

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

**Evaluation von Zielsequenzen zur RNA Interferenz gegen  
den Proteinphosphatase-Inhibitor-1 und den  $\beta_1$ -Adrenozeptor**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Felix Caspar Hansen

aus Hamburg

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am 16.7.2009

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss 2. Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke

Prüfungsausschuss 3. Gutachter: PD Dr. A. El-Armouche

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet.



<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.2	Regulation der Herzfunktion	3
1.3	Funktion, Regulation und Modulation von Phosphatase-Inhibitor-1 im Herzen	4
1.4	Das Werkzeug: RNA Interferenz	8
1.5	Fragestellung und Zielsetzung	13
<b>2.</b>	<b>Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	PCR	14
2.1.1	Primer	14
2.1.2	Reaktionsansatz	14
2.1.3	PCR Programm	15
2.1.4	Gelelektrophorese	15
2.1.5	Sequenzierung	15
2.2	Klonierung	16
2.2.1	Plasmid Vektoren	16
2.2.2	Inserts	16
2.2.3	Restriktionsverdau	17
2.2.4	Gelaufreinigung von DNA	17
2.2.5	Ligation	17
2.2.6	Herstellung von LB-Medium und Agarplatten	18
2.2.7	Herstellung thermokompetenter E. Coli	18
2.2.8	Transformation	19

2.2.9	Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation	19
2.2.10	Mini-Plasmidpräparation	20
2.2.11	Maxi-Plasmidpräparation	20
2.3	Zellkultur	20
2.3.1	Aufzucht und Passagierung	21
2.3.2	Adenovirale Infektion von Zellen	21
2.3.3	Transfektion	22
2.3.4	Selektion	22
2.3.5	Behandlung der Zellen mit Cyclohexamid	22
2.3.6	Handhabung der Kardiomyozyten	22
2.4	Proteinbiochemie	23
2.4.1	Zellernte	23
2.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	23
2.4.3	Diskontinuierliche SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	24
2.4.4	Blotten von Proteinen auf Nitrocellulosemembran	25
2.4.5	Blocken der Membran	26
2.5.6	Immundetektion der Membran	26
2.5	Quantitative RNA Messung	27
2.5.1	Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen	27
2.5.2	Reverse Transkription der präparierten RNA	28
2.5.3	Echtzeit PCR	28
2.6	siRNA-Moleküle	32
2.7	shRNA-Expression	33

2.7.1	Design der shRNA-cDNA-Oligos	34
2.7.2	Klonierung des pALsh	35
2.8	H <sup>3</sup> CGP 12177 Bindungsessay	36
2.8.1	Membranpräparation	36
2.8.2	Bindungsassay	36
2.9	Zellfixation, konfokale Lasermikroskopie	38
2.10	Statistik	39
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
3.1	Etablierung der stabilen Zelllinien	40
3.1.1	Amplifikation des $\beta_1$ -Adrenozeptors der Maus	40
3.1.2	Klonierung der Plasmide	40
3.1.3	Transfektion	43
3.1.4	Selektion	43
3.1.5	Überprüfung der Stabilität der geschaffenen Zelllinien	45
3.2	RNA Interferenz nackte siRNA	48
3.2.1	Transfektionseffizienz von siRNA in Hek293	48
3.2.2	Untersuchung der Halbwertszeit von Inhibitor-1 in Hek293 Zellen und Kardiomyocyten	51
3.2.3	Vergleich der verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen Inhibitor-1 auf mRNA-Ebene	52
3.2.4	Vergleich der verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen Inhibitor-1 auf Proteinebene	53

3.2.5	Vergleich der verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen den $\beta_1$ -Adrenozeptor auf mRNA-Ebene	55
3.3	shRNA-Expression	55
3.3.1	Evaluation von shRNA-Effekten gegen Inhibitor-1	56
3.3.2	Evaluation von shRNA-Effekten gegen den $\beta_1$ -Adrenozeptor in Hek293 Zellen	59
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
4.1	Stabile Zelllinie als Grundlage für die Evaluation von RNA Interferenz	62
4.2	<i>Knockdown</i> Effizienz exogener siRNA Transfektion versus endogene shRNA-Expression im Vergleich	63
4.3	RNA Interferenz gegen den $\beta_1$ -Adrenozeptor	66
4.4	RNA Interferenz gegen den Inhibitor-1	69
4.5	Ausblick	71
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>85</b>
<b>9.</b>	<b>Eidstattliche Erklärung</b>	<b>86</b>



## Abkürzungsverzeichnis

---

A	Ampere
ACE	Angiotensin converting enzyme
Bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
CMV	Cytomegalie Virus
C <sub>T</sub>	Cycle of treshhold
dam	DNA Adenin Methylase
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsRNA	Doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglyceroltetraacetat
EHT	Engineered heart tissue
ENaC	Epithelialer Natrium Kanal
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
h	Stunde
IRES	internal ribosomal entry site
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Lurie Broth Medium

## Abkürzungsverzeichnis

---

min	Minute
MOI	Multiplicity of Infection
ng	Nanogramm
NYHA	New York Heart Association
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PFA	Paraformaldehyd
PIPES	Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure)
PKA	Proteinkinase A
PP	Proteinphosphatase
RISC	RNA induced silencing complex
rpm	Rounds per minute
RTPCR	Realtime PCR
SDS	Natriumdodecanylsulfat
SDS PAGE	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese
SERCA	Calcium ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	short interfering RNA
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
IU	Internationale Einheit
UTR	Untranslatierte Region
v/v	Volumen/Volumen

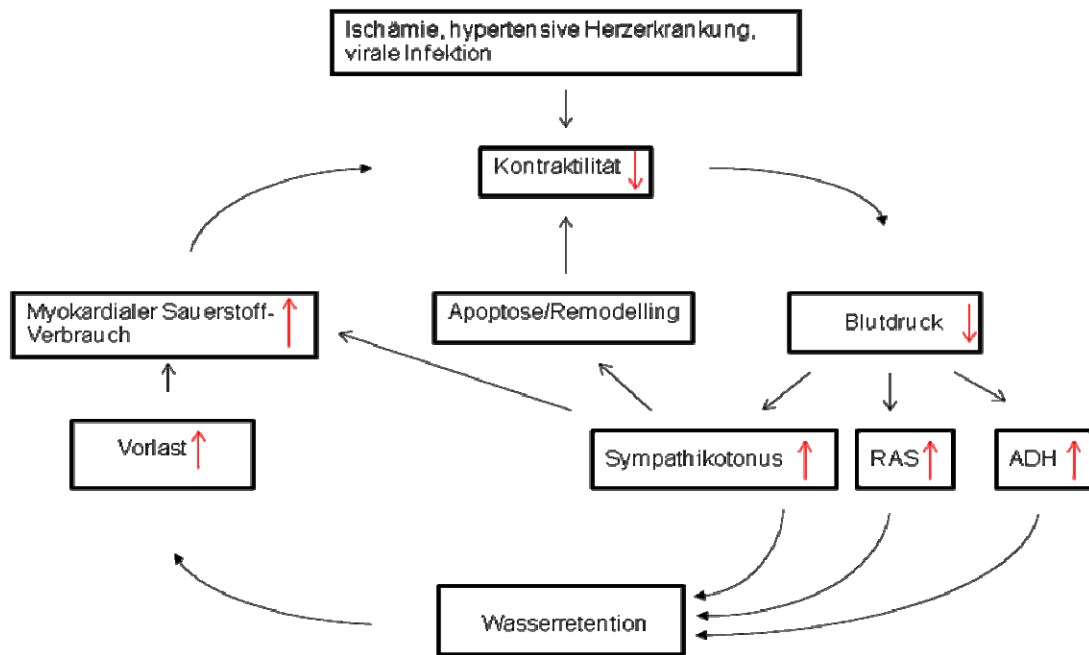
# 1. Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz

Herzerkrankungen sind in den Industrienationen die weitaus häufigste Todesursache. So war im Jahr 2005 in der Bundesrepublik bei mehr als 360.000 Menschen eine Erkrankung des Kreislaufsystems todesursächlich. Das entsprach 44% aller Todesfälle. Unter allen Herzerkrankungen nahmen chronisch ischämische Myokarderkrankungen den Spitzenplatz ein (9,8% aller Verstorbenen), gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (7,4% aller Verstorbenen) und Herzinsuffizienz (5,8% aller Verstorbenen, Statistisches Bundesamt 2007). Da die Prävalenz der Herzinsuffizienz vor allen Dingen mit der höheren Lebenserwartung der Bevölkerung weiter steigen wird und da die Prognose mit steigendem Lebensalter deutlich verschlechtert ist (MacIntyre et al. 2000), ist die Erforschung ihrer Ursachen und neuer Therapieoptionen von größter Bedeutung.

### Chronische Herzinsuffizienz

Eine Vielzahl von Krankheiten, wie die koronare Herzkrankheit, der arterielle Hypertonus, verschiedene Herzklappenerkrankungen ebenso wie primäre und toxische Kardiomyopathien können das Syndrom der Herzinsuffizienz auslösen. Dabei handelt es sich um die Unfähigkeit des Herzens, ein dem Bedarf des Organismus genügendes Herzzeitvolumen aufrecht zu erhalten. So führt jede Schädigung bzw. jeder Verlust von funktionsfähigem Myokard zu einer neurohumoralen Aktivierung, die darauf abzielt, den Blutdruck zu erhöhen und die adäquate Durchblutung des Organismus zu sichern. Daraus resultiert eine verstärkte Belastung des verbleibenden Myokards (siehe Abbildung 1). Im Zentrum dieses Teufelskreises stehen, neben funktionellen Veränderungen des Herzens ( $\beta$ -adrenerge Desensitivierung, Störung der Calciumhomöostase), die morphologischen Umbauprozesse, die zu einer weiteren Verschlechterung der kardialen Pumpleistung führen. Sie sind weitgehend irreversibel und beinhalten unter anderem eine Dilatation des kranken Herzens, eine Fibrose, sowie die Hypertrophie des einzelnen Kardiomyozyten.



**Abbildung 1: Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz.** Dargestellt sind verschiedene Formen des Myokardschadens. Sie alle führen, sofern sie die Pumpkraft des Herzens beeinträchtigen und somit den Blutdruck senken, zu einer Aktivierung des Pressorezeptorenreflexes. Die freigesetzten Katecholamine stimulieren das Herz direkt, unterstützen aber auch die ebenfalls durch den verminderten Blutdruck ausgelöste Reninausschüttung. Das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem (RAS) wird aktiviert, ADH wird ausgeschüttet. Die Folge ist zum einen eine erhöhte Nachlast durch Vasokonstriktion aber auch eine erhöhte Vorlast durch Wasserretention. Beides führt zu einer Mehrbelastung des Herzens und zu einem vermehrten O<sub>2</sub> Verbrauch, wodurch das Herz weiter geschädigt wird. Die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems und Sympathikus führt darüber hinaus zur Apoptose und kardialen Remodelling (Braunwald 2007).

In einer leitliniengerechten Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz kommen heute Betablocker, ACE-Hemmer, Aldosteronantagonisten sowie bei Bedarf Diuretika und Digitalis zum Einsatz. Das Ziel der Therapie besteht darin, den oben beschriebenen Teufelskreis der neurohumoralen Aktivierung zu durchbrechen. Dadurch wurde die Lebenserwartung der Patienten seit 1985 verdoppelt, ist aber immer noch besonders in fortgeschrittenen Krankheitsstadien sehr schlecht. Viele andere Arzneimittelprinzipien haben sich als unwirksam bzw. schädlich erwiesen. Dazu zählen vor allem Katecholamine, die positiv inotrop wirkenden PDE-Hemmer und  $\beta$ -Sympathomimetika. Ihre Anwendung bleibt Fällen akuter Herzinsuffizienz und dem kardiogenen Schock vorbehalten.

## 1.2 Regulation der Herzfunktion

Die Anpassung der Pumpleistung des Herzens an die Anforderungen des Organismus erfolgt zu großen Teilen durch das sympathische Nervensystem. Die physiologische Stimulation des Sympathikus erfolgt in Abhängigkeit von den Anforderungen des Kreislaufs und führt zur Ausschüttung von Katecholaminen, die die kardialen  $\beta$ -Adrenozeptoren stimulieren. Daraus resultieren eine Steigerung der Kontraktionskraft und der Herzfrequenz, sowie eine Beschleunigung der Relaxation. Der größte Anteil an kardialen  $\beta$ -Adrenozeptoren sind  $\beta_1$ -Adrenozeptoren (75-80%), während die  $\beta_2$ -Adrenozeptoren (etwa 20%) im Herzen für die Kontraktionskraft nur eine untergeordnete Bedeutung haben. Nur etwa 10% der kardialen Adrenozeptoren sind dem  $\alpha$ -Subtyp zuzuordnen (Rockman et al. 2002). Die Bindung von Noradrenalin oder Adrenalin an die kardialen  $\beta_1$ -Adrenozeptoren führt über ein stimulierendes G-Protein ( $G_s$ ) zur Aktivierung der membranständigen Adenylzyklase. Dies führt zu einer verstärkten Umwandlung von ATP in zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP), wodurch wiederum die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) aktiviert wird (Bers und Ziolo 2001, Lohse et al. 2003). Über eine PKA abhängige Phosphorylierung von Effektorproteinen werden wahrscheinlich die wesentlichen kardialen Effekte (Chronotropie, Inotropie, Lusitropie) von Katecholaminen vermittelt. Zu diesen Effektorproteinen zählen unter anderem der sarkolemmale, spannungsabhängige Calciumkanal (L-Typ Calciumkanal), der Troponin Inhibitor (TnI), das Myosinbindungsprotein-C (MyBP-C) und Phospholamban (PLB), die anschließend die Calcium assoziierte positive Inotropie und Lusitropie vermitteln (Dorn und Molketin 2004, Kaupp und Seifert 2002).

Lange Zeit wurden Proteinkinasen als zentraler Regulator dieser Zellfunktionen angesehen, da sie bereits recht früh entdeckt und intensiv erforscht wurden. Allerdings haben neuere Forschungsergebnisse gezeigt, dass die Phosphorylierung eines Phosphoproteins nicht nur durch die vermehrte Aktivität der entsprechenden Proteinkinase sondern auch durch eine Hemmung der zugehörigen Proteinphosphatase gesteigert werden kann (Oliver und Shenolikar 1998, Aggen et al. 2000, Herzig und Neumann 2000, Cohen 2002).

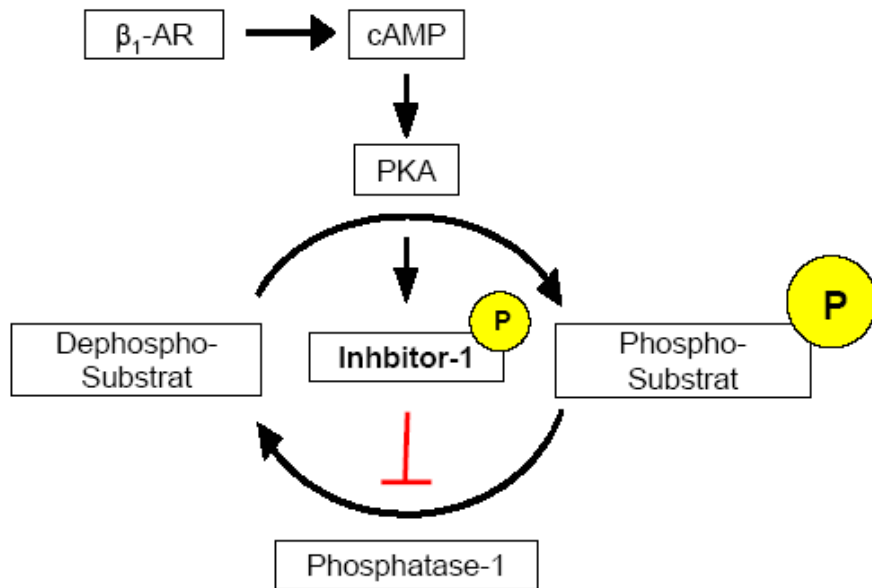
Proteinphosphatasen entfernen die von Proteinkinasen an Aminosäurereste (zumeist Serin, Threonin und Tyrosin) gebundenen Phosphatgruppen. Alle bisher bekannten Proteinphosphatasen werden in die folgenden drei Klassen unterteilt: Tyrosin-Proteinphosphatasen, Serin/Threonin-Proteinphosphatasen und dualspezifische Proteinphosphatasen, die Serin-Threonin- und Tyrosinreste dephosphorylieren (Cohen et al. 1989). Die Serin/Threonin-Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2B, sowie die

PP2C sind für den Großteil aller Serin/Threonin-Proteinphosphataseaktivität *in vivo* verantwortlich (Cohen et al. 1989; Mac Dougall et al. 1991). Sie unterliegen weiteren regulatorischen Elementen.

### **1.3 Funktion, Regulation und Modulation von Phosphatase-Inhibitor-1 im Herzen**

Die Aktivität der kardial dominierenden Serin/Threonin- Proteinphosphatasen vom Typ 1 (PP1) wird hauptsächlich durch den zytosolischen Inhibitor-1 gesteuert. Inhibitor-1 wird von der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) an Thr-35 phosphoryliert und aktiviert. In dieser Form hemmt der Inhibitor-1 sehr wirkungsvoll die PP1 (Cohen et al. 1988). Der Inhibitor-1 wurde schon vor über 30 Jahren im Zusammenhang mit der PKA und PP1 erforscht (Huang und Glinsmann 1976). Zunächst wurde er lange Zeit nur in Leber und Skelettmuskel als Regulator des Glykogenhaushaltes betrachtet (Cohen und Cohen 1989). Dabei wurde angenommen, dass insulinabhängig eine verminderte Hemmung der PP1 zu einer Aktivierung der Glykogensynthese führt. Dieser Effekt sollte von einer vermehrten Aktivität von Inhibitor-1 getragen werden. Die physiologische Bedeutung der Theorie wurde jedoch widerlegt: Inhibitor-1 *Knockout* Mäuse wiesen die gleiche Glykogensyntheserate wie Wildtyp Mäuse auf (Scrimgeour et al. 1999).

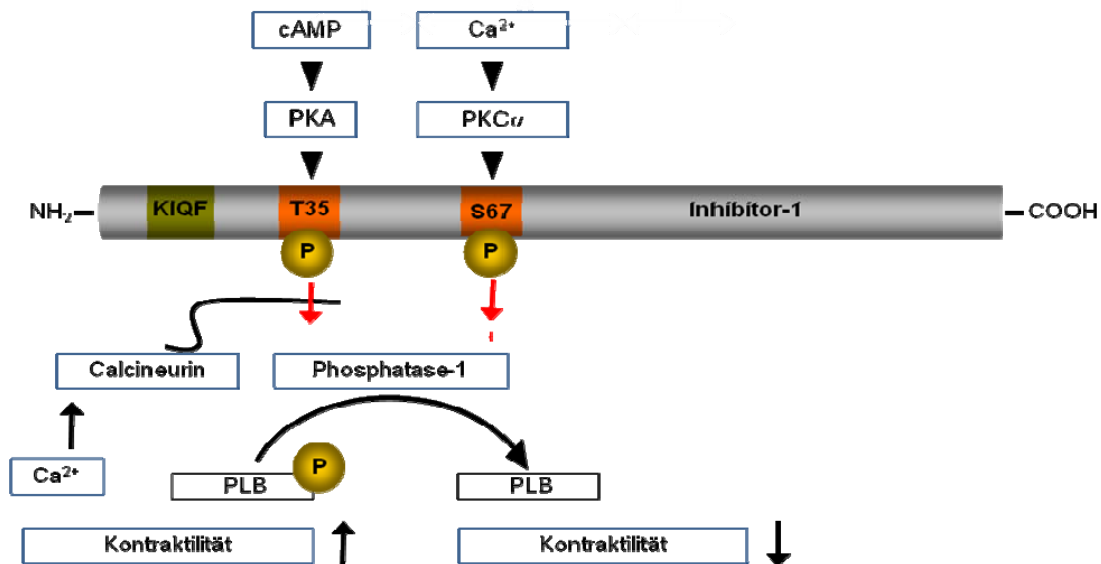
Erst 1991 gab es erste Hinweise, dass Inhibitor-1 im Herzen katecholaminabhängig phosphoryliert wird und die PP1 hemmt (Neumann et al. 1991). Inhibitor-1 stabilisiert den Phosphorylierungszustand wichtiger kardialer Regulatorproteine (Abbildung 2). So konnte gezeigt werden, dass nach adenoviralem Gentransfer in Herzmuskelzellen eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -adrenerger Simulation entsteht und Phospholamban vermehrt phosphoryliert wird (El-Armouche et al. 2003). In isolierten Kardiomyozyten von Patienten mit Herzinsuffizienz konnte mit der adenoviralen Überexpression eines trunkierten, daueraktiven Inhibitor-1 Proteins eine Resensitivierung gegenüber  $\beta$ -adrenerger Stimulation beobachtet werden (Carr et al. 2002).



**Abbildung 2: Inhibitor-1 als positives Rückkopplungselement in der β-adrenergen Signalkaskade.** Die Bindung von Katecholaminen an den kardialen β<sub>1</sub>-Adrenorezeptor führt über die Aktivierung eines stimulatorischen G-Proteins zur vermehrten Bildung von zyklischem Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP) und damit über eine Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Phosphorylierung weiterer Regulatorproteine der Herzfunktion. Die Dephosphorylierung wird zum Teil von der Proteinphosphatase 1 (PP1) katalysiert. Der Inhibitor-1, der selbst PKA abhängig phosphoryliert wird, hemmt in diesem Zustand die PP1. Das Protein verstärkt damit die β-adrenerge Wirkung von Katecholaminen am Herzen und ist somit als ein positives Rückkopplungselement zu betrachten (Abbildung aus El-Armouche 2008).

Die Aktivität von Inhibitor-1 wird je nach Gewebe von unterschiedlichen weiteren regulativen Elementen gesteuert. In Nierenepithelzellen wird Inhibitor-1 durch die PP2A an der PKA-Thr-35-Phosphorylierungsstelle dephosphoryliert und dadurch deaktiviert (Higuchi et al. 2000). Dahingegen wird der Inhibitor-1 in Neuronen vornehmlich calciumabhängig durch Calcineurin (PP2B) dephosphoryliert und inaktiviert (Mulkey et al. 1994). Im Herzen sind beide Phosphatasen sowohl PP2A als auch PP2B als Regulator der Inhibitor-1 Funktion nachzuweisen. So konnte gezeigt werden, dass in Herzmuskelzellen sowohl die spezifische Blockade von Calcineurin als auch die Blockade der Typ 2A Phosphatase zu einer gesteigerten PKA-Phosphorylierung von Inhibitor-1 führten. Als funktionelle Auswirkung zeigte sich eine gesteigerte PKA-Phosphorylierung auch von Phospholamban (El-Armouche et al. 2006). Inhibitor-1 verfügt über zwei weitere Phosphorylierungsstellen: Ser-67 (Braz et al. 2004) und Thr-75 (Sahin et al. 2006, Rodriguez et al. 2007), die von einer weiteren Kinase phosphoryliert werden können (Abbildung 3). Dabei handelt es sich um die Proteinkinase Cα (PKCα), die Ca<sup>2+</sup>-abhängig aktiv ist (Allen et al. 1996). Eine Phosphorylierung an diesen Stellen senkt im Gegensatz zur Thr-35-Phosphorylierung die Aktivität von Inhibitor-1. Zu dieser Erkenntnis führte die Untersuchung von PKCα

*Knockout* Mäusen: Hier zeigte sich eine Hyperkontraktilität. Als Ursache konnte für diesen Phänotyp eine verminderte Phosphorylierung von Inhibitor-1 an Ser-67 und damit eine gesteigerte Inhibitor-1 Aktivität gezeigt werden (Braz et al. 2004).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der Funktion und Regulation von Inhibitor-1.** Inhibitor-1 erfährt positive und negative Regulation. Hier ist der Einfluss der verschiedenen Phosphorylierungsstellen gezeigt (Abbildung aus El-Armouche 2008).  $\beta$ -adrenerge Stimulation von Kardiomyozyten führt über Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA zur Phosphorylierung von Inhibitor-1 an Thr-35. Typ-1 Phosphatasen (PP1) werden dadurch gehemmt, woraus wiederum die vermehrte Phosphorylierung verschiedener Phosphoproteine, wie beispielweise Phospholamban, resultiert. Der funktionelle Effekt ist eine gesteigerte Kontraktilität (El-Armouche et al. 2003). Die PKC $\alpha$  Phosphorylierung an Ser-67 hat einen gegenteiligen Effekt: Sie mindert die Aktivität von Inhibitor-1 und hat somit eine erniedrigte PLB Phosphorylierung und Kontraktilität zur Folge. Die PKA-Thr-35-Phosphorylierung wird am Herzen calciumabhängig, durch die Typ 2B Phosphatase Calcineurin, dephosphoryliert (El-Armouche et al. 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Inhibitor-1 eine zentrale Schaltstelle zwischen den beiden entscheidenden Signalwegen am Herzen einnimmt und von beiden in seiner Aktivität moduliert wird. Auf der einen Seite steht der aktivierende Einfluss durch die PKA, der durch cAMP vermittelt wird. Auf der anderen Seite wird Inhibitor-1 calciumabhängig durch die PKC $\alpha$  phosphoryliert oder durch Calcineurin dephosphoryliert und dadurch gehemmt. Da die PKA, die PKC $\alpha$  und Calcineurin in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz eine zentrale Rolle spielen (Dorn und Molkenkin 2001), könnte der Inhibitor-1 pathophysiologisch aber auch in Hinblick auf eine potentielle Pharmakotherapie interessant sein.



Inhibitor-1 transgene Mäuse mit etwa 200-facher Überexpression von Inhibitor-1 zeigten im Alter von drei Monaten eine spontane kardiale Hypertrophie. Bei der Induktion von Herzinsuffizienz durch die chronische Stimulation mit Isoprenalin wiesen die Mäuse eine ebenfalls erhöhte Zunahme von Herzgewicht zu Körpergewicht Ratio im Vergleich zu Wildtyp Mäusen auf (El-Armouche et al. unveröffentlicht). Währenddessen blieben Inhibitor-1 *Knockout* Mäuse ihr Leben lang herzgesund. Weder Herzhypertrophie noch kardiale Funktionseinbußen konnten nachgewiesen werden. Die Inhibitor-1 *Knockout* Herzen zeigten *in vitro* wie erwartet eine mäßige Desensitivierung nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin. In der Echokardiographie *in vivo* wiesen die Tiere sowohl eine normale basale Herzfunktion als auch eine normale maximale kontraktile Reserve nach der Applikation des  $\beta$ -Adrenozeptoragonisten Dobutamin auf. Die Vermutung, dass der Verlust von Inhibitor-1 die Entwicklung einer Herzinsuffizienz vermindern könnte, ebenso wie es von Betablockern bekannt ist, wurde in unserer Arbeitsgruppe weiterverfolgt. Dabei erzeugte die chronische Isoprenalininfusion bei Wildtyp Mäusen eine kardiale Hypertrophie, sowie eine starke  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung. Bei den Inhibitor-1 *Knockout* Mäusen hingegen war die isoprenalininduzierte Hypertrophieentwicklung deutlich abgeschwächt. Auch die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung fiel deutlich geringer aus. Nach diesen Ergebnissen wäre der Inhibitor-1 als Verstärker der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade in kardiovaskulären Stresssituationen also eher nachteilig und seine verminderte Aktivität in der chronischen Herzinsuffizienz eher protektiv. Es kann die Hypothese abgeleitet werden, dass eine weitere Herunterregulation von Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz als eine Art „intrazelluläre  $\beta$ -Blockade“ nutzbringend sein könnte.

Dem gegenüber stehen Ergebnisse von Pathak und Kollegen. Hier wurde gezeigt, dass Mäuse, die transgen ein trunkiertes, daueraktives (cAMP/PKA unabhängiges) Inhibitor-1 Protein exprimierten, ein vermindertes kardiales *Remodelling* in der druckinduzierten Herzinsuffizienz aufwiesen. Außerdem war es den Autoren möglich, bei Ratten das Fortschreiten der Herzinsuffizienz in demselben Modell mittels adenoviralem Gentransfer von konstitutiv aktivem Inhibitor-1 zu reduzieren (Pathak et al. 2005).

Die therapeutische Blockade von Inhibitor-1 im Rahmen der Herzinsuffizienztherapie ist bis jetzt nicht erforscht und ihr endgültiger Nutzen unklar. Untersuchungen an *Knockout* Mäusen oder transgenen Tieren sind als Modell unzureichend, da hier die Inhibitor-1 Expression bereits vor dem Eintreten einer künstlich erzeugten Herzinsuffizienz vorliegt. Da bis jetzt keine Pharmaka, die eine solche Blockade

vermitteln, bekannt sind, soll im Rahmen dieser Arbeit RNA-Interferenz angewendet werden.

Ein Nachteil der bisher in der Herzinsuffizienztherapie praktizierten Betablockade stellt ihre mangelnde  $\beta_1$ -Spezifität dar. Deshalb ist bei Patienten mit chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen der Einsatz von Betablockern problematisch (Singh et al. 1976). Ein neuartiger Ansatz könnte auch hier in dem Einsatz von RNA-Interferenz bestehen, die hoch spezifisch ist. Gleichzeitig wäre damit eine Vergleichsmöglichkeit geschaffen, um im experimentellen Rahmen die Effekte des Inhibitor-1 *Knockdowns* besser abschätzen zu können.

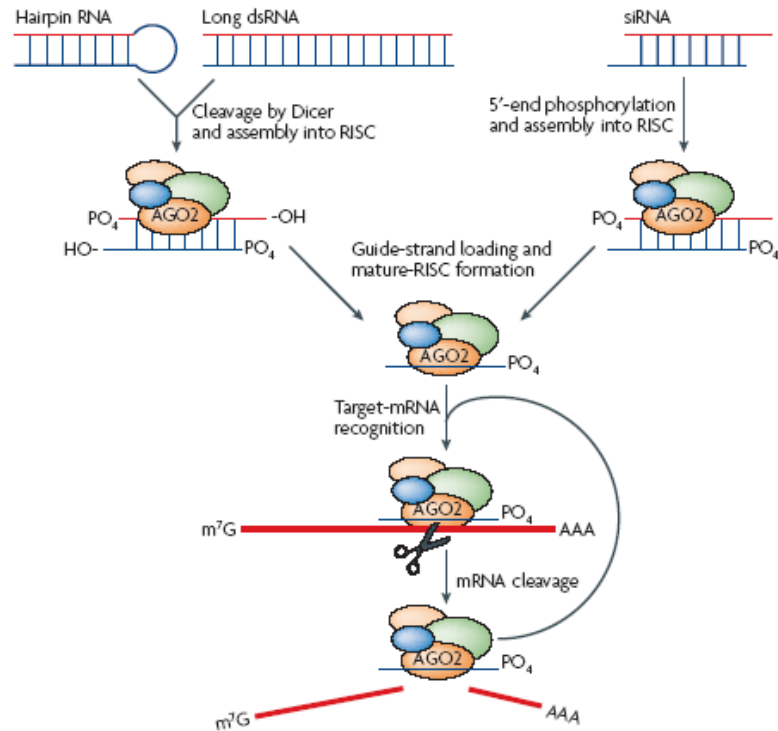
### 1.4 Das Werkzeug: RNA-Interferenz

RNA-Interferenz ist ein effizientes und spezifisches molekularbiologisches Werkzeug zur Herunterregulation von Genen, das sich in nahezu allen Zellen anwenden lässt (Elbashir et al. 2001a). Der besondere Vorteil dieser Methode liegt darin, dass sie auch zu therapeutischen Zwecken genutzt werden könnte, da mit ihr im Gegensatz zur Züchtung eines *Knockout* Tieres das Gen auch postnatal herunterreguliert werden kann (Fire et al. 1998, Mello und Conte 2004, Wiznerowicz et al 2006, Rana 2007).

#### Der Mechanismus von RNA Interferenz

Das Prinzip der RNA-Interferenz besteht darin, dass doppelsträngige RNA-Oligonukleotide, die in eine Zelle eingebracht werden, die Spaltung zelleigener homologer mRNAs induzieren können (Fire et al. 1998). Dabei ist eine Länge des Oligonukleotids von nur 21 Basenpaaren ausreichend. Die doppelsträngige RNA wird dann als *short interfering RNA* (siRNA) bezeichnet. Einer der beiden Stränge, der Antisensestrang, ist komplementär zur Ziel-mRNA. Beide Stränge besitzen je am 3' Ende einen Überhang aus 2 Nukleotiden, der nicht notwendigerweise komplementär zum Ziel sein muss (Elbashir et al. 2001b). Die Stränge binden an einen Enzymkomplex, den *RNA Induced Silencing Complex* (RISC). Hier werden sie getrennt und der Antisensestrang verbleibt an den RISC gebunden, während der Sensestrang degradiert wird. Die Trennung beider Stränge wird durch eine Helicaseaktivität des RISC vermittelt (Robb und Rana 2007). Für die Bindung ist es notwendig, dass das RNA-Duplex an seinen freien 5' OH Gruppen phosphoryliert wird (Chui und Rana. 2002). Der RISC bindet dann mit Hilfe des Antisensestranges als Erkennungssequenz an die Ziel-mRNA und spaltet sie 10 bis 11 Nukleotide oberhalb des 5' Endes des Antisensestranges. Die gespaltene mRNA wird degradiert. Der Bindungsprozess von Antisensestrang und mRNA ist sehr spezifisch. Bereits eine nicht komplementäre Base

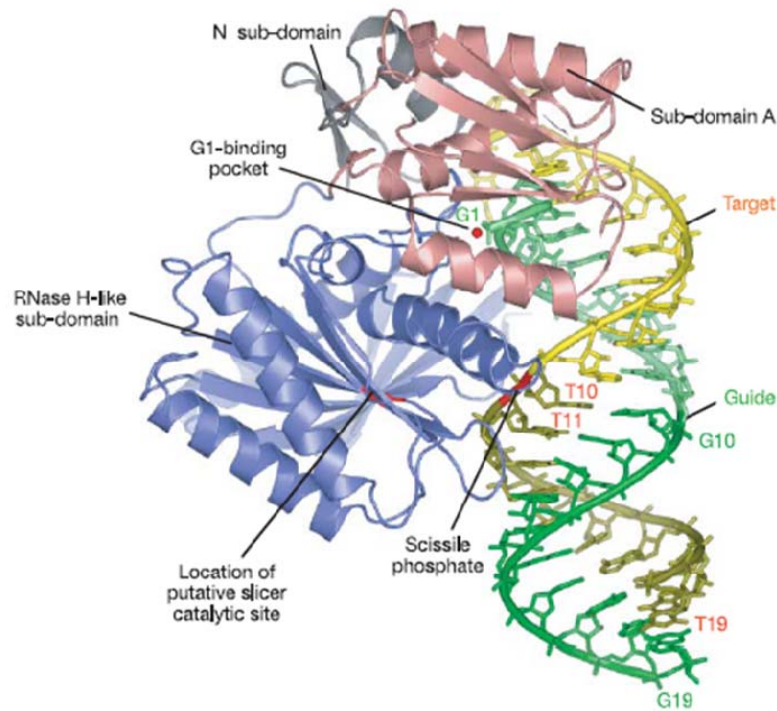
inhibiert die Spaltung der mRNA. Ein einmal aktivierter RISC kann zur Spaltung mehrerer Ziel-mRNAs führen (Rana 2007).



**Abbildung 4: Funktionsweise von RNA-Interferenz.** Doppelsträngige siRNA von 21 Bp Länge aktivieren den RISC und führen damit zur Spaltung der komplementären Ziel-mRNA. Längere dsRNA oder shRNA werden zuvor durch den Dicer, einer RNase, die Teil des RISCs ist, prozessiert und aktivieren anschließend ebenfalls den RISC (Abbildung aus Rana 2007).

Bei dem RISC handelt es sich um einen Komplex, der eine Reihe von Proteinen enthält. Ein Kernelement sind Argonaut Proteine (Hammond et al. 2001). Diese zeichnen sich durch zwei konservierte Domänen aus: PAZ und PIWI. Die PAZ Domäne ist für die Bindung kleiner RNA-Helices verantwortlich. Die PIWI Domäne hat große Ähnlichkeit zur RNase H (Parker et al. 2006). Sie katalysiert die Spaltung der Ziel-mRNA. Mit Hilfe einer Kristallstrukturanalyse der PIWI Domäne konnten tiefe Einsichten in die Funktionsweise des RISC gewonnen werden: Ein Kanal nimmt das siRNA Duplex und im weiteren *Silencing* Prozess die Ziel-mRNA auf. Das phosphorylierte 5' Ende des Antisensestranges kommt in einer Tasche nahe des C-Terminus der PIWI Domäne zu liegen. Dabei wird der Antisensestrang so fixiert, dass sich die Phosphatgruppe zwischen dem 10. und 11. Nukleotid der gebundenen Ziel-mRNA genau neben der potentiellen katalytischen Einheit der RNase befindet. Damit

wäre das beobachtete Schnittmuster an eben dieser Stelle zu erklären (Parker et al. 2005).



**Abbildung 5: Ausschnitt eines RISC.** Hier gezeigt ist das Strukturmodell eines siRNA Antisensestranges (grün) und einer Ziel-mRNA (gelb) gebunden an die PIWI Domäne des Agonate Proteins von *Archaeoglobus fulgidus* nach Kristallstrukturanalyse. G1 markiert das 5' Ende des Antisense-stranges. (Abbildung nach Parker et al. 2005).

#### Anforderungen an siRNA und Ziel-mRNA

Um ein Gen effektiv auszuschalten, ist es von großer Bedeutung, dass der Antisensestrang einer siRNA an den RISC gebunden wird. Grundsätzlich gilt, dass der Strang eines siRNA Duplexes, der an seinem 5' Ende weniger stabil an den komplementären Strang gebunden ist, in den RISC inkorporiert wird (Schwarz et al. 2003). Die Bindungsstärke beider Stränge hängt unter anderem von der Anzahl der Wasserstoffbrückenbindungen ab. Ein C-G Basenpaar ist demnach stabiler als ein A-T Basenpaar. Die Spaltung einer Ziel-mRNA hängt aber nicht nur von der Bindung des Antisensestranges an den RISC ab. Die Bindungsstärke des Antisensestranges zwischen den Basen 9 und 14 vom 5' Ende gezählt, scheint ebenfalls einen Einfluss auf die RISC Aktivität zu haben (Khvorova et al. 2003). Zur Spaltung einer mRNA ist es notwendig, dass zunächst eine Basenpaarung zwischen mRNA und Antisensestrang zustande kommt. Die eigentliche Spaltung erfolgt dann an dieser Stelle. Je geringer die Strangbindungsstärke an dieser Stelle, desto schneller löst sich der RISC nach der Spaltung der mRNA wieder ab und desto schneller kann das nächste Molekül geschnitten werden.

Die Effizienz einer siRNA hängt aber nicht nur von ihren thermodynamischen Eigenschaften ab. Eine weitere entscheidende Rolle kommt der Sekundärstruktur der Ziel-mRNA zu (Overhoff et al. 2005). Hier entscheidet sich, wie gut die mRNA dem RISC und seiner RNase zugänglich ist. Die Sekundärstruktur einer mRNA kann mit der Software mFOLD (Zuker et al. 1999) vorhergesagt werden. Besonders günstig für die Hybridisierung eines Antisensestranges einer siRNA mit einer Ziel-mRNA sind freie Schleifen. Diese sollten mindestens über eine Länge von 10 Basen verfügen.

### Betrachtung weiterer potentieller Auslöser für RNA-Interferenz

Auch längere doppelsträngige RNA (dsRNA) und *short hairpin* RNA (shRNA) können den RISC aktivieren. Diese endogen exprimierten RNAs werden zunächst von einem Enzymkomplex, dem Dicer, gespalten. Der Dicer ist ebenfalls ein Bestandteil des RISC. Er enthält auch eine PAZ Domäne zur RNA Bindung. Die RNA Spaltung ist hier aber von einer RIII Domäne mit RNase Aktivität abhängig (Zhang et al. 2004). Das Produkt dieser Reaktion sind dann kurze RNA-Duplexe, die wie die oben genannten siRNAs zur Spaltung der mRNA führen. Dies eröffnet eine Fülle von Möglichkeiten für den Transfer von siRNA *in vivo*. shRNA kann sowohl durch Plasmid- als auch virale Vektoren in der Zelle exprimiert werden. Zu diesem Zweck werden heute meistens U6 oder H1 Promotoren verwendet (Miyagishi und Taira 2002, Brummelkamp et al. 2002). Beide Promotoren weisen ähnliche Eigenschaften auf. Jedoch ist der H1 Promotor etwas vielfältiger einsetzbar, da im Gegensatz zum U6 Promotor als erstes Nukleotid einer shRNA-cDNA nicht zwangsweise eine Purinbase stehen muss (Myslinski et al. 2001).

Eine wesentlich ältere und bereits etablierte Methode ist die Antisensemethode, bei der zur Ziel-mRNA komplementäre RNA in die Zelle eingebracht wird, die dann an die mRNA bindet und die Translation inhibiert, sowie RNAsen aktiviert und zur Degradation der Ziel-mRNA führt. Da bei dieser Methode kein RISC benötigt wird, liegt hier auch keine RNA-Interferenz im eigentlichen Sinne vor. Der Nachteil der Antisensemethode liegt darin, dass erhebliche Mengen RNA in die Zelle eingebracht werden müssen, da nach jeder Hybridisierung auch die Antisense RNA aufgebraucht wird. Ein weiteres Problem beim Einsatz längerer RNA Sequenzen als therapeutisches Prinzip besteht in der schnellen Degradation, da einzelsträngige RNA viel instabiler als doppelsträngige ist (Fire et al. 1999).

Eine grundlegende Frage ist, ob DNA ebenfalls zur Spaltung von mRNA führen kann. Hier führt die genaue Betrachtung der Strukturen von RNA und DNA zum Ziel. RNA liegt in der Zelle als A-Form Helix vor. Diese ist rechtsgängig und hat mit 11 Bp pro Windung einen Durchmesser von 23 Å. DNA ist eine B-Form Helix. Sie ist ebenfalls

rechtsgängig, verfügt jedoch nur über 10 Bp pro Windung, bei einem Durchmesser von 20 Å. Zum einen kann der Dicer die DNA nicht spalten, zum anderen verfügt das Argonautprotein des RISC an seiner PIWI Domäne über eine Bindungsstelle für den Antisensestrang einer siRNA, in die eine B-Form-Helix nicht passt (Rana 2007).

### Physiologische Bedeutung von RNA-Interferenz

Die physiologische Bedeutung von RNA-Interferenz ist vermutlich wesentlich in einer Immunantwort einzelner Zellen gegen Virusinfektionen zu sehen. Die beteiligten Gene sind konserviert und treten auch in tierischen Zellen und Pilzen auf (Bernstein et al. 2001). Dabei weist das Prinzip einige wesentliche Merkmale des „klassischen“ Immunsystems auf. Der Zelle ist es möglich (1.) RNA-Interferenz nur dann zu aktivieren, wenn die Zelle überhaupt infiziert ist, (2.) eine Unterscheidung zwischen selbst und fremd zu fällen und (3.) die Antwort im Verlaufe der Reaktion zu steigern (Plasterk 2002). Kleine RNA-Moleküle können auch als Transkriptionsfaktoren fungieren. Diese Regulatoren werden endogen exprimiert und heißen *micro* RNA (miRNA). miRNA Gene sind u.a. in Intronregionen lokalisiert. Ihre Wirkung basiert auf einem Translationsstop des zu regulierenden Gens (Ambros 2004, Lim et al. 2005). Sie werden von der RNA-Polymerase II transkribiert und enthalten als posttranskriptionale Modifikationen einen Poly-A-Schwanz und eine 5' Kopfgruppe. Die miRNAs enthalten palindromische Sequenzen, sodass sie Haarnadelstrukturen ausbilden können. Dabei ist die Sequenz jedoch nicht komplett palindromisch, sodass einige ungepaarte Basen in der Sequenz verbleiben und sich mehrere Wölbungen in der RNA ausbilden (Rana, 2007). Diese Pri-miRNA wird von einem Dicer ähnlichen Enzym dem Drosha-DGCR (*DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*) gespalten. Das Produkt ist eine verkürzte Pri-miRNA, die aber immer noch eine Haarnadelstruktur enthält (Tang 2004). Die Reaktion findet im Zellkern statt. Die nun Prä-miRNA genannte miRNA verlässt den Zellkern mit Hilfe des Transportproteins Exportin-5 (Lund et al. 2004) und wird zytosolisch vom Dicer prozessiert. Dabei verliert die miRNA ihre Schleife und kann nun vom RISC gebunden werden. Da die miRNA in Ihrer Wölbung nicht komplementär zu der Ziel-mRNA ist, erfolgt zunächst keine Degradation der mRNA. Vielmehr kommt es zu einem Translationsstop. Hierfür ist eine Komplementarität von mindestens 11 Basen (eine helikale Windung) notwendig (Rana 2007).

Die Komplexe aus miRNA, RISC und mRNA werden in sogenannte P-Körperchen eingelagert, die zusätzlich Teile der Translationsmaschinerie an sich binden (Chu et al. 2006). So wird auch die Translation anderer, nicht an den RISC gebundener, mRNAs beeinflusst. Die mRNA kann wieder für die Translation rekrutiert oder degradiert

werden. Eine zum Ziel vollständig komplementäre miRNA führt genau wie eine siRNA zur Spaltung der Ziel-mRNA.

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Betablocker haben sich in der Therapie der Herzinsuffizienz als sehr erfolgreich erwiesen. Ein neuer Aspekt der neurohumoralen Blockade wäre eine Therapieform, die ihren primären Angriffspunkt innerhalb des Kardiomyozyten hätte. Das Abschwächen (*Knockdown*) von Inhibitor-1 könnte diesbezüglich eine interessante Option sein, da dieses Protein den  $\beta$ -adrenergen Signalweg verstärkt. Inhibitor-1 wird, wie auch  $\beta_1$ -Adrenozeptoren, in der menschlichen Herzinsuffizienz stark vermindert exprimiert und trägt wahrscheinlich zu einer Desensitivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade bei. Ferner konnte bereits gezeigt werden, dass das genetische Fehlen von Inhibitor-1 in *Knockout* Mäusen vor der Katecholamin-induzierten Hypertrophie und  $\beta$ -adrenergen Desensitivierung schützt, ohne sichtbare negative Auswirkungen zu haben.

Bis jetzt ist eine pharmakologische Beeinflussung von Inhibitor-1 nicht möglich. Ziel ist es deshalb, *in vitro* die Voraussetzungen dafür zu schaffen, mittels RNA-Interferenz den Inhibitor-1 *in vivo* herunterzuregulieren, um so eine mögliche Therapieoption zu untersuchen und dies mit einer Genabschaltung des  $\beta_1$ -Adrenozeptors als eine Art „Positivkontrolle“ zu vergleichen.

### Aufgabenstellung

- 1) Stabile Expression von Inhibitor-1 und  $\beta_1$ -Adrenozeptor in Zelllinien *in vitro*.
- 2) Auswahl verschiedener siRNA-Moleküle gegen die mRNA der o.g. Gene unter der Berücksichtigung der von Tuschl etablierten Regeln (Tuschl et al. 1999; Elbashier et al. 2001b).
- 3) Transfektion der siRNA-Moleküle mittels Lipofektion.
- 4) Evaluation des *Knockdowns* auf RNA- und Proteinebene.
- 5) Stabile intrazelluläre Expression von shRNAs gegen Inhibitor-1 und  $\beta_1$ -Adrenozeptor mit dem Expressionsplasmid pALsh.

## 2 Methoden

### 2.1 PCR

#### 2.1.1 Primer

Alle Primer wurden mit Hilfe der Software „Primerexpress“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) gestaltet und vollständig synthetisiert erworben (MWG Biotech, Ebersberg).

Primer für die Amplifikation des  **$\beta_1$ -Adrenozeptors der Maus** (*Accession code*: NM\_007419)

mADRB1_Forward 1	5' CCT CCG CAG CTC GGC ATG 3'	$T_m$ 63 °C
mADRB1_Forward 2	5' CTC CTG GGG TGC TCC CCA G 3'	$T_m$ 65 °C
mADRB1_Reverse 1	5' GTA GAG AGC CAG GCT CTC TG 3'	$T_m$ 61 °C
mADRB1_Reverse 2	5' GCT CTG CAT CCC TAG AGG AAG 3'	$T_m$ 62 °C

Primer für die Amplifikation des **menschlichen  $\beta_1$ -Adrenozeptors** (*Accession code*: NM\_000684)

hADRB1_Forward	5' ATG GGC GCG GGG GTG CTC GT 3'	$T_m$ 68 °C
hADRB1_Reverse	5' CTA CAC CTT GGA TTC CGA GGC 3'	$T_m$ 64 °C

Sequenzierungsprimer  **$\beta_1$ -Adrenozeptor** im pIRES2-EGFP

hADRB1_seq1_Forward	5' TAA CGG CCG CCA GTG TG 3'	$T_m$ 58 °C
hADRB1_seq1_Reverse	5' CAG CCC CAT GAC CAG GTC 3'	$T_m$ 61 °C
hADRB1_seq2_Forward	5' GAC GCT CAC CAA CCT CTT C 3'	$T_m$ 59 °C
hADRB1_seq2_Reverse	5' GAA GAC GCC CAT GAT GAT 3'	$T_m$ 57 °C
hADRB1_seq3_Forward	5' GAG CAG AAG GCG CTC AAG 3'	$T_m$ 58 °C
hADRB1_seq3_Reverse	5' GAT CTC CTC GTT CCC CTG 3'	$T_m$ 58 °C

Sequenzierungsprimer für den **pALsh**

pALsh_seq_Forward	5' TGT CGC TAT GTG TTC TGG GAA A 3'	$T_m$ 58 °C
pALsh_seq_Reverse	5' CCA AGC TCG GAA TTA ACC CTC 3'	$T_m$ 60 °C

#### 2.1.2 Reaktionsansatz

Für diese Arbeit wurde die „Ampli Taq Gold“ Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA) verwendet. Der Puffer und die Magnesiumchloridlösung für die Reaktion wurden mit der Polymerase mitgeliefert.

##### PCR-Ansatz

dNTPs	0,2 mM je Nukleotid
10x Puffer	1x
MgCl <sub>2</sub>	3 mM
Forwardprimer	0,2 $\mu$ M
Reverseprimer	0,2 $\mu$ M
Taqpolymerase	0,1 IU/ $\mu$ l
Template	zwischen 5 ng und 500 ng



### 2.1.3 PCR Programm

	Temperatur [°C]	Dauer	Anzahl der Zyklen
Präinkubation	94	10 min	1
Denaturierung	94	30 sek	35
Annealing	55	1 min	35
Synthese	72	1 min	35
Extinktion	72	10 min	1

**Tabelle 1:** PCR Temperaturbedingungen für „GeneAmp® PCR System 9700“ (Applied Biosystems, Foster City, USA)

Der Annealingschritt ist hier mit einer Temperatur von 55 °C angegeben. Diese variierte aber je nach der Schmelztemperatur  $T_m$  der Primer. Die Annealingtemperatur wurde 5 °C unter der  $T_m$  des Primers gewählt.

### 2.1.4 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung des Erfolgs einer PCR wurden die PCR Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Dieses wurde aus TAE Puffer, in dem 1% Agarose gelöst wurde, gegossen. Zur späteren Darstellung der DNA wurden 0,03% Ethidiumbromid zugegeben, das mit der DNA interkaliert und unter UV-Strahlung orange leuchtet.

Die DNA selbst wurde mit 20% Ladefarbe vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese dauerte je nach Gelgröße etwa eine Stunde bei einer Spannung von 80 V. Als DNA-Standard wurde „GeneRuler 1 kb DNA Ladder“ sowie „GeneRuler 100 Bp DNA Ladder“ (Fermentas, St. Leon-Rot) verwendet.

#### TAE Puffer

EDTA	0,1 M
TRIS	2 M
Essigsäure	1 M
in wässriger Lösung	

#### Ladefarbe

Bromphenolblau	75 mg
Xyclencyanol	25 mg
Glycerol	100 ml

### 2.1.5 Sequenzierung

Die DNA wurde von einem kommerziellen Sequenzierdienst sequenziert (MWG Biotech, Ebersberg). Dazu wurde zunächst eine PCR zur Amplifikation der Ziel-DNA durchgeführt. Die DNA wurde anschließend mit Isopropanol gefällt, mit 70% Ethanol gereinigt, getrocknet und schließlich mitsamt Primern versandt.

## 2.2 Klonierungen

### 2.2.1 Plasmid Vektoren

Für die Versuche wurden der PCR2.1 Vektor, der pIRES2-EGFP Vektor, der pALsh Vektor, und der pcDNA3 Vektor verwendet (Abbildung 9,11).

Der **pIRES2-EGFP** Vektor verfügt über einen CMV Promotor, der dem Cytomegalievirus abstammt und eine starke Proteinexpression bewirkt. Ihm folgt die *Multiple Cloning Site*. Des Weiteren enthält er ein GFP Gen, das über ein IRES von der *Multiple Cloning Site* getrennt ist. IRES ist die Abkürzung von „*Internal Ribosomal Entry Site*“. Hier stoppt die Translation des Gens. Nach dem IRES wird die Translation automatisch wieder aufgenommen, sodass mit einem Promotor zwei verschiedene Proteine exprimiert werden. Der pIRES2-EGFP kodiert ferner für eine Kanamycin- und eine Neomycinresistenz.

Bei dem **pcDNA3** Vektor handelt es sich um einen weit verbreiteten Expressionsvektor, der einen CMV Promotor, jedoch kein GFP Gen enthält. Er trägt als Selektionsgene eine Ampicillin- und eine Neomycinresistenz.

In den **PCR2.1** Vektor konnten PCR Produkte direkt kloniert werden. Der PCR2.1 wurde in linearisierter Form geliefert und hat an seinen beiden Enden einen T-Überhang der mit den von der Taq-Polymerase geschaffenen A-Überhängen reagieren kann.

Der **pALsh** Vektor wurde von Herrn Dr. Alexander Laatsch zur Verfügung gestellt und ist ein modifizierter pSUPER Vektor (Laatsch et al. 2004). Der Vektor trägt einen H1 Promotor zur Expression von shRNA. Als Selektionsmarker trägt der pALsh ein Ampicillinresistenzgen.

### 2.2.2 Inserts

In dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Inserts zum Einsatz:

Ein PCR-Produkt von **Inhibitor-1 (Accession code: NM\_021391)** der Maus, das am 5' Ende zusätzlich mit einer *KpnI* Schnittstelle, sowie am 3' Ende mit einer *NotI* Schnittstelle versehen worden und über diese bereits in den PCR2.1 Vektor kloniert war, wurde freundlicherweise von Frau Katrin Wittköpper aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Der **humane  $\beta_1$ -Adrenozeptor** (**Accession code: NM\_000684**) wurde freundlicherweise von Herrn Prof. Stefan Engelhardt aus Würzburg zur Verfügung gestellt.

### 2.2.3 Restriktionsverdau

In dieser Arbeit kamen die folgenden Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Ipswich, USA) zum Einsatz: *XbaI*; *NotI*; *KpnI*; *SacI*; *BseRI*; *HindIII*; *XhoI*; *EcoRI*. Die Enzyme wurden mit den für die Reaktion notwendigen Puffern geliefert.

Ein Standardreaktionsansatz in Wasser umfasste 2 IU Restriktionsenzym pro  $\mu\text{g}$  DNA, 10% Reaktionspuffer, falls notwendig 10% BSA. Ein Verdau dauerte 1,5 h bei der angegebenen Reaktionstemperatur. Einige Enzyme waren in mehreren Puffern aktiv, sodass es möglich war, mit mehreren Enzymen gleichzeitig zu verdauen. Sollten die Fragmente für eine Ligation verwendet werden, erfolgte eine Gelaufreinigung.

### 2.2.4 Gelaufreinigung von DNA

Die Reaktionsprodukte aus PCR oder Restriktionsverdau wurden auf ein 1% Agarose Gel mit 1 cm breiten Geltaschen geladen. Nach einstündiger Elektrophorese bei 80 V wurden die DNA-Banden mittels UV-Licht dargestellt. Um die DNA vor der Strahlung zu schützen, wurde der äußere Rand des Gels abgeschnitten, unter UV-Belichtung die Banden markiert, dann wieder an das restliche Gel angelegt und anschließend mit Hilfe der Markierung die Bande als Gelblock ausgeschnitten. Die Gelelution erfolgte mit dem Kit „Nucleo SpinExtract II“ (Macherey-Nagel, Düren). Dabei wurde zunächst der Gelblock aufgelöst und, die DNA an eine Silica-Säule gebunden und anschließend in sterilem Wasser aus der Säule eluiert.

### 2.2.5 Ligation

Alle Ligationsreaktionen wurden mit T4-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA) durchgeführt. Dem Enzym liegt ein Reaktionspuffer bei, der das für die Reaktion benötigte ATP enthält. Ein Ligationsansatz enthielt 10% Ligase, 10% Puffer, Backbone und Insert. Das molare Verhältnis von Backbone zu Insert betrug drei zu eins. Der Ansatz wurde mit Wasser zu 10  $\mu\text{l}$  ergänzt und über Nacht bei 14 °C inkubiert.

Da die Ligation von sehr kleinen Oligonukleotiden schwierig ist, wurde für die Ligation des pALsh ein zyklischer Temperaturverlauf (Laatsch 2005) gewählt. Dabei wird die Temperatur in möglichst kleinen Schritten von 4 °C auf 21 °C erhöht und wieder auf 4 °C gesenkt. Dieser Temperaturzyklus wurde 10-fach wiederholt. Bei Temperaturstufen über 17 °C wurde nur kurz verweilt, um die Ligase nicht zu inaktivieren.

## 2.2.6 Herstellung von LB-Medium und Agarplatten

### LB-Medium für Schüttelkulturen

Trypton	1,0% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	170 mM

in wässriger Lösung mit Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt. Anschließend wurde die Lösung im Autoklaven sterilisiert.

### LB-Agarplatten

15 g Agar mit LB-Medium ad 1000 ml

Die Lösung wurde autoklaviert und nach dem Abkühlen auf 37 °C mit Ampicillin oder Kanamycin versetzt. Die Endkonzentration von Ampicillin betrug dabei 100 mg/l, die von Kanamycin 50 mg/l.

## 2.2.7 Herstellung thermokompetenter E. Coli

Zunächst wurden Bakterien mit einem Drei-Ösen-Austrich auf einer Agarplatte ohne Antibiotikazusatz ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einige Klone in 25 ml LB-Medium überführt und unter Schütteln bei 37 °C für 6 h vermehrt. Von dieser Starterkultur wurde 1 ml in 250 ml SOB-Medium überführt und bei 22 °C über Nacht geschüttelt. Am nächsten Tag wurde zu erst stündlich, später halbstündlich die optische Dichte der Suspension im Photometer bestimmt. Bei einer optischen Dichte von 0,45 wurden die Bakterien auf Eis gestellt und somit das Wachstum gestoppt. Die Bakterienlösung wurde bei 4000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Medium wurde abgegossen und die Bakterien in 80 ml eiskaltem Resuspensionspuffer durch vorsichtiges Schwenken resuspendiert. Die Suspension wurde erneut wie oben zentrifugiert und die Bakterien anschließend in 20 ml eiskaltem Resuspensionspuffer resuspendiert. Schließlich wurden 1,5 ml DMSO zugefügt und die Bakterien in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Die folgenden Lösungen wurden eingesetzt:

### Resuspensionspuffer (Inoue et al. 1990)

MnCl <sub>2</sub>	5,44 g (55 mM)
CaCl <sub>2</sub>	1,10 g (15 mM)
KCl	9,33 g (250 mM)
PIPES 0,5 M, pH 6,7	10 ml (10 mM)

Der PIPES Puffer wurde zunächst als 0,5 M PIPES Lösung eingewogen und anschließend mit 5 M Kalilauge auf den pH-Wert von 6,7 eingestellt. Der Puffer wurde sterilfiltriert.

### SOB-Medium

Trypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,5 g (8,5 mM)
KCL	186 mg (2,5 mM)

Die Substanzen wurden in destilliertem Wasser gelöst, der pH-Wert mit 5 M Natronlauge auf 7,4 eingestellt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Die Lösung wurde autoklaviert und mit 5 ml einer 2 M MgCl<sub>2</sub>-Lösung versetzt.

Die beiden folgenden Bakterienstämme wurden eingesetzt:

DH10B (Invitrogen, Carlsbad, USA): F<sup>-</sup>, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara,leu) 7697, galU, galK, λ, rpsL, nupG

Top10F (Invitrogen, Carlsbad, USA): F<sup>-</sup>, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, araD139, Δ(ara,leu) 7697, galU, galK, rpsL (STr<sup>R</sup>), endA1, nupG

### **2.2.8 Transformation**

Für die Transformation wurden thermokompetente E. Coli Bakterien vom Typ DH10B oder Top10F verwendet. Dabei wurden 100 µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut. 5 µl Ligationsansatz wurden vorsichtig hinzugefügt und dabei die Lösungen möglichst wenig vermengt, um in der Mischung einen Gradienten der DNA zu erzeugen. Nach 30 min Inkubationszeit wurden die Bakterien für 30 sec auf 42 °C erhitzt und danach kurz auf Eis abgekühlt. Zum Transformationsansatz wurden 300 µl LB-Medium hinzugegeben. Anschließend wurde 1 h bei 37 °C inkubiert, um im Plasmid enthaltene transformierte Resistenzgene zu exprimieren.

Schließlich wurden die Bakterien auf Agarplatten, die das entsprechende Selektionsantibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C temperiert. Nach 16 h Wachstum waren klonale Kolonien von resistenten Bakterien zu erkennen.

### **2.2.9 Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation**

Je eine Bakterienkolonie wurde mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 10 ml LB-Medium mit Selektionsantibiotikum (Konzentration wie bei der Herstellung von Agarplatten, siehe oben) überführt. Die Lösung wurde für 16 h bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt.

### **2.2.10 Mini-Plasmidpräparation**

Hier wurden fertige Lösungen (Qiagen, Hamburg) verwendet.

Lösung „P1“: 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0

Lösung „P2“: 200 mM NaOH, 3,5 mM SDS

Lösung „P3“: 3 M Kaliumacetat;

Dabei wurden 2 ml der Bakteriensuspension gemäß Herstellerangaben pelletiert, das LB-Medium abgesaugt und die Bakterien anschließend in 200 µl der Lösung Puffer „P1“ resuspendiert. Die Zellen wurden mit 200 µl der Lösung „P2“ lysiert und die Lyse anschließend mit 200 µl Puffer „P3“ gestoppt. Der entstehende weiße Niederschlag aus präzipitierten Proteinen und Bakterienfragmenten wurde abzentrifugiert. Der Überstand (etwa 300 µl), der die DNA enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und mit der gleichen Menge reinem Isopropanol versetzt und bei 4 °C wie oben zentrifugiert. Die ausgefallene DNA war als Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes zu erkennen. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das Pellet wurde mit Ethanol 70% v/v gewaschen, nochmals zentrifugiert, getrocknet und in 30 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm. Positive Klone wurden mittels Restriktionsanalyse verifiziert.

### **2.2.11 Maxi-Plasmidpräparation**

Hierfür wurde eine Schüttelkultur von 250 ml benötigt, die am Vortag aus LB-Medium sowie 1 ml einer kleinen Vorkultur angeimpft wurde. Der Ansatz enthielt ferner ein entsprechendes Selektionsantibiotikum (Ampicillin 100 mg/l oder Kanamycin 50 mg/l). Die Bakterien wurden zentrifugiert und aus dem Pellet mit dem Kit „Nucleo Bond PC 500“ (Macherey-Nagel, Düren) nach Herstellerangaben isoliert.

## **2.3 Zellkultur**

In den Experimenten dieser Arbeit wurden HEK293a Zellen, HEK293 Zellen, NIH3t3 Zellen, sowie CHO Zellen verwendet. Kardiomyozyten wurden aus Herzen neonataler Ratten präpariert und von Frau Denise Jühr zur Verfügung gestellt. Es handelt sich dabei um primäre, sich nicht mehr teilende Zellen. HEK293 Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen, HEK293a Zellen sind modifizierte HEK293, die über bessere Adhäsionseigenschaften verfügen, sowie genetisch für die Generierung von Adenoviren optimiert sind. Im Gegensatz zu Kardiomyozyten sind HEK293 Zellen eine immortale Zelllinie, die *in vitro* beliebig vermehrt werden kann. NIH3t3 Zellen sind Mäusefibroblasten, bei den CHO Zellen handelt es sich um Hamsterfibroblasten. Beide Zelllinien sind ebenfalls immortal.

### 2.3.1 Aufzucht und Passagierung

Alle Zellkulturmedien wurden gebrauchsfertig bezogen (Invitrogen, Carlsbad, USA). Die NIH3t3 Zellen, sowie die HEK293 und HEK293a Zellen wurden in Dulbeccos MEM Medium kultiviert. Dem Medium wurden 10% inaktiviertes fetales Kälberserum und 1% einer 0,2 M Glutaminlösung zugesetzt. Zum Schutz vor Kontamination enthielt das Medium 100 IU/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Die CHO Zellen wuchsen in F-12 Medium mit einem Zusatz von Penicillin und Streptomycin. Die Temperatur des Brutschranks betrug 37 °C, bei einem CO<sub>2</sub> Gehalt von 7%.

Bei einer Zelldichte von 80% bis 90% wurden die Zellen passagiert. Dabei wurde zunächst mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die HEK293 Zellen mit Natriumcitratlösung oder im Falle von NIH3t3 Zellen, CHO Zellen und HEK293a Zellen mit einer 0,05% Trypsinlösung (Invitrogen, Carlsbad, USA) von den Kulturschalen abgelöst. Mit Dulbeccos MEM ohne weitere Zusätze wurde die Enzymwirkung gestoppt und die Zellen anschließend bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in neuem Nährmedium resuspendiert und wieder auf Kulturschalen ausplattiert.

Bei NIH3t3 Zellen mussten alle Kulturschalen mit einer Kollagenschicht überzogen sein, da andernfalls die Zelladhäsion nicht sicher gewährleistet war. Die Schalen wurden hierzu mit einer Lösung von Typ 1 Rattenschwanzkollagen (Upstate, New York, USA), mit einer Konzentration von 50 mg/l in PBS befeuchtet. Die Schalen wurden 20 min im Brutschrank angewärmt. Dann wurde die Lösung abgesaugt und die Schalen unter einer Sterilwerkbank getrocknet.

#### PBS

NaCl	136 mM
KCl	2,7 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	6,5 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,4 mM

#### Natriumcitratlösung

Na <sub>3</sub> Citrat	22 mM
KCl	0,14 M

jeweils in wässriger Lösung, autoklaviert.

### 2.3.2 Adenovirale Infektion von Zellen

Ein Adenovirus, das CMV Promotor-abhängig für den Inhibitor-1 der Ratte kodiert, wurde von Frau Anna Bednorz aus unserer AG generiert und zur Verfügung gestellt.

### **2.3.3 Transfektion**

Alle Transfektionsexperimente wurden mit „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. Für eine maximale Transfektionseffizienz bei Plasmid-DNA sollte die Zelldichte möglichst hoch, d.h. bei etwa 90% liegen. Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in antibiotikafreiem Medium ausplattiert. Sollten bei der Transfektion siRNA oder shRNA Effekte untersucht werden, erfolgte die Aussaat in zuvor kollagenisierte 12-Well Schalen. Die Transfektion wurde gemäß Herstellerangaben von „Lipofectamine 2000“ durchgeführt. Die entsprechende DNA oder RNA-Menge wurde in Opti MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) gelöst. In einem zweiten Ansatz wurde „Lipofectamine 2000“ in Opti MEM gelöst. Nach 5 min wurden die Lösungen vermischt und 25 min inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz direkt auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert.

### **2.3.4 Selektion**

Die Selektion der Zellen für die Generierung einer stabilen Zelllinie erfolgte mittels Neomycin (Roth, Karlsruhe) 1 mg/ml Medium oder Geneticin (Invitrogen, Carlsbad, USA) 1 mg/ml Medium. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion 1 zu 5 gesplittet; weitere 24 h später wurde das Selektionsmedium zugegeben. Auch stabile Zelllinien wurden weiterhin in Selektionsmedium gehalten.

### **2.3.5 Behandlung der Zellen mit Cyclohexamid**

Cyclohexamid (Sigma, München) inhibiert die Peptidyltransferase bei Eukaryonten und damit die komplette zelluläre Proteinbiosynthese. Misst man nun im Westernblot den Gehalt von einem bestimmten Protein im gesamten Proteinlysate einer Zellkultur, dokumentiert man ausschließlich dessen Abauprozess. Das Cyclohexamid lag in DMSO gelöst vor, sodass Kontrollkulturen ebenfalls mit einer äquivalenten Menge DMSO versetzt wurden.

### **2.3.6 Handhabung von Kardiomyozyten**

Kardiomyozyten wurden stets als Zellsuspension übernommen. Um in der Kultur möglichst wenige Fibroblasten zu züchten, wurden die Zellen in eine Kulturschale überführt und 1 h bei 37 °C präinkubiert. Dabei wurden die Fibroblasten adhärent. Dieser Prozess dauerte bei Kardiomyozyten erheblich länger, sodass die Zellsuspension mit deutlich reduzierter Fibroblastenzahl vorsichtig wieder von der Schale abgesaugt und auf kollagenisierte Schalen ausplattiert werden konnte. Kardiomyozyten wurden in demselben Medium wie HEK293 Zellen kultiviert und waren nach 3-4 Tagen in Kultur bereit für die Verwendung in weiteren Experimenten.



## 2.4 Proteinbiochemie

### 2.4.1 Zellernte

Die Zellen wurden vor der Ernte in PBS gewaschen. Geerntet wurde mit Lysepuffer. Dabei wurde für eine 1,5 cm Schale 300  $\mu$ l Puffer verwendet. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst.

#### Lysepuffer

TRIS	30 mM
NaF	30 mM
Glycerol	10%
EDTA	5 mM
SDS	3%

### 2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford 1976)

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Bradford besteht darin, dass sich das Absorptionsmaximum von Coomassie brilliant blue G-250 bei Anwesenheit von Proteinen von 465 nm hin zu 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm verhält sich proportional zur Proteinkonzentration der Lösung. Für die Anfertigung dieser Arbeit wurde das fertige Bradfordreagenz „Nanoquant“ (Roth, Karlsruhe) verwendet. Eine Eichkurve wurde mit Rinder IgG (Sigma, München) erstellt. Dazu wurden 10 mg IgG in 2,94 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Proteinkonzentration betrug dann 3,4 mg/ml. Insgesamt wurden 7 Standardwerte sowie der Leerwert in Doppelbestimmung gemessen:

Standard 1:10 verdünnt	0 $\mu$ l	5 $\mu$ l	10 $\mu$ l	20 $\mu$ l	30 $\mu$ l	40 $\mu$ l	50 $\mu$ l	60 $\mu$ l
0,1 M Natron- Lauge	800 $\mu$ l	795 $\mu$ l	790 $\mu$ l	780 $\mu$ l	770 $\mu$ l	760 $\mu$ l	750 $\mu$ l	740 $\mu$ l
Bradfordreagenz	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
Erwartete Proteinkonzentration	0 mg/ml	85 mg/ml	170 mg/ml	340 mg/ml	510 mg/ml	680 mg/ml	850 mg/ml	1020 mg/ml

**Tabelle 2:** Bradford Standardkurve

Nach Inkubation für 10 min wurde die Absorption in Einmalküvetten (Sarstedt, Nürnberg) in dem Spektrometer „Smart Spec® 3000“ (Bio Rad, München) bei 595 nm gemessen. Aus der Absorption ließ sich nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Proteinkonzentration errechnen. Ein Reaktionsansatz enthielt dabei 790  $\mu$ l 0,1 M Natronlauge, 10  $\mu$ l 1:10 vorverdünnte Proteinprobe und 200  $\mu$ l Bradfordreagenz. Die Proben wurden in NaOH so vorverdünnt, dass die gemessenen Absorptionen im mittleren Bereich der Standardkurve lagen.

### 2.4.3 Diskontinuierliche SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Ziel der Elektrophorese war die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Elektrophoretisch werden Proteine prinzipiell nach ihrer Ladung aufgetrennt. Vor der Beladung des Gels wurden die Proteine mit SDS zur Reaktion gebracht. Dadurch wurden sie von außen gleichmäßig mit negativ geladenen Dodecanylsulfatresten überzogen und die Wanderungsgeschwindigkeit im Gel war proportional zur Molekülmasse. Alle Proben wurden mit sechsfach konzentriertem Ladepuffer zur Reaktion gebracht. Für eine vollständige Lösung der Proteine und die Zerstörung aller Sekundär- und Tertiärstrukturen war eine Erhitzung der Proben auf 95 °C für 5 min notwendig.

Das Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese liegt in den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Gele. Im Sammelgel liegt das Glycinion des Laufpuffers aufgrund des niedrigen pH-Werts des Gels als Zwitterion vor und läuft folglich sehr viel langsamer im Gel als die Proteine. Die Chloridionen des TRIS-Puffers laufen aufgrund ihrer geringen Größe und negativen Ladung sehr viel schneller als die Proteine. Die beiden Ionen bilden nun zwei Lauffronten, zwischen denen sich wiederum eine Potentialdifferenz ausbildet, die dazu führt, dass die Proteine zwischen beiden Fronten gehalten und verdichtet (gestapelt) werden. Alle Proteine laufen im Sammelgel gleich schnell. Im Trenngel liegt das Glycin aufgrund des höheren pH-Wertes negativ geladen vor. Jetzt „überholt“ es die Proteine. Die Potentialdifferenz verschwindet und alle Proteine werden nun nach ihrer Größe aufgetrennt.

Zuerst wurde ein Trenngel gegossen und darauf nach dessen Aushärten ein Sammelgel, in dem durch einen Kamm Taschen zur Beladung mit den Proben freigehalten wurden.

Für die Elektrophorese wurde eine Laufkammer (Biorad, München) verwendet, die mit Laufpuffer aufgefüllt wurde. Die zu untersuchenden Proben wurden gemäß Proteinbestimmung in gleicher Proteinmenge, etwa 50 µg pro Geltasche, geladen. In eine Tasche wurde ein Proteinstandard (Biorad, München), der farbige Banden definierter Größe auf dem Gel erzeugt, geladen. Somit war später eine Einschätzung der Größe des detektierten Proteins möglich. An das Gel wurde eine Spannung von 80 V für 10 min und dann 120 V für 2 h angelegt. Anschließend wurden die geladenen Proteine im Gel entweder auf eine Nitrocellulosemembran geblottet oder mit Coomassie Färbereagenz gefärbt

Benötigte Lösungen:

### 6x Ladepuffer (Lämmli 1970)

SDS	0,4 M
Bromphenolblau	1 mM
Glycerol	6,5 M
TRIS	0,6 mM
DTT	0,6 M

### Sammelgel

TRIS	1,25 M, pH6,8
Acrylamid	0,73 M
SDS	3,5 mM
Ammoniumpersulfat	4,4 mM
TEMED	6 µM

### Trenngel

TRIS	0,375 M, pH 8,8
Acrylamid	1,7 M
SDS	3,5 mM
Ammoniumpersulfat	4,4 mM
TEMED	2,4 µM

### Laufpuffer

TRIS	125 mM
Glycin	192 mM
SDS	10 mM

### Coomassie Färbereagenz

Coomassie brilliant blue R 250	3 mM
Essigsäure	1,6 M
Methanol	14 M

#### **2.4.4 Blotten von Proteinen auf Nitrocellulosemembran**

Die im SDS Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran „Protran® 0,45 µm Porengröße“ (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Eine Quellung des Gels wurde durch das im Transferpuffer enthaltene Methanol verhindert. Dabei sollte das Gel auf der Seite der Kathode, die Membran anodenseitig liegen. Die Blotkammer wurde vollständig mit eiskaltem Transferpuffer aufgefüllt und zusätzlich ein Eisblock in einer Kunststoffform in die Lösung gelegt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,4 A für 90 min.

Um die übergegangenen Proteine sichtbar zu machen, wurde die Membran für 5 min mit Ponceau S gefärbt und die Höhe der Banden des Proteinstandards zur späteren Identifikation des Molekulargewichtes spezifisch gefärbter Banden dauerhaft markiert. Nach kurzer Inkubation der Membranen mit Ponceau S-Lösung wurde zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen. Dabei löste sich überschüssiger, nicht an Proteine gebundener Farbstoff ab, während die Proteinbanden deutlich zu erkennen blieben.

Anschließend wurde die Membran fotografiert. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran abschließend mit TBS mit Tween 20 (TBST) gewaschen.

Benötigte Lösungen:

### Transferpuffer

TRIS	25 mM
Glycin	192 mM
Methanol	12,5 M

### TBST 0,1%

TRIS	0,1 M
NaCl	0,15 M
Tween 20	0,9 mM

in wässriger Lösung mit 37% Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt.

### Ponceau S-Lösung

Ponceau S	26 mM
Trichloressigsäure	30 mM

## **2.4.5 Blocken der Membran**

Hierbei sollten noch freie Proteinbindungsstellen auf der Membran besetzt werden. Geblockt wurde unter stetigem Schwenken mit einer Lösung von 5% Milchpulver (Roth, Karlsruhe) in TBST 0,1% für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran zweimal 5 Minuten mit TBST 0,1% gewaschen.

## **2.4.6 Immundetektion der Membran**

Die Inkubation der primären, gegen das jeweilige Protein spezifischen Antikörper, erfolgte in der Regel über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C. Die Verdünnungen und Lösungsmittel der einzelnen Antikörper sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit TBST für je 10 min folgte die Inkubation mit dem sekundärem Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettichs gekoppelt war, in Trockenmilch-Lösung für 1 h. Anschließend wurde dreimal für je 10 min in TBST gewaschen und die Membran für 5 min mit dem „ECL+“ Westernblot Detektions-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert, das ein Substrat der Peroxidase enthielt, welches nach Umsetzung eine Chemolumineszenz zeigt. Zur Visualisierung wurden Filme (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), je nach Stärke der Lumineszenz für 2 bis 30 min, belichtet und anschließend entwickelt. Eine quantitative Erfassung und Auswertung der Banden erfolgte mit der „GeneSnap“ Apparatur (Syngene, Cambridge).

	Verdünnung	Erwartete Proteingröße	2. Antikörper
Anti-Inhibitor-1	1:1000	32 kDa	Anti-Rabbit 1:5000
Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor (Santa Cruz, Kalifornien, USA)	1:500	65 kDa	Anti-Rabbit 1:5000
Anti- $\beta$ -Aktin (Sigma, München)	1:5000	45 kDa	Anti-Mouse 1:5000

**Tabelle 3:** Verwendete Antikörper

## 2.5 Quantitative RNA-Messung

Die Messung der zellulären mRNA-Konzentration eines bestimmten Gens erfolgte mittels quantitativer Echtzeit PCR.

### 2.5.1 Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen

Die Kulturschalen wurden auf Eis gestellt und die Zellen mit PBS gewaschen. Danach wurden 300  $\mu$ l RNAzol (Wak-Chemie, Steinbach) je 4 cm<sup>2</sup> Zellrasen auf die Schalen gegeben und die Zellen unter dem Abzug mit dem Zellschaber von der Kulturschale entfernt. Die Suspension wurde in 1,5 ml Gefäße (Eppendorf, Hamburg) überführt und mit 30  $\mu$ l Chloroform versetzt. Anschließend wurde ausgiebig gevortext und dann bei 13000 rpm und einer Temperatur von 4 °C 15 min zentrifugiert.

Die hydrophile RNA-haltige Phase wurde vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt. Die hydrophobe phenolische Phase wurde verworfen. Der Überstand wurde mit dem gleichen Volumen eisgekühltem Isopropanol versetzt und nach erneutem, kurzen Schütteln wiederum für 10 min inkubiert. Schließlich wurde die RNA in einer Tischzentrifuge pelletiert (10 min, 4 °C, 13000 rpm). Der klare Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 300  $\mu$ l Ethanol (70%) gewaschen. Wiederholt wurde das Gefäß kurz geschüttelt (Vortex), um das präzipitierte Pellet vom Gefäßboden zu lösen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 4 °C, 13000 rpm) wurde der Überstand verworfen und das Pellet bei Raumtemperatur für 5-10 min getrocknet. Das Präzipitat wurde in 25  $\mu$ l DEPC Wasser gelöst. 2  $\mu$ l wurden abgenommen und mit DEPC Wasser 1:50 verdünnt, um die RNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm zu ermitteln. Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40  $\mu$ g/ml (Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt, und der Quotient OD 260/OD 280 gebildet, der bei allen Versuchen zwischen 1,4 und 2,0 lag.

### 2.5.2 Reverse Transkription der präparierten RNA

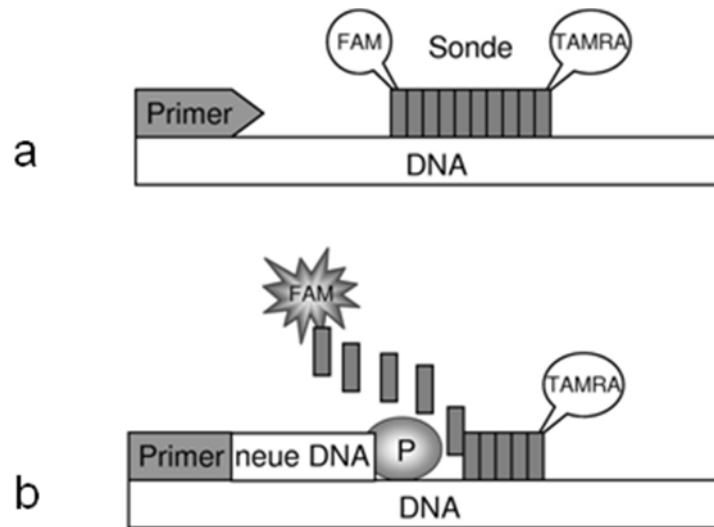
Bei der reversen Transkription wird die RNA in cDNA umgeschrieben und damit der PCR zugänglich gemacht. Es wurde das Kit „Super Script First-Strand Synthesis System for RT PCR“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Alle Schritte wurden gemäß Herstellerangaben vollzogen und dabei stets 500 ng RNA eingesetzt. Als Primer für die reverse Transkription wurden Oligo dTs verwendet. Diese können an das Poly-A-Ende einer mRNA binden. Am Ende der Reaktion lag die cDNA in 20 µl Reaktionsgemisch gelöst vor.

### 2.5.3 Echtzeit PCR

#### Prinzip der Echtzeit PCR

Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer Echtzeit PCR der, wie oben beschrieben durch reverse Transkription erhaltenen, cDNA auf einem „ABI PRISM 7900 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) bestimmt. Dabei wurde die Amplifikation der DNA in Echtzeit quantifiziert. Zunächst musste für jedes zu detektierende Gen eine fluorogene Sonde konstruiert werden. Dabei handelte es sich um ein zur cDNA komplementäres Oligonukleotid von etwa 25 Basen, dessen 5' Ende mit einem fluoreszierenden *Reporter* Farbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) markiert war, während das 3' Ende einen *Quencher* Farbstoff (6-Carboxytetramethylrhodamin; TAMRA) trug. Bei der vollständigen Sonde wurde die Fluoreszenz, die der *Reporter* Farbstoff unter UV-Strahlung abgab, durch den *Quencher* aufgrund seiner räumlichen Nähe unterdrückt. Zu Beginn eines PCR-Zyklus hybridisierte die Sonde zunächst spezifisch mit dem komplementären Abschnitt des Matrizenstranges zwischen dem Forward- und dem Reverseprimer. Die „AmpliTaQ Gold“ DNA Polymerase, die zur Synthese des Gegenstranges eingesetzt wurde, hatte die Eigenschaft, in der Extensionsphase an die Zielsequenz hybridisierte DNA zwischen dem Primerpaar aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität zu hydrolysieren. (Abbildung 6). Durch die Hydrolyse der Sonde wurden *Reporter* und *Quencher* räumlich getrennt und es kam nach Anregung durch ultraviolettes Licht zu Fluoreszenz, die entsprechend der Akkumulation des PCR Produktes mit jedem PCR Zyklus anstieg und in Echtzeit während des gesamten PCR Laufes aufgezeichnet wurde. Durch die statistische Anlagerung der Sonde und Primer ist die Geschwindigkeit des Anstiegs der Fluoreszenz direkt proportional zur Expression des entsprechenden Gens. Ein übliches Quantifizierungsmaß, der in einem Reaktionsansatz enthaltenen cDNA, ist der ct-Wert. Das ist der Zeitpunkt des Laufes, zu dem die Fluoreszenz einen bestimmten

Schwellenwert (*Threshold*) übersteigt. Bei jedem PCR Zyklus wird die DNA verdoppelt. Es gilt also: Die Expression eines Gens ist proportional zu  $2^{-\text{(ct-Wert)}}$ .



**Abbildung 6: Prinzip der TaqMan PCR** (a) Zunächst hybridisiert die Sonde sequenzspezifisch mit dem Matrizenstrang. (b) Durch die Synthese neuer DNA wird die Sonde hydrolysiert und Reporter und Quencher getrennt, sodass unter UV-Strahlung ein Fluoreszenzsignal generiert wird (Abbildung aus Mühlhäuser 2004).

#### Design und Optimierung der Sonden und Primer

Die Auswahl von Sonden und Primern mit optimierter Schmelztemperatur, Sekundärstruktur, Basenzusammensetzung und Länge des Amplikons erfolgte mittels der Software „ABI Primer Express“ (Applied Biosystems, Foster City, USA). Alle Oligonukleotide wurden fertig synthetisiert erworben (MWG Biotech, Ebersberg). Um unspezifische Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden, wurden die Sonden für GAPDH und Inhibitor-1 so gewählt, dass ihre Zielsequenzen die Grenze zwischen zwei benachbarten Exons überschritten. Der  $\beta_1$ -Adrenozeptor liegt nur als einzelnes Exon vor (*Accession code*: NM\_007419). Deshalb war kein exonübergreifendes Primerdesign möglich. Zur Überprüfung der Spezifität der Primerpaare wurden Echtzeit PCR Reaktionen durchgeführt und die PCR Produkte auf einem zweiprozentigen Agarosegel analysiert. Bei nur einer sichtbaren Bande mit der Größe des erwarteten Amplikons wurde das Primerpaar als spezifisch angenommen.

Die folgenden Primer und Sonden (MWG Biotech, Ebersberg) wurden verwendet:

Primer für die Echtzeit PCR für Inhibitor-1 der Maus

ex1-I1 Taqm_Forward	5' CCA CGG AAG ATC CAG TTT ACG 3'	$T_m$ 60 °C
ex1-I1 Taqm_Reverse	5' GAC TGA TCA CTG GTC AGC ACA A 3'	$T_m$ 60 °C

Primer für die Realtime PCR für den  $\beta_1$ -Adrenozeptor des Menschen, der Maus und der Ratte

B1_Taqm_Forward	5' CGC CTC TTC GTC TTC TTC A 3'	$T_m$ 57 °C
B1_Taqm_Reverse	5' GGC AGT AGA TGA TGG GGT 3'	$T_m$ 60 °C

Primer für die Echtzeit PCR für GAPDH Maus (*Accession code*: NM\_008084)

mGAPDH_Taqm_Forward	5' ATG TTC CAG TAT GAC TCC ACT CAC G 3'	$T_m$ 63 °C
mGAPDH_Taqm_Reverse	5' GAA GAC ACC AGT AGA CTC CAC GAC A 3'	$T_m$ 65 °C

Primer für die Echtzeit PCR GAPDH Mensch (*Accession code*: NM\_002046)

Hier wurde eine fertige nicht primerlimitierte Mischung aus Primern und Sonde (Applied Biosystems, Forster City, USA) verwendet.

Sonde für die Echtzeit PCR Inhibitor-1 der Maus

I1_ex1/2 Sonde	5' AGG CGG CGG AGC AGA TTC GGA 3'	$T_m$ 68 °C
----------------	-----------------------------------	-------------

Sonde für die Echtzeit PCR GAPDH der Maus

mGAPDH_Taqm_Probe	5' AAG CCC ATC TTC CAG GAG CGA GAG CGA GA 3'	$T_m$ 70 °C
-------------------	--	-------------

Sonde für die Echtzeit PCR des  $\beta_1$ -Adrenozeptors für Maus, Mensch und Ratte

B1_Taqm_Sonde	5' CTG GGC TAC GCC AAC TCG GCC 3'	$T_m$ 68 °C
---------------	-----------------------------------	-------------

### Versuchsbedingungen

Die Zusammensetzung aller Reaktionsansätze ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Temperaturbedingungen waren bei jedem Lauf identisch und sind in Tabelle 5 aufgeführt. Annealing und Extension wurden dabei in einem einzigen Schritt zusammengefasst. Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft, Primer während der Elongation am Matrizenstrang zu stabilisieren. Da die Sonde nicht zusätzlich stabilisiert wird, wurde ihre Schmelztemperatur um mindestens 5 °C über der der Primer gewählt. Damit wurde sichergestellt, dass die Sonde an den Strang gebunden hatte, bevor die Replikation startete. Aus diesem Grunde wurde auch auf den Elongationsschritt verzichtet, da hier die Temperatur so hoch wäre, dass die Gefahr bestünde, die Sonde wieder vom Matrizenstrang zu trennen und damit eine Amplifikation ohne Sondenhydrolyse zu erzeugen. 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; 0,1; 0,01; 0,001; 0,0001 eingesetzt. Die aus der Standardreihe erhaltenen relativen Konzentrationen wurden für jede Probe auf die relative Konzentration von GAPDH als internen Standard bezogen. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung ausgeführt. Bei jedem PCR Lauf wurde eine NTC (*No Template Control*, Kontrolle ohne DNA, Wasser-Kontrolle) mitgeführt.



Um kleine Pipettierfehler auszugleichen, wurde zusätzlich ein passiver Referenzfarbstoff mitgeführt: ROX. ROX wird genau wie FAM und TAMRA bei 488 nm angeregt und emittiert bei 602 nm. Die Emission bleibt während des Laufs konstant und ist nur von der eingesetzten Menge ROX abhängig. ROX wurde unter dem Namen „Standard Dye for Quantitative PCR“ (Sigma, München) bezogen und lag als gebrauchsfertige Lösung vor. Alle weiteren Reagenzien, sowie die 384-Well-Platte, auf der alle Reaktionen stattfanden, wurden von Applied Biosystems, Forster City, USA bezogen. Der Puffer, sowie eine 25 mM MgCl<sub>2</sub> Lösung lagen der Taq-Polymerase „AmpliAq Gold“ bei. Die cDNA ist das Produkt der vorhergegangenen reversen Transkription. Pro Reaktionsansatz von insgesamt 10 µl wurde 1 µl der cDNA-Lösung eingesetzt.

	Reaktionsansatz GAPDH Mensch	Reaktionsansatz Inhibitor-1 Maus	Reaktionsansatz GAPDH Maus	Reaktionsansatz β <sub>1</sub> - Adrenzeptor Mensch/Maus
10x PCR Puffer	1 x	1 x	1 x	1 x
MgCl <sub>2</sub>	3 mM	3 mM	3 mM	3 mM
dNTPs (je Nukleotid)	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM	0,2 mM
ROX-Lösung	1%	1%	1%	1%
Taq-Polymerase	0,05 IU/µl	0,05 IU/µl	0,05 IU/µl	0,05 IU/µl
ex1-I1 Taqm_Forward	-	0,3 µM	-	-
ex1-I1 Taqm_Reverse	-	0,9 µM	-	-
I1_ex1/2 Sonde	-	0,2 µM	-	-
B1_Taqm_Forward	-	-	-	0,3 µM
B1_Taqm_Reverse	-	-	-	0,9 µM
B1_Taqm_Sonde	-	-	-	0,3 µM
mGAPDH_Taqm_ Forward	-	-	0,6 µM	-
mGAPDH_Taqm_ Reverse	-	-	0,4 µM	-
mGAPDH_Taqm_ Probe	-	-	0,2 µM	-
Fertig Mix GAPDH Mensch	2%	-	-	-
cDNA	10%	10%	10%	10%

**Tabelle 4:** Zusammensetzung der einzelnen Reaktionsansätze für die Echtzeit PCR

Die Reaktion wurde in dem „7900HT Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Forster City, USA) durchgeführt. Die anschließende Auswertung erfolgte mit dem Computerprogramm SDS2.1 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

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

**Tabelle 5:** Temperaturbedingungen für TaqMan PCR

## 2.6 siRNA-Moleküle

Die Auswahl der siRNA Sequenzen erfolgte nach einem Regelwerk, das von Tuschl (Tuschl et al. 1999, Elbashier et al. 2001b) veröffentlicht wurde. Die siRNA-Oligos waren danach 21 Basen lange RNA-Duplexe, bei denen jedoch nur 19 Basen komplementär waren. An jedem 3' Ende gab es einen Überhang von zwei Basen. Einer der beiden Stränge war exakt homolog zur Ziel-mRNA, der Sensestrang. Der Antisensestrang war folglich komplementär zur Ziel-mRNA. Der 3' Überhang des Antisensestranges musste nicht notwendigerweise komplementär zu der Zielsequenz sein. Betrachtet man die Ziel-mRNA, so hat eine ideale Zielsequenz das Motiv AA(N)<sub>19</sub>TT oder – falls das Zielgen eine solche Basenabfolge nicht enthält – NA(N)<sub>21</sub>. „N“ steht dabei für ein beliebiges Nukleotid. In dieser Arbeit wurden nur Sequenzen letzteren Typs verwandt. Die so generierte siRNA hatte dann die Basenfolge (N)<sub>19</sub>NN, wobei NN den 3' Überhang markierte. Der C/G Gehalt der siRNA lag zwischen 30% und 70%. Für eine effektive Herunterregulierung eines Gens war es notwendig, dass der Antisensestrang in den RISC inkorporiert wird. Dazu musste die siRNA in der 3' Region von Sense- und 5' Region des Antisensestrangs weniger stabil als am anderen Ende sein (Seite 10). Diese Strangstabilität konnte von einer Software berechnet (Schwarz et al. 2003) und mit einem thermodynamischen Wert ausgedrückt werden.

Um Interaktionen zwischen UTR Bindungsproteinen und RISC zu vermeiden, wurden nur siRNAs, die ihre Zielsequenz mindestens 100 Nukleotide nach dem ATG der mRNA hatten, verwendet.

Alle siRNA-Sequenzen wurden gebrauchsfertig bestellt (Ambion, Austin, USA). Es wurden vier Sequenzen gegen den Inhibitor-1 und drei Sequenzen gegen den  $\beta_1$ -Adrenozeptor erstellt. Als Negativkontrolle wurden die Nukleotide einer Sequenz gegen den  $\beta_1$ -Adrenozeptor ( $\beta_1$ -AR #1) willkürlich zusammengesetzt. Die Sequenz wurde einer BLAST-Suche unterzogen, um sicherzustellen, dass kein anderes Gen beeinflusst wird.

Die Anti- $\beta_1$ -siRNA-Sequenzen wurden so ausgewählt, dass sie sowohl zum menschlichen, als auch zum  $\beta_1$ -Adrenozeptor der Maus homolog waren. So konnten

sie *in vitro* an Zelllinien evaluiert werden, die den humanen  $\beta_1$ -Adrenozeptor überexprimieren und trotzdem später *in vivo* zur Behandlung einer Maus herangezogen werden. Die Sequenzen gegen den Inhibitor-1 affektieren, bis auf die vierte, die auch gegen den Inhibitor-1 der Ratte gerichtet ist, nur mRNA der Maus.

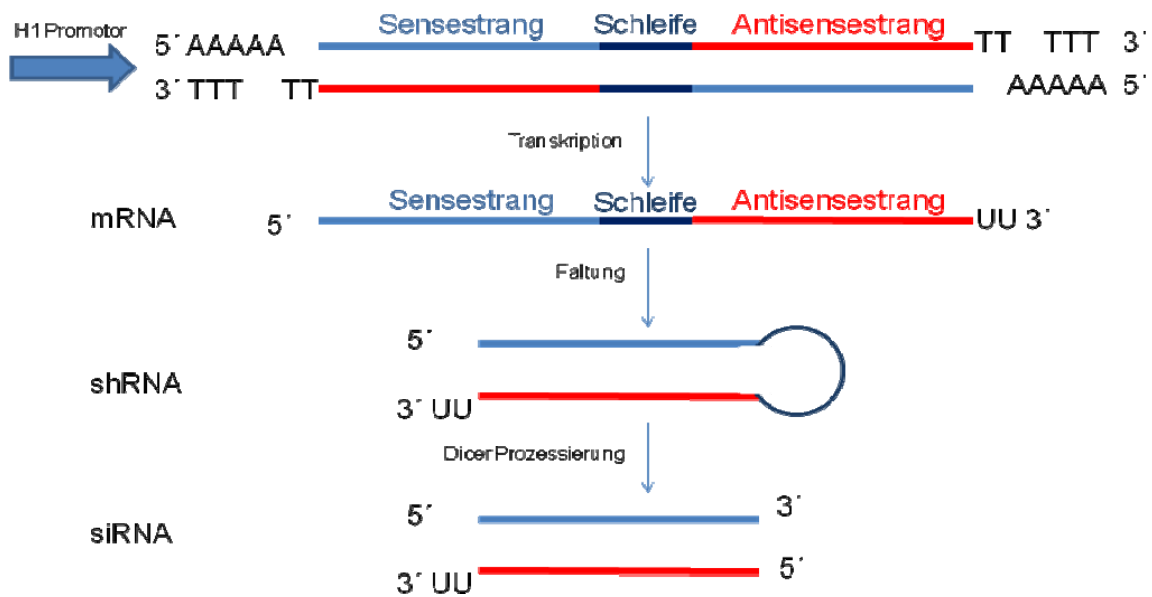
In Klammern hinter jeder Sequenz ist die Differenz der Bindungsenergie von Sense- und Antisensestrang (thermodynamischer Wert) zwischen beiden Enden des Oligos in kcal/mol angegeben.

I-1 #1	Sense	5'	ggaccacaccacccaugaauu	3' (-5,2)
	Antisense	3'	uuccuggugugggugguacu	5'
I-1 #2	Sense	5'	ccacaccacccaugaagauu	3' (-3,4)
	Antisense	3'	uuggugugggugguacuuccu	5'
I-1 #3	Sense	5'	guccaccuugucaaugucuuu	3' (-2,3)
	Antisense	3'	uucagguggaacaguacaga	5'
I-1 #4	Sense	5'	gggagccacugagagcacauu	3' (-1,6)
	Antisense	3'	uucccucggugacucucgugu	5'
$\beta_1$ -AR #1	Sense	5'	cgcucaccaaccucuucauuu	3' (-4,2)
	Antisense	3'	uugcgagugguuggagaagua	5'
$\beta_1$ -AR #2	Sense	5'	uggccuucguguaccugcguu	3' (-2,1)
	Antisense	3'	uuaccggaagcacauggacgc	5'
$\beta_1$ -AR #3	Sense	5'	cuggcugggcuacgccaacuu	3' (-1,8)
	Antisense	3'	uugaccgacccgaugcgguug	5'
Kontrolle	Sense	5'	ugcccauacuacaccuccuuu	3' (-1,9)
	Antisense	3'	uuacggguaugauguggagga	5'

## 2.7 shRNA-Expression

Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf ein Plasmid mit dem Namen pALsh zurückgegriffen, das sich vom pSUPER Vektor (Brummelkamp et al. 2002) ableitet und von Dr. Alexander Laatsch (Laatsch et al. 2004) modifiziert wurde. Es enthält einen H1 Promotor, der zur Expression einer mRNA führt, die weder über ein 5' Methylguanosintriphosphat noch am 3' Ende über eine Poly-A Kette verfügt. Dem H1 Promotor soll im Vektor ein Oligo, das die Sequenz einer shRNA enthält, folgen. Die Modifikation des pSUPER durch Dr. Laatsch bestand darin, zwei *BseRI* Schnittstellen in den Vektor einzufügen. Dadurch wird das Klonieren der Zielsequenzen erheblich vereinfacht (Laatsch et al. 2004).

Da die shRNA-cDNA palindromisch ist, faltet sich aus dem Transkript eine doppelsträngige RNA mit einer Haarnadelstruktur (Abbildung 7). Diese kann vom Dicer prozessiert werden, sodass als Produkt eine endogen exprimierte siRNA entsteht.



**Abbildung 7: Funktionsweise des pSUPER.** Dargestellt ist nur der Ausschnitt aus H1 Promotor und Oligonukleotid, der zur Ausbildung von einer shRNA führt. Die 3' Thymidine sind das Stoppsignal für den H1 Promotor.

### 2.7.1 Design der shRNA-cDNA-Oligos

Auf einem Oligo mussten sowohl der Sensestrang der späteren siRNA als auch der Antisensestrang liegen. Die beiden Stränge waren durch ein DNA-Stück getrennt, das später zur Schleifenstruktur der shRNA wurde. Die Oligos waren zu sich selbst komplementär, da die Schleife palindromisch aufgebaut war. Am 3' Ende besaß jedes Oligo TT Überhänge, die zusätzlich an die shRNA Sequenz angefügt und dazu benutzt wurden, um über AA Überhänge mit dem pALsh zu ligieren. Für alle vorher verwendeten siRNA Sequenzen wurden auf diese Weise Oligonukleotide erstellt. Die Schleife bestand in dieser Arbeit aus 4 Nukleotiden, von denen die ersten 2 zur Ziel-mRNA komplementär waren.

Die Oligos wurden vor der Ligation zunächst hybridisiert. Da die Sequenzen bis auf die beiden Thymidine am 3' Ende palindromisch waren, konnten sich immer zwei Stränge zusammenlagern. Es wurde ein 10 µM Ansatz mit 10% PCR 10x Puffer pipettiert und im Thermocycler zunächst auf 95 °C erhitzt und 60 min in Schritten von 1 °C pro min auf 35 °C abgekühlt.

#### Verwendete Oligonukleotide

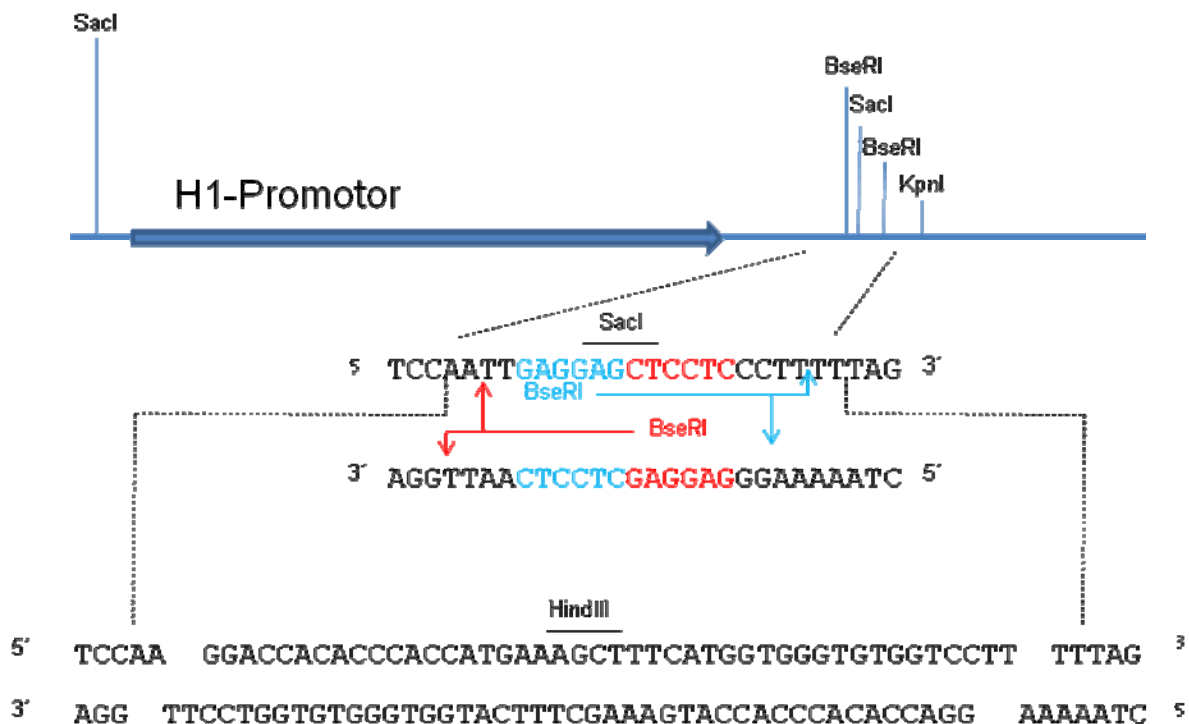
I-1 #1	5' GGA CCA CAC CCA CCA TGA AAG CTT TCA TGG TGG GTG TGG TCC TT 3'
I-1 #2	5' CCA CAC CCA CCA TGA AAG AGC GCT CTT TCA TGG TGG GTG TGG TT 3'
I-1 #3	5' GTC CAC CTT GTC AAT GTC TCC GGA GAC ATT GAC AAG GTG GAC TT 3'
I-1 #4	5' GGG AGC CAC TGA GAG CAC AGG CCT GTG CTC TCA GTG GCT CCC TT 3'
β <sub>1</sub> -AR #1	5' CGC TCA CCA ACC TCT TCA TCA TGA TGA AGA GGT TGG TGA GCG TT 3'
β <sub>1</sub> -AR #2	5' TGG CCT TCG TGT ACC TGC GGG CCC GCA GGT ACA CGA AGG CCA TT 3'
β <sub>1</sub> -AR #3	5' CTG GCT GGG CTA CGC CAA CTC GAG TTG GCG TAG CCC AGC CAG TT 3'

Kontrolle 5' TGC CCA TAC TAC ACC TCC TAC GTA GGA GGT GTA GTA TGG GCA TT 3'

### 2.7.2 Klonierung des pALsh

*Bse*RI schneidet einen DNA-Strang zehn Basen, den anderen acht Basen außerhalb seiner Erkennungssequenz. Dies wird im pALsh ausgenutzt. Zwei *Bse*RI Schnittstellen sind so angeordnet, dass ein Verdau zum Ausschneiden der Erkennungssequenzen führt. Die Schnittstellen fallen in jeweils eine Sequenz von fünf Thymidin, wovon zwei mit ausgeschnitten werden. Am Gegenstrang erfolgt die Spaltung 2 Basen vorher, weshalb ein AA-Überhang entsteht (Abbildung 8). Der Vektor kann so nicht mehr religieren und das einzubringende Oligonukleotid kann nur in der richtigen Orientierung kloniert werden.

Dadurch, dass die beiden *Bse*RI Schnittstellen direkt nebeneinander liegen, war das nach dem Verdau entstandene Fragment so klein, dass es nicht an eine Silica Säule binden konnte. Der Verdau konnte deshalb ohne Gelaufreinigung auf die Säule geladen werden. Das Eluat wurde direkt zur Ligation herangezogen.



**Abbildung 8: Klonierungsstrategie pALsh.** Der Vektor wurde mit *Bse*RI linearisiert. Das Fragment mit den beiden Erkennungssequenzen wurde ausgeschnitten. Das palindromische und damit selbstkomplementäre Oligo (hier als Beispiel I-1 #1) verfügte über 3' TT Überhänge, die mit den 5' AA Überhängen des Vektor ligiert werden konnten. Abbildung modifiziert nach Alexander Laatsch, 2005.

## 2.8 <sup>3</sup>H-CGP12177 Bindungsassay

Für die Quantifizierung des Proteins des  $\beta_1$ -Adrenozeptors in Zellmembranen kam in dieser Arbeit ein Bindungsassay mit radioaktiv markiertem CGP12177 zum Einsatz (Joseph et al. 2004a). Bei CGP12177 handelt es sich um einen unselektiven Liganden von Adrenozeptoren, der an zwei Bindungsstellen bindet. Nach Reaktion des Radioliganden mit einer gegebenen Menge Membranproteine wurden die Membranfragmente gewaschen und damit nicht gebundener Ligand entfernt. Die verbliebene radioaktive Strahlung ließ sich messen und so die Rezeptordichte errechnen.

### 2.8.1 Membranpräparation

Pro Bindungsassay wurde 200 cm<sup>2</sup> Zellrasen der zu untersuchenden Zelllinie zunächst in PBS gewaschen. Als nächstes wurden 4 ml PBS auf die Schale gegeben, die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Anschließend wurde bei 500 rpm für 5 min zentrifugiert und die Zellen dabei auf 4 °C gekühlt.

Das Zellpellet wurde zur Lyse in 1 mM KHCO<sub>3</sub> Lösung resuspendiert, der 50 µg/ml Aprotinin zugesetzt worden war. Das Aprotinin diente dabei als Proteaseinhibitor.

Die Membranen wurden mit dem Homogenisationsapparat „Polytron“ (Kinematic AG, Littau, Schweiz) zerkleinert. Es wurde in einer Tischzentrifuge bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um die Membranfraktion von der zytosolischen Fraktion zu trennen. Die Membranfragmente wurden anschließend wie oben in 1 mM KHCO<sub>3</sub> Lösung mit 50 µg/ml Aprotinin aufgenommen. Es folgte eine Proteinbestimmung nach Bradford, da später im Bindungsassay auf die eingesetzte Proteinmenge normalisiert wurde. Die fertigen Proben wurden bei -80 °C gelagert.

#### Membranpräparationspuffer

KHCO <sub>3</sub>	1 mM
Aprotinin	50 mg/l

in wässriger Lösung

### 2.8.2 Bindungsassay

Als Radioligand wurde H<sup>3</sup> markiertes CGP12177 (K<sub>D</sub> 100-500 pmol/l), von Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg bezogen, eingesetzt. Die spezifische Aktivität lag bei 37 Ci/mmol, die bezogene Lösung hatte die Aktivität von 1 Ci/l und damit eine Konzentration des Radioliganden von 27 µM in Ethanol. Diese Lösung wurde auf eine

Konzentration von 10 nM verdünnt. 1 fmol Radioligand hatte eine Aktivität von 82,14 Zerfällen pro Minute.

Zunächst wurden alle Proben mit Membranpräparationspuffer, in dem auch die Zellyse erfolgte, auf eine Proteinkonzentration von 1 mg/ml verdünnt, um später in allen Reaktionsansätzen die gleiche Proteinmenge einzusetzen. Die Bindungsreaktion selbst fand in einer 96-Well Platte statt. Der Boden der Wells war von jeweils einem Ventil verschlossen, das durch Sog von außen geöffnet werden konnte. Auf dem Ventil lag ein Plättchen aus Filterpapier. Der Reaktionsansatz für eine Probe bestand aus 100  $\mu$ l zweifachkonzentriertem Assaypuffer, 100  $\mu$ l Proteinsuspension mit einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml, 25  $\mu$ l Radioligandlösung und 25  $\mu$ l Assaypuffer, sodass die Konzentration des Radioliganden im Endansatz 1 nM betrug.

Nach einstündiger Inkubationszeit wurde die Platte in eine Saugvorrichtung gestellt, bei der das Reaktionsgemisch durch das Filterpapier abgesaugt wurde. Die Membranen, sowie gebundener Radioligand, blieben im Filter zurück. Um nicht gebundenen Radioliganden aus dem Well und vom Filter zu entfernen, wurde zweimal mit Assaypuffer gewaschen und jeweils der Puffer abgesaugt. Die Filtereinsätze wurden nun 1 h bei Raumtemperatur getrocknet. Die Auswertung erfolgte mittels der Szintillationsflüssigkeit „Ultima Gold“ (Perkin/Elmer, Massachusetts, USA). Dabei wurden 5 ml Szintillationsflüssigkeit mit einem Plättchen für 48 h unter Schütteln inkubiert und anschließend die Szintillation im *Gammacounter* „LS3800“ (Beckmann Coulter, Krefeld) gemessen. Unter der Annahme einer *Counting* Effizienz von etwa 50%, sowie einer Aktivität von etwa 80 Zerfällen pro Minute und fmol Ligand ließ sich aus der gemessenen Szintillation die Konzentration an Radioligand und damit die Menge an  $\beta_1$ -Adrenozeptor im Ansatz berechnen. Als weiterer Faktor musste in der Berechnung berücksichtigt werden, dass die Rezeptorbindung einer sigmoidalen Konzentrations-Bindungsbeziehung folgt. Da die Lösung Radioliganden in einer Konzentration von 1 nM enthielt, war bei einer  $K_D$  des Liganden von 0,5 nM von einer Besetzung von nur etwa 66% der Rezeptoren auszugehen. Im Falle der neu generierten stabilen Zelllinie war die  $\beta_1$ -Adrenozeptordichte so hoch, dass zum Teil  $\frac{2}{3}$  des Radioliganden in der Lösung gebunden wurde. Die Konzentration des freien Radioliganden betrug damit etwa 0,3 nM. Unter erneuter Betrachtung der sigmoidalen Bindungskurve waren in diesem Fall nur 33% der Rezeptoren an Radioliganden gebunden.

Um den Anteil der unspezifischen Bindung des Radioliganden an Membranbestandteile abschätzen zu können, wurde in der Hälfte der Ansätze zusätzlich Propranolol in einer Endkonzentration von 1  $\mu$ M zugesetzt. Aufgrund der

1000-fach höheren Konzentration von Propranolol im Vergleich zu CGP12177 waren alle  $\beta_1$ -Adrenozeptoren geblockt und nur unspezifische Bindung wurde gemessen. Die Differenz der Gesamtaktivität, d.h. ohne Einsatz von Propranolol und der Aktivität nach der Betablockade, stellte die spezifische Ligandenbindung dar.

Benötigte Lösungen:

Assaypuffer

TRIS	50 mM mit HCL auf pH 7,5 eingestellt
EGTA	5 mM
EDTA	1 mM
MgCl <sub>2</sub>	4 mM

in wässriger Lösung

Propranolol

Propranolol	10 $\mu$ M ( $K_D$ 1-10 nmol/l)
-------------	---------------------------------

in Assaypuffer

## 2.9 Zellfixation, konfokale Lasermikroskopie

Für die Betrachtung von Zellen in konfokaler Lasermikroskopie war es notwendig, die Zellen auf Glasplättchen auszuplattieren. Die Glasplättchen wurden dabei in eine 3 cm Kulturschale gelegt, wie oben beschrieben kollagenisiert und anschließend die Zellsuspension zugegeben. Nach einem Tag erfolgte die Transfektion mit siRNA oder Plasmid-DNA.

Zur Erfassung der Transfektionseffizienz von siRNAs kam eine siRNA (Qiagen, Hamburg) zu Einsatz, die gegen GFP gerichtet war und am 3' Ende des Sensestranges mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Rhodamin) markiert war.

siRNA Anti GFP	Sense	5'	gcaagcugacccugaagucau	3'
	Antisense	3'	gccguucgacugggacuucaag	5'

8 h nach Transfektion erfolgte die Fixierung der Zellen. Dafür wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 15 minütige Behandlung mit einer Lösung aus 4% Paraformaldehyd in PBS. Anschließend wurden die Zellen auf den Deckgläschen nochmals mit PBS gewaschen und schließlich mit dem Eindeckelmedium Fluoroment-G (Southern Biotech, Alabama, USA) auf Objekträger geklebt. Die konfokale Lasermikroskopie wurde mit dem „Axiovert 200M“ (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt.



## **2.10 Statistik**

Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetisches Mittel +/- der Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt, berechnet aus den Einzelwerten (n). Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test beim Vergleich zweier Gruppen ermittelt. Ein p-Wert kleiner 0.05 wurde als statistisch signifikanter Unterschied bewertet und als solcher gekennzeichnet.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung der stabilen Zelllinien

Für die Generierung einer stabilen Zelllinie war zunächst ein Plasmid notwendig, das für das zu exprimierende Protein kodierte. Es musste außerdem einen Selektionsmarker tragen, um später Zellen, die das Plasmid nicht in ihr Genom integriert hatten, mit einem Selektionsmedium eliminieren zu können.

Benutzte Zellart	Transfiziertes Plasmid
HEK293	pIRES2-EGFP-I-1
HEK293	pIRES2-EGFP- $\beta_1$ -AR
HEK293	pcDNA3- $\beta_1$ -AR
NIH3t3	pIRES2-EGFP-I-1

**Tabelle 6:** Übersicht aller in dieser Arbeit erzeugten stabilen Zelllinien

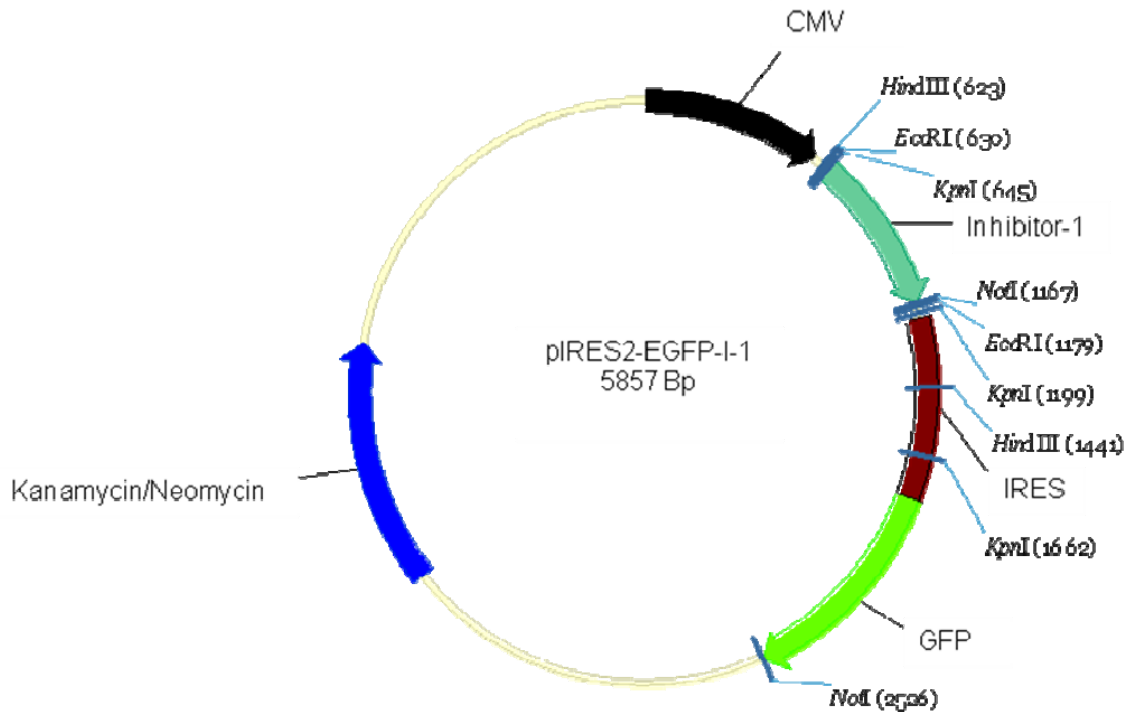
##### 3.1.1 Amplifikation des $\beta_1$ -Adrenozeptors der Maus

Zunächst wurde versucht, die cDNA für den  $\beta_1$ -Adrenozeptor der Maus in einer PCR zu amplifizieren. Dazu wurde aus Mäuseherzen mRNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und eine PCR durchgeführt. Unglücklicherweise ist die Sequenz des  $\beta_1$ -Adrenozeptors um dessen Startcodon herum besonders CG-reich, sodass schon eine geeignete Primerauswahl extrem eingeschränkt war und trotz umfangreicher Bestrebungen kein korrektes Amplifikat erzielt werden konnte.

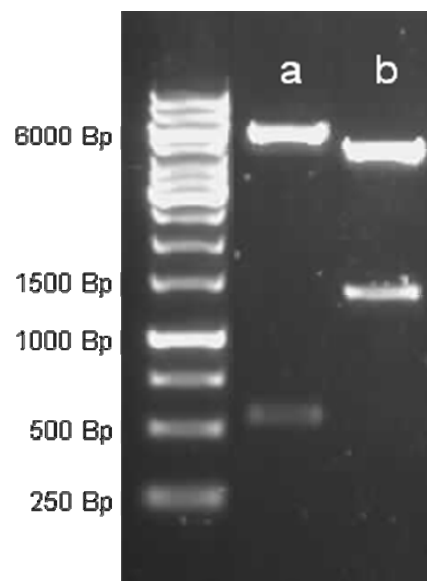
Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde eine alternative Strategie entwickelt. Hierbei wurde der menschliche  $\beta_1$ -Adrenozeptor als Grundlage für die Zelllinie verwendet. Dieser wurde freundlicherweise von Prof. Stefan Engelhardt aus Würzburg kloniert und zur Verfügung gestellt. Da die  $\beta_1$ -Adrenozeptorsequenzen von Mensch und Maus (*Accession code*: NM\_007419 für die Maus, NM\_000684 für den Menschen) einige homologe Bereiche aufweisen, war es möglich siRNA-Sequenzen zu finden, die gegen beide Sequenzen effektiv waren (Seite 33).

##### 3.1.2 Klonierung der Plasmide

Zunächst wurde die Inhibitor-1 cDNA, die bereits in den PCR2.1 Vektor kloniert übernommen wurde, mit *EcoRI* ausgeschnitten. Der pIRES2-EGFP Vektor wurde mit *EcoRI* linearisiert, beide Fragmente wurden ligiert und in kompetente Bakterien transformiert. Das Inhibitor-1 Insert enthielt an seinem C-Terminus eine *NotI* Schnittstelle. Auch der pIRES2-EGFP Vektor enthielt eine *NotI* Schnittstelle. Die korrekte Orientierung des Inserts konnte deshalb mit einem Restriktionsverdau mit *NotI* überprüft werden (Abbildung 10b).



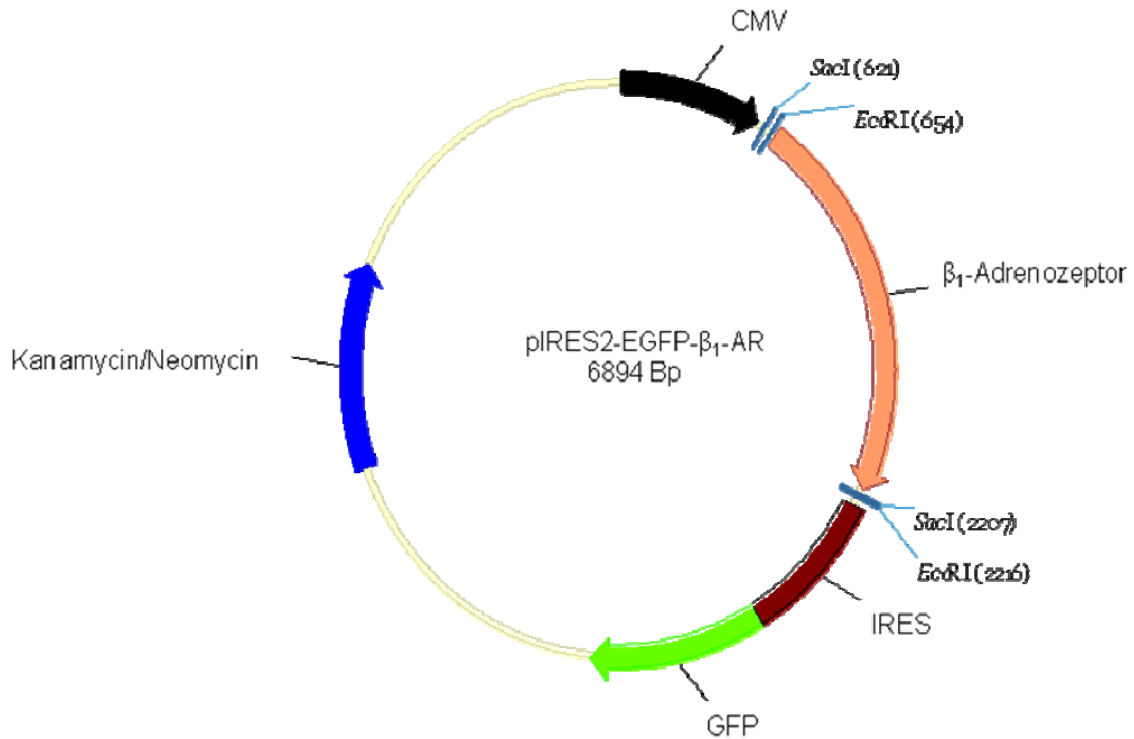
**Abbildung 9: Skizze des pIRES2-EGFP-I-1 Plasmids** zur Etablierung einer stabilen Zelllinie für den Inhibitor-1.



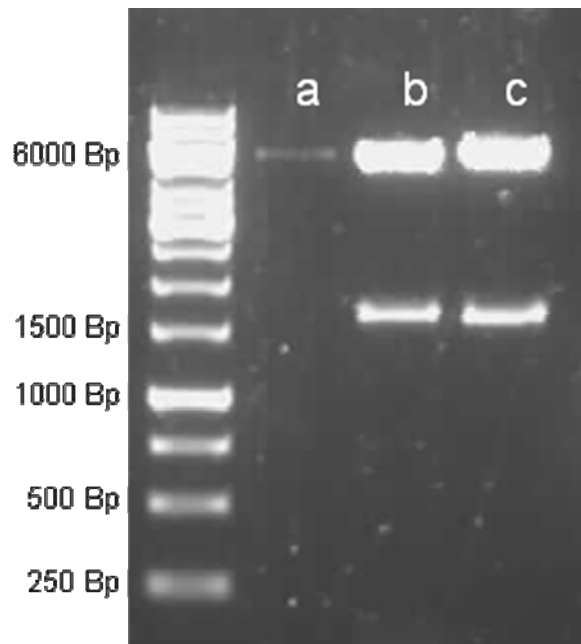
**Abbildung 10: Agarosegel vom Verdau eines positiven Klonen des pIRES2-EGFP-I-1.** (a) Mit *EcoRI* wurde das Insert wieder ausgeschnitten. (b) Der asymmetrische Verdau mit *NotI* demonstriert hier seine korrekte Orientierung.

Die cDNA für den humanen  $\beta_1$ -Adrenozeptor wurde bereits in dem pcDNA3 Vektor übernommen. Die cDNA wurde mit *SacI* ausgeschnitten und über dieselbe Schnittstelle in den pIRES2-EGFP Vektor kloniert. Zur Verifikation der korrekten Orientierung wurde ein Verdau des Konstrukts mit *EcoRI* durchgeführt (Abbildung 12c). Eine *EcoRI*

Schnittstelle flankierte die  $\beta_1$ -Adrenozeptorsequenz im Insert N-terminal. Der pIRES2-EGFP enthielt eine weitere *EcoRI* Schnittstelle hinter der *SacI* Schnittstelle (Abbildung 11).



**Abbildung 11: Skizze des pIRES2-EGFP- $\beta_1$  Plasmids** zur Etablierung einer stabilen Zelllinie zur Überexpression des humanen  $\beta_1$ -Adrenozeptors.

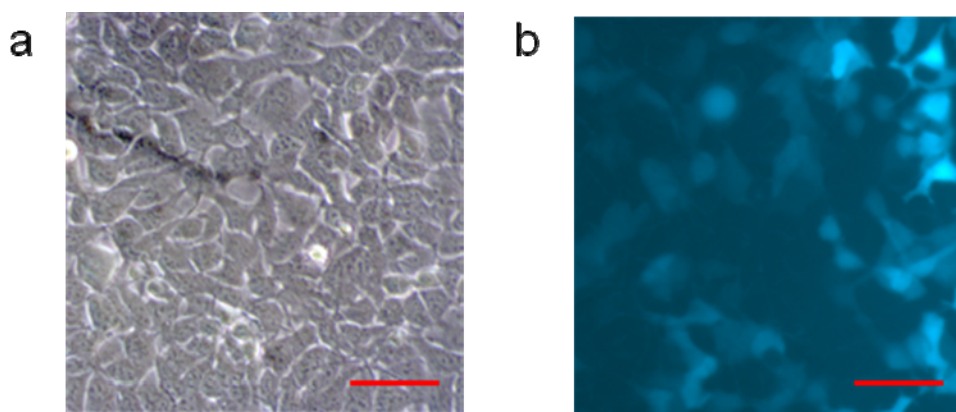


**Abbildung 12: Agarosegel** mit (a) Restriktionsverdau des Wildtyp pIRES2-EGFP mit *SacI*, (b) Restriktionsverdau des pIRES2-EGFP- $\beta_1$ -AR mit *SacI*, (c) Restriktionsverdau des pIRES2-EGFP- $\beta_1$ -AR mit *EcoRI*.

Alle Inserts wurden in den Zielvektoren sequenziert. Dabei wurden keine Mutationen festgestellt.

### 3.1.3 Transfektion

HEK293a Zellen wurden am Vortag der Transfektion ausplattiert. Die Zelldichte vor der Transfektion betrug 95% (Abbildung 14a). Für jedes der Plasmide wurde eine Kulturschale vorbereitet. 24 h nach der Lipofektion wurde die GFP-Epifluoreszenz unter UV-Licht ermittelt. In HEK293a Zellen lag die Transfektionseffizienz bei etwa 50% (Abbildung 14b).



**Abbildung 13: HEK293a Zellen zur Etablierung einer stabilen Zelllinie.** (a) Darstellung der Zelldichte direkt vor Transfektion, Maßstabbalken: 70 µm. (b) GFP-Epifluoreszenz in HEK293a Zellen, transfiziert mit pIRES2-EGFP-I-1, 24 h nach Transfektion, Maßstabbalken: 70 µm

Nach derselben Strategie wurden stabile NIH3t3 Zelllinien transfiziert. Hier war die Transfektionseffizienz jedoch erheblich geringer, bei etwa 10% (nicht gezeigt).

### 3.1.4 Selektion

Um eine stabile Zelllinie zu generieren, war es notwendig, nur die Zellen, die den Vektor tatsächlich in ihr Genom integriert hatten, weiter zu kultivieren. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen zunächst 1:5 gesplittet, da sehr dichte Zellen sich schlecht selektionieren lassen. Mit den Plasmiden war ein Neomycinresistenzgen in das Zellgenom integriert worden. Deshalb wurden die Zellen weitere 24 h später mit einem Selektionsmedium behandelt, das zunächst Neomycin in einer Konzentration von 1 mg/ml enthielt. Normalerweise integrieren weniger als 1% der Zellen den Vektor stabil in ihr Genom. Somit war zu erwarten, dass spätestens nach 3 Tagen ein Großteil der Zellen eliminiert sein müsste. Dies war aber nicht der Fall. Auf nicht transfizierten HEK293a Zellen als Kontrolle zeigte sich ebenfalls keine Wirkung von Neomycin.

Tatsächlich affiziert Neomycin eher prokaryotische als eukaryotische Zellen (Wilhelm et al. 1978). Darum wurde nun G 418 für die Selektion verwendet. G 418 ist ebenfalls ein Aminoglykosid, schädigt aber auch eukaryotische Zellen. Nach Wiederholung der Transfektion war aber auch hier kein Effekt festzustellen. So entstand der Verdacht einer primären Neomycinresistenz der verwendeten HEK293a Zellen. Bei den HEK293a Zellen handelt es sich um modifizierte Zellen, die sich besonders zur Virusanzucht eignen. Sie verfügen gegenüber herkömmlichen Zellen über verbesserte Adhäsionseigenschaften. Möglicherweise kodiert für diese Veränderungen ein Plasmid, das zusätzlich eine Neomycinresistenz enthält. Leider ließen sich beim Hersteller diesbezüglich keine Angaben erhalten. Deshalb wurden die Experimente mit „Standard“-HEK293 Zellen wiederholt.

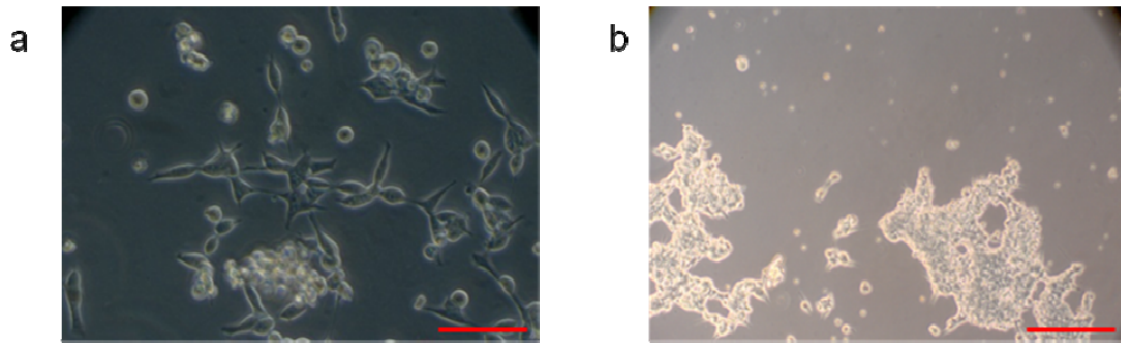
Hier wurde zunächst eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung (Tabelle 7) von G 418 auf nicht transfizierte Zellen erstellt, um die Wirksamkeit zu überprüfen. Dabei wurden HEK293 Zellen in gleicher Dichte auf 6 Schalen ausplattiert und mit aufsteigenden Konzentrationen von G 418, die sich an der Herstellerangabe orientierten, behandelt. Anschließend wurde die Zeit gemessen, die benötigt wurde, um alle Zellen in der jeweiligen Schale abzutöten. Dabei wurde in allen Schalen nach 3 Tagen das Medium gewechselt. Nach 6 Tagen wurde der Versuch beendet.

Eingesetzte G 418 Konzentration in µg/ml Medium	300	500	1000	1500	2500
Dauer bis zur Eradikation aller Zellen in h	keine Wirkung	keine Wirkung	96	48	24

**Tabelle 7:** Konzentrations-Wirkungsbeziehung von G 418 auf HEK293

Als niedrigste wirkende Konzentration wurde demzufolge 1000 µg/ml für alle weiteren Selektionen verwendet.

HEK293 Zellen wurden erneut transfiziert, 24 h nach der Transfektion 1:5 gesplittet und weitere 24 h später mit dem Selektionsmedium behandelt. Nach 3 Tagen war die nicht transfizierte Kontrollschale zellfrei, während bei der transfizierten Schale einige einzelne Zellen (Abbildung 14a) überlebten. Innerhalb einer Woche entstanden Kolonien, in denen die Zelldichte langsam soweit anstieg, dass in der Mitte bereits Zellen übereinander wuchsen und abzusterben begannen (Abbildung 14b).

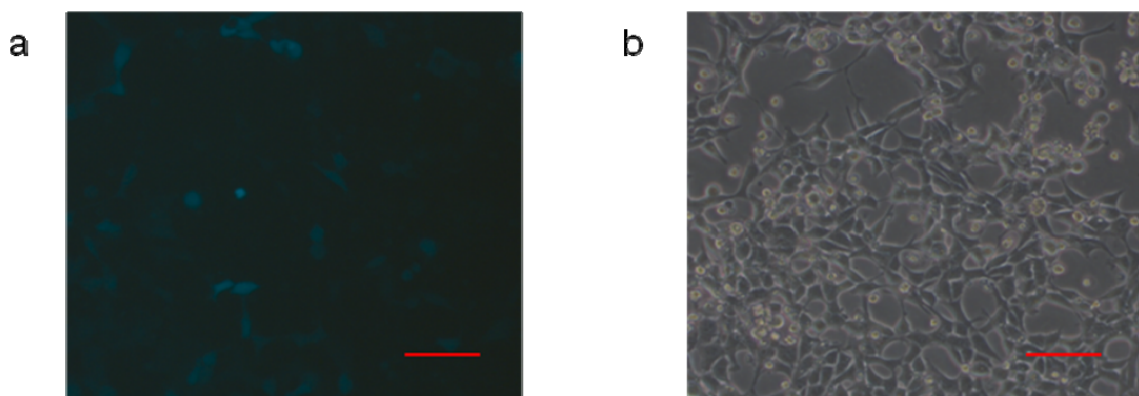


**Abbildung 14: Darstellung des Zellwachstums von HEK293 Zellen, transfiziert mit pIRES2-EGFP-I-1.** (a) Zellen nach dreitägiger Selektion mit G418 1 mg/ml Medium, Maßstabbalken: 70 µm. (b) Zellnesterbildung nach zehntägiger Selektion mit G418 1 mg/ml Medium, Maßstabbalken: 280 µm.

### 3.1.5 Überprüfung der Stabilität der geschaffenen Zelllinien

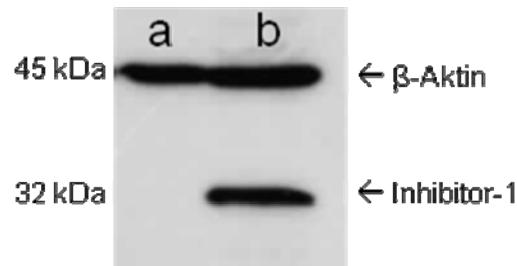
Hierzu wurde zunächst die GFP-Epifluoreszenz (Abbildung 15a) der Zellen herangezogen. Der Nachteil an dieser Vorgehensweise lag darin, dass die GFP Expression in stabilen Zelllinien sehr viel geringer ist, als dies bei transient transfizierten Zellen der Fall ist, da viel weniger Genkopien in das Zellgenom integriert werden, als zunächst in die Zelle transfiziert werden.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop war dabei kaum ein GFP Signal zu erkennen. In der konfokalen Lasermikroskopie war das Signal jedoch gut zu detektieren, schwankte aber je nach betrachteter Zelle erheblich. Das lag vermutlich daran, dass die Zelllinien nicht auf einem einzelnen Zellklon aufbauten, sondern vielmehr die Summe aller transfizierten Zellen war, die die Selektion überlebten.



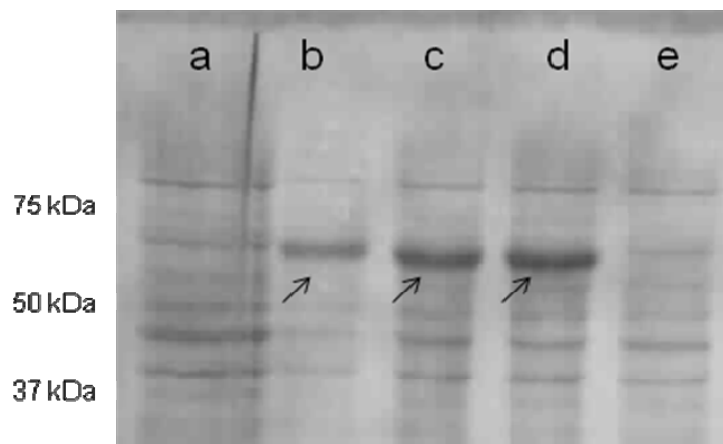
**Abbildung 15: Kultivierung der stabilen HEK293 pIRES2-EGFP-I-1 Zelllinie.** (a) GFP- Epifluoreszenz 13 Tage nach Transfektion und zweimaliger Passagierung. Maßstabbalken: 70 µm. (b) Lichtmikroskopische Darstellung der Zelldichte, Maßstabbalken: 70 µm.

Darum sollte die Überexpression von Inhibitor-1 im Westernblot überprüft werden. Mittels Proteinbestimmung wurde eine gleichmäßige Beladung des Gels gesichert, die hier mit der Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin (Abbildung 16) gezeigt ist. Während in Wildtyp HEK293 Zellen keine Inhibitor-1 Proteinbande zu detektieren war, erkannte man bei der erzeugten pIRES2-EGFP-I-1 Zelllinie eine starke Bande bei 32 kDa.



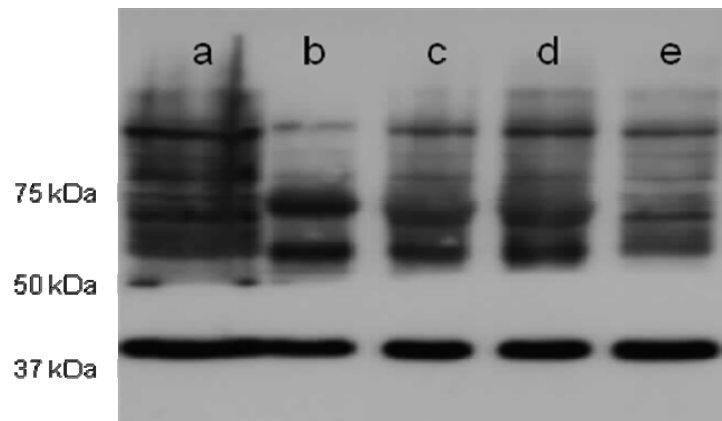
**Abbildung 16: Demonstration der stabilen Expression von Inhibitor-1.** (a) Westernblot von HEK293 Wildtyp Zellen und (b) der stabilen Zelllinie HEK293 pIRES2-EGFP-I-1

Zunächst wurde versucht, den  $\beta_1$ -Adrenozeptor ebenfalls im Westernblot zu detektieren. In der Ponceaufärbung (Abbildung 17) erkannte man bei den Spuren b, c, d ein kräftiges Signal zwischen 75 kDa und 50 kDa. Dieses fand sich nur bei transgenen Zellen, nicht jedoch bei HEK293 Zellen.



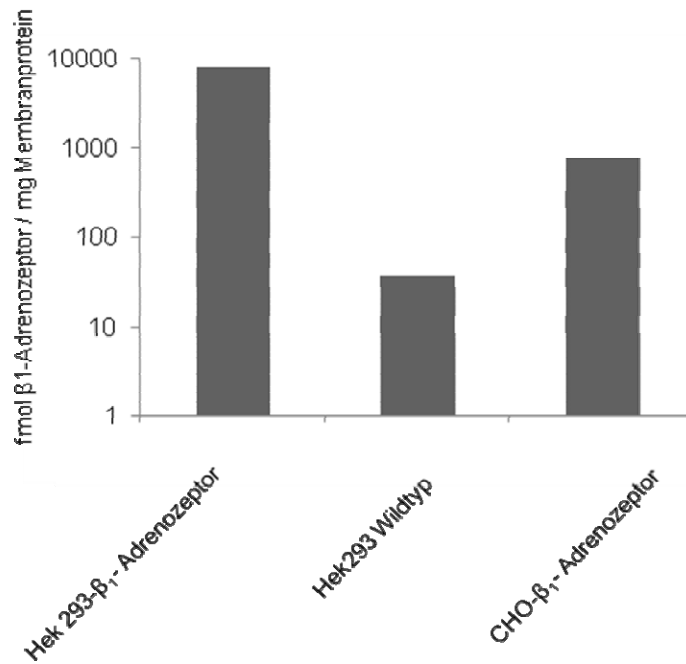
**Abbildung 17: Ponceaufärbung der Nitrozellulosemembran zur späteren Detektion des  $\beta_1$ -Adrenozeptors.** Geladen wurden (a) Wildtyp HEK293 Zellen, (b)-(d) HEK293 pIRES2-EGFP- $\beta_1$ -AR, (e) Wildtyp HEK293. Der  $\beta_1$ -Adrenozeptor hat ein Molekulargewicht von 65 kDa, sodass man vermuten könnte, dass es sich bei den mit Pfeilen markierten Banden um den Rezeptor handelt.





**Abbildung 18: Westernblot zur Detektion des  $\beta_1$ -Adrenozeptors in stabiler HEK293 Zelllinie.** Die Membran wurde bei 50 kDa geschnitten, die obere Membranhälfte mit Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Antikörper, untere Hälfte mit Anti-GAPDH-Antikörper als Ladekontrolle inkubiert. (a) Wildtyp HEK293, (b)-(d) HEK293 pIRES2-EGFP- $\beta_1$ , (e): Wildtyp HEK293. Der  $\beta_1$ -Adrenozeptor hat ein Molekulargewicht von etwa 65 kDa.

Der verwendete Anti- $\beta_1$ -Adrenozeptor-Antikörper (Santa Cruz, Kalifornien, USA) erzeugte trotz vielversprechender Literatur (Dincer et al. 2001) kein spezifisches Signal. Somit wurde auf einen Radioligandenbindungsassay zur Detektion des  $\beta_1$ -Adrenozeptors mit  $^3\text{H}$ -markiertem CGP12177 als Radioligand zurückgegriffen. Ein Nachteil dieses Prinzips gegenüber dem Westernblot war die außerordentlich große Zellmenge (etwa  $10^6$  Zellen, Joseph et al. 2004a), die für einen Assay benötigt wurde. Als Negativkontrolle dienen Wildtyp HEK293 Zellen. Als Positivkontrolle wurde eine stabile  $\beta_1$ -Adrenozeptor-CHO Zelllinie (Hamsterfibroblasten) von Prof. Stefan Engelhardt, Universität Würzburg verwendet. Alle Messungen wurden in dreifacher Bestimmung durchgeführt.



**Abbildung 19: CGP12177 Bindungsassay zur Überprüfung der Stabilität der generierten  $\beta_1$ -Adrenozeptors-Zelllinie.** In der Abbildung ist nur die spezifische Bindung gezeigt.

Die  $\beta_1$ -Adrenozeptordichte in den Wildtyp HEK293 Zellen war außerordentlich gering. Die nachgewiesene Menge an gebundenem Radioliganden überschreitet nicht die unspezifische Bindung. Das radioaktive Signal der stabilen Zelllinie hingegen war außerordentlich stark und übertraf die Positivkontrolle um das fünffache.

## 3.2 RNA-Interferenz – nackte siRNA

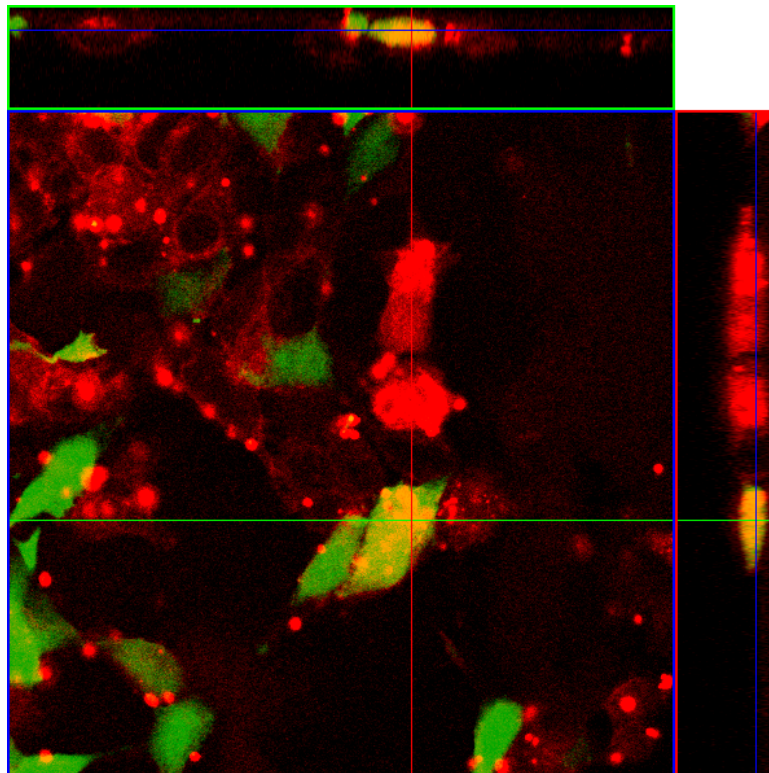
### 3.2.1 Transfektionseffizienz von siRNA in HEK293

Nach Fertigstellung der stabilen Zelllinien galt es, die Frage nach der Transfektionseffizienz von siRNA in HEK293 Zellen zu beantworten. Zu diesem Zweck wurde auf Rhodamin-markierte siRNA zurückgegriffen. Für eine genaue Darstellung der Zelllumina im konfokalen Aufnahmemodus war ein weiterer Fluoreszenzfarbstoff, von dem man mit großer Sicherheit annehmen konnte, dass er intrazellulär liegt, notwendig. Hierzu bot sich das GFP an.

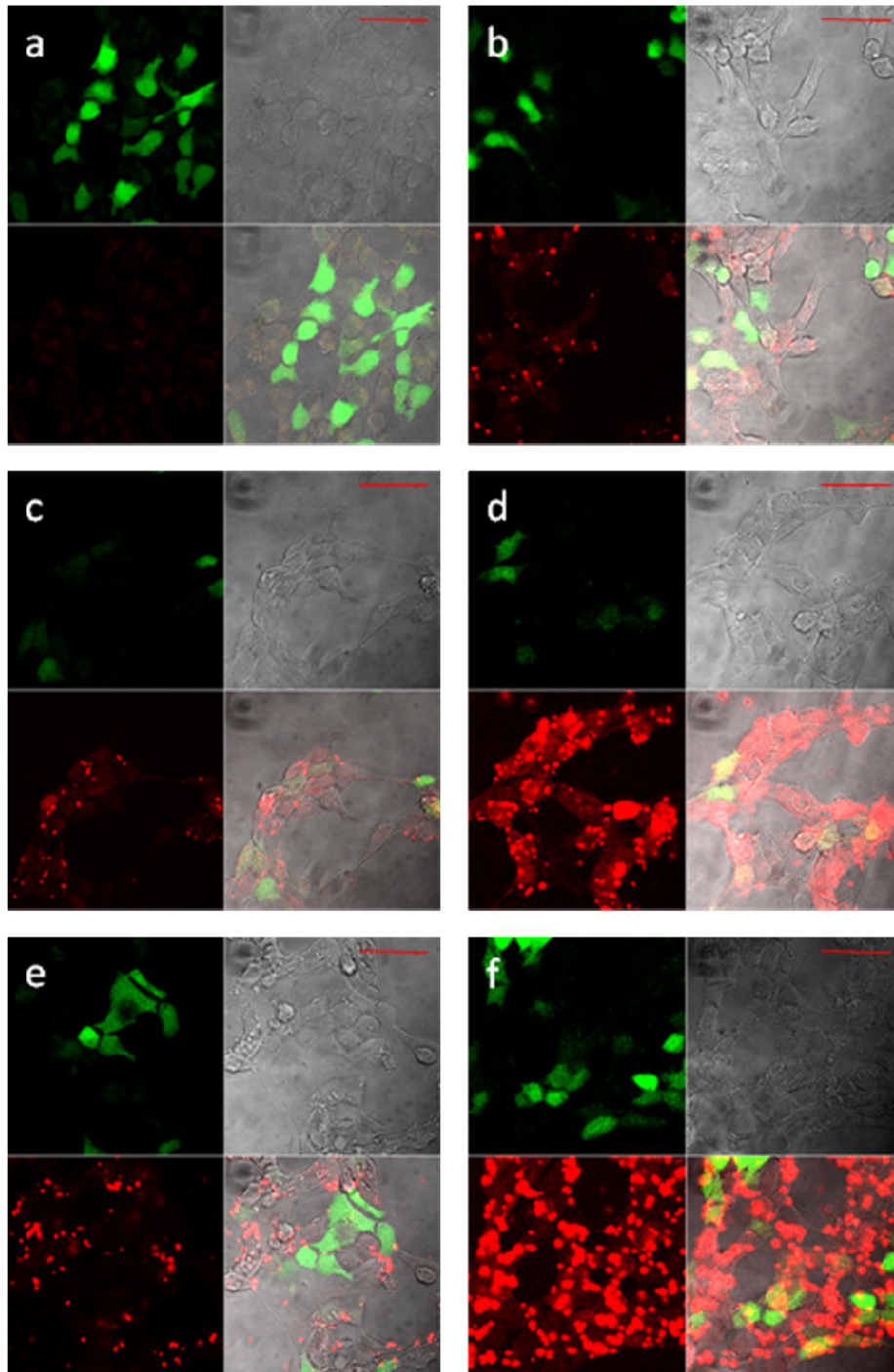
Zellen der stabilen Zelllinie HEK293 pIRES2-EGFP-I-1 wurden auf Deckgläschen ausplattiert und nach 24 h mit Rhodamin-markierter siRNA, die gegen das GFP-Gen gerichtet war, in unterschiedlicher Konzentration von siRNA und „Lipofectamine 2000“ transfiziert. Da nach 8 h das Rhodaminsignal am stärksten war (El-Armouche et al. 2007), wurden zu diesem Zeitpunkt die Zellen mit 4% PFA fixiert und auf Objektträger gebracht. Anschließend wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie Aufnahmen

angefertigt und GFP (Anregung 488 nm, Filter BP 505-530 nm), sowie Rhodamin (Anregung 543 nm, Filter BP 560-615 nm) zur Darstellung gebracht. Die Aufnahmen belegten, dass je nach gewählter Transfektionsbedingung, die Transfektionseffizienz erheblich schwankte. Unter Standardbedingungen, d.h. bei Transfektion gemäß Herstellerangaben, war die Transfektionseffizienz aber bereits sehr gut (Abbildung 21b). Gut zur Darstellung kam das deutlich stärkere Rhodaminsignal bei der höheren siRNA-Konzentration im Transfektionsmedium (Abbildung 21f). Dabei war jedoch die Transfektionseffizienz nicht größer. Rhodamin-positive Lipofektaminvesikel hafteten in großer Zahl außen auf den Zellen.

Um die Transfektion der Zellen mit siRNA zu überprüfen, wurden zusätzlich Z-Stapel-Aufnahmen der Zellen angefertigt. Dabei wurde eine Serie von 29 Schnitten, jeweils in einer Dicke von 0,73  $\mu\text{m}$ , aufgenommen. Alle Schnitte wurden digital zu einem dreidimensionalen Bild verarbeitet. GFP-positive Zellen waren komplett von GFP ausgefüllt. Das Rhodamin erstreckte sich ebenfalls über das gesamte Zellvolumen (Abbildung 20). Dabei lagen die starken Rhodaminverdichtungen, die sich in Abbildung 21f darstellten, teilweise ebenfalls intrazellulär.



**Abbildung 20: Konfokale Z-Stapel-Aufnahme zur Überprüfung der Lokalisation der siRNA.** Aufnahme von stabilen HEK293 pIRES2-EGFP-I-1 transfiziert mit Rhodamin (rot) markierter siRNA. GFP ist grün dargestellt. Im roten (rechts) bzw. grünen Kasten (oben) ist jeweils die Schnittebene, die senkrecht zu der Aufnahmeebene steht, gezeigt. Ihre Lage ist in der Hauptabbildung jeweils als rote und grüne Linie dargestellt.



**Abbildung 21: Überprüfung der Transfektionseffizienz von Rhodamin-markierter siRNA unter Variation von siRNA- und Lipofektaminkonzentration im Medium.** Transfiziert wurden pIRES2-EGFP-I-1 stabile HEK293 Zellen.

Zusammensetzung des Transfektionsmediums: (a) Opti MEM (b) Opti MEM mit 0,2% Lipofektamin, siRNA 40 nM, entsprechend Standardprotokoll von Invitrogen, (c) Opti MEM mit 0,1% Lipofektamin, siRNA 40 nM, (d) Opti MEM mit 0,4% Lipofektamin, siRNA 40 nM, (e) Opti MEM mit 1,2% Lipofektamin, siRNA 40 nM, (f) Opti MEM mit 1% Lipofektamin, siRNA 120 nM.

Jeweils im oberen linken Quadranten erfolgt die Darstellung von GFP, im oberen rechten Quadranten eine Durchlichtaufnahme, unten links die Darstellung des Rhodaminsignals, unten rechts alle Signale übereinander, roter Maßstababstaken: 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Untersuchung der Halbwertszeit von Inhibitor-1 in HEK 293 Zellen und Kardiomyozyten

Um den Abstand zwischen der Transfektion der siRNA und Zellernte richtig zu wählen, wäre die Kenntnis der Halbwertszeit des auszuschaltenden Proteins sehr hilfreich. Eine Abschätzung der Halbwertszeit war, da diese bisher nicht bekannt war, mit Cyclohexamid möglich. Zunächst wurden stabile HEK293 pIRES2-EGFP-I-1 Zellen ausplattiert und nach 24 h mit variablen Konzentrationen von Cyclohexamid inkubiert, sodass die Proteinbiosynthese komplett inhibiert war. Dabei wurde mit einer Konzentration von 100 µg je ml Medium (0,35 mM) begonnen.

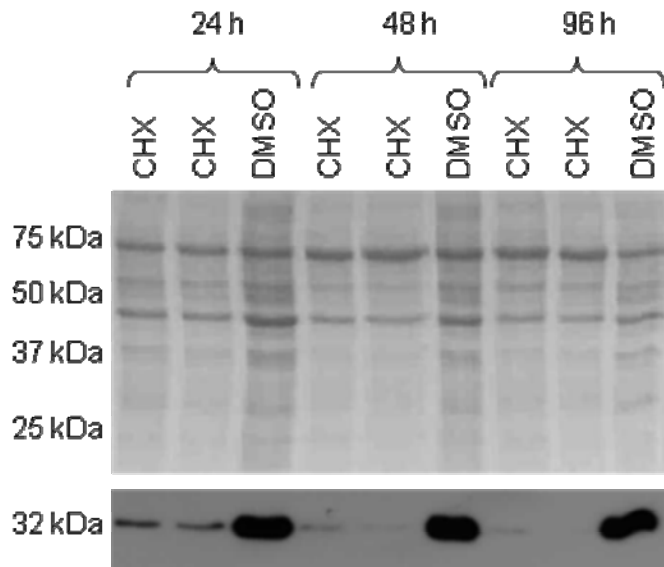
Konzentration Cyclohexamid im Medium	3,125 µg/ml	6,25 µg/ml	12,5 µg/ml	25 µg/ml	50 µg/ml	100 µg/ml
Dauer bis zur vollständigen Ablösung des Zellrasens	--	48 h	24 h	24 h	24 h	12 h

**Tabelle 8:** Darstellung des zytotoxischen Effekts von Cyclohexamid auf HEK293 Zellen. Das Ablösen einer Zelle von der Kulturschale wurde als Zelltod gewertet.

Da HEK293 als sich schnell teilende Zellen besonders anfällig gegenüber Zytostatika zeigten, wurde der Versuch mit neonatalen Rattenkardiomyozyten wiederholt. Diese erwiesen sich als ausgesprochen widerstandsfähig gegen Cyclohexamid, sodass es im Rahmen dieser Arbeit möglich war, sie mehr als drei Tage in einem Medium zu kultivieren, das 100 µg/ml Cyclohexamid enthielt. Diese Zeitspanne war ausreichend, um den Abbauprozess von Inhibitor-1 zu verfolgen.

Nach dem Ausplattieren wurden die Kardiomyozyten zunächst 4 Tage in Kultur gehalten. Um eine starke Expression von Inhibitor-1 zu gewährleisten, erfolgte eine Infektion mit einem für Inhibitor-1 kodierenden Adenovirus (El-Armouche et al. 2003) mit einer MOI von 1. Weitere 24 h später erfolgte ein Mediumwechsel mit der Zugabe von Cyclohexamid in der oben genannten Konzentration. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten geerntet und die Inhibitor-1 Konzentration im Westernblot analysiert.

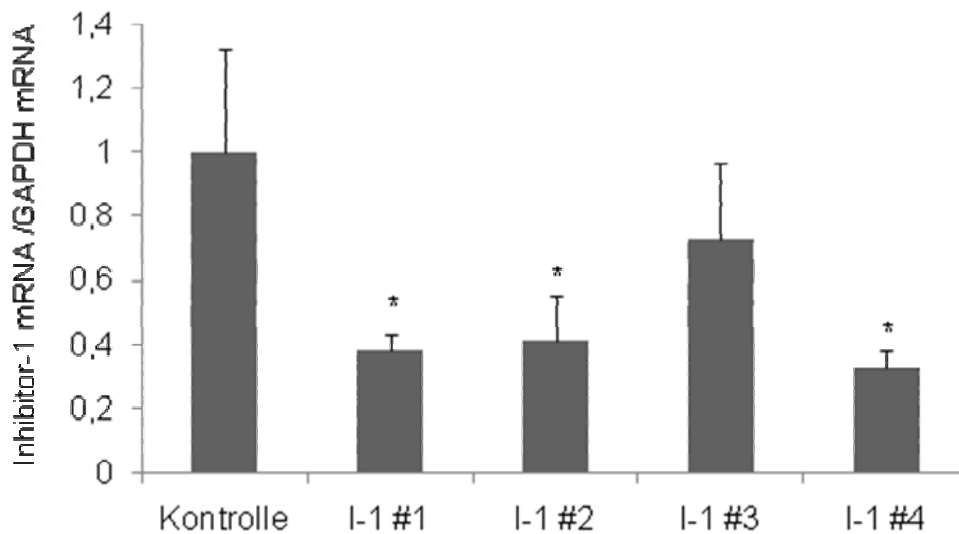
Aufgrund der großen Abstände der Probeentnahmen war lediglich eine orientierende Abschätzung der Halbwertszeit möglich. Ein Vergleich der Ponceaubanden, der mit Cyclohexamid behandelten Zellen, ließ die Annahme zu, dass alle Taschen etwa mit der gleichen Proteinmenge beladen wurden (Abbildung 22). Der Rückgang von Inhibitor-1 in der Immundetektion ließ eine Halbwertszeit von weniger als 24 h vermuten. Eine genauere Einschätzung mittels radioaktiv markierter Aminosäuren war im Rahmen dieser Arbeit entbehrlich, da bei allen Transfektionsexperimenten mit siRNA gegen den Inhibitor-1 mindestens 72 h zwischen Transfektion und Ernte lagen.



**Abbildung 22: Untersuchung der Halbwertszeit von Inhibitor-1 in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** Darstellung des Ponceaubildes des Proteinlysats von Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Cyclohexamid nach adenoviraler Inhibitor-1 Überexpression. Unten ist die Immundetektion von Inhibitor-1 mittels Westernblot gezeigt.

### 3.2.3 Vergleich der verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen Inhibitor-1 auf mRNA-Ebene

Hierzu wurden stabile HEK293 pIRES2-EGFP-I-1 Zellen zunächst mit den siRNAs I-1 #1, I-1 #2, I-1 #3, I-1 #4 und Kontroll-siRNA gemäß Herstellerangabe von „Lipofectamine 2000“ (0,2% Lipofektamin, 40 nM siRNA, siehe Abbildung 21b) transfiziert. Alle Zellen wurden nach 3 Tagen geerntet und die RNA isoliert. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die mRNA von Inhibitor-1 und GAPDH mittels Echtzeit PCR quantifiziert. Es war ein signifikanter Rückgang von Inhibitor-1 bei den siRNAs I-1 #1, I-1 #2 und I-1 #4 zu beobachten, wobei der stärkste *Knockdown* Effekt (-65% Inhibitor-1 mRNA) bei der Behandlung mit I-1 #4 erreicht wurde.

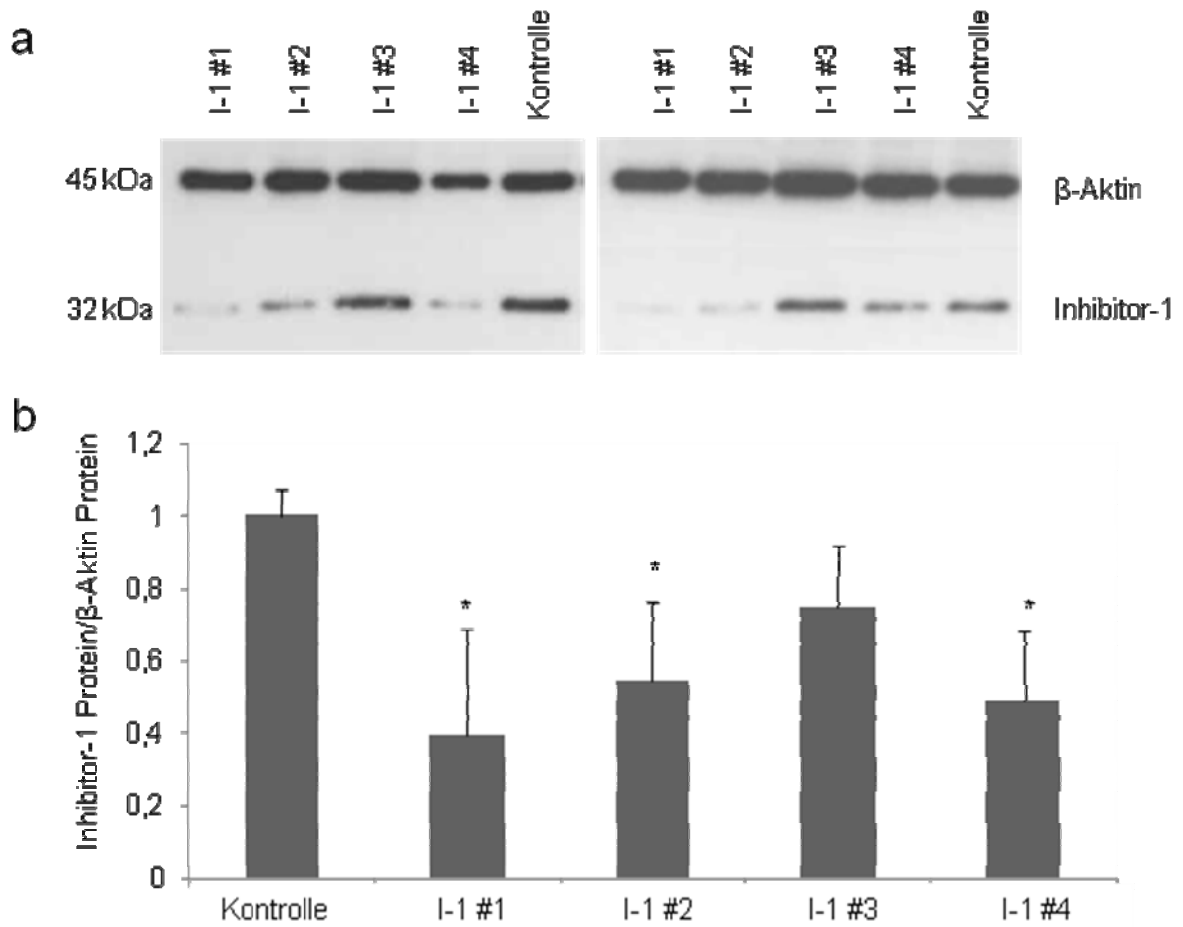


**Abbildung 23: Inhibitor-1 mRNA Herunterregulation durch siRNA.** Vergleichende Darstellung der Inhibitor-1 mRNA-Konzentration in der stabilen Inhibitor-1 HEK293 Zelllinie nach Einwirkung der verschiedenen siRNAs. Als interner Standard diente GAPDH. Alle Messergebnisse wurden auf die mit der Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normalisiert. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle,  $n=3$ .

### 3.2.4 Vergleich der verschieden siRNA-Sequenzen gegen Inhibitor-1 auf Proteinebene

Das entscheidende Kriterium für den Vergleich der siRNA-Sequenzen war jedoch der Rückgang der Inhibitor-1 Proteinkonzentration. Um dies zu überprüfen, wurden erneut Zellen ausplattiert und wie oben mit allen siRNA gegen Inhibitor-1 transfiziert.

Nach 3 Tagen wurden die Zellen geerntet und die Inhibitor-1 Proteinkonzentration im Westernblot quantifiziert. Aufgrund der unterschiedlichen Zelldichte bei der Ernte kam es teilweise zu erheblichen Schwankungen in der *Knockdown* Effizienz der einzelnen siRNAs. So war ein maximaler Effekt von etwa -60% Inhibitor-1 Proteinkonzentration zu beobachten. Es lag eine signifikante Senkung der Inhibitor-1 Proteinmenge bei den siRNAs I-1 #1, I-1 #2, I-1 #4 gegenüber der Kontroll-siRNA vor. Der stärkste Effekt war bei der siRNA I-1 #1 und I-1 #4 festzustellen. Die Reihenfolge der Effektivität, die auf Ebene der mRNA gemessen wurde, konnte somit auf Proteinebene bestätigt werden.



**Abbildung 24: Herunterregulation von Inhibitor-1 durch siRNA.** Vergleichende Darstellung der Inhibitor-1 Proteinkonzentration in der stabilen Inhibitor-1 Zelllinie nach verschieden langer Einwirkung der verschiedenen siRNAs.

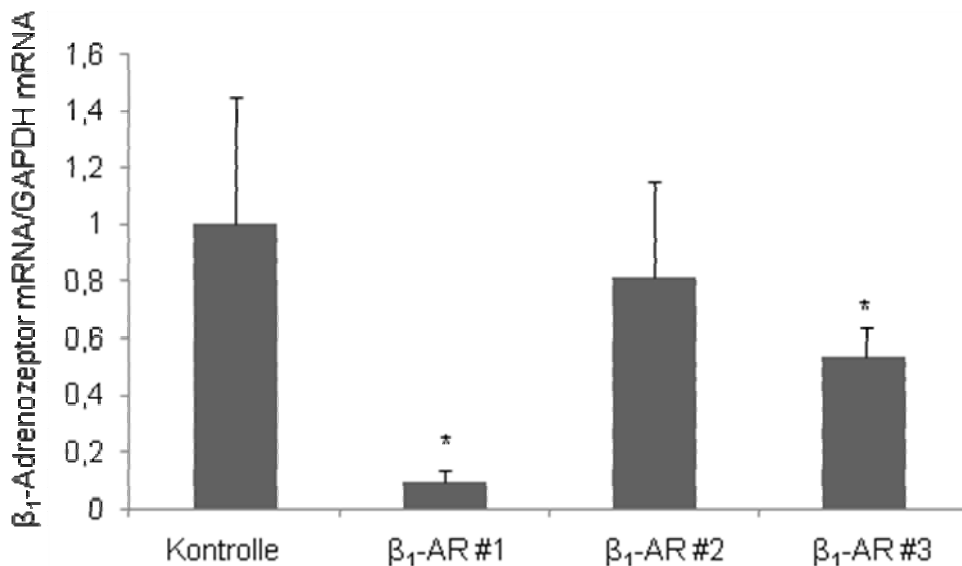
(a) Repräsentativer Ausschnitt des Westernblots. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.  
 (b) Photodensitrometrische Auswertung. Alle Messergebnisse wurden auf die Inhibitor-1 Proteinkonzentration der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normalisiert.  
 \* $p < 0,05$  versus Kontrolle,  $n = 3$ .



### 3.2.5 Vergleich der verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen den $\beta_1$ -Adrenozeptor auf mRNA-Ebene

Zellen der stabilen Zelllinie HEK293 pIRES2-EGFP- $\beta_1$  wurden zunächst ausplattiert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit den siRNAs  $\beta_1$  #1,  $\beta_1$  #2,  $\beta_1$  #3, sowie der Kontroll-siRNA. 3 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und die RNA isoliert. Diese wurde in cDNA umgeschrieben und die  $\beta_1$ -Adrenozeptor mRNA, sowie GAPDH als Standard quantitativ durch Echtzeit PCR erfasst.

Die Sequenzen  $\beta_1$  #1 und  $\beta_1$  #3 führten jeweils zu einer signifikanten Reduktion der  $\beta_1$ -Adrenozeptor mRNA-Konzentration um 85% bzw. 55% gegenüber der Kontroll-siRNA (siehe Abbildung 25).



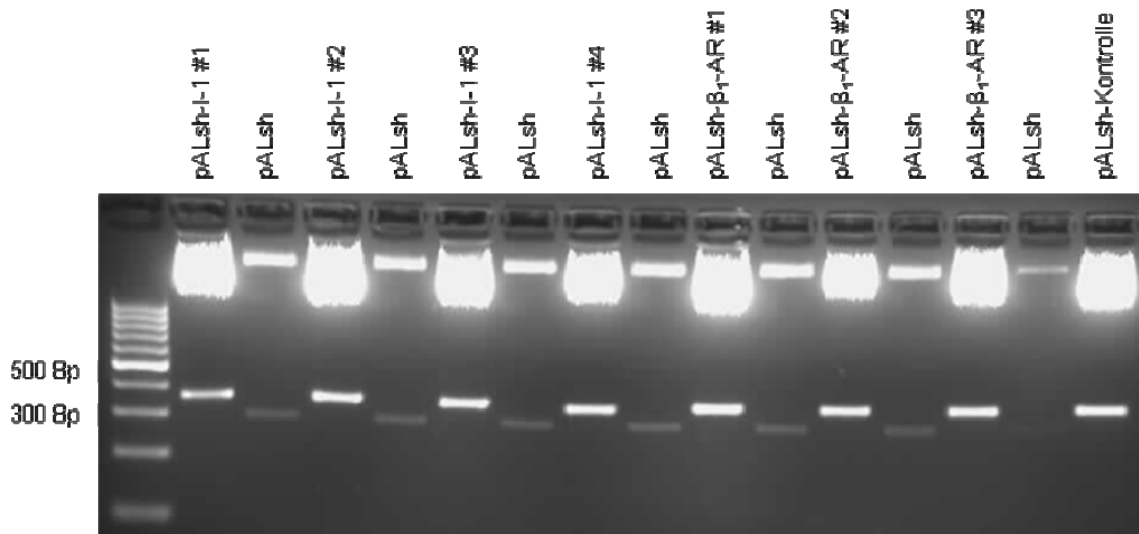
**Abbildung 25: Vergleichende Darstellung der  $\beta_1$ -Adrenozeptor mRNA-Konzentration in stabiler Zelllinie nach Einwirkung der verschiedenen siRNAs.** Als interner Standard diente GAPDH. Alle Messergebnisse wurden auf die  $\beta_1$ -Adrenozeptor mRNA-Konzentration in den mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normalisiert. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle,  $n = 3$ .

### 3.3 RNA-Interferenz – shRNA-Expression

Die shRNA Expression erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch das Expressionsplasmid pALsh. Dieses wurde, wie oben (Seite 35) beschrieben, mit dem Restriktionsenzym *BseRI* linearisiert und die shRNA-cDNA für jede der 8 verwendeten siRNAs hineinkloniert.

Nach der Transformation wurden positive Klone mittels Restriktionsverdau durch die Enzyme *SacI* und *KpnI* verifiziert. Eine *SacI* Schnittstelle lag dabei zwischen den *BseRI*

Schnittstellen. Sie fiel bei erfolgreicher Ligation weg. Eine weitere *SacI* Schnittstelle lag vor dem H1 Promotor, eine *KpnI* Schnittstelle direkt hinter dem Insert.



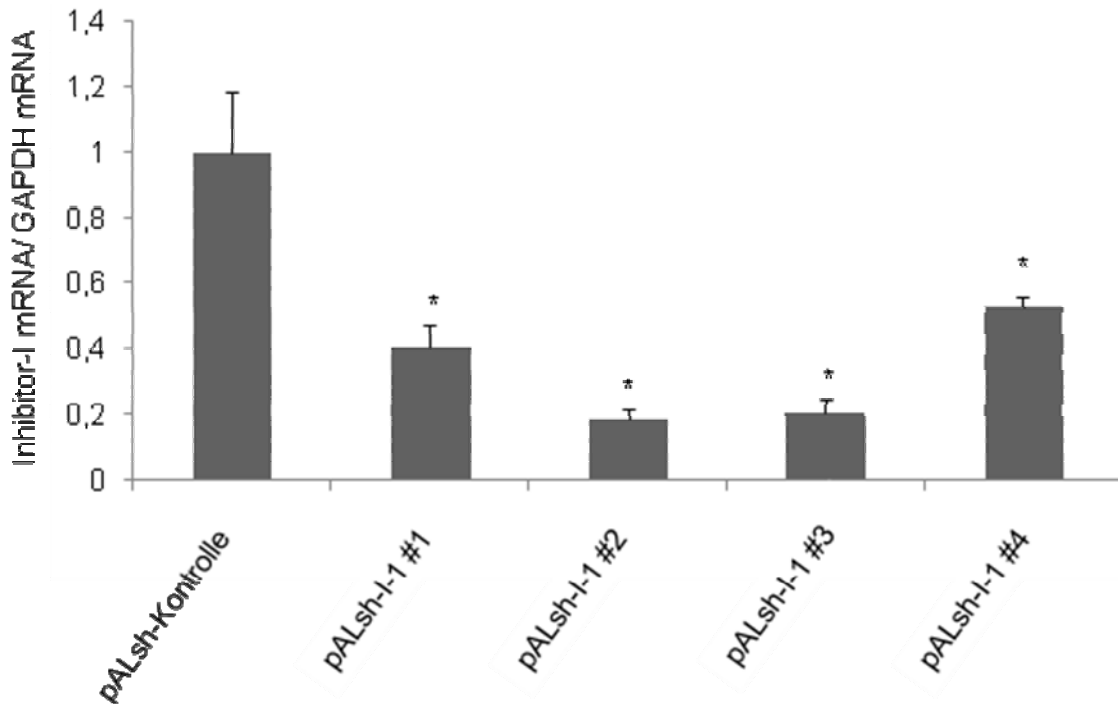
**Abbildung 26: Restriktionsanalyse aller pALsh Klone mit den Enzymen *SacI* und *KpnI*.** Als Vergleich wurde neben jeder Probe verdauter Wildtyp pALsh geladen. Bei positiven Klonen ergaben sich rechnerisch eine Bande von 355 Bp und eine Bande von 2856 Bp. Bei negativen Klonen liefen eine Bande bei 300 Bp und eine bei 2856. Ein kleines Fragment von 35 Bp konnte auf dem Gel nicht detektiert werden.

Die Synthese von Oligonukleotiden > 30 Bp ist oft mit Fehlern behaftet. So ergab sich bei der Sequenzierung der fertigen pALsh Vektoren das Fehlen von zehn Nukleotiden am 3' Ende der Sequenz I-1 #4 sowie das Fehlen des 31. Nukleotids pALsh- $\beta_1$ -AR #3. Die Sequenzen wurden trotzdem verwendet. Die Auswirkungen dieser inkorrekten Sequenzen werden auf Seite 63-66 diskutiert. Die übrigen Sequenzen waren korrekt.

### 3.3.1 Evaluation von shRNA-Effekten gegen Inhibitor-1

Hierzu wurden stabile HEK293 pIRES2-EGFP-I-1 Zellen mit den Vektoren pALsh-I-1 #1, pALsh-I-1 #2, pALsh-I-1 #3, pALsh-I-1 #4 und pALsh-Kontrolle transfiziert.

Als erster Schritt wurde die mRNA-Konzentration von Inhibitor-1 unter shRNA-Einfluss gemessen. Nach drei Tagen erfolgte die Zellernte. Die gewonnene RNA wurde in cDNA umgeschrieben und die Inhibitor-1-mRNA mittels Echtzeit PCR quantifiziert.

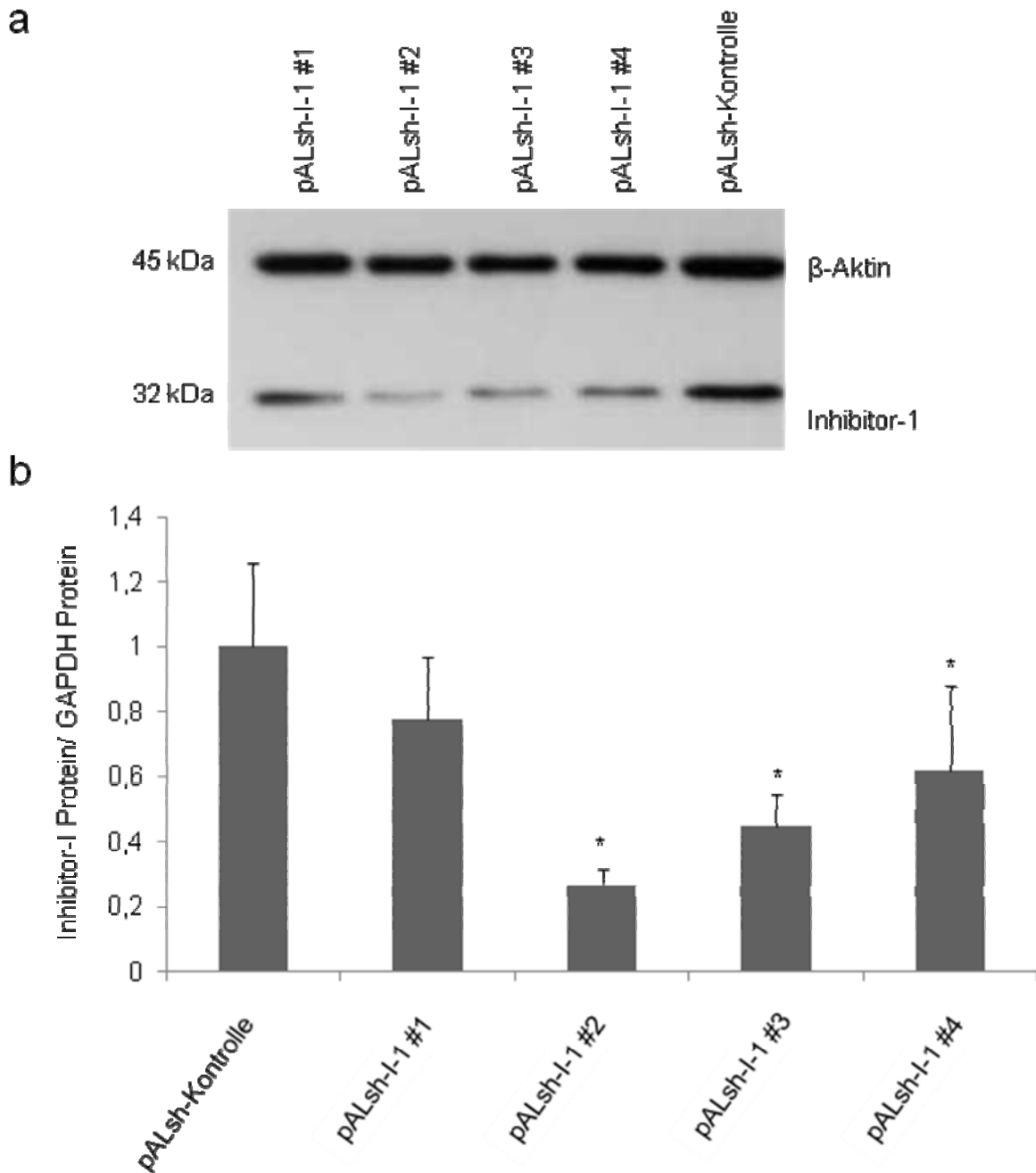


**Abbildung 27: Herunterregulation von Inhibitor-1 in stabilen HEK293 durch Expression von shRNA auf mRNA-Niveau.** Als interner Standard diente GAPDH. Es wurden die Effekte aller Plasmide auf ein Kontrollplasmid mit einer Kontroll-shRNA bezogen. \* $p < 0,05$  Kontrolle,  $n = 3$ .

Mit allen shRNAs ließ sich die Inhibitor-1 mRNA-Konzentration signifikant reduzieren. Dabei lagen alle Effekte zwischen 50% und 80% Herunterregulation (Abbildung 27).

Dieses Ergebnis konnte mittels Westernblot auf Proteinebene bestätigt werden. Dazu wurden, wie schon für die mRNA-Analyse, Zellen mit allen pALsh Plasmiden gegen Inhibitor-1 sowie der pALsh-Kontrolle transfiziert. Die Zellernte erfolgte nach drei Tagen in Lysepuffer.

Wie zu erwarten war, war der Effekt hier geringer als auf mRNA-Ebene. Dennoch ließ sich auch auf Proteinebene ein Abfall von Inhibitor-1 um 70%, verglichen mit der Kontrolle, nachweisen (Abbildung 28). Die sich darstellende Reihenfolge der Effektivität der shRNA- Vektoren entsprach den Ergebnissen auf mRNA-Ebene.

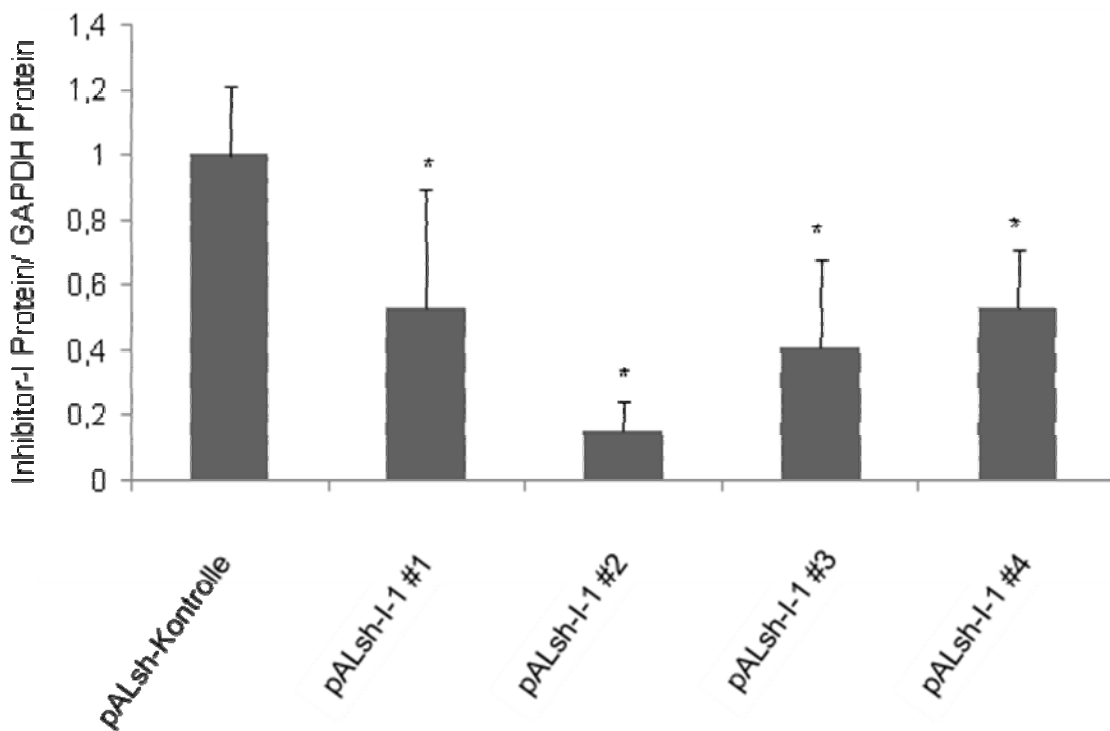


**Abbildung 28: Herunterregulation von Inhibitor-1-Protein in HEK293 durch Expression von shRNA.** (a) Repräsentativer Ausschnitt des Westernblots. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. (b) Photodensitrometrische Bandenquantifizierung. Alle Messergebnisse wurden auf Inhibitor-1 der mit Kontroll-siRNA transfizierten Zellen normalisiert. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle,  $n = 3$ .

Da je nach Spezies die Effizienz einer siRNA oder shRNA beträchtlich schwanken kann und die shRNA später im Mausmodell verwendet werden soll, wurde die Effizienz der shRNA auch an NIH3t3 Zellen getestet. Dabei handelte es sich um Mäusefibroblasten, von denen analog zu den HEK293 Zellen mit dem pIRES2-EGFP-I-1 Vektor eine stabile Zelllinie generiert wurde.

Die NIH3t3 Zelllinie wurde wie schon die HEK293 Zellen mit den Vektoren pALsh-I-1 #1-4 und pALsh-Kontrolle transfiziert. Die Zellen wurden nach drei Tagen geerntet und die Inhibitor-1 Proteinkonzentration im Westernblot untersucht.

Der Inhibitor-1 *Knockdown* war in den NIH3t3 Zellen insgesamt etwas stärker als in den HEK293 Zellen. Alle vier pALsh shRNA-Expressionsplasmide erreichten, verglichen mit dem Kontrollplasmid, eine signifikante Reduktion von Inhibitor-1. Wie schon bei der HEK293 Zelllinie wurde auch bei der NIH3t3 Zelllinie mit dem pALsh-I-1 #2 die stärkste Herunterregulation beobachtet. Die Abstufungen zwischen den Plasmiden blieben erhalten.

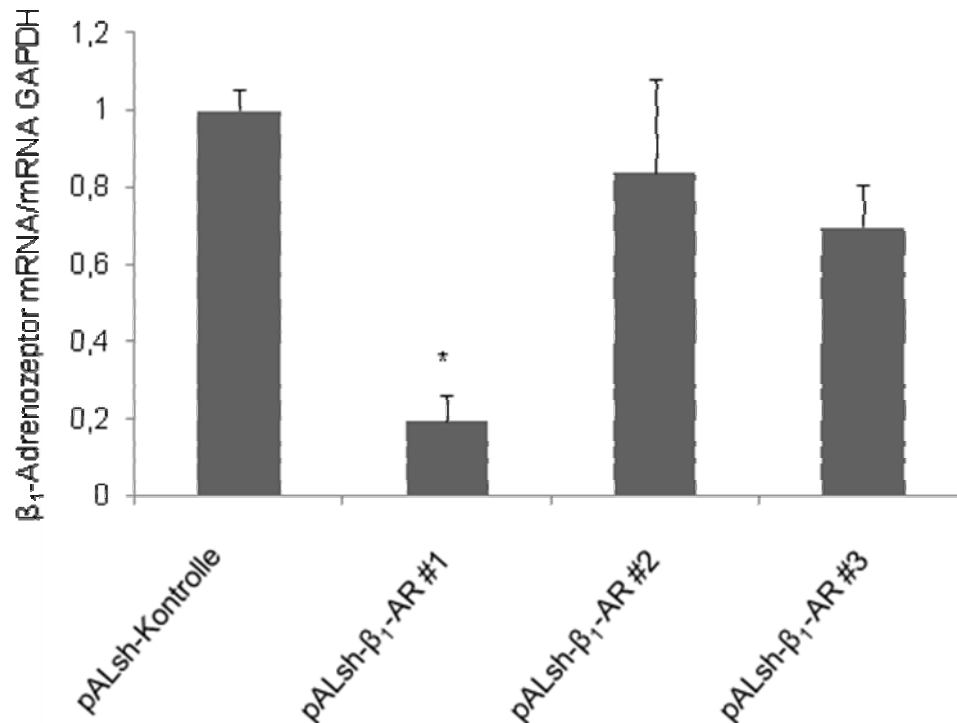


**Abbildung 29: Herunterregulation von Inhibitor-1 in stabilen NIH3t3 pIRES2-EGFP-I-1-Zellen.** Photodensitrometrische Auswertung des Westernblots zu Darstellung der Inhibitor-1-Proteinkonzentration in Zellen, die mit den Vektoren pALsh-I-1 #1-4 und pALsh-Kontrolle behandelt wurden. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle,  $n=6$ .

### 3.3.2 Evaluation von shRNA-Effekten gegen den $\beta_1$ -Adrenozeptor in HEK293 Zellen

Es wurden stabile HEK293 pIRES2-EGFP- $\beta_1$ -AR Zellen ausplattiert. Nach 24 h erfolgte die Transfektion mit den Vektoren pALsh- $\beta_1$ -AR #1, pALsh- $\beta_1$ -AR #2, pALsh- $\beta_1$ -AR #3 und pALsh-Kontrolle. Nach 3 Tagen wurde die RNA der Zellen präpariert und mRNA des  $\beta_1$ -Adrenozeptor quantitativ mittels Echtzeit PCR bestimmt.

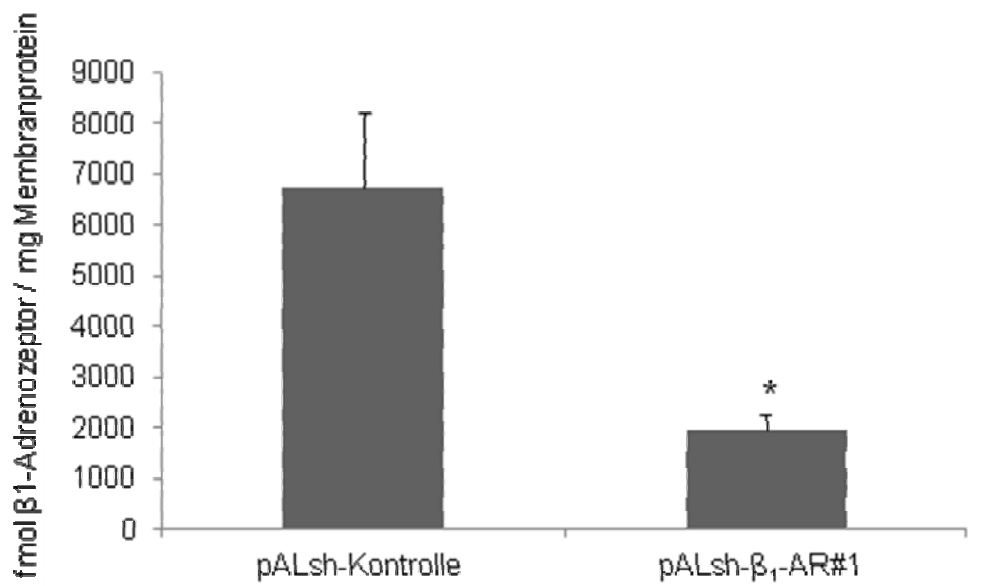
Die shRNA des Vektors pALsh- $\beta_1$  #1 führte zu einer signifikanten Reduktion der mRNA des  $\beta_1$ -Adrenozeptors um 80 %. Die beiden anderen Vektoren zeigten keinen signifikanten Effekt (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Herunterregulation der  $\beta_1$ -Adrenozeptor mRNA-Konzentration durch Expression von shRNA.** Vergleich der verschiedenen pALsh-Plasmide in stabilen HEK293 in ihrer *Knockdown* Effizienz. Als interner Standard diente GAPDH. Es wurden die Effekte aller Plasmide auf ein Kontrollplasmid mit einer Kontroll-shRNA bezogen. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle,  $n=3$ .

Um die Wirkung der shRNA auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden zwei Schalen der stabilen Zelllinie mit dem auf mRNA-Ebene effektivstem Vektor pALsh- $\beta_1$  #1 und zwei Schalen mit pALsh-Kontrolle transfiziert. Nach drei Tagen erfolgten die Zellernte und Präparation der Membranen. Anschließend erfolgte die Abschätzung der Dichte der  $\beta_1$ -Adrenozeptoren mittels  $^3\text{H}$ -CGP12177 Bindungsassay.

Der Knockdowneffekt lag hier bei etwa 70% (Abbildung 31). Er lag damit, wie bereits erwartet, etwas unter den Effekten auf mRNA-Ebene.



**Abbildung 31: Herunterregulation der  $\beta_1$ -Adrenozeptordichte durch Expression von shRNA.** Gezeigt ist der *Knockdown* Effekt von pALsh- $\beta_1$  #1 gegen pALsh-Kontrolle in stabilen HEK293 pIRES2-EGFP- $\beta_1$ -AR. Die Quantifizierung erfolgte durch  $^3$ H-CGP12177 Bindungsassay. \* $p < 0,05$  versus Kontrolle,  $n=2$ .

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die Evaluierung von Zielsequenzen zum effektiven *Knockdown* von Inhibitor-1 und dem  $\beta_1$ -Adrenozeptor *in vitro*. Dazu wurden zunächst verschiedene siRNA-Sequenzen bezüglich ihrer Effektivität an verschiedenen, die entsprechenden Proteine stabil überexprimierenden, Zellen überprüft. Anschließend erfolgte, zur stabilen endogenen Expression von Inhibitor-1/ $\beta_1$ -Adrenozeptor shRNAs, die Klonierung der entsprechenden Sequenzen in Expressionsplasmide mit einem RNA-Polymerase III Promotor. Diese wurden anschließend transfiziert, sowie eine Quantifizierung des *Knockdowns* auf mRNA und Proteinebene in unterschiedlichen Zellsystemen vorgenommen.

### 4.1 Stabile Zelllinie als Grundlage für die Evaluation von RNA-Interferenz

Der Inhibitor-1 weist ungewöhnliche physiko-chemische Eigenschaften auf. Es handelt sich um ein hitzestabiles und säurelösliches Protein (Huang und Glinsmann 1976), das in Kardiomyozyten und Herzmuskelgewebe erst nach starker Anreicherung mittels TCA-Extraktion immunologisch nachweisbar ist (El-Armouche et al. 2004). In Standard-SDS-Homogenaten konnte der Inhibitor-1 bis jetzt immunologisch nicht nachgewiesen werden. Bei Überexpression (z.B. adenoviral) war die immunologische Detektion jedoch problemlos möglich (El-Armouche et al. 2003). Ein ähnliches Problem bestand bei dem Nachweis des  $\beta_1$ -Adrenozeptors. Der Nachweis auf Proteinebene gelang im Rahmen dieser Arbeit, mangels Spezifität der zur Verfügung stehenden Antikörper, nicht im Immunoblot (Seite 47). Vielmehr waren Bindungsversuche mit Radioliganden notwendig (Kaumann et al. 2004a). In Fibroblasten war die Dichte an  $\beta_1$ -Adrenozeptoren allerdings so gering, dass auch im Bindungsassay kein Nachweis möglich war (Seite 48). Die Evaluation von siRNA- und shRNA-Effekten gegen den  $\beta_1$ -Adrenozeptor in Kardiomyozyten, in denen der Rezeptor für einen Nachweis ausreichend exprimiert würde, schied allerdings wegen der erschwerten Lipofektion der siRNAs und shRNA-Expressionsplasmide aus (El-Armouche et al. 2007).

Deshalb wurden in dieser Arbeit die beiden Proteine, Inhibitor-1 und der  $\beta_1$ -Adrenozeptor, in verschiedenen immortalen Zelllinien überexprimiert. Die transiente Überexpression von Proteinen in Zellen brachte allerdings Schwankungen mit sich, die aus der unterschiedlichen Transfektionseffizienz der Expressionsvektoren resultierte. Diese ergab sich unter anderem aus der schwankenden Zelldichte zum Zeitpunkt der Transfektion, sowie aus potentiellen Pipettierfehlern bei der Lipofektion. Ein konstanteres Modell ist eine das Protein stabil überexprimierende Zelllinie, was auch



eine Doppeltransfektion erspart. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig eine Zelllinie generiert, die den Inhibitor-1 stabil überexprimiert. Dieses hatte folgende Vorteile: 1. Es war möglich, RNA-Interferenz über einige Tage zu beobachten, da die Inkubationszeit zwischen beiden Transfektionen wegfiel. Dadurch war, bei gleicher Einwirkzeit der siRNA oder shRNA, die Zelldichte am Ende des Experiments geringer. Eine zu hohe Zelldichte kann per se Ergebnisse verfälschen. 2. Wenn auch nicht alle stabilen Zellen klonal waren, also nicht von einer einzigen Zelle abstammten, konnte dennoch von einer pro Kulturschale im Durchschnitt einheitlichen Proteinexpression ausgegangen werden.

In dieser Arbeit wurde RNA-Interferenz sowohl in Mäusefibroblasten (NIH3t3) als auch in menschlichen HEK293 Zellen untersucht. Erstaunlicherweise traten kaum Unterschiede zwischen den Zelltypen auf: Die Abstufung in der Effizienz der einzelnen eingesetzten Sequenzen war relativ gesehen sehr ähnlich. So war in beiden Zelllinien jeweils der pALsh-I-1 #2 am effizientesten, gefolgt von pALsh-I-1 #3 (Seite 58, 59). Jedoch war die Herunterregulation in den NIH3t3 Zellen insgesamt etwas effizienter (-70% Inhibitor-1 Proteinkonzentration bei HEK293 gegen -85% Inhibitor-1 Konzentration in NIH3t3 Zellen nach Behandlung z.B. für pALsh-I-1 #2). Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung könnte darin liegen, dass je nach Zellart der RISC Apparat unterschiedlich ausgeprägt ist (Elbashir et al. 2001a).

## **4.2 Knockdown Effizienz exogener siRNA Transfektion versus endogener shRNA-Expression**

In dieser Arbeit wurde die Effizienz direkter, exogener siRNA-Transfektion mit endogener shRNA-Expression verglichen.

Eine grundsätzliche Frage bei der Arbeit mit RNA-Interferenz besteht in der Vorhersehbarkeit von Effekten einer beliebig gewählten RNA-Sequenz. Schon für siRNA-Oligos ist es schwer vorherzusagen, ob durch sie bei Anwendung tatsächlich ein Gen herunterreguliert wird. Dies gilt noch in verstärktem Maße für ein shRNA-Expressionssystem, da hier neben den Effekten, die die siRNA-Oligos selbst erzeugen, noch Ereignisse auf dem Weg zu ihrer Expression einen Einfluss auf ihre Effizienz haben können (siehe unten). Allerdings gibt es verschiedene Regeln zum Design von „effizienten“ siRNAs (Tuschl et al. 1999), die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen. Für jede siRNA wurde die Bindungsstärke der beiden Stränge berechnet (Seite 33). Damit der Antisensestrang in den RISC inkorporiert wurde, was für eine effektive Genrepression notwendig war, mussten die beiden Stränge der siRNA am 5' Ende des Antisensestranges weniger stabil verbunden sein als am 3' Ende (Schwarz et al. 2003;

Khvorova et al. 2003). Eine Einteilung von siRNAs nach Bindungsenergie­differenz an ihren Enden ist jedoch nur nach „effizient“ und „nicht effizient“ möglich. Ein ab­stufender Vergleich zweier „effizienter“ siRNAs aufgrund einer unterschiedlichen Bindungsenergie­differenz ist nicht möglich, was sich auch in der Effektivität der unterschiedlichen, in dieser Arbeit getesteten siRNAs widerspiegelte. Deren Bindungsenergie­differenz nahm mit aufsteigender Nummerierung der Sequenzen ab (Seite 33). So ist eine vergleichende Aussage bezüglich der Effizienz zweier siRNA-Sequenzen nur empirisch möglich.

Ungleich schwieriger werden Überlegungen zu shRNAs, da hier neben den Eigenschaften einer als siRNA prozessierten shRNA noch weitere, nicht direkt von der Struktur ableitbare Faktoren eine Rolle spielen können, die den Effekt einer shRNA-Expression determinieren. Hier könnte vor allen Dingen das Zusammenspiel zwischen H1 Promotor und shRNA-Sequenz zum Tragen kommen. Grundsätzlich ist das System shRNA effektiver in der Herunterregulation von Proteinen als siRNA (Brummelkamp et al. 2002). Dies konnte, zumindest teilweise, in dieser Arbeit bestätigt werden. Für den Inhibitor-1 ergab sich dabei, dass die zweite und dritte Sequenz jeweils im Expressionssystem sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinniveau deutlich effektiver waren (Seite 53, 54 und 57, 58). Die erste Sequenz war sowohl als siRNA-Oligo, als auch als shRNA wirkungslos. Bei der vierten Sequenz zeigte sich eine erstaunliche Diskrepanz zwischen siRNA-Oligo und shRNA. Während das Oligo eine stärkere Inhibitor-1 Herunterregulation auf mRNA-Ebene erzeugte, war paradoxerweise der Effekt auf Proteinebene etwa gleichstark. Die nackte siRNA bewirkte in diesem Fall eine Herunterregulation von Inhibitor-1 von -70% auf mRNA-Ebene, der Rückgang der Expression lag bei derselben Sequenz als shRNA nur bei -50%. Hier lag der Verdacht nahe, dass bei der Generierung von sehr großen Oligos, wie sie im Rahmen dieser Arbeit für die Klonierung der pALsh-Plasmide verwendet wurden, Sequenzfehler aufgetreten sein konnten. Daher wurde die Expressionskassette aller Vektoren sequenziert. In der Tat konnte dadurch die Unwirksamkeit der entsprechenden shRNA erklärt werden. So ergab die Sequenzierung der shRNA in pALsh-I-1 #4 das Fehlen von 10 Nukleotiden am 3' Ende des Antisensestranges (Seite 56). Hierfür gibt es prinzipiell zwei Erklärungsmöglichkeiten: (1.) Die Sequenzierung lief nicht korrekt ab und (2.) die Sequenz selbst war nicht korrekt. So ist oftmals die Sequenzierung von palindromischen Sequenzen schwierig, da es während der PCR von shRNA-Vektoren häufig zur Ausbildung von Sekundärstrukturen in der DNA kommt. Diese Faltung führt dann zum Abbruch der Reaktion (McIntyre und Fanning 2006). Da nach dem fehlenden Stück die Sequenzierung korrekt weiterlief, ist jedoch die zweite Erklärungsmöglichkeit eher anzunehmen. Das bedeutet, dass im o.g. Vektor tatsächlich die Nukleotide

fehlten. Dies würde natürlich zu einer „unsinnigen“ shRNA-Sequenz führen. Eigentlich würde man erwarten, dass die falsche Sequenz keine Auswirkungen auf die Inhibitor-1 Expression haben dürfte. Warum trat dennoch ein moderater Rückgang der Konzentration von Inhibitor-1 mRNA von -30% und -40% Inhibitor-1 Protein im Falle der falschen pALsh Sequenz auf? Die Frage kann hier nicht abschließend beantwortet werden. Ein isolierter Rückgang der Proteinbiosynthese wäre dadurch erklärbar, dass bereits 11 homologe Basen in einer siRNA RNA-Interferenz auslösen können (Rana 2007). Dabei kommt es allerdings nicht zur Spaltung der Ziel-mRNA, sondern vielmehr wie bei einer endogenen miRNA (siehe unten) zur Translationshemmung. Die mRNA-Spiegel müssten jedoch gleich bleiben, da mRNA-RISC Verbindungen bei ausbleibender Spaltung der mRNA in so genannte P-Körperchen eingelagert werden (Chu et al. 2006). Ein Schutz der mRNA vor Degradation ist die 5' Methylguanositriphosphat Kopfgruppe. Vom P-Körperchen aus kann eine mRNA entweder erneut für die Translation rekrutiert werden oder die Kopfgruppe durch Enzyme entfernt werden und die mRNA so dem Abbau zugeführt werden (Chan und Slack 2006). Dies wäre eine mögliche Erklärung der verringert gemessenen mRNA-Konzentration von Inhibitor-1 nach der Behandlung mit einer fehlerhaften shRNA-Sequenz in pALsh-I-1 #4.

Die beste Effektivität zeigte hingegen die shRNA-Sequenz in pALsh-I-1 #2. Da für eine *in vivo* Anwendung das Zusammenspiel von Promotor und shRNA-Sequenz entscheidend ist, soll diese Sequenz für einen Gentransfer mit einem adenoassoziierten Virus, AAV Verwendung finden (siehe Ausblick).

Eine ähnliche Situation wie bei pALsh-I-1 #4 bestand bei pALsh- $\beta_1$ -AR #3. Lag als nackte siRNA hier noch ein mäßiger aber signifikanter Rückgang der  $\beta_1$ -Adrenozeptor mRNA vor, war mit dem Expressionsvektor kein Effekt nachweisbar. Hier zeigte die Sequenzierung das Fehlen des 31. Nukleotids des klonierten Oligos (Seite 56). Damit fällt das fehlende Nukleotid auf die spätere 8. Stelle des sich bildenden Antisensestranges der shRNA. Es trat somit ein *Frameshift* bei der siRNA auf. Die ersten 7 Nukleotide waren zwar zum Ziel komplementär, konnten jedoch auch keine Translationshemmung erzielen. Somit blieb die shRNA völlig wirkungslos. An diesen Befunden wird deutlich, wie empfindlich und sequenzspezifisch die RNA-Interferenz funktioniert. Eine siRNA-Sequenz, die mindestens 11 Nukleotide umfasst, kann noch eine Wirkung im Sinne von miRNA entfalten. Ist der korrekte Anteil der Sequenz allerdings kürzer, bleibt ein Effekt aus. Da die Sequenz  $\beta_1$ -AR #1 sowohl als siRNA als auch als shRNA den stärksten Effekt hatte, sollte diese für die weiteren Versuche verwendet werden und ebenfalls in ein AAV kloniert werden.

Als methodische Limitation, die natürlich auch für die Inhibitor-1 Ergebnisse gilt, sollte erwähnt werden, dass hier mittels Echtzeit PCR und Westernblot im Gesamthomogenat immer nur ein durchschnittlicher *Knockdown* gemessen wurde. Es kann keine Aussage darüber gemacht werden, (1) wie viele Zellen (%) einen *Knockdown* Effekt zeigten und (2) wie effektiv der *Knockdown* in der einzelnen Zelle war.

Gäbe es Alternativen zu den hier verwendeten siRNA und shRNA? Ein weiterer, neuer Aspekt der RNA-Interferenz Technologie ist die Verwendung von miRNA. Retrospektiv wäre ein solches Versuchskonzept tatsächlich gut vorstellbar. Allerdings handelt es sich bei der in dieser Arbeit verwendeten Form der RNA-Interferenz mit siRNA und shRNA um ein etabliertes Verfahren, das sehr spezifisch und effizient zur Herunterregulation von Genen verwendet wird (Elbashir et al. 2001, Brummelkamp et al. 2002). Die Expression von shRNAs verlangt aber spezielle Promotoren (RNA-Polymerase III U6 Promotor oder H1 Promotor), unter deren Einfluss eine posttranskriptionale Modifikation wie 5'Cap und PolyA Ende unterbleibt (Brummelkamp et al. 2002). Im Verlaufe dieser Arbeit erschienen Veröffentlichungen, die die Stellung von miRNA als neuartiges Werkzeug zur Beeinflussung zellulärer Genexpression weiter festigten (van Rooij et al. 2006, 2007). miRNAs sind wichtige endogene Regulatoren der Genexpression. Ihre Gene sind in den nicht proteogenen Regionen des Zellgenoms kodiert (Rana 2007). Sie werden von vielen Zellen exprimiert und führen zur Herunterregulation sequenzhomologer Gene. Die Expression von miRNAs ist unter anderem von Stress abhängig, sodass am Herzen bereits eine Reihe an miRNA Sequenzen entdeckt wurden, deren Expression sich bei Ausprägung einer Herzhypertrophie gegenüber nicht hypertrophen Herzen ändert. Durch Überexpression oder *Knockout* von miRNA-Genen lässt sich das Entstehen einer Herzhypertrophie begünstigen oder verhindern (Carè et al. 2007, van Rooij et al. 2007). Ein besonderer Vorteil der Expression von miRNA ist, dass es keines speziellen Promotors bedarf. So ist es sogar möglich, mittels z.B.  $\alpha$ -MHC-Promotor herzspezifisch miRNA zu exprimieren und dadurch Nebeneffekte in anderen Organen zu minimieren (van Rooij et al. 2006).

### **4.3 RNA-Interferenz gegen den $\beta_1$ -Adrenozeptor**

Eine typische Veränderung des kranken Herzens und des einzelnen Kardiomyozyten ist die Desensitivierung des  $\beta$ -adrenergen/cAMP/PKA Systems (Übersicht bei Vatner et al. 2000, El-Armouche et al. 2003, Lohse et al. 2003). Sie ist u.a. mit einer Herunterregulation von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren (Bristow et al. 1982) assoziiert, die sehr wahrscheinlich Folge der chronischen Erhöhung des Sympathikotonus ist (Cohn et al.

1984). Die  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung schützt zwar vermutlich vor proarrhythmischen und energieverbrauchssteigernden Effekten der Katecholamine, zum anderen reduziert sie aber z.B. über eine verringerte Phosphorylierung von Phospholamban die diastolische Calciumrückaufnahme und trägt zur mangelnden Belastbarkeit von Patienten mit Herzinsuffizienz bei (Übersicht bei Lohse et al. 2003). In dieser Arbeit wurde die Voraussetzung dafür geschaffen, den  $\beta_1$ -Adrenozeptor *in vivo* unter experimentell pathologischen Bedingungen (Herzinsuffizienz) herunterzuregulieren. Die folgenden Punkte sind zu diskutieren:

Welche generellen Erwartungen oder Nutzen bzw. welche Risiken wären bei einer Veränderung der Katecholaminwirkung auf das Herz zu erwarten?

Eine wie in dieser Arbeit praktizierte Herunterregulation hätte zunächst die Folge einer Verstärkung der Desensitivierung. Demgegenüber stehen viele experimentell therapeutische Veränderungen, die auf einer Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade beruhen. Diese zeigten sich jedoch langfristig als unwirksam oder sogar schädlich. So wiesen Mäuse, die den  $\beta_1$ -Adrenozeptor transgen überexprimierten, eine Herzhypertrophie, verminderte Kontraktilität und eine Übersterblichkeit auf (Engelhardt et al. 1999). Auch bei dem funktionell nachgeschalteten  $G_{sa}$  und der PKA führte eine Überexpression im Mausmodell zur Übersterblichkeit durch plötzlichen Herztod und Herzversagen (Iwase et al. 1997, Antos et al. 2001). Mäuse in denen das Gen der Adenylylzyklase Typ V deletiert wurde, wiesen dagegen einen Schutz gegen eine druckinduzierte Hypertrophie auf (Okumura et al. 2003). Die Übertragung von Ergebnissen aus Tierexperimenten auf den Menschen ist aber nicht immer möglich. So ist beispielsweise ein Phospholamban *Knockout* im Mausmodell protektiv bezüglich der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, wohingegen Menschen, die aufgrund eines Gendefekts eine verkürzte, funktionslose Mutante von Phospholamban exprimieren, im jungen Alter an einer dilatativen Kardiomyopathie versterben (Haghighi et al. 2001, 2003).

Allerdings wurden auch beim Menschen Therapieversuche der chronischen Herzinsuffizienz mit Substanzen unternommen, die eine Stimulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade zum Ziel hatten (z.B. Katecholamine, PDE-Hemmer). Hier zeigte sich, obgleich die Substanzen lange zur Standardtherapie gehörten, eine deutliche Übersterblichkeit im Vergleich zum Placebo (Packer et al. 1991). Dagegen nimmt die  $\beta$ -Blockade im Rahmen der Therapie der Herzinsuffizienz einen hohen Stellenwert ein und ihre Wirksamkeit konnte bereits in mehreren großen Studien gezeigt werden (Packer et al. 1996; CIBIS-Studie 1999; Hjalmarson et al. 2000).

Dies führt zu der Vermutung, dass eine weitere „Desensitivierung“, wie sie das Ziel dieser Arbeit und der Folgeexperimente ist, hilfreich in der Behandlung einer Herzinsuffizienz sein könnte.

### Wie verhält sich die Verringerung der Expression des $\beta_1$ -Adrenozeptors (*Knockdown/Knockout*) im Vergleich zu einer pharmakologischen $\beta$ -Adrenozeptor-Blockade?

Während der  $\beta_1$ -Adrenozeptor bei pharmakologischer Therapie nur blockiert aber nicht deletiert ist, sich also noch in der Zellmembran befindet, könnten auch von Ligandenbindung unabhängige Effekte des  $\beta_1$ -Adrenozeptors eine Rolle spielen, die durch eine Blockierung nicht beeinflusst werden. Solche Effekte sind allerdings noch nicht beschrieben. Ein weiteres wichtiges Problem der Pharmakotherapie mit Betablockern ist jedoch immer noch die mangelnde Spezifität der Blockade, sodass auch  $\beta_2$ -Adrenozeptoren blockiert werden. Dies kann zum Beispiel bei Patienten mit obstruktiven Atemwegserkrankungen oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit zu Nebenwirkungen führen.

Bei *Knockout* Mäusen konnte das komplette Fehlen von  $\beta_1$ -Adrenozeptoren untersucht werden. Die oben beschriebenen „Nebenwirkungen“ traten nicht auf. Solche Tiere erscheinen phänotypisch zunächst unauffällig. Erwartungsgemäß war die Isoprenalinsensitivität stark vermindert, fehlte jedoch nicht völlig (Rohrer et al. 1996). Der Baroreflex ließ sich bei  $\beta_1$ -Adrenozeptor *Knockout* Mäusen gleichermaßen wie auch bei Wildtyp Mäusen auslösen. Auch die Belastbarkeit der Tiere im Laufrad unterschied sich nicht signifikant, wenngleich die maximale Herzfrequenz der *Knockout* Mäuse deutlich verringert war (Rohrer et al. 1998).

Die möglicherweise protektiven Einflüsse des völligen Fehlens des  $\beta_1$ -Adrenozeptors auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz sind erstaunlicherweise bis jetzt noch unerforscht. Denkbar wären hier Studien, die die Auswirkungen einer druckinduzierten Hypertrophie (TAC, siehe Ausblick) oder künstlich erzeugten Infarkten durch permanente LAD-Ligatur bei *Knockout* Mäusen untersuchen würden. Allerdings handelt es sich bei *Knockout* Mäusen ohnehin nur um einen experimentellen Ansatz, bei dem eine therapeutische Übertragung auf den Menschen nicht möglich ist. Auch wurde bis jetzt noch kein Mensch beschrieben, der auf Grund eines genetischen Defektes keine funktionsfähigen  $\beta_1$ -Adrenozeptoren exprimiert.

Ein Therapieansatz, nachdem der  $\beta_1$ -Adrenozeptor vollständig fehlt, hätte also möglicherweise andere Effekte als eine pharmakologische  $\beta$ -Blockade. Ein neuartiger Versuchsansatz wäre die in dieser Arbeit praktizierte RNA-Interferenz gegen den Rezeptor. Diese Intervention könnte dabei zu einem beliebigen Zeitpunkt eingesetzt

werden. Damit wäre ein therapeutisch unrealistischer Aspekt der *Knockout* Maus, nämlich, dass der Rezeptor hier bereits im Eizellstadium fehlt und die „Therapie“ nicht erst mit Auftreten einer Herzinsuffizienz begonnen wird, ausgeräumt. Es würde die Menge der kodierenden mRNA und auch die Rezeptorzahl auf der Zelloberfläche selbst verringert werden, wie bei einer *Knockout* Maus. So konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Lipofektion von siRNA gegen den  $\beta_1$ -Adrenozeptor in HEK293 Zellen eine Herunterregulation des  $\beta_1$ -Adrenozeptors um 80% auf mRNA-Niveau (Seite 55) bei vorhergehender stabiler Überexpression erreicht werden. Ein Nachteil beim Einsatz von siRNA ist allerdings die kurze Wirkdauer (etwa vier Tage, Fechner et al. 2006). Dies schränkt auch einen potentiellen therapeutischen Nutzen von nackter siRNA *in vivo* ein, wenngleich sie dennoch kurzfristig erhebliche Wirkungen erzielen können. So zeigten Ratten nach Lipofektion von siRNA gegen den  $\beta_1$ -Adrenozeptor einen niedrigeren Blutdruck und auch eine verbesserte kontraktile Funktion nach myokardialer Ischämie (Arnold et al. 2007). Ein verbessertes Prinzip der RNA-Interferenz ist die Expression von shRNA. Dabei ist es möglich, über längere Zeit intrazellulär konstant siRNAs zu generieren (Brummelkamp et al. 2002). Es gibt bereits eine Vielzahl von Zelllinien, bei denen shRNA-Expressionsvektoren stabil ins Zellgenom integriert wurden und somit der *Knockdown* eines Zielgens dauerhaft bestehen blieb (Paskowitz et al. 2007). Als Vorbereitung für *in vivo* Versuche wurden in der vorliegenden Arbeit alle siRNAs auch in ihrer Wirkung nach Expression als shRNA verglichen. Dabei zeigte sich ein maximaler *Knockdown* Effekt des  $\beta_1$ -Adrenozeptors von 80% auf mRNA-Niveau und von 70% auf Proteinebene. Allerdings ist auch ein Plasmid als Vektor für *in vivo* Versuche nur schlecht vorstellbar. Zu gering sind die Herzspezifität und die Transfektionseffizienz. Effektiv ist mit dieser Technik nur der Gentransfer in die Leber (Herweijer und Wolff 2003). Dies dürfte auch ein erheblicher Kritikpunkt an der Arbeit von Arnold und Kollegen sein. Der Gentransfer erfolgte organunspezifisch und der größte Teil der siRNA dürfte von der Leber aufgenommen worden sein. Denkbare Vektoren wären jedoch adenoassoziierte Viren vom Serotyp 9, die eine relative Herzspezifität zeigen (Seite 71).

#### **4.4 RNA-Interferenz gegen Inhibitor-1**

Neben der selektiven RNA-Interferenz gegen den  $\beta_1$ -Adrenozeptor wäre das Eingreifen in die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade unterhalb des Rezeptors ein neuartiger Ansatz. Ein mögliches Ziel für eine derartige Intervention wäre der Inhibitor-1. Der Inhibitor-1 bewirkt durch die hochpotente Hemmung der PP1 ( $IC_{50}=1$  nM) eine verstärkte PKA-abhängige Phosphorylierung von Regulatorproteinen und damit eine Verstärkung der Katecholamineffekte am Herzen (Neumann et al. 1991, Carr et al. 2002; El-Armouche

et al. 2003, Pathak et al. 2005, El-Armouche et al. 2006). Eine Herunterregulation von Inhibitor-1 durch RNA-Interferenz könnte somit eine Art „partielle intrazelluläre  $\beta$ -Blockade“ bewirken. So wurden im Rahmen dieser Arbeit siRNA-Sequenzen gegen den Inhibitor-1 evaluiert. Die maximale Herunterregulation betrug hier ca. 65% gegenüber der Kontroll siRNA auf mRNA-Niveau und 60% auf Proteinniveau. Die endogene H1 Promotor getriebene Expression der entsprechenden shRNA führte zu einer Reduktion der Inhibitor-1 mRNA-Konzentration um 80% und der Proteinkonzentration um 70%. Grundsätzlich kann bemerkt werden, dass die Effekte mit Angaben in der Literatur vergleichbar waren (Elbashir et al. 2001b; Brummelkamp et al. 2002; Fechner et al. 2006; El-Armouche et al. 2007). Weiterhin konnte bestätigt werden, dass shRNA effizienter ist als die Transfektion von nackter siRNA. Dabei ist zu bedenken, dass die Testbedingungen im Rahmen dieser Arbeit eher noch schwieriger waren als in der zitierten Literatur. Dort wurde RNA-Interferenz nur gegen endogene Genexpression eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit erfolgte jedoch eine vom CMV-Promotor abhängige, also sehr starke Überexpression von Inhibitor-1 und dem  $\beta_1$ -Adrenozeptor.

### Welche Unterschiede bestehen zwischen einer Manipulation der $\beta$ -adrenergen Signalkaskade am Rezeptor und nachgeschalteten Proteinen wie Inhibitor-1?

Ein interessanter Unterschied könnte in der Regulation der Herzfrequenz liegen. Offensichtlich beeinflussen Katecholamine durch Bindung an den  $\beta_1$ -Adrenozeptor auch PKA-unabhängige intrazelluläre Signalwege. So werden beispielsweise HCN-Kanäle im Sinusknoten direkt durch cAMP-Bindung aktiviert und dadurch positiv chronotrope Effekte erzeugt (Kaupp und Seifert 2002; Baruscotti et al. 2005). Darin könnte auch die Erklärung für ein scheinbar paradoxes Phänomen liegen. Betrachtet man Mäuse, die die  $\alpha$ -Untereinheit des stimulierenden G-Proteins  $G_{s\alpha}$  überexprimieren, entsteht hier erwartungsgemäß eine Erhöhung der Herzfrequenz (Iwase et al. 1997). Demgegenüber führte die Überexpression der katalytischen Untereinheit der PKA zu einer signifikanten Verringerung der Herzfrequenz. Dabei wiesen die Tiere eine etwa vierfache Hyperphosphorylierung verschiedener PKA-Substrate wie dem Ryanodinrezeptor oder Phospholamban auf (Antos et al. 2001).

Der Anteil der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade oberhalb der PKA, also Adenylylzyklase, cAMP-Spiegel und die HCN-Kanalaktivität, würden vermutlich nicht durch eine Blockade von Inhibitor-1 beeinflusst. Dies zeigt sich dadurch, dass die basale Herzfrequenz und der Herzfrequenzanstieg nach  $\beta$ -adrenerger Stimulation von Inhibitor-1 *Knockout* Mäusen normal ist. Die Frage nach dem Nutzen einer solchen Teilblockade bleibt offen. Das vollständige Fehlen des HCN-Kanals in *Knockout*



Mäusen führte zu einem frühen Tod der Tiere (Stieber et al. 2003). Ivabradin, ein HCN-Kanalblocker, hingegen ist bereits zur Therapie der stabilen Angina Pectoris zugelassen, der Nutzen dieses Medikamentes ist jedoch noch umstritten (Vilaine 2006).

Derartige mechanistische Überlegungen lassen jedoch kaum eine Aussage über den absoluten Effekt von Inhibitor-1 in der Herzfunktion zu. Selbst nach Betrachtung von transgenen bzw. *Knockout* Mäusen bleibt die Bedeutung von Inhibitor-1 in der Herzinsuffizienz kontrovers. So wiesen transgene Mäuse eine spontane Erhöhung der Herz- zu Körpergewicht-Ratio auf. Nach chronischer Stimulation mit Isoprenalin verstärkte sich dieser Unterschied (unveröffentlichte Befunde aus unserer AG). Bei Inhibitor-1 *Knockout* Mäusen ergab sich eine normale basale Herzfunktion, die Tiere blieben ihr Leben lang herzgesund. Allerdings fiel hier die katecholamininduzierte Fibrose, Myokarddilatation und  $\beta$ -adrenerge Desensitivierung deutlich geringer aus, als bei Wildtyp Mäusen (El-Armouche et al. unveröffentlicht). Demgegenüber stehen die Ergebnisse einer anderen Arbeitsgruppe: Hier wurde eine verminderte Herzfunktion bei *Knockout* Mäusen aus derselben Linie beschrieben (Carr et al. 2002). Darüber hinaus gelang es dort durch die adenovirale transgene Überexpression eines veränderten, dauerhaft aktiven Inhibitor-1 Proteins kardiale Umbauprozesse nach druckinduzierter Herzinsuffizienz zu reduzieren (Pathak et al. 2005). Die Autoren vermuteten deshalb, dass der adenovirale Gentransfer eines daueraktiven Inhibitor-1 zur Therapie der Herzinsuffizienz herangezogen werden könnte. Dabei ist allerdings zu bedenken, dass die Überexpression des Proteins erheblich ist – etwa die 25- fache Menge der endogenen Inhibitor-1 Expression. Das trunkierte Protein ist deutlich weniger potent als aktivierter Wildtyp Inhibitor-1, sodass eher Bindungskapazität für endogenen Inhibitor-1 verloren gehen könnte. Daraus dürfte sich auch der geringe Aktivitätsverlust der PPI von nur etwa -15% in diesen Mäusen ergeben (Pathak et al. 2005). Ob diese PP1-Aktivitäts-Reduktion für die gemessenen Effekte verantwortlich ist, bleibt zu klären. Desweiteren wären unspezifische Effekte zu diskutieren, da der adenovirale Gentransfer, wie bereits beschrieben, hauptsächlich in die Leber erfolgt.

## 4.5 Ausblick

Die Erfolgsaussichten einer Inhibitor-1 Blockade als Therapieoption im Rahmen einer Herzinsuffizienz lassen sich nur mittels *in vivo* Versuchen sinnvoll abschätzen. Für die Erzeugung einer Herzinsuffizienz bei Mäusen existieren verschiedene Ansätze. Zum Beispiel ist es möglich, mittels einer osmotischen Isoprenalinpumpe eine Dauerstimulation der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade zu erzeugen, wodurch sich eine Herzhypertrophie entwickelt (Eschenhagen et al. 1991; 1992; Boluyt et al. 1995). Eine

weitere Methode ist eine akute Aortenklappenstenose zu simulieren. Dabei wird dem Tier die Aorta mit einer Kanüle als Lehre auf einen definierten Durchmesser zusammengebunden (Rockman et al. 1991). Anschließend erfolgt die „Therapie“. Da eine pharmakologische Beeinflussung der Aktivität von Inhibitor-1 bis jetzt nicht möglich ist, soll RNA-Interferenz zum Einsatz kommen. Der Gentransfer *in vivo* soll mit adenoassoziierten Viren erfolgen (Grimm et al. 2005). Adenoassoziierte Viren gehören zur Familie der Parvoviren. Sie sind selbst nicht replikationsfähig und benötigen deshalb ein Adenovirus, das ebenfalls die Wirtszelle infiziert und für Kapsidstrukturen sowie weitere für die Replikation notwendige Proteine kodiert. Dies ist ein großer Vorteil für die Nutzung von AAV als therapeutisches Instrument, da AAV sich so nicht unkontrolliert im Wirt replizieren können. Ferner sind AAV kaum pathogen und immunogen. Über die Blutbahn können durch sie die meisten Organe erreicht werden. Von AAV sind über 100 Subtypen bekannt. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass der Subtyp 9 für einen besonders spezifischen Gentransfer in Herzmuskelzellen verwendet werden kann (Inagaki et al. 2006; Pacak et al. 2006). Dies ist aber bereits ein immenser Vorteil gegenüber Adenoviren, die zwar wesentlich leichter herzustellen sind, jedoch zum größten Teil die Leber infizieren (Herz und Gerard 1993). Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene shRNA-Sequenzen gegen Inhibitor-1 ausgesucht und im Zusammenspiel mit dem H1 Promotor erprobt. Die „beste“ shRNA-cDNA-Sequenz soll mitsamt Promotor durch passende Restriktionsenzyme aus dem pALsh ausgeschnitten und in ein Plasmid mit der AAV Expressionskassette kloniert werden. Wie oben beschrieben, ist das völlige Fehlen des  $\beta_1$ -Adrenozeptors als Therapeutikum der Herzinsuffizienz anders als die Blockade nicht erforscht. Aus diesem Grunde und auch um einen potentiellen Effekt der Inhibitor-1 Herunterregulation besser abschätzen zu können, sollen analog zu Inhibitor-1 auch AAV konstruiert werden, die für eine shRNA gegen den  $\beta_1$ -Adrenozeptor kodieren.

Die Viren sollen mittels einmaliger Schwanzveneninjektion in die Versuchstiere eingebracht werden. Die Infektionsrate und damit die Effizienz des Gentransfers schwanken und wurden nach einem Pilotexperiment der Arbeitsgruppe von Dr. El-Armouche (unveröffentlicht) auf etwa 30% aller Kardiomyozyten eines Herzens geschätzt. Interessant ist hier ein Vergleich mit der Pharmakotherapie mit  $\beta$ -Blockern. Der tatsächliche Anteil an  $\beta$ -Adrenozeptoren, der dabei blockiert ist, ist unbekannt. Mit folgenden Überlegungen kann aber eine Abschätzung vorgenommen werden. In hohen therapeutischen Dosen bei oraler Gabe liegt die Plasmakonzentration von Metoprolol etwa bei 1  $\mu$ M (Lücker et al. 1990). Bei einer  $K_D$  von 173 nM (Joseph et al. 2004b) sind definitionsgemäß 50% aller Rezeptoren mit Metoprolol besetzt. Eine Plasmakonzentration von 1  $\mu$ M entspricht etwa der sechsfachen  $K_D$ . Damit würden,

unter Annahme einer sigmoidalen Bindungskurve und der gleichmäßigen Verteilung des Medikaments über das gesamte Organ, etwa 80% aller Rezeptoren besetzt. Daran wird deutlich, dass dabei ein erheblich größerer Anteil der Rezeptoren erreicht wird, als wahrscheinlich Inhibitor-1 durch RNA-Interferenz. Allerdings führt dies aufgrund des kompetitiven Mechanismus nicht zu einem kompletten Ausfall der Wirkung von Katecholaminen auf den Rezeptor, sondern verschiebt deren Wirkungen in höhere Konzentrationsbereiche. Dagegen würde der Gentransfer der shRNA-Vektoren die Rezeptoren effektiv ausschalten. Die weiteren Experimente werden zeigen, ob das Gewicht von Inhibitor-1 in der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade so groß ist, dass trotzdem ein therapeutischer Nutzen einer Inhibitor-1 Herunterregulation bei Herzinsuffizienz überprüft werden kann.

## 5 Zusammenfassung

Der Erfolg von Betablockern in der Therapie der Herzinsuffizienz legt nahe, Therapieprinzipien zu testen, die ihren primären Angriffspunkt innerhalb des Kardiomyozyten haben und dort die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade partiell hemmen („intrazelluläre partielle  $\beta$ -Blockade“). Das Abschwächen (*Knockdown*) von Inhibitor-1 könnte diesbezüglich eine interessante Option sein, da (1.) dieses Protein den  $\beta$ -adrenergen Signalweg verstärkt, (2.) es in der menschlichen Herzinsuffizienz wie auch die  $\beta_1$ -Adrenozeptoren stark vermindert ist und (3.) das genetische Fehlen von Inhibitor-1 in Mäusen vor Katecholamin induzierten Arrhythmien und Herzhypertrophie schützt, ohne sichtbare negative Auswirkungen zu haben. Bis jetzt ist jedoch eine spezifische pharmakologische Beeinflussung von Inhibitor-1 nicht möglich. Ziel der Arbeit war es deshalb, *in vitro* die Grundlage dafür zu schaffen, die Wirksamkeit einer herzspezifischen Genabschaltung von Inhibitor-1 im Tiermodell zu testen und dies mit einer Genabschaltung des  $\beta_1$ -Adrenozeptors zu vergleichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst hochspezifische siRNA-Sequenzen gegen Inhibitor-1 und den  $\beta_1$ -Adrenozeptor *in silico* konstruiert und dann kommerziell synthetisiert. Anschließend wurde die biologische Effizienz dieser Sequenzen in Form von exogen applizierter siRNA und endogen produzierter shRNA in verschiedenen Zellsystemen getestet. Für optimale Testbedingungen wurden zuvor mehrere stabile Zelllinien erzeugt, die jeweils eines der beiden Proteine überexprimieren. Die *Knockdown* Effekte wurden sowohl auf mRNA- (mittels quantitativer Echtzeit PCR) als auf Proteinebene (mittels Western Blot bzw. Bindungsassays) gemessen und auf die Effekte einer wirkungslosen Kontroll-siRNA normalisiert. Übereinstimmend mit der Literatur zeigte sich das shRNA System in der spezifischen Herunterregulation von Inhibitor-1 und  $\beta_1$ -Adrenozeptor dem siRNA System überlegen. Hier konnten die mRNA- und Proteinkonzentration von Inhibitor-1 und  $\beta_1$ -Adrenozeptor mit bestimmten shRNAs um bis zu 80% reproduzierbar reduziert werden. Diese hocheffizienten spezifischen shRNAs sollen nun im Rahmen von adenoviral-assoziiertes (AAV-) shRNA-Expression *in vivo* in der experimentellen Herzinsuffizienz getestet werden und somit zur Beantwortung der Frage, ob die Herunterregulation von Inhibitor-1 eine mögliche Therapieoption in der Herzinsuffizienz darstellt und wie diese im Vergleich zu einer Herunterregulation des  $\beta_1$ -Adrenozeptors zu bewerten ist, beitragen.

## 6 Literatur

- Aggen JB, Nairn AC, Chamberlin R. Regulation of protein phosphatase-1. *Chem Biol.* 2000; 7:R13-23
- Ambros V (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature.* 2004 Sep 16;431(7006):350-5
- Antos CL, Frey N, Marx SO, Reiken S, Gaburjakova M, Richardson JA, Marks AR, Olson EN. Dilated cardiomyopathy and sudden death resulting from constitutive activation of protein kinase a. *Circ Res.* 2001; 89:997-1004
- Arnold AS, Tang YL, Qian K, Shen L, Valencia V, Phillips MI, Zhang YC. Specific beta1-adrenergic receptor silencing with small interfering RNA lowers high blood pressure and improves cardiac function in myocardial ischemia. *J Hypertens.* 2007; 25:197-205
- Baruscotti M, Bucchi A, Difrancesco D. Physiology and pharmacology of the cardiac pacemaker ("funny") current. *Pharmacol Ther.* 2005; 107:59-79
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001; 409:363-6
- Bers DM, Ziolo MT. When is cAMP not cAMP? Effects of compartmentalization. *Circ Res.* 2001; 89:373-5
- Boluyt MO, Long X, Eschenhagen T, Mende U, Schmitz W, Crow MT, Lakatta EG. Isoproterenol infusion induces alterations in expression of hypertrophy-associated genes in rat heart. *Am J Physiol.* 1995; 269:H638-47
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72:248-54
- Braunwald. *Heart Disease* 8. Auflage Saunders, 2007
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Sahin B, Klevitsky R, Kimball TF, Lorenz JN, Nairn AC, Liggett SB, Bodi I, Wang S, Schwartz A, Lakatta EG, DePaoli-Roach AA, Robbins J, Hewett TE, Bibb JA, Westfall MV, Kranias EG, Molkenstein JD. PKC-alpha regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat Med.* 2004; 10:248-54
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 1982; 307:205-11

- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002; 296:550-3
- Carè A, Catalucci D, Felicetti F, Bonci D, Addario A, Gallo P, Bang ML, Segnalini P, Gu Y, Dalton ND, Elia L, Latronico MV, Høydal M, Autore C, Russo MA, Dorn GW 2nd, Ellingsen O, Ruiz-Lozano P, Peterson KL, Croce CM, Peschle C, Condorelli G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2007;13:613-8
- Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, Breeden K, Jing SL, Allen PB, Greengard P, Yatani A, Hoit BD, Grupp IL, Hajjar RJ, DePaoli-Roach AA, Kranias EG. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol Cell Biol*. 2002; 22:4124-35
- Chan SP, Slack FJ. microRNA-mediated silencing inside P-bodies. *RNA Biol*. 2006; 3:97-100
- Chiu YL, Rana TM. RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell*. 2002; 10:549-61
- Chu CY, Rana TM. Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol*. 2006; 4:e210
- CIBIS II Investigators and Committees. The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet*. 1999; 353:9-13
- Cohen P, Foulkes JG, Holmes CF, Nimmo GA, Tonks NK. Protein phosphatase inhibitor-1 and inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle. *Methods Enzymol*. 1988; 159:427-37
- Cohen P. The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem*. 1989; 58:453-508
- Cohen P, Cohen PT. Protein phosphatases come of age. *J Biol Chem*. 1989; 264:21435-8
- Cohn JN, Levine TB, Olivari MT, Garberg V, Lura D, Francis GS, Simon AB, Rector T. Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. 1984; 311:819-23
- Dinçer UD, Bidasee KR, Güner S, Tay A, Özçelikay AT, Altan VM. The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts. *Diabetes*. 2001; Feb; 50:455-61
- Dorn GW 2nd, Molkenin JD. Manipulating cardiac contractility in heart failure: data from mice and men. *Circulation*. 2004; 109:150-8
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J, Eschenhagen T. Evidence for protein

- phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes. *FASEB J.* 2003; 17:437-9
- El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O, Eschenhagen T. Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts. *Cardiovasc Res.* 2004; 61:87-93
- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didié M, Dobrev D, Eschenhagen T. Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006; 346:700-6
- El-Armouche A, Singh J, Naito H, Wittkopper K, Didie M, Laatsch A, Zimmermann WH, Eschenhagen T. Adenovirus-delivered short hairpin RNA targeting PKCalpha improves contractile function in reconstituted heart tissue. *J Mol Cell Cardiol.* 2007 2007; 43:371-6
- El-Armouche A. Funktion und Regulation des Protein-Phosphatase-Inhibitors-1 im gesunden und kranken Herzen. *Habil. Hamburg: Freie Universität* 2008
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001a; 411:494-8
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J.* 2001b; 20:6877-88
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F, Lohse MJ. Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:7059-64
- Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Warnholtz A, Wüstel JM. Isoprenaline-induced increase in mRNA levels of inhibitory G-protein alpha-subunits in rat heart. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1991; 343:609-15
- Eschenhagen T, Mende U, Diederich M, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Warnholtz A, Schäfer H. Long term beta-adrenoceptor-mediated up-regulation of Gi alpha and G(o) alpha mRNA levels and pertussis toxin-sensitive guanine nucleotide-binding proteins in rat heart. *Mol Pharmacol.* 1992; 42:773-83
- Fechner H, Suckau L, Kurreck J, Sipo I, Wang X, Pinkert S, Loschen S, Reikittke J, Weger S, Dekkers D, Vetter R, Erdmann VA, Schultheiss HP, Paul M, Lamers J, Poller W. Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban. *Gene Ther.* 2007; 14:211-8

- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998; 391:806-11
- Fire A. RNA-triggered gene silencing. *Trends Genet*. 1999 Sep;15(9):358-63
- Forth W, Henschler D, Rummel W. *Allgemeine und spezielle Pharmakologie*. 9. Auflage Urban und Fischer, München 2005
- Grimm D, Pandey K, Kay MA. Adeno-associated virus vectors for short hairpin RNA expression. *Methods Enzymol*. 2005; 392:381-405
- Haghighi K, Schmidt AG, Hoit BD, Brittsan AG, Yatani A, Lester JW, Zhai J, Kimura Y, Dorn GW 2nd, MacLennan DH, Kranias EG. Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure. *J Biol Chem*. 2001; 276:24145-52
- Haghighi K, Kolokathis F, Pater L, Lynch RA, Asahi M, Gramolini AO, Fan GC, Tsiapras D, Hahn HS, Adamopoulos S, Liggett SB, Dorn GW 2nd, MacLennan DH, Kremastinos DT, Kranias EG. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest*. 2003; 111:869-76
- Hammond SM, Boettcher S, Caudy AA, Kobayashi R, Hannon GJ. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*. 2001; 293:1146-50
- Herweijer H, Wolff JA. Progress and prospects: naked DNA gene transfer and therapy. *Gene Ther*. 2003; 10:453-8
- Herz J, Gerard RD. Adenovirus-mediated transfer of low density lipoprotein receptor gene acutely accelerates cholesterol clearance in normal mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993; 90:2812-6
- Herzig S, Neumann J. Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes. *Physiol Rev*. 2000; 80:173-210
- Hjalmarson A, Goldstein S, Fagerberg B, Wedel H, Waagstein F, Kjekshus J, Wikstrand J, El Allaf D, Vítovec J, Aldershvile J, Halinen M, Dietz R, Neuhaus KL, Jánosi A, Thorgeirsson G, Dunselman PH, Gullestad L, Kuch J, Herlitz J, Rickenbacher P, Ball S, Gottlieb S, Deedwania P. Effects of controlled-release metoprolol on total mortality, hospitalizations, and well-being in patients with heart failure: the Metoprolol CR/XL Randomized Intervention Trial in congestive heart failure (MERIT-HF). MERIT-HF Study Group. *JAMA*. 2000; 283:1295-302
- Huang FL, Glimsmann WH. Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem*. 1976; 70:419-26



- Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, Mctiernan CF, Kay MA, Nakai H. Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol Ther.* 2006; 14:45-53
- Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene.* 1990; 96:23-8.
- Ishida A, Shigeri Y, Taniguchi T, Kameshita I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. *Pharmacol Ther.* 2003; 100:291-305
- Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Asai K, Shannon RP, Kudej RK, Wagner TE, Wight DC, Patrick TA, Ishikawa Y, Homcy CJ, Vatner SF. Cardiomyopathy induced by cardiac Gs alpha overexpression. *Am J Physiol.* 1997; 272:H585-9
- Joseph SS, Lynham JA, Grace AA, Colledge WH, Kaumann AJ. Markedly reduced effects of (-)-isoprenaline but not of (-)-CGP12177 and unchanged affinity of beta-blockers at Gly389-beta1-adrenoceptors compared to Arg389-beta1-adrenoceptors. *Br J Pharmacol.* 2004a; 142:51-6
- Joseph SS, Lynham JA, Colledge WH, Kaumann AJ. Binding of (-)-[3H]-CGP12177 at two sites in recombinant human beta 1-adrenoceptors and interaction with beta-blockers. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2004b; 369:525-32
- Kaupp UB, Seifert R. Cyclic nucleotide-gated ion channels. *Physiol Rev.* 2002; 82:769-824
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell.* 2003; 115:209-16
- Laatsch A, Ragozin S, Grewal T, Beisiegel U, Joerg H. Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP). *Eur J Cell Biol.* 2004; 83:113-20
- Laatsch A. Rolle des low density lipoprotein receptor-related protein1 im humanen Lipoproteinstoffwechsel. Diss. Hamburg: Freie Universität 2005
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227:680-5
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature.* 2005; 433:769-73
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res.* 2003; 93:896-906
- Lücker P, Moore G, Wieselgren I, Olofsson B, Bergstrand R. Pharmacokinetic and pharmacodynamic comparison of metoprolol CR/ZOK once daily with

- conventional tablets once daily and in divided doses. *J Clin Pharmacol.* 1990; 30:S17-27
- Lund E, Guttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* 2004; 303:95-8
- MacDougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem.* 1991; 196:725-34
- MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JW, Boyd J, Finlayson A, Redpath A, Pell JP, McMurray JJ. Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995. *Circulation.* 2000; 102:1126-31
- McIntyre GJ, Fanning GC. Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC Biotechnol.* 2006; 6:1
- Mello CC, Conte D Jr. Revealing the world of RNA interference. *Nature.* 2004; 431:338-42
- Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nat Biotechnol.* 2002; 20:497-500
- Mühlhäuser U. Einfluss von HMG-CoA Reduktase Inhibitoren auf die kontraktile Funktion und die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade von Kardiomyozyten. Diss. Erlangen-Nürnberg: Freie Universität 2004
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S, Malenka RC. Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression. *Nature.* 1994; 369:486-8
- Myslinski E, Ame JC, Krol A, Carbon P. An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29:2502-9
- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM. Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res.* 1991; 69:1450-7
- Oliver CJ, Shenolikar S. Physiologic importance of protein phosphatase inhibitors. *Front Biosci.* 1998; 3:D961-72
- Okumura S, Takagi G, Kawabe J, Yang G, Lee MC, Hong C, Liu J, Vatner DE, Sadoshima J, Vatner SF, Ishikawa Y. Disruption of type 5 adenylyl cyclase gene

- preserves cardiac function against pressure overload. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:9986-90
- Overhoff M, Alken M, Far RK, Lemaitre M, Lebleu B, Sczakiel G, Robbins I. Local RNA target structure influences siRNA efficacy: a systematic global analysis. *J Mol Biol*. 2005; 348:871-81
- Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, Zolotukhin I, Tarantal AF, Byrne BJ. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res*. 2006; 99:e3-9
- Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML, et al. Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J Med*. 1991; 325:1468-75
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM, Shusterman NH. The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure. U.S. Carvedilol Heart Failure Study Group. *N Engl J Med*. 1996; 334:1349-55
- Parker JS, Roe SM, Barford D. Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature*. 2005; 434:663-6
- Parker JS, Roe SM, Barford D. Molecular mechanism of target RNA transcript recognition by Argonaute-guide complexes. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2006;71:45-50
- Paskowitz DM, Greenberg KP, Yasumura D, Grimm D, Yang H, Duncan JL, Kay MA, Lavail MM, Flannery JG, Vollrath D. Rapid and stable knockdown of an endogenous gene in retinal pigment epithelium. *Hum Gene Ther*. 2007; 18:871-80
- Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ, Kranias EG. Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ Res*. 2005; 96:756-66
- Plasterk RH. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*. 2002; 296:1263-5
- Rana TM. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007; 8:23-36
- Robb GB, Rana TM. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell*. 2007; 26:523-37

- Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilber ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 88:8277-81
- Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature*. 2002; 415:206-12
- Rodriguez P, Mitton B, Nicolaou P, Chen G, Kranias EG. Phosphorylation of human inhibitor-1 at Ser67 and/or Thr75 attenuates stimulatory effects of protein kinase A signaling in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 293:H762-9
- Rohrer DK, Desai KH, Jasper JR, Stevens ME, Regula DP Jr, Barsh GS, Bernstein D, Kobilka BK. Targeted disruption of the mouse beta1-adrenergic receptor gene: developmental and cardiovascular effects. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996; 93:7375-80
- Rohrer DK, Schauble EH, Desai KH, Kobilka BK, Bernstein D. Alterations in dynamic heart rate control in the beta 1-adrenergic receptor knockout mouse. *Am J Physiol*. 1998; 274:H1184-93
- Sahin B, Shu H, Fernandez J, El-Armouche A, Molkentin JD, Nairn AC, Bibb JA. Phosphorylation of protein phosphatase inhibitor-1 by protein kinase C. *J Biol Chem*. 2006; 281:24322-35
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T Extraction, Purification, and Analysis of Messenger RNA from Eukaryotic Cells. In: *Molecular cloning - a laboratory manual*. 2<sup>nd</sup> ed C. Nolan (Hrsg.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003; 115:199-208
- Scrimgeour AG, Allen PB, Fienberg AA, Greengard P, Lawrence JC Jr. Inhibitor-1 is not required for the activation of glycogen synthase by insulin in skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1999; 274:20949-52
- Singh BN, Whitlock RM, Comber RH, Williams FH, Harris EA. Effects of cardioselective beta adrenoceptor blockade on specific airways resistance in normal subjects and in patients with bronchial asthma. *Clin Pharmacol Ther*. 1976; 19:493-501
- Statistisches Bundesamt, 2007
- Stieber J, Herrmann S, Feil S, Löster J, Feil R, Biel M, Hofmann F, Ludwig A. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of

- pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:15235-40
- Tang G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. *Trends Biochem Sci*. 2005; 30:106-14
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP, Sharp PA. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev*. 1999; 13:3191-7
- van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006; 103:18255-60
- van Rooij E, Olson EN. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest*. 2007; 117:2369-76
- Vatner SF, Vatner DE, Homcy CJ. beta-adrenergic receptor signaling: an acute compensatory adjustment-inappropriate for the chronic stress of heart failure? Insights from Galpha overexpression and other genetically engineered animal models. *Circ Res*. 2000; 86:502-6
- Vilaine JP. The discovery of the selective I(f) current inhibitor ivabradine. A new therapeutic approach to ischemic heart disease. *Pharmacol Res*. 2006; 53:424-34
- Wilhelm JM, Pettitt SE, Jessop JJ. Aminoglycoside antibiotics and eukaryotic protein synthesis: structure--function relationships in the stimulation of misreading with a wheat embryo system. *Biochemistry*. 1978; 17:1143-9
- Wiznerowicz M, Szulc J, Trono D. Tuning silence: conditional systems for RNA interference. *Nat Methods*. 2006; 3:682-8
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W. Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*. 2004; 118:57-68
- Zuker M, Mathews DH, Turner DH Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide in RNA Biochemistry and Biotechnology, J. Barciszewski and B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, (1999)

## 7. Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Herrn Professor Eschenhagen für die fachkundige Unterstützung, während der Anfertigung dieser Arbeit.

Besonders bei Herrn Dr. Ali El-Armouche möchte ich mich für die freundschaftliche und sehr herzliche Betreuung bedanken. Sehr hilfreich für mich waren neben Fachkompetenz stete Offenheit für Fragen, sowie die unermüdliche Motivation während harter Durststrecken.

Herrn Dr. Thomas Rau, der immer Zeit für meine Fragen hatte, möchte ich auf diesem Wege für die unzähligen Diskussionen am Rande, viele Anregungen, sowie für seine immerwährende Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Wojciech Palinkiewicz danke ich für seinen treuen Beistand in mancher Krisensituation.

Bleibt Frau Christiane Neuber, mit der ich viele Stunden im Labor verbracht habe. Die Zusammenarbeit war großartig und die gemeinsame Zeit war nicht nur fachlich eine Bereicherung für mich.

## 8. Lebenslauf

Name	Felix Caspar Hansen
Geburtsdatum	27. November 1983
Geburtsort	Hamburg
Eltern	Hildegard und Klaus Hansen

### Schulbildung

1990 bis 1994	Grundschule Altgemeinde Schenefeld
1994 bis 2003	Gymnasium Schenefeld

### Hochschulbildung

10.2003 bis voraussichtlich Ende 2009	Studium der Medizin an der Universität Hamburg
08.2005	1. Abschnitt der Medizinischen Prüfung
08.2008 bis 07.2009	Praktisches Jahr
voraussichtlich 10.2009	2. Abschnitt der Medizinischen Prüfung

## **9. Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....