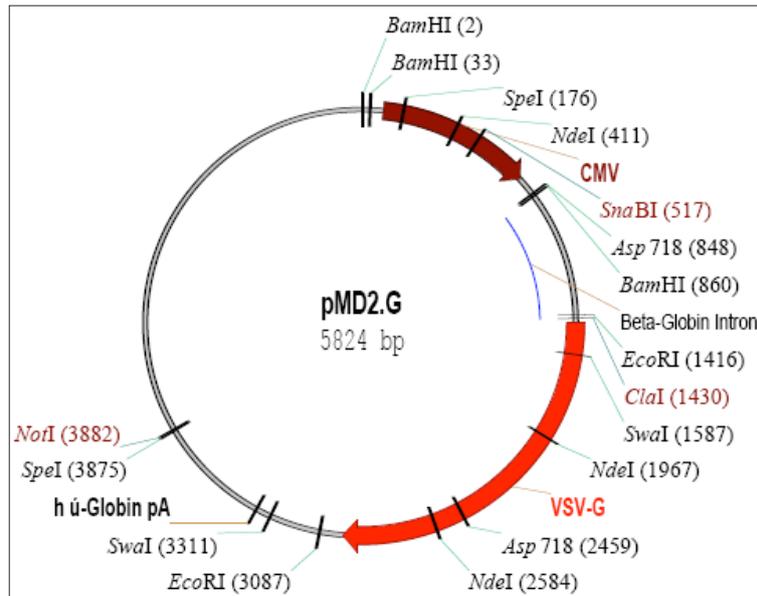


Abbildung 126: Vektorkarte des lentiviralen Helferplasmids pMD2.G

(nach <http://tronolab.epfl.ch>)

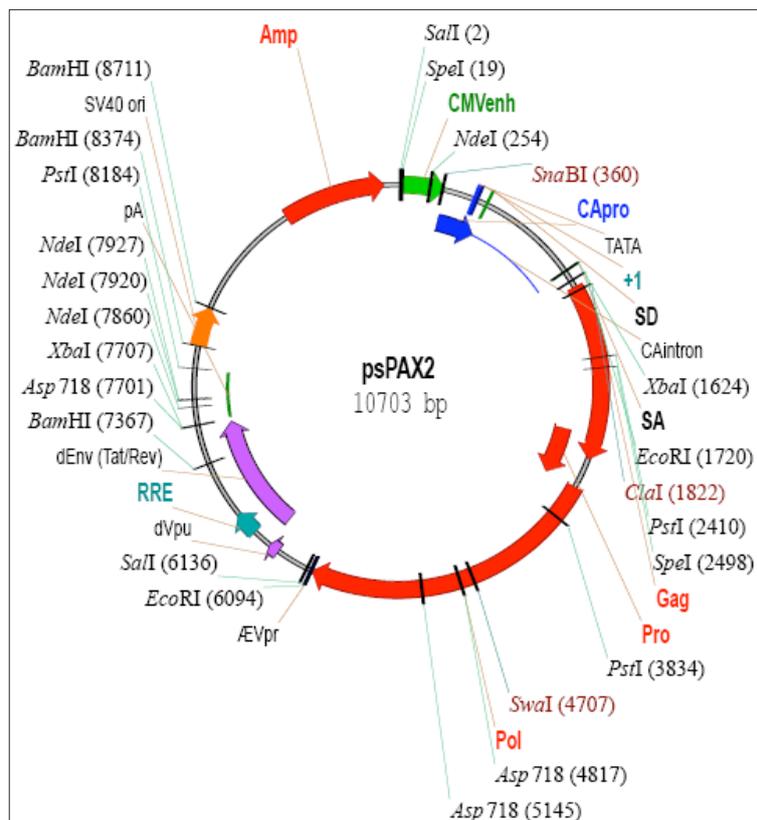


Abbildung 127: Vektorkarte des lentiviralen Helferplasmids psPAX2

(nach <http://tronolab.epfl.ch>)

8.8 Molekulargewichtsmarker

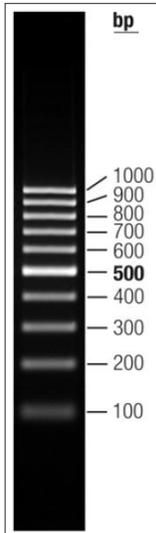


Abbildung 128: 100bp DNA Ladder *GeneRuler*TM

Geändert nach: <http://www.fermentas.com>. Der Marker ist gepuffert in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) und 1 mM EDTA. Dieser Marker wurde für die DNA-Agarosegelelektrophorese verwendet.

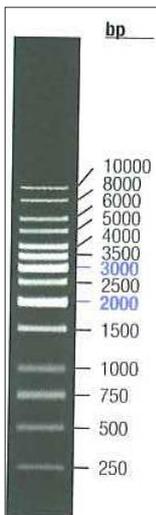


Abbildung 129: 1kb DNA Ladder *GeneRuler*TM

Geändert nach: <http://www.fermentas.com>, Version von Juni 2002. Der Marker ist gepuffert in 10 mM Tris-HCl (pH 7,6) und 1 mM EDTA. Dieser Marker wurde für die DNA-Agarosegelelektrophorese verwendet.

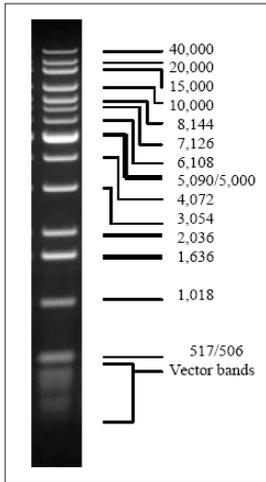


Abbildung 130: 1 Kb DNA Extension Ladder
 Geändert nach: <http://www.invitrogen.com>. Der Marker ist gepuffert in 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM NaCl und 0,1 mM EDTA. Dieser Marker wurde für die DNA-Agarosegelelektrophorese verwendet.

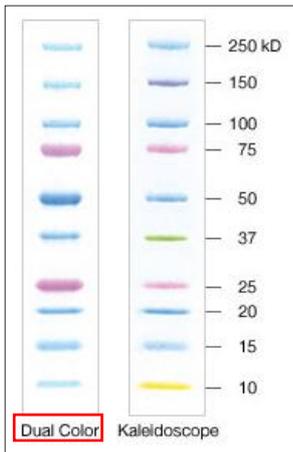


Abbildung 131: Precision Plus Protein Dual Color Molekulargewichtsmarker
 Geändert nach: <http://www.bio-rad.com>. Dieser Marker (rotfarbig umrandet) wurde für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet

8.9 Weitere Abbildungen

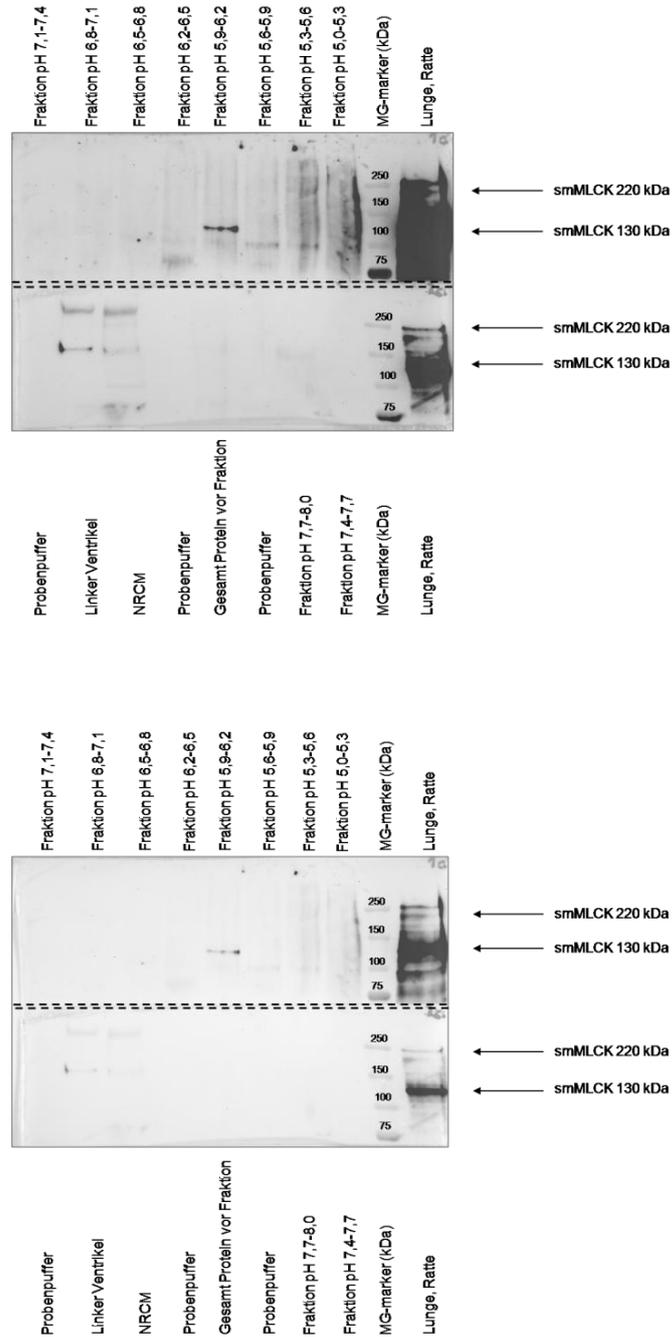


Abbildung 132: Western Blot von Rotorfraktionen aus Standard-EHTs, inkubiert mit Anti-smMLCK

Es sind zweimal die gleichen Membranen mit unterschiedlich langer Belichtungsdauer gezeigt. Lungengewebe der Ratte diente als Positivkontrolle.

Die smMLCK 130 kDa ließ sich neben der linken Herzkammer und den NRCM als zusätzliche Positivkontrollen (auch jeweils als Rotorfraktion) in der Fraktion 4 mit dem pH-

Wert-Bereich von 5,9-6,2 finden. Die smMLCK 220 kDa konnte auf diesem Wege nur in den Positivkontrollen detektiert werden. Da jedoch eine Übernachtbelichtung dieser Membranen Anlass zur Vermutung eines Vorhandenseins der smMLCK 220 kDa in Fraktion 7 (pH-Bereich 6,8-7,1) gab, wurde eine neue Membran u. a. mit maximaler Beladung der Fraktion 7 angefertigt und mittels Fotofilm nach Übernachtbelichtung detektiert (s. Abb. 133).

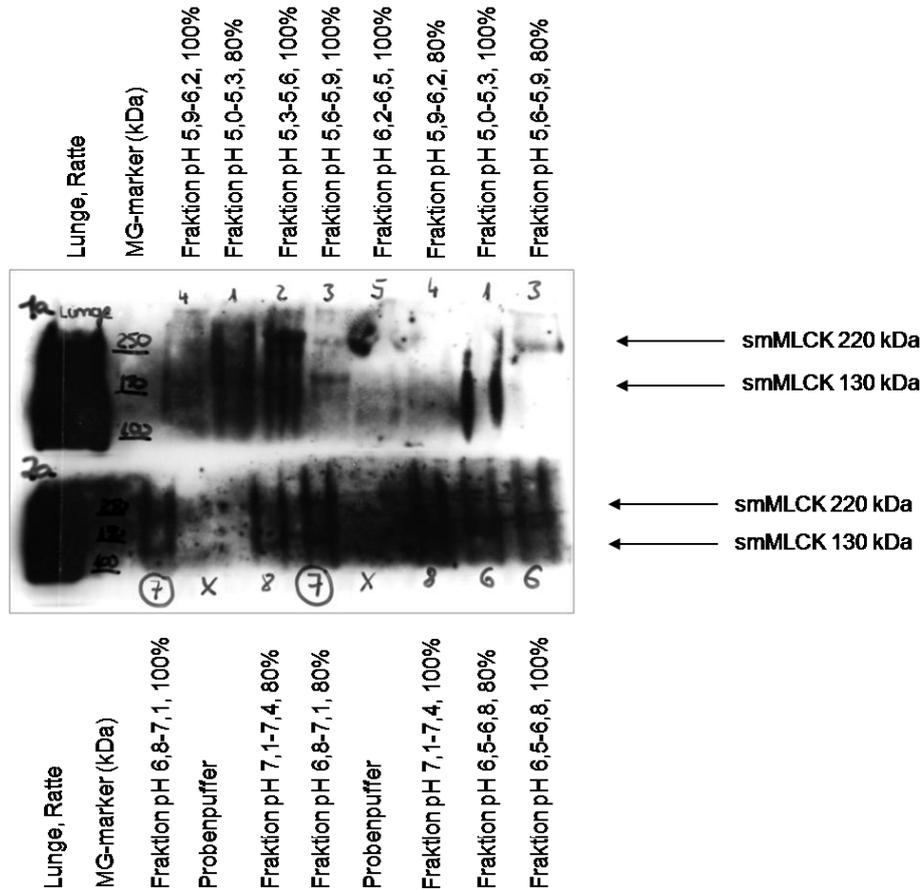


Abbildung 133: Fotofilm eines Western Blots von Rotoforfraktionen aus Standard-EHTs, inkubiert mit Anti-smMLCK

8.10 Abbildungsverzeichnis

8.10.1 Liste der in der Arbeit dargestellten Abbildungen

Abbildung 1: Arbeitszyklus beim Filamentgleiten in quer gestreifter Muskulatur	1
Abbildung 2: Schematische Darstellung der kontraktile und regulatorische Proteine der dicken und dünnen Filamente eines kardialen Sarkomers	7
Abbildung 3: Struktur des MYLK1-Gens der Maus	8
Abbildung 4: Mechanismus der RNA-Interferenz	14
Abbildung 5: HIV und seine Gene	17
Abbildung 6: Replikationszyklus des HIV	18
Abbildung 7: Im Rahmen einer Promotionsarbeit in unserer Arbeitsgruppe von Haas (2004) postulierte α_1 -adrenerge Signaltransduktionswege im menschlichen Vorhof ...	19
Abbildung 8: Darstellung eines Organbades mit einem linken Vorhof der Maus	22
Abbildung 9: Schematische Darstellung der Herstellung eines rekombinanten Adenovirus mithilfe des AdEasy-Systems	26
Abbildung 10: Klonierung von Zielsequenzen in den pALsh Vektor	38
Abbildung 11: Schematische Darstellung der generierten rekombinanten Adenoviren	41
Abbildung 12: Ultrazentrifugationsröhrchen nach 24 h Zentrifugation mit sichtbarer Virusbande (untere)	46
Abbildung 13: pLKO.1 Vektor	47
Abbildung 14: pHR CEW Vektor	51
Abbildung 15: Schematischer Ablauf der lentiviralen Virusproduktion	53
Abbildung 16: Schemazeichnung und Zusammensetzung einer Gussform	65
Abbildung 17: Schematische Darstellung des Ausgießens von EHTs (links) und Fotografie einer Gussform mit EHTs am 6. Kulturtag (rechts)	66
Abbildung 18: EHT auf einem Abstandhalter in einer mit Medium gefüllten Kulturschale	67
Abbildung 19: Darstellung eines Organbades mit einem EHT	69
Abbildung 20: Prinzip der <i>TaqMan</i> [®] -PCR	87
Abbildung 21: Fluoreszenzkurven der Verdünnungsreihe eines exemplarischen quantitativen RT-PCR Laufs	88
Abbildung 22: Effekt von Phenylephrin unter α_1 -Adrenozeptorblockade mit Prazosin	94
Abbildung 23: Effekt von Isoprenalin unter α_1 -Adrenozeptorblockade mit Prazosin nach PE-KWK	95
Abbildung 24: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes von linken Vorhöfen der Maus unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin und Stimulation mit Phenylephrin sowie Isoprenalin	96
Abbildung 25: Kumulative Entwicklung von Arrhythmien unter Wortmannin-Behandlung	97
Abbildung 26: Effekt von Wortmannin und einer Bolusgabe Phenylephrin	98

Abbildung 27: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes von linken Vorhöfen der Maus unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin und Stimulation mit Phenylephrin, Endothelin-1 sowie Isoprenalin.....	99
Abbildung 28: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin	100
Abbildung 29: Effekt von Endothelin-1 unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin nach PE-KWK	101
Abbildung 30: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin nach PE-KWK und ET-1-Gabe.....	101
Abbildung 31: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit Wortmannin.....	102
Abbildung 32: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit ML-7	104
Abbildung 33: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach PE-KWK.....	105
Abbildung 34: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit ML-7	106
Abbildung 35: Effekt von Endothelin-1 unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach PE-KWK.....	107
Abbildung 36: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach PE-KWK und ET-1-Gabe.....	108
Abbildung 37: Effekt von Endothelin-1 unter MLCK-Inhibition mit ML-7	109
Abbildung 38: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach ET-1-KWK...	110
Abbildung 39: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7 nach ET-1-KWK und PE-Gabe.....	110
Abbildung 40: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7.....	111
Abbildung 41: Einfluss der MLCK-Inhibition durch ML-9 im linken Vorhof der Maus	112
Abbildung 42: Effekt von Phenylephrin unter IP ₃ -Rezeptorblockade mit 2-APB, 2 µM	113
Abbildung 43: Effekt von Isoprenalin unter IP ₃ -Rezeptorblockade mit 2-APB, 2 µM nach PE-KWK	114
Abbildung 44: Effekt von Phenylephrin unter IP ₃ -Rezeptorblockade mit 2-APB, 20 µM	115
Abbildung 45: Effekt von Isoprenalin unter IP ₃ -Rezeptorblockade mit 2-APB, 20 µM nach PE-KWK	116
Abbildung 46: RNA-Agarosegel von verschiedenen Maus- sowie NRCM-RNA-Proben.....	117
Abbildung 47: 3%iges Agarosegel mit RT-PCR Produkten der MLCK-Isoformen	118
Abbildung 48: 3%iges Agarosegel mit RT-PCR Produkten der MLC2-Isoformen.....	119
Abbildung 49: smMLCK 220 kDa-mRNA-Menge von verschiedenen Geweben der Maus..	120
Abbildung 50: smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge von verschiedenen Geweben der Maus und NIH3T3-Zellen	121
Abbildung 51: skMLCK-mRNA-Menge von verschiedenen Geweben der Maus	122
Abbildung 52: Anteile der verschiedenen MLCK-Isoformen an der Gesamt-MLCK-mRNA-Menge.....	123

Abbildung 53: Western Blot von Mausgewebeproben und NRCM, inkubiert mit Anti-smMLCK	124
Abbildung 54: Western Blot von Rattengewebeproben und NRCM, inkubiert mit Anti-smMLCK	125
Abbildung 55: Restriktionsanalyse der pALsh Vektoren auf 3%igen Agarosegelen	127
Abbildung 56: Restriktionsanalyse der pAdTrack-CMV Vektoren auf einem 2%igen Agarosegel	128
Abbildung 57: 0,8%ige Agarosegele mit geschnittener Plasmid-DNA von pAdEasy-1-shRNA-smMLCK220 bzw. pAdEasy-1-shRNA-NS nach der homologen Rekombination	129
Abbildung 58: 0,8%ige Agarosegele mit geschnittener Plasmid-DNA von pAdEasy-1-shRNA-smMLCK220 bzw. pAdEasy-1-shRNA-NS nach der Retransformation in <i>E. coli</i> DH10B	130
Abbildung 59: Restriktionsanalyse mit <i>Xba</i> I und <i>Kpn</i> I der pAdEasy-1 Vektoren auf einem 1%igen Agarosegel.....	131
Abbildung 60: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für Ad-shRNA-NS.....	132
Abbildung 61: Ausschnitt aus Abbildung 60 vergrößert dargestellt	132
Abbildung 62: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für Ad-shRNA-smMLCK220	133
Abbildung 63: Transfektion von QBI-HEK 293A-Zellen.....	133
Abbildung 64: Titration von Ad-shRNA-smMLCK220 und Ad-shRNA-NS in NRCM.....	134
Abbildung 65: Adenovirale Infektion von NMCM.....	135
Abbildung 66: Western Blot von adenoviral-infizierten NMCM, inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-Calsequestrin	136
Abbildung 67: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 66 gezeigten Western Blot Membranen von adenoviral-infizierten NMCM.....	137
Abbildung 68: smMLCK-mRNA-Menge von adeno-viral-infizierten NMCM.....	138
Abbildung 69: Adenovirale Infektion von NRCM	140
Abbildung 70: Western Blot von adenoviral-infizierten NRCM (MOI 20), inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ.....	141
Abbildung 71: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 70 gezeigten Western Blot Membranen.....	142
Abbildung 72: Western Blot von adenoviral-infizierten NRCM (MOI 2,5), inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ.....	143
Abbildung 73: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 72 gezeigten Western Blot Membranen.....	144
Abbildung 74: Western Blot von adenoviral-infizierten NRCM (MOI 5), inkubiert mit Anti-MLC2a-P und Anti-CSQ	145

Abbildung 75: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 74 gezeigten Western Blot Membran.....	145
Abbildung 76: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes eines EHTs.....	147
Abbildung 77: Effekt von Phenylephrin unter MLCK-Inhibition mit ML-7	148
Abbildung 78: Effekt von Isoprenalin unter MLCK-Inhibition mit ML-7.....	149
Abbildung 79: Western Blot von ML-7-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-MLC2v und Anti-CSQ	150
Abbildung 80: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 79 gezeigten Western Blot Membran.....	150
Abbildung 81: Western Blot von ML-7-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-MLC2a-P und Anti-CSQ	151
Abbildung 82: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 81 gezeigten Western Blot Membran.....	151
Abbildung 83: Adenovirale Infektion von EHTs	152
Abbildung 84: Western Blot von adenoviral-infizierten EHTs, inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ	153
Abbildung 85: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 84 gezeigten Western Blot Membran.....	154
Abbildung 86: Restriktionsverdau der pLKO.1 Vektoren auf 1%igen Agarosegelen.....	156
Abbildung 87: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für das Lentivirus Non-Target.....	157
Abbildung 88: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für das Lentivirus E3	157
Abbildung 89: Ausschnitt eines Sequenzierergebnisses für das Lentivirus E5	158
Abbildung 90: smMLCK 130 kDa-mRNA-Menge von lentiviral-infizierten NIH3T3-Zellen ...	159
Abbildung 91: Lentivirale Infektion von NRCM.....	161
Abbildung 92: Western Blot von lentiviral-behandelten NRCM, inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ	162
Abbildung 93: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 92 gezeigten Western Blot Membran.....	162
Abbildung 94: Western Blot von lentiviral-behandelten NRCM, inkubiert mit Anti-MLC2a-P und Anti-CSQ	163
Abbildung 95: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 94 gezeigten Western Blot Membran.....	163
Abbildung 96: smMLCK 130 kDa-mRNA-Daten aus lentiviral-infizierten NRCM zum Zwecke des Primer-Vergleiches	164
Abbildung 97: smMLCK 130 kDa-mRNA-Daten aus NRCM mit verschiedenen Titern an E3-Lentiviurs infiziert	165
Abbildung 98: mRNA-Daten verschiedener Gene aus lentiviral-infizierten NRCM	166

Abbildung 99: Mit eGFP-Lentivirus infiziertes EHT	168
Abbildung 100: Effekt von Phenylephrin in verschiedenen lentiviral-behandelten EHTs bzw. Kontroll-EHTs	169
Abbildung 101: Effekt von Isoprenalin in verschiedenen lentiviral-behandelten EHTs bzw. Kontroll-EHTs	170
Abbildung 102: Effekt von Calcium in verschiedenen lentiviral-behandelten EHTs bzw. Kontroll-EHTs	171
Abbildung 103: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-smMLCK und Anti-CSQ.....	172
Abbildung 104: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 103 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran	172
Abbildung 105: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-MLC2v und Anti-CSQ.....	173
Abbildung 106: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 105 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran	173
Abbildung 107: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-MLC2a-P und Anti-CSQ.....	174
Abbildung 108: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 107 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran	174
Abbildung 109: Coomassiegefärbte Gele nach Transfer auf Nitrocellulose Membran.....	175
Abbildung 110: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti- α -Aktinin und Anti-CSQ.....	176
Abbildung 111: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 110 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran	176
Abbildung 112: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti- β -Aktin und Anti-CSQ.....	177
Abbildung 113: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 112 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran	177
Abbildung 114: Western Blot von lentiviral-behandelten EHTs, inkubiert mit Anti-cMyBP-C und Anti-CSQ.....	178
Abbildung 115: Densitometrische Auswertung der Proteinmengen der in Abbildung 114 exemplarisch gezeigten Western Blot Membran	178
Abbildung 116: mRNA-Daten verschiedener Gene aus lentiviral-infizierten EHTs.....	179
Abbildung 117: Immunfluoreszenzaufnahmen von lentiviral-infizierten EHTs, inkubiert mit Anti- α -Aktinin und Anti-cMyBP-C sowie TO-PRO [®] -3 Iodid	180
Abbildung 118: Auswertung der Sarkomerlängen der u. a. in Abbildung 117 gezeigten Aufnahmen	181

Abbildung 119: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes der SMC-Pseudo-EHTs mit ML-7, 10 μ M.....	182
Abbildung 120: Einfluss der MLCK-Inhibition in SMC-Pseudo-EHTs	183
Abbildung 121: Originalaufzeichnung eines Kontraktionsexperimentes der SMC-Pseudo-EHTs mit Y-27632, 10 μ M.....	185
Abbildung 122: Einfluss der Rho-Kinase-Inhibition in SMC-Pseudo-EHTs.....	185

8.10.2 Liste der im Anhang dargestellten Abbildungen

Abbildung 123: Vektorkarte des pLKO.1 Plasmids	289
Abbildung 124: Vektorkarte des pAdTrack-CMV Plasmids	290
Abbildung 125: Vektorkarte des pAdEasy-1 Plasmids	290
Abbildung 126: Vektorkarte des lentiviralen Helferplasmids pMD2.G	291
Abbildung 127: Vektorkarte des lentiviralen Helferplasmids psPAX2.....	291
Abbildung 128: 100bp DNA Ladder <i>GeneRuler</i> TM	292
Abbildung 129: 1kb DNA Ladder <i>GeneRuler</i> TM	292
Abbildung 130: 1 Kb DNA Extension Ladder	293
Abbildung 131: Precision Plus Protein Dual Color Molekulargewichtsmarker	293
Abbildung 132: Western Blot von Rotoforfraktionen aus Standard-EHTs, inkubiert mit Anti-smMLCK.....	294
Abbildung 133: Fotofilm eines Western Blots von Rotoforfraktionen aus Standard-EHTs, inkubiert mit Anti-smMLCK.....	295

8.11 Verzeichnis der Tabellen

8.11.1 Liste der in der Arbeit dargestellten Tabellen

Tabelle 1: Liste der Interventionssubstanzen.....	24
Tabelle 2: Restriktionsendonukleasen mit den dazugehörigen Sequenzen	32
Tabelle 3: Oligonukleotide für shRNA-Klonierung in den pALsh Vektor	36
Tabelle 4: Thermoprofil für das shRNA- <i>Annealing</i>	37
Tabelle 5: shRNA-Sequenzierungsprimer.....	41
Tabelle 6: Eigenschaften des pLKO.1 Vektors	48
Tabelle 7: Sequenzen der lentiviralen shRNAs im pLKO.1 Vektor	49
Tabelle 8: pLKO.1 Sequenzierprimer.....	57

Tabelle 9: Pipettierschema für die Proteinstandardkurve.....	75
Tabelle 10: Antikörper für Immunoblot.....	78
Tabelle 11: Sequenzen der verwendeten Primer und Sonden für die nicht-quantitative RT-PCR und quantitative RT-PCR.....	83
Tabelle 12: Temperaturbedingungen für die nicht-quantitative RT-PCR zur Identifizierung der MLCK-Isoformen	85
Tabelle 13: Temperaturbedingungen für die nicht-quantitative RT-PCR zur Überprüfung der shRNA-Sequenz in den Lentiviren	85
Tabelle 14: Primer- und Sondenkonzentrationen für den Reaktionsansatz der quantitativen RT-PCR	89
Tabelle 15: Temperaturbedingungen für die quantitative RT-PCR.....	89
Tabelle 16: Antikörper und Farbstoffe für die Immunhistologie	91

8.11.2 Liste der im Anhang dargestellten Tabellen

8.6 Ergebnistabellen.....	275
---------------------------	-----

9 Lebenslauf

Name: Mahnecke
Vorname: Nina
Geboren: 21. 05. 1976 in Dannenberg (Elbe)
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Berufliche Tätigkeit

- 11/2003 - 09/2007 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
wissenschaftliche Mitarbeiterin in Verbindung mit der Absolvierung der zweiten Hälfte des Praktischen Jahres im Rahmen des Pharmaziestudiums und der Anfertigung der vorliegenden **Promotionsarbeit**
- 05/2003 - 11/2003 Erste Hälfte des Praktischen Jahres im Rahmen des Pharmaziestudiums in der Dulsberg-Apotheke, Hamburg
Pharmaziepraktikantin
- 06/1998 - 04/2004 Bereitschafts- und Schichtdienst in verschiedenen Hamburger Krankenhauslaboratorien (Teilzeitanstellungen)
Wilhelmsburger Krankenhaus Groß-Sand, Asklepios Klinik Nord (Heidelberg) und Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg
MTA-Labor
- 02/1995 - 05/1998 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Liquorlabor der Neurologie (Vollzeitanstellung, ab 02/1997 beurlaubt, um das Abitur zu vollenden)
MTA-Labor
- 10/1994 - 01/1995 Vollzeittätigkeit in der Rezeptverarbeitung, Norddeutsche Rezeptcodierung Jameln
Angestellte

Studium

- 10/2007 - 08/2008 Aufbaustudium Friedensforschung und Sicherheitspolitik,
Universität Hamburg
(10/2007 - 08/2008 Förderung durch ein Stipendium der
Deutschen Stiftung Friedensforschung)
Abschlussprüfung am 27. 08. 2008 bestanden
Master of Peace and Security Studies
- 10/2004 - 10/2006 Aufbaustudium Molekularbiologie, Universität Hamburg
Abschlussprüfung am 17. 10. 2006 bestanden
- 10/1998 - 07/2002 Pharmaziestudium, Universität Hamburg
3. Staatsexamen am 24. 06. 2004 abgeschlossen,
approbierte Apothekerin

Ausbildung und Schule

- 08/1995 - 06/1998 Abendgymnasium Hamburg St. Georg (04/1997 - 06/1998
Förderung durch ein Stipendium der Rudolph Lohff-Stiftung)
Abitur
- 09/1992 - 09/1994 Naturwissenschaftlich-technische Akademie Prof. Dr. Grübler,
Isny im Allgäu
Staatlich examinierte Medizinisch-technische-
Laboratoriumsassistentin
- 07/1988 - 06/1992 Bernhard-Riemann-Realschule Dannenberg (Elbe)
Erweiterter Sekundarabschluss I

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die Anleitung, stete Unterstützung und nahezu immer offene Tür bei der Ausarbeitung der Promotion wie auch von wissenschaftlichen Beiträgen. Durch die konstruktive Kritik und seinen immerwährenden Optimismus konnte diese Dissertation nach einigen Stolpersteinen nun vollendet werden.

Herrn Professor Dr. med. Michael Korth danke ich ausdrücklich für die Betreuung meiner Promotionsarbeit für den Fachbereich Chemie.

Mein großer Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf für die spontane Hilfsbereitschaft bei jeglichen theoretischen und praktischen Problemen. Besonders danke ich Herrn Dr. med. Thomas Rau und Herrn Dr. med. vet. Karim Sultan für ihre Zeit, Geduld und kompetente Hilfe in vielen Fragestellungen. Frau Friederike von Ahn danke ich von ganzem Herzen für die Unterstützung während der gemeinsamen Laborzeit und vor allem der Zeit danach. Ihre Diskussionsbereitschaft bei der Umsetzung meiner Gedanken und der Beistand in allen Problemsituationen haben mir sehr geholfen. Frau Cornelia Woermann danke ich für die liebenswerte Einführung in viele Labortechniken.

Mein aufrichtiger Dank gilt meiner/meinen herzallerliebsten Familie und Freunden, die mir emotional, materiell und finanziell seit langer Zeit zur Seite stehen. Ich konnte meinen bisherigen Weg nach meinen Vorstellungen gehen und bekam immer Rat, wenn ich ihn erfragte. Es ist schön zu wissen, dass sie trotz Zeitmangel und vieler Absagen meinerseits immer zu mir standen und stehen, DANKE.

Frau Dr. rer. nat. Apothekerin Stefanie Albers, Frau Angelika Borchers und Frau Ingrid Mahnecke gilt mein außerordentlicher Dank für ihre unermüdliche Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Die Experimente dieser vorliegenden Arbeit wurden mit finanzieller Unterstützung vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (01GI0205 BMBF, KNHI, TP 8) durchgeführt.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Bedeutung der Myosin-Leichtketten-Kinase für den alpha1-adrenergen positiv inotropen Effekt im Herzmuskel

in der Abteilung Pharmakologie des Instituts für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen und der Anleitung von Herrn Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen sowie der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. med. Michael Korth für den Fachbereich Chemie ohne fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht habe.

Hamburg, den

.....

Nina Mahnecke