

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktor: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

**Molekulare und funktionelle Auswirkungen einer adenoviralen  
Überexpression von short hairpin RNA gegen Proteinkinase C  $\alpha$  in  
neonatalen Rattenkardiomyozyten und rekonstituiertem  
Herzmuskelgewebe**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jasmin Maya Annabel Singh

aus Hamburg

2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 29.10.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in Prof. Dr. S. Baldus

meinen geliebten Eltern

---

## Inhaltsverzeichnis

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>1.</b> | <b>Einleitung</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1       | Herzinsuffizienz  | 1         |
| 1.2       | Regulation der Herzfunktion   | 2         |
| 1.3       | Proteinkinase C   | 4         |
| 1.3.1.    | Proteinkinase C alpha   | 5         |
| 1.4       | RNA Interferenz (RNAi)  | 8         |
| 1.4.1.    | RNAi-Mechanismus  | 9         |
| 1.4.2.    | Experimentelle Voraussetzung  | 11        |
| 1.5       | Fragestellung und Zielsetzung   | 13        |
| <b>2.</b> | <b>Methoden</b>   | <b>14</b> |
| 2.1       | Klonierung  | 14        |
| 2.1.1     | Restriktionsverdau  | 15        |
| 2.1.2     | Gelaufreinigung von DNA   | 15        |
| 2.1.3     | Ligation  | 15        |
| 2.1.4     | Herstellung von LB-Medium und Agarplatten   | 15        |
| 2.1.5     | Herstellung thermokompetenter E. Coli   | 16        |
| 2.1.6     | Transformation  | 16        |
| 2.1.7     | Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation                      | 17        |
| 2.1.8     | Mini-Plasmidpräparation   | 18        |
| 2.1.9     | Aufarbeitung im großen Maßstab mittels Ionenaustauscher-Säule<br>(Maxi-Präparation) | 18        |
| 2.1.10    | Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren  | 19        |
| 2.1.11    | Gelelektrophorese   | 19        |
| 2.2       | shRNA-Konstruktion  | 20        |
| 2.2.1     | siRNA Design  | 20        |
| 2.2.2     | shRNA-Generierung   | 21        |

---

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 2.2.3  | Herstellung der shRNA-Oligodeoxynukleotide  | 21 |
| 2.3    | Klonierung des pALsh  | 22 |
| 2.3.1  | Klonierung der Konstrukte in den pALsh Vektor   | 24 |
| 2.4    | Herstellung rekombinanter Adenoviren  | 25 |
| 2.4.1  | Adenovirale Expressionssysteme  | 25 |
| 2.4.2  | Klonierung der Transfervektoren: pAdTrack   | 27 |
| 2.4.3  | pAdTrack-shPKC $\alpha$ / pAdTrack-shNS   | 27 |
| 2.4.4  | Vorbereitung der Transfervektor-DNA für die homologe Rekombination von pAdTrack und pAdEasy | 27 |
| 2.4.5  | Homologe Rekombination  | 27 |
| 2.5    | Methoden der Zellkultur   | 28 |
| 2.5.1  | HEK-Erhaltungskultur  | 29 |
| 2.5.2  | Transfektion von HEK-293T-Zellen  | 29 |
| 2.5.3  | Ernte virusinfizierter Zellen   | 30 |
| 2.5.4  | Präparation eines hochtitrigen Virus-Stocks   | 30 |
| 2.5.5  | Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren  | 30 |
| 2.5.6  | Transfektion von NIH-3T3, Neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKMs) und HEK 293T-Zellen       | 31 |
| 2.5.7  | Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRKM)   | 33 |
| 2.5.8  | Herstellung von EHTs  | 34 |
| 2.5.9  | Kultivierung der EHTs   | 35 |
| 2.5.10 | Virusinfektion von NRKM und EHTs  | 36 |
| 2.6    | Erfassung der Kontraktionsdaten   | 36 |
| 2.6.1  | Kontraktionsmessung   | 36 |
| 2.7    | Proteinbiochemie  | 38 |
| 2.7.1  | Proteinextraktion   | 38 |
| 2.7.2  | Diskontinuierliche SDS Polyacrylamidgelelektrophorese                                       | 39 |
| 2.7.3  | Immunoblot  | 39 |

---

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 2.8       | Quantitative RNA-Messung   | 41        |
| 2.8.1     | Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen   | 41        |
| 2.8.2     | Reverse Transkription der präparierten RNA   | 41        |
| 2.8.3     | Echtzeit-PCR   | 42        |
| 2.9.      | Statistik  |           |
| 2.10      | Verwendete Geräte und Materialien  | 46        |
| <b>3.</b> | <b>Ergebnisse</b>  | <b>49</b> |
| 3.1       | Transfektionseffizienz von siRNA in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKM)                 | 49        |
| 3.1.1     | Vergleich der Transfektionseffizienz von NRKM mit NIH 3T3                                  | 49        |
| 3.2       | Klonierung des pALsh-PKC $\alpha$ und pALsh-NS   | 56        |
| 3.2.1     | Evaluation von shRNA-Effekten gegen PKC $\alpha$ in NIH 3T3                                | 57        |
| 3.3       | Generierung der Adenoviren Ad-shPKC $\alpha$ und Ad-shNS                                   | 58        |
| 3.3.1     | Titration der adenoviren Adsh-PKC $\alpha$ und Ad-shNS                                     | 56        |
| 3.4       | Expression von sh-PKC $\alpha$ und sh-NS in Neonatalen Rattenkardiomyozyten                | 62        |
| 3.4.1     | Auswirkungen der Expression von shPKC $\alpha$ und shNS in NRKM auf Protein- und RNA-Ebene | 62        |
| 3.5       | Effekte der shPKC $\alpha$ -Überexpression auf die Kontraktilität von EHTs                 | 63        |
| <b>4.</b> | <b>Diskussion</b>  | <b>68</b> |
| 4.1       | Evaluation des Transfektionsergebnisses der NRKM   | 68        |
| 4.2       | shRNA-Design   | 70        |
| 4.3       | Adenovirale sh-RNA Expression in NRKM und EHT  | 72        |
| 4.4       | Das EHT-Modell   | 75        |
| 4.6       | Effekte der Beeinflussung der PKC $\alpha$   | 77        |
| 4.7       | Die Rolle von PKC $\alpha$ in der Herzinsuffizienz   | 80        |
| 4.8.      | Ausblick   | 81        |
| <b>5.</b> | <b>Zusammenfassung</b>   | <b>84</b> |

---

|           |                             |           |
|-----------|-----------------------------|-----------|
| <b>6.</b> | <b>Literaturverzeichnis</b> | <b>86</b> |
| <b>7.</b> | <b>Danksagung</b>           | <b>93</b> |
| <b>8.</b> | <b>Lebenslauf</b>           | <b>94</b> |
| <b>9.</b> | <b>Erklärung</b>            | <b>95</b> |

---

|                |  |
|----------------|--|
| A              | Ampere                                   |
| ACE            | Angiotensin converting enzyme            |
| AngII          | Angiotensin II                           |
| Bp             | Basenpaar                                |
| BrdU           | 5'-Brom-2'-deoxyuridin                   |
| BSA            | Bovine serum albumin                     |
| cAMP           | zyklisches Adenosinmonophosphat          |
| CMV            | Cytomegalie Virus                        |
| C <sub>T</sub> | Cycle of treshhold                       |
| dam            | DNA Adenin Methylase                     |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                         |
| dsRNA          | Doppelsträngige RNA                      |
| DTT            | Dithiothreitol                           |
| DGCR           | DiGeorge Critical Syndrome Gene 8        |
| EDTA           | Ethylendiamintetraacetat                 |
| E              | Early gene                               |
| EGTA           | Ethylenglyceroltetraacetat               |
| EHT            | Engineered heart tissue                  |
| ERK            | Extrazelluläre Rezeptorkinase            |
| FKS            | Fetales Kälberserum                      |
| 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                    |
| min          | Minute                                |
| MOI          | Multiplicity of infection             |
| ng           | Nanogramm                             |
| NRKM         | Neonatale Rattenkardiomyozyten        |
| NTC          | No template control                   |
| NYHA         | New York Heart Association            |
| ori          | Origin of replication                 |
| Paz          | Piwi-Argonaut-Zwille Domäne           |
| PBS          | Phosphate buffered saline             |
| PCR          | Polymerasekettenreaktion              |
| PDE          | Phosphodiesterase                     |
| PFA          | Paraformaldehyd                       |
| PIPES        | Piperazin-1,4-bis(2-Ethansulfonsäure) |
| PKA          | Proteinkinase A                       |
| PKC $\alpha$ | Proteinkinase C alpha                 |
| PMA          | Phorbol 13-myristate 12- Acetat       |
| PPI-1        | Proteinphosphataseinhibitor-1         |
| PP-1         | Proteinphosphatase-1                  |
| P/S          | Penicilin/Streptomycin                |
| PTGS         | Posttranskriptional gene silencing    |
| RISC         | RNA induced silencing complex         |

---

|          |  |
|----------|--|
| RNAi     | RNA-interferenz                                  |
| rpm      | Rounds per minute                                |
| RTPCR    | Reverse Transkriptase Echtzeit-PCR               |
| SDS      | Natriumdodecanylsulfat                           |
| SDS PAGE | SDS Polyacrylamidgelelektrophorese               |
| SERCA    | Calcium ATPase des Sarkoplasmatisches Retikulums |
| shRNA    | Short hairpin RNA                                |
| siRNA    | Short interfering RNA                            |
| TCA      | Trichloressigsäure                               |
| TEMED    | Tetramethylethylendiamin                         |
| TRIS     | Tris(hydroxymethyl)-aminomethan                  |
| IU       | Internationale Einheit                           |
| UTR      | Untranslatierte Region                           |
| VS       | Virus storage buffer                             |
| v/v      | Volumen/Volumen                                  |

## 1. Einleitung

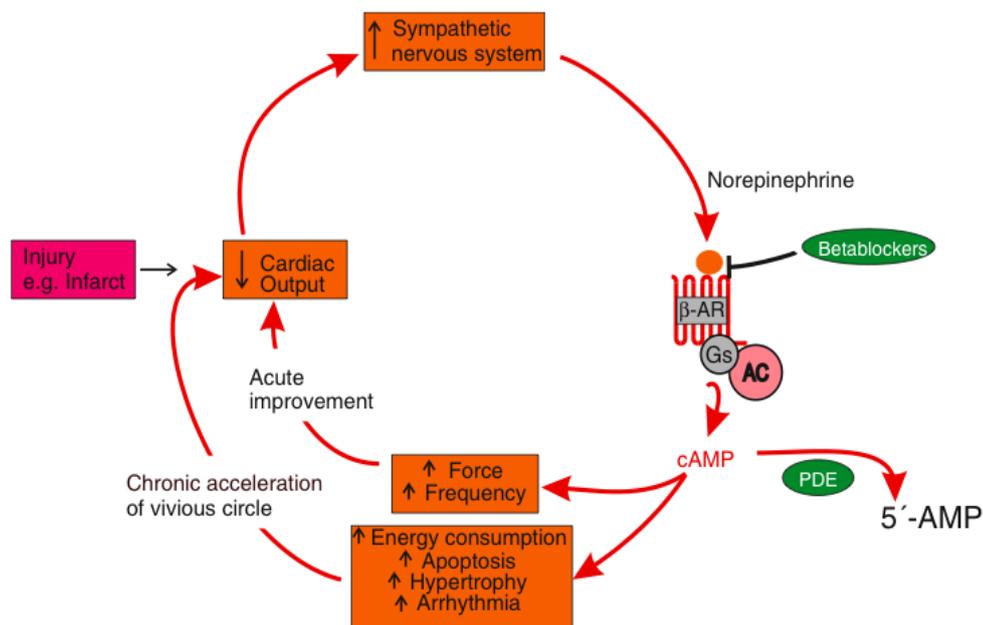
### 1.1 Herzinsuffizienz

Im Jahr 2007 erlagen allein in Deutschland knapp 360.000 Menschen einem pathologischen kardiovaskulären Geschehen. Mit 43% war dies die häufigste Todesursache noch vor tumorösen Erkrankungen (25%) und auch in weltweit allen Industrienationen zusammengenommen gibt es keine Erkrankungsgruppe, die mehr Todesopfer gefordert hätte. Neben den chronisch-ischämischen Erkrankungen des Myokards (9,7% aller Verstorbenen) und dem akuten Myokardinfarkt (7,6% aller Verstorbenen) verdient die Herzinsuffizienz (5,8% aller Verstorbenen) besondere Aufmerksamkeit (Statistisches Bundesamt 2008). Die Herzinsuffizienz ist vor allem eine Erkrankung des alten Menschen, deren Prognose sich mit zunehmendem Lebensalter stetig verschlechtert. Da sich die Lebenserwartung der Bevölkerung mit großer Wahrscheinlichkeit noch weiter erhöhen wird und die Prävalenz der Herzinsuffizienz demzufolge ansteigt (Stewart et al. 2003), verlangt die ausführliche Aufklärung der pathophysiologischen Prozesse und die Erarbeitung weiterer Therapienansätze besonderes Augenmerk.

Die Herzinsuffizienz bezeichnet einen Zustand des Herzens, in dem es unfähig ist, das von der Körperperipherie benötigte Blutvolumen bei normalem enddiastolischen Ventrikeldruck zu befördern. Es kommt dadurch zu einem Missverhältnis zwischen der Auswurfleistung des Herzens und dem Durchblutungsbedarf peripherer Organe. Klinische Leitsymptome sind Dyspnoe, Müdigkeit und Flüssigkeitsretention (WHO 1995). Im Gegensatz zu den relativ einheitlichen Symptomen der Herzinsuffizienz kann eine Vielzahl von unterschiedlichen Grunderkrankungen letztendlich zu diesem pathologischen Funktionszustand führen. Häufigste Ursache ist der Myokardinfarkt sowie eine arterielle Hypertonie ohne adäquate Behandlung. Aber auch andere Krankheiten, die zu einer chronischen Volumen-, oder Druckbelastung des Herzens oder zur Schädigung des Herzgewebes führen, können die Herzinsuffizienz auslösen. Zu nennen sind hier vor allem die unterschiedlichen Herzvitien, wie auch Kardiomyopathien unterschiedlichster Genese und virale Myokarditiden (Adams 2001). Pathophysiologisch kommt es durch diese initiale Schädigung des Myokards unterschiedlicher Ätiologie zu einer weiteren verminderten Pumpleistung mit daraus resultierender Blutdrucksenkung. Zur Erhaltung eines adäquaten Perfusionsdruckes werden daher neuroendokrine Systeme aktiviert, die über Vasokonstriktion und Retention von Wasser und NaCl die ausreichende Durchblutung von Organen sicherstellen sollen. Wichtigster neuroendokriner Aktivator ist dabei das Beta-adrenerge sympathische System und hierbei im Speziellen die Stimulation kardialer  $\beta_1$ -Adrenozeptoren. Aus diesem zunächst kompensatorischen Mechanismus resultiert auch eine verstärkte Belastung des verbliebenen Myokards, die wiederum auf der einen Seite einen belastungsinduzierten vermehrten

Zelluntergang zur Folge haben kann. Auf der anderen Seite kommt es zur belastungsbedingten Hypertrophie des Myokards mit Wandverdickung und daher zusätzlicher Verschlimmerung der Sauerstoffmangelsituation des vorgeschädigten Herzens (s. Abbildung 1).

Zusammen mit einer betaadrenergen Dauerstimulation und anschließender Herabregulation der kardialen Beta-Rezeptoren, was eine zusätzliche Aktivierung der neuroendokrinen Kompensationsmechanismen zur Folge hat, ergibt sich so ein Circulus Vitiosus, der letztendlich zur völligen Dekompensation führen kann (Eschenhagen 2008).



**Abbildung 1 Circulus vitiosus der Herzinsuffizienz:** Kardiale Schädigungen unterschiedlicher Genese führen zu einer verminderten Pumpleistung des Herzens. Der Körper reagiert mit einer Aktivierung des Sympathischen Nervensystems, was u. A. in einer Ausschüttung von Noradrenalin (Norepinephrine) resultiert. Durch eine Steigerung der Kontraktionskraft und Frequenz führt Noradrenalin kurzfristig zu einer Verbesserung der eingeschränkten Auswurfsleistung des Herzens. Langfristig jedoch, bei Fortbestehen der insuffizienten Pumpleistung, wirkt sich die dauerhafte Stimulation des Sympathikus negativ auf die Herzfunktion aus. Periphere Vasokonstriktion, Hypertrophie der Kardiomyozyten, vermehrte Fibrose und Arrhythmien sind die Folge. Das bereits kranke Myokard wird so zusätzlich in seiner Funktion eingeschränkt (nach Eschenhagen 2008).

## 1.2 Regulation der Herzfunktion

Das gesunde Herz unterliegt einer Vielzahl von Regulationsmechanismen, durch welche seine Kontraktionskraft und Schlagfrequenz den jeweiligen Bedürfnissen angepasst werden können. Der Frank-Starling-Mechanismus (Kraft-Wandspannungs-Beziehung; (Starling and Visscher 1927)) ist ein Beispiel für einen solchen Regulationsmechanismus. Über eine zunehmende Vorlast (enddiastolisches Ventrikelvolumen) erhöht sich die diastolische

Vorspannung des Myokards, in deren Folge in physiologischen Grenzen das Schlagvolumen proportional zunimmt. Die Kontraktilität kann auch durch den Bowditch-Effekt (Kraft-Frequenz-Beziehung; Bowditch 1871) gesteigert werden. Die lokale und systemische Freisetzung endogener Peptide, wie Angiotensin II und Endothelin-1, ist ebenfalls an der Adaptation des Herzens an die unterschiedlichen Bedürfnisse beteiligt (Barton and Yanagisawa 2008).

Der größte Teil der Kontraktilitätszunahme verläuft jedoch über die Aktivierung der  $\beta_1$ -Rezeptoren. Ihre Stimulation bewirkt ebenfalls eine Steigerung der Schlagfrequenz, der Relaxationsgeschwindigkeit (positive Chronotropie und Lusitropie) sowie eine verkürzte Überleitungszeit am AV-Knoten (positive Dromotropie). Sie gehören aufgrund ihrer großen Bedeutung zu den am besten untersuchten Rezeptoren am Herzen. Neben den  $\beta_1$ - werden auch  $\beta_2$ -Adrenozeptoren von Kardiomyozyten exprimiert (Bristow 1993; Brodde and Michel 1999). Sie sind jedoch weitaus seltener vertreten (etwa 20%) und weisen im Herzen nur eine untergeordnete Bedeutung für die Kontraktionskraft auf. Nur etwa 10% der kardialen Adrenozeptoren sind dem  $\alpha$ -Subtyp zuzuordnen (Rockman et al. 2002). Ihre Rolle und der genaue Mechanismus für den  $\alpha_1$ -adrenergen inotropen Effekt gelten heute noch als umstritten (Brodde and Michel 1999; Brodde et al. 2006). Die Stimulation von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren führt zwar am Herzen vieler Spezies zu einer akuten Steigerung der Kontraktilität (Brückner et al. 1985). Im Vergleich zum größtmöglichen Effekt durch Stimulation der  $\beta$ -Adrenozeptoren ist dieser  $\alpha_1$ -adrenerg-vermittelte Anstieg der Kontraktionskraft allerdings geringer ausgeprägt (Brodde and Michel 1999; Rockman et al. 2002; Grimm et al. 2005). Zudem haben endogene Katecholamine in Konzentrationen, die bereits den maximalen  $\beta$ -adrenergen positiv inotropen Effekt auslösen, noch keine Wirkung am  $\alpha_1$ -Adrenozeptor (Jahnel et al. 1992). Die chronische  $\alpha_1$ -Adrenozeptorstimulation im Herzen führt zu einer hypertrophen Antwort, die sich in der Größenzunahme des einzelnen Myozyten, der Neubildung von kontraktile Einheiten, sowie einer veränderten Genexpression ähnlich der fetalen Phase ausdrückt (Simpson 1983; Molkentin and Dorn 2001). Mit erhöhten Plasmaspiegeln von u.a. Angiotensin II, Endothelin-1 und Noradrenalin als Folge der neurohumoralen Aktivierung tritt eine Herzmuskelhypertrophie auf (Shubeita et al. 1990; Dorn and Brown 1999). Dem Angiotensin II- und Endothelin-1-Rezeptor sowie dem  $\alpha_1$ -Adrenozeptor gemein ist die Signalkaskade, die sie stromabwärts nach Bindung ihres Liganden auslösen. Zusammen mit den  $\beta$ -Adrenozeptoren stellen sie einen Vertreter der Gruppe der G-Protein-gekoppelten-Rezeptoren dar (Dorn et al. 1999). Anders als bei den  $\beta_1$ -Adrenozeptoren, bei denen die Aktivierung eines stimulierenden G-Proteins (Gs) die Bildung von zyklischem Adenosin-3'-5'-Monophosphat initiiert (cAMP) und hierdurch die Proteinkinase A aktiviert, führt die Bindung des Liganden an den  $\alpha_1$ -Adrenozeptor, bzw.

ATII-Rezeptor oder ET-1-Rezeptor über die Aktivierung eines Gq-Proteins zur Stimulation der Proteinkinase C (Graham et al. 1996).

### 1.3 Proteinkinase C

Die Proteinkinase C (PKC) wurde erstmals 1977 als proteolytisch aktivierte Proteinkinase identifiziert (Inoue et al. 1977). Heutzutage zählt man sie zu einer großen Familie von Serin/Threonin-Kinasen und 10 Isozyme konnten seither charakterisiert werden (Kikkawa et al. 1989). Diese Isozyme lassen sich in drei Untergruppen unterteilen, abhängig von ihren homologen Sequenzen und ihrem Aktivierungsmodus. Unter den konventionellen, oder klassischen PKC-Isozymen versteht man die Unterformen PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II und  $\gamma$ . Diese weisen eine Calcium- und Diacylglycerol- bzw. PMA- (Phorbol-12-myristate-13-acetat) abhängige Aktivierung auf, wobei die erst in jüngerer Zeit erforschten PKC-Isoformen ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ ,  $\theta$ ) zwar auf DAG oder PMA, nicht jedoch auf Calcium für ihre Aktivierung angewiesen sind. Die atypischen PKCs ( $\xi$ ,  $\lambda$ ) hingegen lassen sich weder durch Calcium noch durch DAG/PMA stimulieren, sondern benötigen hierfür andere Lipide. Die PKC ist Teil der Inositolphospholipid-Signalkaskade, welche ubiquitär in allen Geweben und Organen vorkommt (Churchill et al. 2008)

Nach der Bindung eines Signalmoleküls an einen membranständigen Gq-Proteingekoppelten Rezeptor aktiviert dieses G-Protein die Phospholipase C. Diese führt zu einer Spaltung von Phosphatidylbisphosphat (PIP<sub>2</sub>), einem Membranlipid, unter Bildung von Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>) und Diacylglycerol (DAG). Diese sind, ähnlich wie cAMP, „second messenger“. Hauptaufgabe des IP<sub>3</sub> ist die transiente Freisetzung von Calcium aus endogenen Speichern, welches zusammen mit DAG im Falle der klassischen Isozyme dann die Proteinkinase C aktiviert. Unter die Signalmoleküle, die zu einer solchen G-Proteinaktivierung führen, fallen, wie oben bereits erwähnt, Endothelin-1 (Kramer et al. 1991), Angiotensin II sowie Noradrenalin und Adrenalin (Brown et al. 1985; Dosemeci et al. 1988). Aber auch Acetylcholin, Vasopressin und Thromboxan (Murphy and Frishman 2005) vermitteln über diese Signalkaskade ihre Effekte auf die Zielzelle. Jedes Gewebe weist sein eigenes spezifisches Expressionsmuster der Isoformen auf. Die PKC ist zu einem großen Teil über die Aktivierung variabler Proteinkinasekaskaden (z.B. MAP-Kinase, NF- $\kappa$ B) in die Regulation von Zellwachstum und -differenzierung involviert (Reyland 2009). Es überrascht daher nicht, dass sie mit einer Reihe von pathophysiologischen Prozessen bei unterschiedlichsten Erkrankungen in Verbindung gebracht wird. So soll sie an der Entstehung von endokrinen und renalen Störungen bei Diabetes mellitus, ophthalmologischen Erkrankungen wie der Makuladegeneration, oder auch neuronalen Störungen, hier sei die Alzheimer Krankheit zu nennen, beteiligt sein (Murphy and Frishman 2005). In den letzten zwei Jahrzehnten wurde die Relevanz der PKC auch in der kardiovaskulären Pathologie

zunehmend erkannt. Ischämische Präkonditionierung, chronische Herzinsuffizienz, Hypertonie und Atherosklerose gehen mit einer erhöhten Aktivierung spezifischer Isoformen einher (Churchill et al. 2008). Durch nähere Untersuchungen unter Einsatz von transgenen Mäusen, die individuelle PKC-Isoformen überexprimieren, PKC-*knockout*-Mäusen und Zellkulturexperimenten mit Kardiomyozyten konnten einige von ihnen identifiziert werden. PKC-Isoformen werden bei mechanischem Stress und durch neurohormonale Signale aktiviert und sie sind involviert in der Regulation von unzähligen Zellprozessen wie Transkription, Zellwachstum, Zelltod, Calciumhomöostase und Myofilamentfunktion (Belin et al. 2007). In der Pathogenese und Progression der Herzinsuffizienz scheint die PKC $\alpha$  eine bedeutende Rolle zu spielen und stellt in dieser Arbeit das zu untersuchende Zielprotein dar.

### 1.3.1 Proteinkinase C alpha (PKC $\alpha$ )

Die PKC $\alpha$  ist die vorherrschende PKC-Isoform im menschlichen Herzen (Hambleton et al. 2006; Simonis et al. 2007). Ihre Rolle ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch konnte bisher nachgewiesen werden, dass PKC $\alpha$  im Spätstadium der Herzinsuffizienz verstärkt exprimiert wird und hier eine gegenüber dem gesunden Herzen erhöhte Aktivität aufweist (Belin et al. 2007). Die Proteinkinase C-Familie ist in der Entstehung der kardialen Hypertrophie involviert (Churchill et al. 2008). Nicht genau geklärt ist jedoch, welche der Isoformen hierbei beteiligt sind. Der PKC $\alpha$  wurde schon früh eine tragende Rolle bei der hypertrophen Antwort auf neurohumorale Stimulation mit Phenylephrin, Endothelin-1 und Angiotensin II wie auch auf mechanischen Stress zugesagt (Dorn and Brown 1999). Untersuchungen mit dem Vorreiter der siRNA, den Antisense-Oligonukleotiden, fanden, dass eine PKC $\alpha$ -Inhibierung die Endothelin-1- und Phenylephrin-induzierte Expression von fetalen Genen unterdrückt. (Kerkelä 2002). Unterstützt werden die Ergebnisse durch die Erkenntnis, dass die PKC $\alpha$  zu einer Aktivierung von extrazellulärer Rezeptor kinase- (ERK1/2) führt, einem deutlich weiter abwärts in der Signalkaskade gelegenen Protein, dem hypertrophische Effekte zugeschrieben werden (Purcell et al. 2007). Die Expression von dominant-negativer PKC $\alpha$  in Kardiomyozyten hingegen inhibierte die Stimulation von ERK1/2 (Braz et al. 2002) partial, welches zuvor durch den unspezifischen Aktivator der PKC-Familie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) aktiviert worden war. Diese Arbeit geht daher von einer Schlüsselrolle der PKC $\alpha$  in der Regulation und Entstehung des hypertrophen Wachstums aus.

In vivo-Untersuchungen widerlegten jedoch diese Annahme. PKC $\alpha$ -*knockout*-Mäuse zeigten keine verminderte hypertrophe Reaktion auf eine chronische Druckbelastung durch partielle Aortenligatur. Auch konnte eine PKC $\alpha$ -Überexpression in transgenen Mäusen keine übermäßige Hypertrophie-Antwort auf eine Druckerhöhung auslösen (Braz et al. 2004). Die Vermutung, dass PKC $\alpha$ , im Gegensatz zu den Isoformen  $\delta$  und  $\epsilon$ , keinen, oder nur einen

kleinen Stellenwert bei der Regulation der kardialen Hypertrophie hat, sondern vielmehr die Regulation der Kontraktilität beeinflusst, wurde durch mehrere Arbeiten bekräftigt (Braz et al. 2002; Hahn et al. 2003). Derzeit werden dagegen den Isoformen  $\delta$  und  $\epsilon$  hypertrophe Effekte zugeschrieben (Churchill et al. 2008).

PKC $\alpha$ -*knockout*-Mäuse zeigen interessanterweise einen hyperkontraktilen Phänotyp, ohne jedoch einen signifikanten Unterschied in der Herzfrequenz oder dem Blutdruck im Vergleich zu Wildtypmäusen aufzuweisen. Im Gegensatz hierzu haben transgene Mäuse, die die PKC $\alpha$  überexprimieren, einen hypokontraktilen Charakter (Braz 2004). Auch konnte eine eher unspezifische pharmakologische Inhibition der PKC $\alpha$  mit Ro-32-0432 in isolierten Langendorff-perfundierten WT-Mäuseherzen die Kontraktilität signifikant erhöhen. Diese Erkenntnisse weisen daraufhin, dass PKC $\alpha$  einen negativen Regulator der kardialen Kontraktilität darstellen könnte. Bisher konnten zwei potentielle Mechanismen identifiziert werden, die diese Annahme unterstützen:

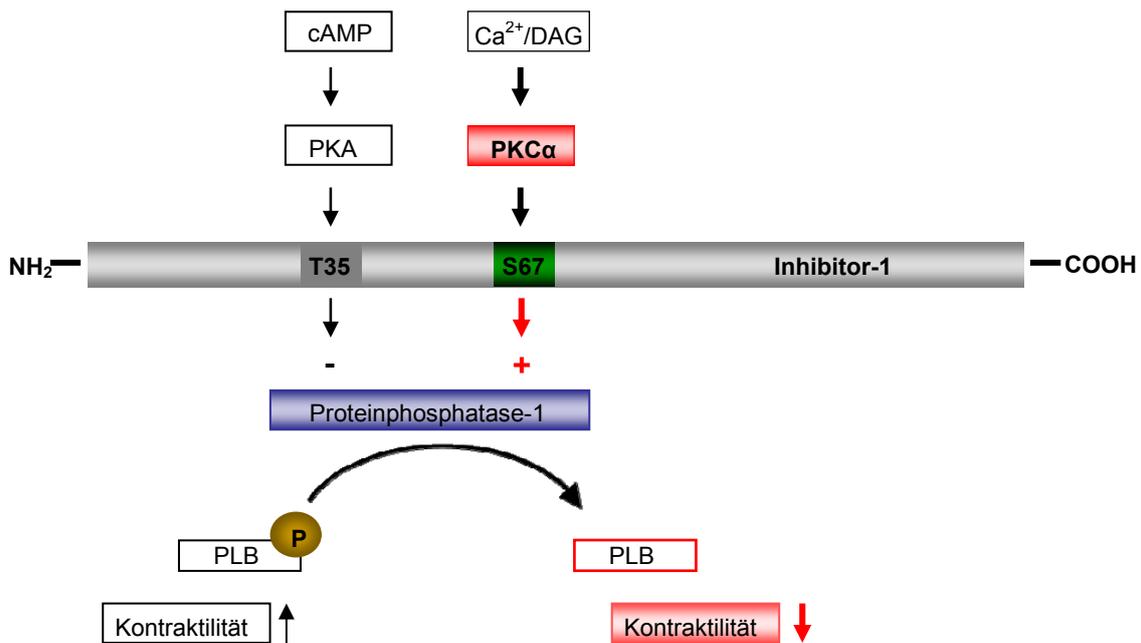
#### Phosphorylierung von PPI-1 durch PKC $\alpha$

Der Proteinphosphatase-Inhibitor 1 (PPI-1) wirkt als ein positiv inotrop wirksamer Regulator der Kontraktionskraft von Kardiomyozyten.

In der Signalkaskade weiter stromabwärts gelegene andere positiv inotrope Regulatoren der Kontraktionskraft wie Phospholamban, der Ryanodinrezeptor (RYR) oder der L-Typ-Calziumkanal liegen in aktivem Zustand in phosphorylierter Form vor. Diese Phosphorylierung ist ein Produkt der durch zyklisches AMP (cAMP) als Effektor der beta-adrenergen Signalkaskade aktivierten Proteinkinase A (PKA). Zugleich phosphoryliert PKA auch den PPI-1 selbst und aktiviert ihn so (El-Armouche et al. 2003).

In phosphoryliertem Zustand hemmt PPI-1 nun die Proteinphosphatase-1 (PP1 (Neumann et al. 1991) und verhindert damit die Dephosphorylierung von Zielproteinen wie Phospholamban und RyR und so deren potentielle Inhibition. PPI-1 wirkt dadurch als intrazellulärer Verstärker der beta-adrenergen Stimulation.

Neben der PKA-Phosphorylierungsstelle Thr35 weist der PPI-1 jedoch noch eine zweite Phosphorylierungsstelle an Ser67 auf. Braz et al. (2004) konnten zeigen, dass diese alternative Bindungsstelle von der Calcium-abhängigen PKC $\alpha$  phosphoryliert wird und zu einem gegensinnigen Effekt der PKA führen könnte. Der PPI-1 würde somit durch die Phosphorylierung von Ser67 in seiner Funktion inhibiert. Als Konsequenz steigt die Proteinphosphatase 1-Aktivität und hat u.a. eine erniedrigte PLB-Phosphorylierung und verminderte Kontraktilität zur Folge (s. Abbildung 2).



**Abbildung 2: 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 nach El-Armouche 2008).  $\beta$ -adrenerge Stimulation führt über Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA zur Phosphorylierung von Inhibitor-1 an Thr-35 und somit über die Inhibition der Typ-1-Phosphatasen (PP1) zu einer gesteigerten Phospholamban- (PLB-) Phosphorylierung und Kontraktilität (El-Armouche et al. 2003). Die PKC $\alpha$ -Phosphorylierung an Ser-67 mindert die Aktivität von Inhibitor-1 und hat dadurch eine erniedrigte PLB-Phosphorylierung und verminderte Kontraktilität zur Folge.

### Phosphorylierung von cTnI und cTnT durch PKC $\alpha$

Für den Kontraktionsmechanismus sind die Myofilamente der Sarkomereinheiten essentiell. Diese unterliegen der Regulation des Troponinkomplexes bestehend aus Troponin I, -T und Troponin C. Das inhibitorische Troponin I stellt seinerseits ein Substrat der PKA dar. Diese phosphoryliert, nach cAMP-abhängiger Aktivierung, die Serinreste 23 und 24, fördert so das Troponin I in seiner Wirkung und setzt hierdurch die Calcium-Sensitivität der MgATPase des Aktomyosins herab. Die verminderte Calcium-Sensitivität führt zu einer beschleunigten Relaxation der Myofilamente, welche dadurch der nächsten Kontraktion schneller zur Verfügung stehen. Dieser Prozess ist essentiell für die Adaption der Herzfunktion an eine katecholaminerge Stimulation. Neben den PKA-Bindungsstellen konnten Burkart et al. zusätzlich zwei Phosphorylierungsstellen der PKC identifizieren (Sumandea et al. 2003). Diese phosphoryliert, nach Calcium-abhängiger Aktivierung, Troponin I an Ser43 und Ser45. Die Rolle dieser Phosphorylierungsstellen ist noch nicht vollständig aufgeklärt, doch deuten Studien in menschlichen insuffizienten Herzen und transgenen Tiermodellen an, dass eine vermehrte Expression und Aktivität der PKC $\alpha$  zu einer exzessiven und dauerhaften Phosphorylierung von TnI führen kann (Burkart et al. 2003). Die PKC $\alpha$ -abhängige Phosphorylierung von TnI führt zu einer signifikanten Abnahme der isometrischen

Kraftentwicklung und der Aktomyosin-Mg-ATPase-Aktivität sowie zu einer Calciumdesensitivierung der Myofilamente. Aber nicht nur Troponin I unterliegt einer Regulation durch PKC $\alpha$ . Troponin T wird an Thr206 ebenfalls durch die Kinase phosphoryliert (Sumandea et al. 2003). Transgene Mäuse, denen die Phosphorylierungsstellen der PKC fehlen, zeichnen sich, verglichen mit Wildtyptieren, durch eine erhöhte basale Kontraktilität aus (Roman et al. 2004). Bewirkt die PKA durch die obengenannte Phosphorylierung von Troponin I einen Teil der positiv lusitropen Wirkung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade, so scheint die dauerhafte PKC $\alpha$ -abhängige Phosphorylierung von Troponin I und T hingegen zu einer negativ inotropen und lusitropen Wirkung zu führen (Burkart et al. 2003; MacGowan et al. 2004; Roman et al. 2004).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im insuffizienten Herzen die PKC $\alpha$ -Aktivität erhöht ist. Dies wird durch mehrere Faktoren, wie mechanische Belastung und neurohormonale Aktivierung bedingt, welche zu einer erhöhten cytosolischen Calcium führen. Troponin I und T liegen im Endstadium der chronischen Herzinsuffizienz bedingt durch PKC $\alpha$  in einem hyperphosphorylierten Zustand vor (Belin et al. 2007) und führen so zur chronisch verminderten, adaptionsgestörten Kontraktionsfähigkeit. Über die Inhibierung von PPI-1 und die daraus resultierende vermehrte Dephosphorylierung von inotrop wirksamen Zielproteinen, wie z. B. PLB, senkt PKC $\alpha$  zusätzlich die Kontraktilität. Dies sind sicherlich nicht die einzigen Prozesse, die die negativ inotrope Wirkung von PKC $\alpha$  begründen und es lässt sich erahnen, dass PKC $\alpha$  noch in weiteren pathophysiologischen Prozessen involviert ist, die das charakteristische Bild der Herzinsuffizienz bedingen und deren Aufklärung es bedarf.

#### **1.4 RNA Interferenz (RNAi)**

Die „RNA-Interferenz“ (RNAi) beschreibt den Prozess, bei dem doppelsträngige RNA die Genexpression unterdrückt. Dies vermitteln die beteiligten RNA-Moleküle durch eine sequenzspezifische Degradation der Ziel-messenger-RNA. In Pflanzen und Pilzen wurde erstmals beobachtet, dass die Anwesenheit von langer doppelsträngiger RNA (dsRNA) im Zytosol eine Gensuppression zur Folge hatte. Da die Transkription der betroffenen Gene unverändert blieb, die Translation jedoch durch die induzierte Degradation der mRNA unterdrückt wurde, bezeichnete man dieses Phänomen fortan als „post transcriptional gene silencing“ (PTGS) (Fire 1999; Tabara et al. 1999). Frühe Untersuchungen an Pflanzen zeigten, dass die Spaltung von langer Vorläufer-dsRNA in kleinere, 23 nt-dsRNA-Oligonukleotide (small interfering RNA, siRNA) für PTGS entscheidend ist. Für die Degradation der endogenen mRNA ist die Beteiligung einer ATP-abhängigen Reaktion notwendig, die so die Gensuppression vermittelt (Zamore et al. 2000). Ein direkter Transfer dieser Technik in Säugetierzellen scheiterte jedoch zunächst. Im Vergleich zu den

beobachteten Effekten in Pflanzen und wirbellosen Tieren löste die Inkorporation von dsRNA, größer als 30 bp, in das Zytosol der Säugetierzellen eine starke immunologische Reaktion aus. Unter anderem triggern die Aktivierung der RNase-abhängigen Proteinkinase sowie der 2',5'-Oligoadenylatsynthetase eine interferonvermittelte Immunantwort. Bei der Transfektion von 21 nt-siRNA-Molekülen in Säugetierzellen bleibt dagegen die Immunantwort aus, so dass nun eine effektive Gensuppression erzielt werden kann (Elbashir et al. 2001).

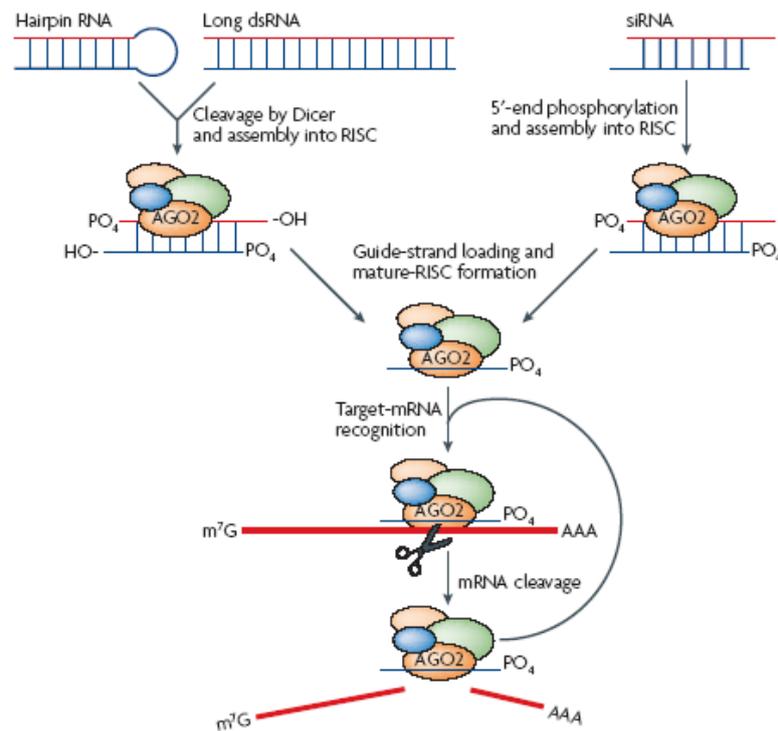
Heutzutage gilt die RNAi als eine etablierte und vielseitig genutzte Methode der hochspezifischen posttranskriptionalen Gensuppression. Die genaue Charakterisierung von Genprodukten und ihren vielseitigen Funktionen ist für die Aufklärung pathophysiologischer Prozesse von essentieller Bedeutung. Die Untersuchungsmöglichkeiten sind jedoch limitiert. So mangelt es dem Einsatz von pharmakologischen Inhibitoren oft an Spezifität. Die Generierung von *knockout*-Mäusen hingegen ist mit großem Arbeitsaufwand und hohen Kosten verbunden. Zusätzlich kann man nicht ausschließen, dass der Verlust eines Gens von Geburt an die Regulation anderer Gene beeinflusst, um diesen Zustand zu kompensieren (Molkentin 2008). Die Methode der RNAi stellt somit heute eine einfache und kostengünstigere Alternative dar, um die Auswirkungen eines akuten Genverlusts zu untersuchen (Scherr and Eder 2007).

Durch die Möglichkeit der postnatalen Genregulierung bietet der Einsatz von RNAi neben der diagnostischen Komponente auch einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz (Rayburn and Zhang 2008). Der klinische Einsatz wird derzeit jedoch stark limitiert durch den Mangel an geeigneten Transfersystemen, die die siRNA nicht-toxisch und gezielt an ihren Wirkort zu verbringen mögen. Möglichkeiten zum in vivo-Transfer von siRNA stellen zum Beispiel die Infektion mit siRNA-exprimierenden Adenoviren oder Adeno-assoziierten Viren oder auch die lokale Applikation „nackter“ siRNA dar (Wullner et al. 2009). Die Optimierung solcher Vektorsysteme ist jedoch die größte Herausforderung in Bezug auf die klinische Anwendbarkeit der RNAi (Whitehead et al. 2009).

#### 1.4.1 RNAi-Mechanismus

Hauptverantwortlich für RNA-Interferenz sind kleine doppelsträngige RNA-Oligonukleotide, so genannte „short“ oder „small interfering RNAs“ (siRNA). Sie sind in der Lage, nach Aufnahme in eine Zielzelle die Spaltung homologer mRNA-Moleküle herbeizuführen. Dies stellt das grundlegende Prinzip der hoch sequenz-spezifischen RNA-Interferenz dar. Die siRNA hat einen sehr charakteristischen Aufbau: Sie ist etwa 21 Basenpaare lang und besitzt am 5'-Ende eine Phosphatgruppe sowie am 3'-Ende eine freie Hydroxylgruppe und einen Überhang aus zwei Nukleotiden, vorzugsweise UTP (Elbashire et al. 2002). Gelangt

die siRNA in das Zytosol einer Zelle, wird sie von einem Proteinkomplex erkannt, dem sogenannten „RNA-induced-silencing-complex“ (RISC). Dieser RISC bindet die siRNA und kann mittels seiner Helicaseaktivität die beiden RNA-Stränge voneinander trennen. Der zur mRNA homologe RNA-Strang (*sense*-Strang) verlässt den RISC wieder und wird degradiert, während der RNA-Strang mit der komplementären Basensequenz (*antisense*-Strang) in den RISC inkorporiert wird (Rana 2007). Für diese Bindung ist die phosphorylierte Hydroxylgruppe am 5'-Ende essentiell (Chiu and Rana 2002). Ein RISC, der eine RNA trägt, wird als aktivierter RISC bezeichnet, da er nun in der Lage ist, den *antisense*-Strang an die Erkennungssequenz der mRNA zu binden. Diese wird anschließend durch eine Endonukleaseaktivität des RISC 10 bis 11 Nukleotide stromaufwärts vom 5'-Ende des *antisense*-Stranges gespalten und steht somit nicht mehr für den weiteren Translationsprozess zur Verfügung (Rana 2007) (s. Abbildung 3). Interessanterweise ist diese hochspezifische Lokalisation der Spaltung konstant, ungeachtet jeglicher Größendimension, die eine mRNA annehmen kann. Verständlich wird dieses Phänomen, wenn man sich den Aufbau und die daraus resultierende Funktionsweise des RISC näher betrachtet. Der RISC ist ein Multienzymkomplex. Seine Helicaseaktivität trennt die RNA-Stränge der siRNA ATP-abhängig voneinander. Zusätzlich zeichnet sich der RISC durch die Beteiligung eines Proteins namens Argonaut aus. Eine hoch konservierte PIWI-Domäne, die Bestandteil der Argonaut-Proteine ist, ist ähnlich der RNase H aufgebaut (Parker et al. 2005; Parker et al. 2006). Die mRNA und der *antisense*-Strang kommen in einer Art Tunnel zu liegen. Hierbei wird das RNA-RNA Hybrid so gebunden, dass sich die Phosphatgruppe zwischen dem 10. und 11. Nukleotid genau neben dem katalytischen Zentrum der PIWI-Domäne befindet (Parker et al. 2005). Dies erklärt die hochspezifische Spaltungsaktivität des RISC.



**Abbildung 3: Funktionsweise der RNA-Interferenz.** Doppelsträngige siRNA von 21 bp Länge aktivieren den RISC und initiieren damit die Spaltung der komplementären Ziel-mRNA. Längere dsRNA oder von Plasmiden transkribierte shRNA wird zuvor durch den Dicer, eine RNase, die einen weiteren Bestandteil des RISC darstellt, prozessiert und führt anschließend ebenfalls zu einer Aktivierung des RISC (Abbildung aus (Rana 2007)).

### 1.4.2 Experimentelle Voraussetzungen

Für eine suffiziente Effektivität einer siRNA, die vollständig komplementär zur Ziel-mRNA ist, ist die zusätzliche Erfüllung einer Vielzahl von Kriterien Voraussetzung.

Die Sequenz sollte mit zwei Adeninbasen beginnen und ein doppelsträngiges Gerüst von 19 Basenpaaren aufweisen. Desweiteren sollte der Guanin/Cytosin (G/C) Anteil zwischen 45-55% liegen. Ausschlaggebend neben dem Aufbau der siRNA ist auch die Lokalisation der Zielsequenz innerhalb der mRNA. Vorzugsweise sollte sie zwischen 50 bp stromabwärts des Startcodons und 50-100 bp stromaufwärts des Terminationscodons zu liegen kommen. Die UTR-Regionen (untranslated regions) sollten vermieden werden. Um die mögliche Ausbildung von Agglomeraten zu umgehen, sollten keine repetitiven Guanin- oder Cytosinbasen-Folgen von 3 Basen oder mehr vorliegen (Tuschl et al. 1999). Voraussetzung einer spezifischen Gensuppression ist der vorherige Vergleich der gewählten siRNA-Sequenz mit allen Gensequenzen des Zielorganismus, um Kollateraleffekte so gering wie möglich zu halten. Hierbei sollten Homologien von mehr als 17 bp nicht toleriert werden (Elbashir et al. 2001)

Auch längere doppelsträngige RNA-Moleküle können PTGS auslösen. Ermöglicht wird dies durch die Anwesenheit eines weiteren Proteinkomplexes, dem sogenannten Dicer. Der Dicer stellt einen weiteren Bestandteil des RISC dar und enthält zwei RNase III-Domänen (Zhang et al. 2004). Durch eine PAZ-Domäne (konservierte Piwi-Argonaut-Zwille-Domäne) ist der Dicer in der Lage, an die dsRNA binden. Durch die katalytischen Einheiten der RNase III-Anteile, deren Abstand zueinander über einen Helixbereich klar definiert ist, wird jede gebundene dsRNA stets im gleichen Muster gespalten. Die Reaktion hinterläßt 19 bp lange dsRNA-Oligonukleotide, welche am 3'-Ende zwei ungepaarte Nukleotide als Überhang und am 5'-Ende eine Phosphatgruppe besitzen. Als Produkt der Reaktion von dsRNA mit dem Dicer entstehen so siRNA-Oligonukleotide, die dem RISC überführt werden können (Tijsterman and Plasterk 2004).

Dieses Phänomen komplettiert den hoch konservierten Prozess der RNAi, der in dieser Reaktionsabfolge wahrscheinlich der physiologischen Bedeutung einer Art Verteidigungsmechanismus von einzelnen Zellen gegen Virusinfektionen entstammt (Williams 1997). Die Existenz des Dicers in nahezu allen Zellen macht es möglich, diesen Mechanismus für die Untersuchung einzelner Genprodukte auszunutzen. Die Transfektion von synthetischen siRNA-Molekülen in Zielzellen oder von Plasmiden, die der Expression von siRNA dienen, ermöglicht es theoretisch, jedes Gen akut herabzuregulieren. Für die Konstruktion solcher Expressionskonstrukte für siRNA existieren unterschiedliche Ansätze (Brummelkamp et al. 2002; Paddison et al. 2002). Ein RNA-Polymerase III-Promotor steuert hierbei stets die Expression. Meistens wird ein H1- oder U6-Promotor eingesetzt (Tuschl et al. 1999). Die RNA-Polymerase III bildet eine RNA, die weder einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende besitzt, noch eine methylierte Kopfgruppe am 5'-Ende trägt. Dabei können der *sense*- und *antisense*-Strang von je einem Promotor exprimiert werden, wobei sich die beiden Stränge im Anschluss zur siRNA zusammenlagern. Ein anderer Ansatz ist die selbstkomplementäre *short hairpin* RNA (shRNA), bei der *sense*- und *antisense*-Strang durch einen in der Regel drei bis neun Basen langen *loop* verbunden sind. Nach der intrazellulären Ausbildung der doppelsträngigen RNA (dsRNA), werden diese dann vom Dicer erkannt und in funktionsfähige siRNA umgewandelt. Aufgrund der sehr geringen Halbwertszeit von „nackter siRNA“ (Rana 2007) erweist sich die stabilere, Plasmid-vermittelte Expression von siRNA als sehr vorteilhaft.

Ein Einbau von für siRNA oder shRNA codierenden Sequenzen in adenovirale Vektoren zur Transduktion ungenügend transfizierbarer Zellen ist darüber hinaus auch zur in vivo-Anwendung möglich (Wullner et al. 2009).

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

Der Einsatz von siRNA stellt eine vielversprechende und kostengünstige Methode dar, um die Auswirkungen eines akuten Genverlustes zu untersuchen. Limitiert ist diese Technik jedoch zunächst einmal auf teilungsfähige Zellen, da sich post-mitotische Zellen bekanntermaßen nur sehr schwierig transfizieren lassen. Kardiomyozyten stellen solche differenzierten, sich nicht teilenden Zellen dar. Für Untersuchungen von Signalprozessen in Kardiomyozyten muss daher oft auf aufwendige Techniken zurückgegriffen werden, wie beispielsweise die Generierung von transgenen Tieren.

Adenoviren zeichnen sich durch die Eigenschaft aus, eine Vielzahl von Zellarten infizieren zu können, darunter auch ruhende, post-mitotische Zellen. Durch eine endogene adenovirale Expression von short-hairpin-RNA kann das limitierte Anwendungsgebiet der RNAi daher auf die post-mitotischen Kardiomyozyten erweitert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein Adenovirus generiert werden, der eine shRNA exprimiert, welche eine spezifische Herabregulation der PKC $\alpha$  bewirkt.

Die PKC $\alpha$  scheint einen negativen Regulator der Kontraktilität des Herzens darzustellen. Wie Kardiomyozyten jedoch auf einen akuten spezifischen Ausfall der PKC $\alpha$  reagieren, war bisher in dieser Form nicht untersucht worden. Mit dem eingangs beschriebenen adenoviral vermittelten siRNA-knockdown der PKC $\alpha$  stand nun ein geeignetes System zur Klärung dieser Fragestellung zur Verfügung. Interessant erschien es insbesondere, die Auswirkungen eines akuten *knockdowns* der PKC $\alpha$  auf die Kontraktionskraft von Kardiomyozyten zu untersuchen. Hierfür wurde auf das Modell des rekonstituierten Herzmuskelgewebes (engineered heart tissue, EHT) zurückgegriffen.

Aus diesem experimentellen Ansatz ergaben sich also folgende Fragestellungen:

- 1) Klärung der Frage, ob neonatale Rattenkardiomyozyten der chemischen Transfektion von siRNA zugänglich sind.
- 2) Generierung eines Adenovirus, welcher gegen PKC $\alpha$  gerichtete shRNA exprimiert.
- 3) Untersuchung der funktionellen Auswirkungen einer PKC $\alpha$ -Herabregulation mittels RNAi am Modell des rekonstituierten Herzmuskelgewebes (EHT).

## 2. Material und Methoden

### Übersicht über verwendete Bakterien, Zellstämme und Plasmide:

#### Standards

|                                  |                  |
|----------------------------------|------------------|
| GeneRuler 1 kb DNA Ladder        | MBI              |
| GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus | Fermentas        |
| GeneRuler 100 bp Ladder          | Fermentas        |
| Precision Plus Protein           | Standards BioRad |

#### Bakterienstämme

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <i>E.coli</i> BJ 5183 | andA, sbcBC, recBC, galK, met, thPPI-1, bioT, hsdR  |
| <i>E.coli</i> DH10B   | F-, mcrA, $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15, $\Delta$ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, $\Delta$ (ara, leu) 7697, galU, galK, $\lambda$ , rpsL, nupG                      |
| TOP10F'               | F-, mcrA $\Delta$ (mrr-hsdRMS-mcrBC) $\Phi$ 80lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ lacX74, recA1 deoR, araD139 $\Delta$ (ara-leu) 7697, galU, galK, rpsL, (StrR) endA1(nupG), TOPO Manual, 2002, Invitrogen |

#### Eukaryotische Zelllinien

|          |  |
|----------|--|
| HEK 293T | humane, embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert mit den Genen E1A und E1B des Adenovirus Ad5 |
| NIH 3T3  | Mausfibroblasten , National Institute of Health  |

#### Plasmide

|          |  |
|----------|--|
| pALsh    | pSuper Vector mit zwei zusätzlichen BSER1-Schnittstellen, Oligoengine (s: 2:3)   |
| pAdTrack | Shuttle-Vektor zur Rekombination mit pAdEasy1 (He et al., 1998) (s. 2.4.2)   |
| pAdEasy1 | Vektor mit Sequenz des Adenovirus Ad5 ( $\Delta$ E1, $\Delta$ E3), zur Rekombination mit pShuttle, 33441 bp, Qbiogene, Heidelberg (s. 2.4.4) |

## 2.1. Klonierung

### 2.1.1 Restriktionsverdau

In dieser Arbeit kamen die folgenden Restriktionsenzyme (New England Biolabs, Ipswich, USA) zum Einsatz: XbaI; KpnI; BseRI; PaeI und PmeI. Die Enzyme wurden mit den für die Reaktion notwendigen Puffern geliefert.

Ein Standardreaktionsansatz in Wasser umfasste 2 IU Restriktionsenzym pro µg 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 entweder eine Gelaufreinigung oder eine Säulenreinigung (E.Z.N.A.® Cycle-Pure Kit, nach Herstellerangaben aufgereinigt).

### 2.1.2 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, die DNA an eine Silica-Säule gebunden und anschließend in sterilem Wasser aus der Säule eluiert.

### 2.1.3 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 µl ergänzt und über Nacht bei 14 °C inkubiert.

### 2.1.4 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.

### **2.1.5 Herstellung thermokompetenter E. Coli-Bakterien**

Zunächst wurden Bakterien mit einem Drei-Ösen-Ausstrich 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 zuerst 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 abgossen 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         | 6 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-, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15, E.coli

TOP10F' (F- mcrA \_ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZ\_M15 \_lacX74 recA1deoR araD139 \_ (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1nupG), TOPO Manual, 2002, Invitrogen

### 2.1.6 Transformation

Für die Transformation wurden einerseits 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. Im Falle der homologen Rekombination wurden elektrokompetente BJ 5183-Zellen verwendet. Hierfür wurde 1 µl Ligationsansatz und 40 µl Bakterien in eine Elektroporationsküvette pipettiert. Die Elektroporation wurde mit 2500 V durchgeführt. 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.

### 2.1.7 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.

### 2.1.8 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.

### 2.1.9 Aufarbeitung im großen Maßstab mittels Ionenaustauscher-Säule (Maxi-Präparation)

Mit der präparativen Plasmidisolierung (Maxipräparation) wurden Plasmide aus Kulturen mit einem Volumen von 250 ml bis 2 l gewonnen. Dazu wurde das Plasmid-Maxi-Kit (NucleoBondPC 500®, Macherey-Nagel) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Bakterien wurden, wie bei der analytischen Plasmidisolierung, alkalisch lysiert und genomische DNA, denaturierte Proteine und SDS wurden ausgefällt. Das über einen Faltenfilter geklärte Bakterienlysat wurde über eine Anionenaustauschersäule (Nucleo Bond 500, äquilibriert mit Puffer N5) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Bindung erfolgt bei niedrigem pH-Wert und niedriger Salzkonzentration aufgrund der Interaktion der negativ geladenen Phosphatreste der DNA mit den positiv geladenen Diethylaminomethanol-Gruppen auf der Oberfläche des Anionenaustauscherharzes. Die Anionenaustauschersäule wurde mit Waschpuffer (Puffer N3) mittlerer Salzkonzentration gewaschen und anschließend die DNA mit einem Hochsalzpuffer im schwach alkalischen Milieu eluiert. Durch

Isopropanolfällung wurde die DNA konzentriert und entsalzt. Das DNA-Sediment wurde, um Isopropanol- und Salzreste zu entfernen, mit 5 ml 70 prozentigem Ethanol gewaschen und im offenen Reaktionsgefäß vorsichtig getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in A.dest aufgenommen und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch.

#### 2.1.10 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Konzentration und Reinheit von DNA bzw. RNA-Lösungen wurden im Spektralphotometer (SmartSpec 3000, BioRad) bestimmt. Es wurden 100  $\mu\text{l}$  einer 1:50 Verdünnung der Plasmidlösung in einer Quartz-Küvette vermessen. Die Absorption bei 260 nm zeigte die Konzentration von Nukleinsäure an, welche auf der Adsorption der aromatischen Ringe der Basen beruht. Das Absorptionsmaximum für Proteine liegt, basierend auf der Absorption aromatischer Aminosäureresten (Tyrosin, Tryptophan), bei 280 nm. Der Quotient der Absorptionskoeffizienten  $A_{260}/A_{280}$  definierte die Reinheit der DNA. Eine reine DNA-Lösung besitzt einen Quotienten  $A_{260}/A_{280}$  von 1,8 bis 2. Ist die Nukleinsäurelösung mit Proteinen (oder Phenol) verunreinigt, so war der Wert dagegen deutlich kleiner. Die Konzentration berechnete sich nach folgender Formel:

Nukleinsäurekonzentration = Abs 260 x Faktor x Verdünnung

Dabei galten folgende Faktoren:

ds DNA: 50 g/ml

ss DNA und RNA: 40 g/ml

ss Oligonukleotide: 20 g/ml

#### 2.1.11 Gelelektrophorese

Die DNA wurde unter nativen Bedingungen in Abhängigkeit von ihrer Molekülgröße in einer Agarosegelmatrix elektrophoretisch aufgetrennt. Der Größe der aufzutrennenden Moleküle entsprechend wurden 0,8–3%-ige (m/V) Gele verwendet. Die Agarose wurde durch Aufkochen in 1xTBE-Puffer gelöst, nach dem Abkühlen auf ca.  $50^{\circ}\text{C}$  mit 0,2–0,5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Ethidium-Bromid (EtBr) versetzt und in einen Träger einer Flachbett-Elektrophoresekammer (BioRad) gegossen. Entstandene Luftblasen wurden entfernt. Nach dem Erkalten wurde das Gel mit 1xTBE-Puffer überschichtet und die mit 20%-Ladepuffer versetzten Proben (6x-Probenpuffer), sowie ein DNA-Marker, als Größenreferenz bzw. zur Konzentrationsbestimmung, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 5 V/cm oder 1 V/cm bis die gewünschte Auftrennung erfolgt war. Unter UV-Licht (302 nm) konnten die DNA-Banden durch das in der DNA interkallierende EtBr sichtbar gemacht und durch eine Sofortbildkamera aufgenommen werden.

TBE Puffer

|          |       |
|----------|-------|
| EDTA     | 0,1 M |
| TRIS     | 2 M   |
| Borsäure | 1 M   |

in wässriger Lösung

Ladefarbe

|                |        |
|----------------|--------|
| Bromphenolblau | 75 mg  |
| Xyclencyanol   | 25 mg  |
| Glycerol       | 100 ml |

## 2.2 shRNA-Konstruktion

### 2.2.1 siRNA-Design

Für den spezifischen *knockdown* der PKC $\alpha$  musste zunächst eine geeignete Zielsequenz innerhalb der mRNA gefunden werden. Hierfür wurde die Auswahl unter Zuhilfenahme der Internetseite des *Whitehead Institute* getroffen (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>). Die dort zur Verfügung gestellte Datenbank berücksichtigt bei der Auswahl die von der Arbeitsgruppe Tuschl publizierten Kriterien für wirksame siRNA (Elbashir et al., 2001b; Elbashir et al., 2001c; zusammengefasst auf der Internetseite der Arbeitsgruppe Tuschl <http://www.rockefeller.edu/labheads/tuschl/sirna.html>). Neben diesem anerkanntem Algorithmus, musste die optimale Zielsequenz aber noch weitere Vorraussetzungen erfüllen:

1: Die Sequenz sollte 19–21 nt nicht überschreiten

2a: Es mussten sich am 3'-Terminus zwei Thymidinnukleotide befinden und am 5'-Ende eine palindromische Sequenz mit einer Länge von mindestens 4 Basen Länge

oder

2b: Die palindromische Sequenz befand sich am 3'-Ende wobei dann die Auflage erfüllt sein musste, dass am 5' Terminus zwei Adenosin Nukleotiden standen.

Als Negativkontrolle sollte eine siRNA dienen, die dieselben Basen wie die gegen PKC $\alpha$  gerichtete siRNA enthielt. Die Basen wurden hierfür in eine beliebige Reihenfolge angeordnet, mit dem Ziel, dass sie keinerlei Homologien mit dem Rattengenom aufwies („scrambled-“ oder „nonsense-“siRNA). Die Sequenzen wurden mithilfe des *BLAST*-Programms (*National Center for Biotechnology Information* = NCBI) mit den bekannten Rattensequenzen abgeglichen, um eine Homologie zu anderen bekannten Genen auszuschließen. Hierbei wurde eine Übereinstimmung von 16 Basen toleriert.

Zielsequenz der PKC $\alpha$ : 5'AACTCACAGACTTCAACTTCCTCATG3'

Zielsequenz der Negativkontrolle: 5'AGTACTATCCGCCGCCATACTCTATCTT3'

### 2.2.2 shRNA-Generierung

Um eine intrazelluläre Expression von siRNA zu gewährleisten, musste sich auf einem Oligonukleotid der *antisense*-Strang (komplementär zur Zielsequenz) als auch der *sense*-Strang, d.h. der zur mRNA homologe Anteil befinden. Diese hybridisieren dann spontan und bilden die gewünschte doppelsträngige short hairpin-RNA aus und sind über eine ungepaarte Schleife miteinander verbunden. Die ausgewählten Zielsequenzen stellten somit den *sense*-Strang dar und mussten zur Vollständigkeit durch den *antisense*-Strang ergänzt werden. Hierbei musste darauf geachtet werden, dass die palindromische Sequenz in der Mitte des fertigen Oligonukleotids zu liegen kommt. Diese Region sollte den späteren Loop darstellen. Die hier vorliegenden Basen hätten zwar theoretisch miteinander hybridisieren können, jedoch würde sich dies räumlich nicht umsetzen lassen und der Loop würde sich zwangsläufig ausbilden. Desweiteren wurde die shRNA-Sequenz so gewählt, dass am 3'-Ende die zwei Thymidinnukleotide als Überhang verblieben. Das heißt, der *antisense*-Strang wurde nicht durch zwei Adenosinnukleotide ergänzt, sondern verblieb ohne komplementären Partner in diesem Bereich. Im Falle der PKC $\alpha$ -Zielsequenz, die mit den zwei Adenosinnukleotiden begann, wurden diese bei der shRNA-Sequenz weggelassen und der *antisense*-Strang um zwei Thymidinnukleotide ergänzt. Da sie in sich palindromisch sind, können sich zwei Oligonukleotide jeweils hybridisieren und die zur Weiterverarbeitung bereite cDNA ausbilden. Tabelle 1 gibt die einsetzbaren shRNA-Oligonukleotidsequenzen an.

|                               | Oligonukleotidsequenzen  |
|-------------------------------|--|
| <b>PKC<math>\alpha</math></b> | 5'CTCACAGACTTCAACTTCCTCATGAGGAAGTTGAAGTCTGTGAGTT3'<br>3'TTGAGTGTCTGAAGTTGAAGGAGTACTCCTTCAACTTCAGACACTC5'     |
| <b>Nonsense</b>               | 5'GCTCGCGTATGGCGGATAGTACTAGTACTATCCGCCATACGCGAGCTT3'<br>3'TTCGAGCGCATACCGCCTATCATGATCATGATAGGCGGTATGCGCTCG5' |

Tabelle 1: cDNA-Oligonukleotide der sh-PKC $\alpha$  und sh-Nonsense

### 2.2.3 Herstellung der shRNA-Oligodeoxynukleotide

Die ausgewählten *sense*- und *antisense*-Sequenzen für die shRNA-Oligodeoxynukleotide wurden kommerziell synthetisiert und vor Verwendung mit Aqua ad iniectionabilia auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. 2 µl cDNA wurden mit 10 µl 10x *annealing*-Puffer und 88 µl Aqua ad iniectionabilia zusammengefügt und nach folgendem Thermoprofil in einem PCR-Gerät (GeneAmp® PCR System 9700) inkubiert (s. Tabelle. 2).

| Temperatur |                                 | Zeit  |
|------------|---------------------------------|-------|
| 90°C       |                                 | 5 min |
| 1 min      | 89°C } 70 Zyklen, -1 °C /Zyklus |       |
| 20°C       |                                 | 7 min |

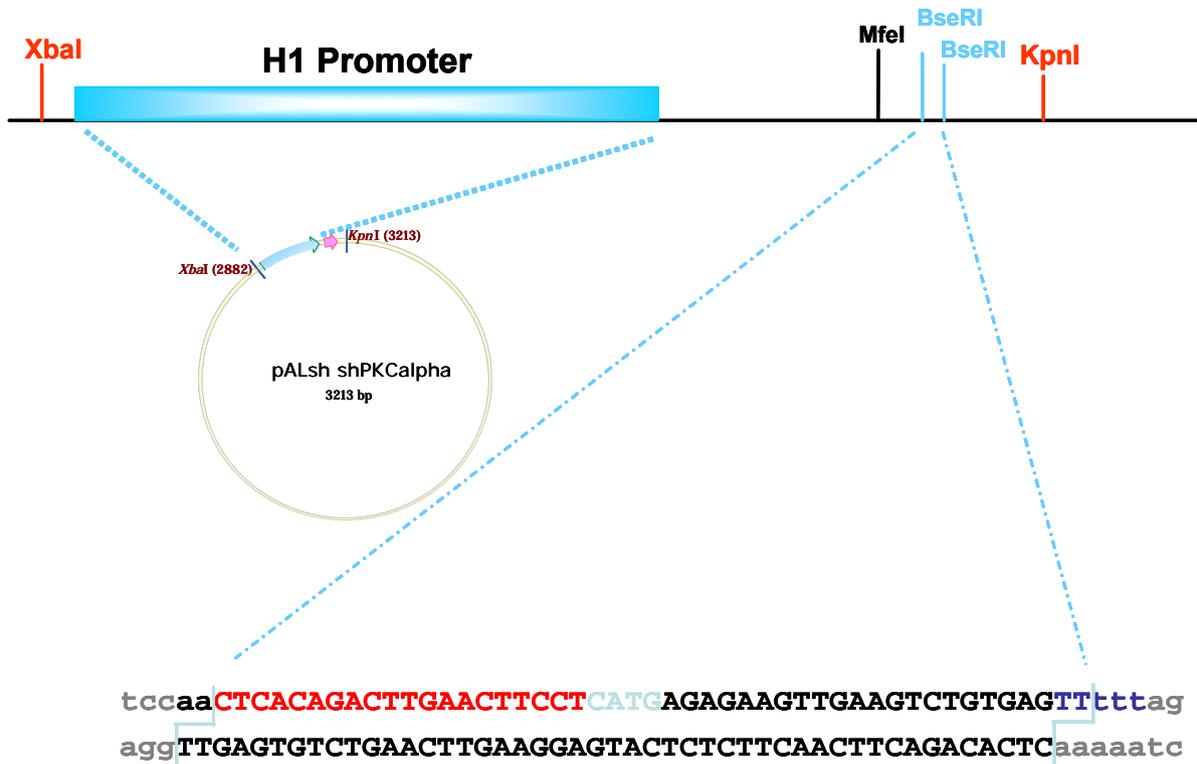
**Tabelle 2: Thermoprofil für shRNA-*annealing***

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

### 2.3 Klonierung des pALsh

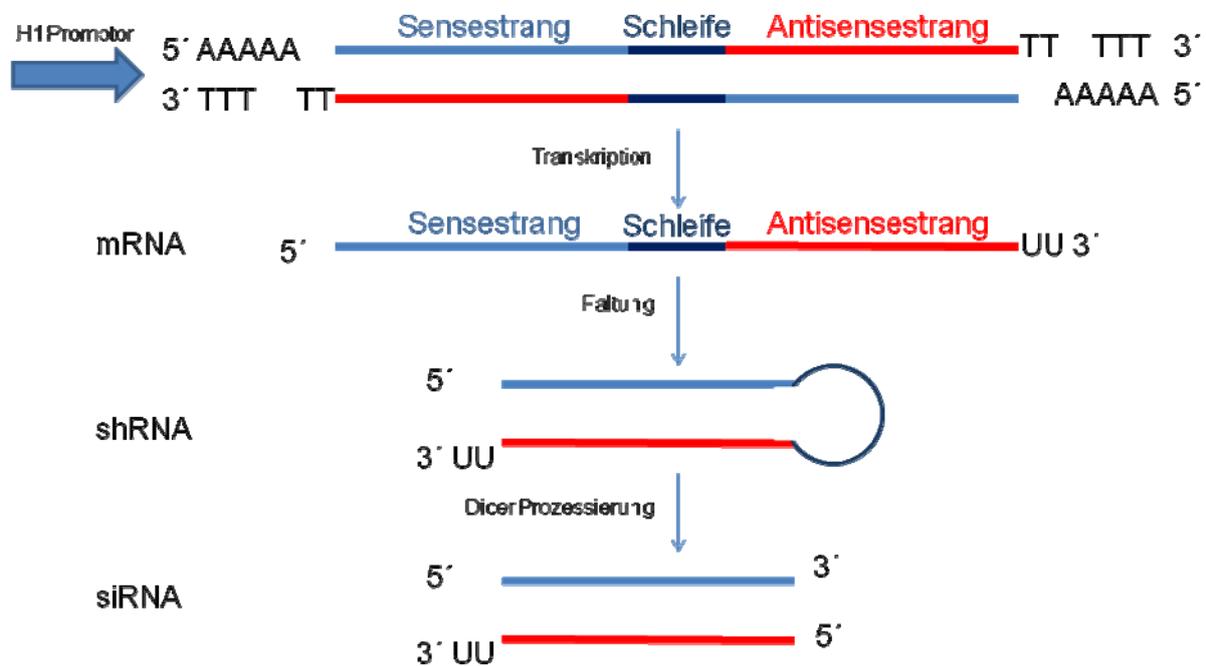
Für die Expression von funktionsfähiger shRNA benötigen die cDNA-Oligonukleotide einen adäquaten Promotor. Hierfür wurde auf ein Expressionsplasmid zurückgegriffen, das den Namen pALsh trug. Bei diesem handelt es sich um einen modifizierten pSUPER-Vektor der Firma OligoEngine, Seattle welcher freundlicherweise von Dr. Alexander Laatsch (Institut für Biochemie, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt wurde. Der pALsh Vektor unterschied sich von seinem Original durch zwei zusätzliche BseRI-Schnittstellen welche stromabwärts eines H1-Promotors (RNA Polymerase III-Promoter) einkloniert wurden. Das Plasmid kann so mit der Restriktionsendonuklease *BseRI* geöffnet werden, dessen Erkennungssequenzen zweimal in entgegengesetzter Orientierung in dem pALsh vorkommen. Da *BseRI* außerhalb seiner Erkennungssequenz schneidet, geht das Fragment mit den Erkennungssequenzen verloren, und durch eine entsprechende Wahl der flankierenden Sequenzen verbleiben am geöffneten Vektor zwei 3'-AA-Überhänge. Diese Enden verhindern eine Selbstligation des Vektors und senken somit die Gefahr von falsch-positiven Ligationsklonen. Weiterhin ermöglichen sie die Ligation mit einem palindromischen Oligodeoxynukleotid mit einem 3'-TT-Überhang. Die Ligation des ds-cDNA-Fragments komplettiert das in der Sequenz vom pALsh angelegte Terminationssignal von fünf

Thymidinresten für die RNA-Polymerase III, die am H1-Promotor rekrutiert wird und die Transkription an der ersten Base der Sequenz des dsDNA-Fragments initiiert. Die RNA-Polymerase III beendet die Transkription nach Erreichen des Terminationssignal, indem es zwei der Thymidinreste transkribiert (Abbildung 4). Die entstandene shRNA besitzt somit immer einen 3'-UU-Überhang, welcher sich als besonders günstig auf die Funktionalität der späteren prozessierten siRNA auswirkt.



**Abbildung 4: Klonierungsstrategie von pALsh.** Der Vektor wurde mit *BseRI* linearisiert. Das Fragment mit den beiden Erkennungssequenzen wurde ausgeschnitten. Das palindromische und damit selbstkomplementäre Oligonukleotid (hier als Beispiel PKC $\alpha$ ) verfügte über 3' TT-Überhänge, die mit den 5' AA-Überhängen des Vektors ligiert werden konnten. Abbildung modifiziert nach (Laatsch et al. 2004).

Zum besseren Verständnis gibt Abbildung 5 einen Überblick über die siRNA-Generierung durch die Transkription des pALsh-Plasmides.



**Abbildung 5: Funktionsweise des pALsh.** Dargestellt sind nur der Ausschnitt aus dem H1-Promotor und das Oligonukleotid, das zur Ausbildung von einer shRNA führt. Die fünf 3'-Thymidine stellen das Stoppsignal für den H1 Promotor dar.

### 2.3.1 Klonierung der Konstrukte in den pALsh Vektor

Es wurden 0,7 µg des pALsh Vektors mit 5 U BseRI für 2 h verdaut. Dieser Ansatz wurde über eine Säule (E.Z.N.A.® Cycle-Pure-Kit) nach Herstellerangaben aufgereinigt (Zentrifugenmodell Beckman-Coulter Centrifuge 5415 C). Dabei wurden abweichend 10 µl des Vektoransatzes mit 40 µl CP-Puffer aus dem Kit vermengt. Die Elution erfolgte mit 40 µl Aqua ad iniectionem. Dieses Fragment war kurz genug, um auf einer üblichen Silicasäule nicht zu binden, so dass der geöffnete Vektor ohne vorherige Gelelektrophorese direkt aus dem BseRI-Reaktionsansatz aufgereinigt werden konnte. Zur Ligation des geschnittenen Vektors und der unter 2.2.3 hergestellten shRNA-Oligonukleotide wurde folgender Ansatz zusammenpipettiert:

#### Ligationansatz pALsh:

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| Mit BseRI verdauter Vektor pALsh | 2 µl   |
| shRNA-Oligodeoxynukleotid        | 1 µl   |
| 10x NEBuffer 2                   | 1 µl   |
| Aqua ad iniectionem              | 4,5 µl |

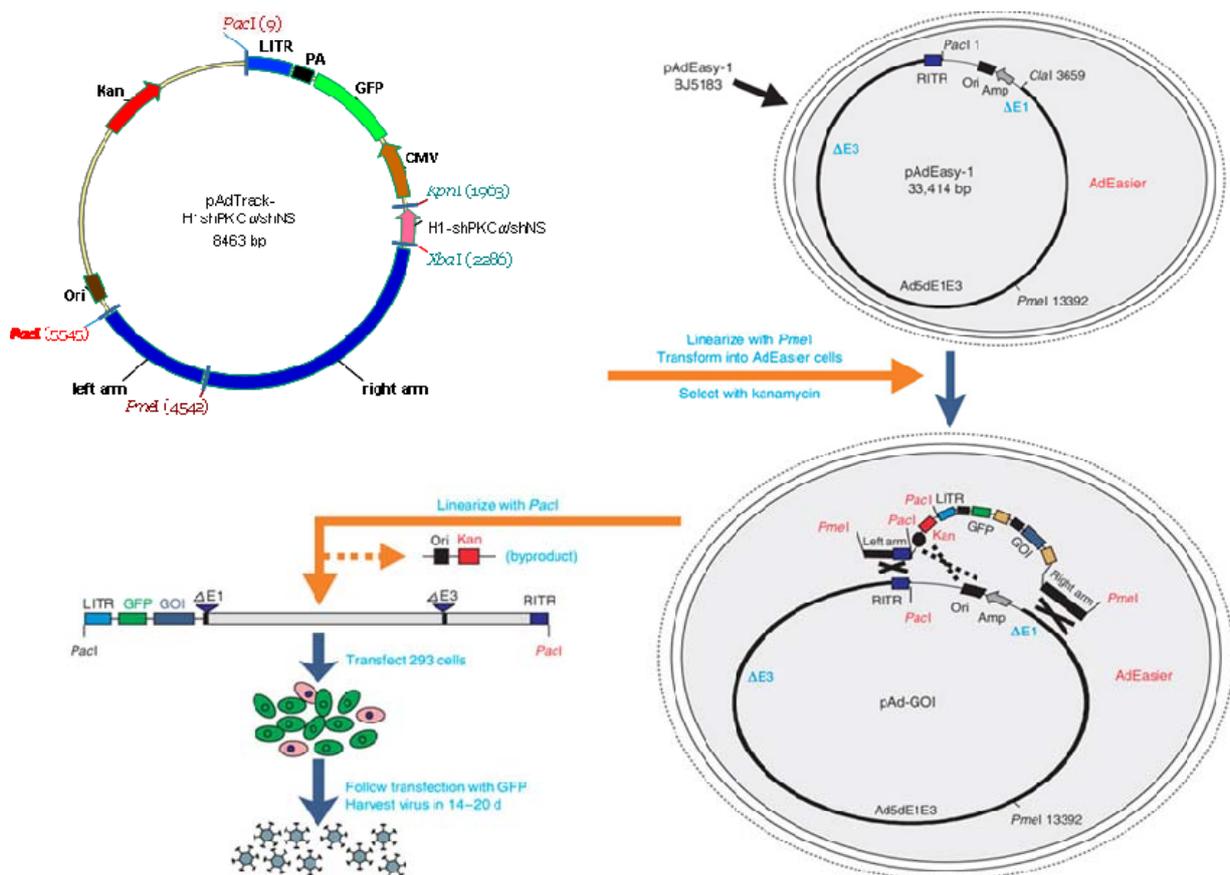
Dieser Ansatz wurde auf 75 °C erhitzt (PCR-Gerät GeneAmp®) und anschließend mit einer Rate von 0,05 °C/s auf 55 °C heruntergekühlt. Von 55 °C ausgehend folgte eine weitere Abkühlung auf 4 °C mit einer Rate von 0,25 °C/s. Zu diesem Reaktionsgemisch wurde 1 µl einer 10 mM ATP-Lösung hinzugefügt und 0,5 µl der T4-DNA-Ligase. Anschließend folgte ein Ligationszyklus für 12 h bei 16 °C. Zur Enzyminaktivierung schloss sich eine 10-minütige Erhitzung auf 65 °C an. Anschließend wurde nochmals mit 1 U BseRI für 1 h inkubiert, um mögliche fehlerhafte Klone aus selbstligierten Vektormolekülen erneut zu linearisieren. Das Enzym wurde ebenfalls bei 65 °C für 20 min inaktiviert. Dieser Ansatz wurde in *E. coli* TOP10F' hitzetransformiert und auf ampicillinhaltige LB-Agarplatten ausgestrichen. Ausgewählte gewachsene Kolonien wurden nach Plasmid-DNA Isolation mit den Enzymen XbaI und KpnI verdaut und auf einem 3%igen Agarosegel überprüft.

## 2.4 Herstellung rekombinanter Adenoviren

### 2.4.1 Adenovirale Expressionssysteme

Replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren stellen ein vielseitiges und schnelles virales Transfektionssystem für die funktionelle und therapeutische Genanalyse dar. Mit Adenoviren können nahezu alle Arten von Säugetierzellen infiziert werden, ungeachtet ihrer Teilungsfähigkeit. Zusätzlich zeichnen sie sich durch ihre geringe Pathogenität für den Menschen aus. Die in dieser Arbeit generierten rekombinanten Adenoviren sind extrachosomal-verbleibende Adenoviren vom Serotyp 5 (Ad5) und wurden nach der Methode von He et al. (1998) hergestellt. Das verwendete adenovirale Genom enthielt Deletionen in den Regionen E1 (E1, Ad5 Nukleotide 1 - 3533) und E3 (E3, Ad5 Nukleotide 28130 - 30820). Der produktive Infektionszyklus wird mit der Transkription des E1A-Gens eingeleitet, dessen Genprodukt transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Gene E1B, E2A, E3 und E4 wirkte (E = *early gene*). Darauf folgt die DNA-Replikation und, mit der Aktivierung der späten viralen Gene, die Bildung neuer Virionen. Die E3-Region kodiert für Proteine, die für die Umgehung der Immunantwort des Wirtsorganismus wichtig sind, ist aber für die Virusreplikation in der Zellkultur nicht essentiell. Durch die beiden Deletionen wurde somit einerseits erreicht, dass das rekombinante Adenovirus replikationsdefizient war und andererseits das Virusgenom bis zu 7,5 kb an fremden DNA-Fragmenten aufnehmen konnte, ohne die Enkapsidation der Virus-DNA zu stören (Benihoud et al., 1999; Bett et al., 1993). Die Fremd-DNA wurde zunächst in einen Transfervektor kloniert, da eine direkte Klonierung in das Virusgenom aufgrund der Größe der DNA (33,4 kb) und mangels singulärer Schnittstellen nicht möglich ist. Anschließend wurde durch homologe Rekombination mit dem viralen Genom (pAdEasy-1) in Bakterien das rekombinante adenovirale Genom erzeugt. Die Generierung der Adenoviren erfolgte durch

Transfektion der rekombinanten Plasmid-DNA in HEK 293T-Zellen. Die HEK 293-Zelllinie ist eine kontinuierlich wachsende Zelllinie humaner, embryonaler Nierenzellen, die mit gescherter humaner Ad5-DNA transformiert wurde. Diese Zelllinie enthält die viralen Gene E1A und E1B (Ad5 Nukleotide 1 - 4344), welche die Deletionen im rekombinanten Virusgenom ausgleichen können und so die Generierung rekombinanter, selbst replikationsdefizienter Adenoviren ermöglichen (Graham et al., 1977; Louis et al., 1997). Die Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen Schritte der Virusherstellung.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herstellung eines rekombinanten Adenovirus mit Hilfe des AdEasy-Systems.**

Die kodierende Sequenz der sh-RNA zusammen mit einem H1-Promotor wurde in den Transfektor pAdTrack einkloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease Pme I linearisiert und mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) durch Co-Transformation in E. coli BJ5183 zur homologen Rekombination gebracht. Über das Kanamycinresistenzgen (Kan) wurde auf rekombinante Plasmide selektiert. Das mit der Restriktionsendonuklease Pac I linearisierte rekombinante Virusgenom wurde in HEK 293-Zellen transfiziert, welche die Fähigkeit besitzen die Deletionen (E1, E3) im Virusgenom zu vervollständigen und somit infektiöse, replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren zu bilden. Ad5 DNA: genomische DNA des humanen Adenovirus Serotyp 5, Amp: Ampicillinresistenzgen, CMV: Zytomegalievirus-Promotor, E1, E3: Deletionen in den frühen Genen E1 und E3 der adenoviralen Replikation, GFP: grün fluoreszierendes Protein, LITR/RITR: linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz, pA: Polyadenylierungssignal. Modifizierte Graphik aus der Beschreibung der AdEasy-Systems aus der Veröffentlichung (He et al. 1998).

### 2.4.2 Klonierung der Transfervektoren: pAdTrack

Als Transfervektor für alle nachfolgend aufgeführten Konstrukte diente der Transfervektor pAdTrack (He et al. 1998). Im Vergleich zu dem sehr ähnlichen pAdTrack-CMV Shuttlevektor, besitzt pAdTrack nicht zwei, sondern nur eine Expressionskassette. Die Kassette dient der Expression eines verstärkt grün fluoreszierenden Proteins (eGFP, im weiteren Verlauf als GFP bezeichnet) zur Kontrolle und Quantifizierung des Infektionsverlaufs. Mittels einer multiplen Klonierungsstelle kann die Zielsequenz mit einem individuellen Promotor eingefügt werden. Diese ist von adenoviralen Sequenzen umgeben (linker und rechter Arm) die eine homologe Rekombination mit dem eigentlichen Virusgenom (pAdEasy-1) erlauben. Für die Amplifikation des Vektors in *E.coli* sind zusätzlich ein Kanamycinresistenzgen (Selektionsgen) und ein Replikationsstart (*ori*, *origin of replication*) integriert.

### 2.4.3 pAdTrack-shPKC $\alpha$ / pAdTrack-shNS

Die Generierung eines Transfervektors zur Expression einer shRNA erfolgte durch Einklonieren des H1-Promotors zusammen mit der cDNA-Sequenz der sh-NS und sh-PKC $\alpha$  in den pAd-Track-Vektor. Diese wurden zuvor aus pALsh durch den Verdau mit KpnI und XbaI isoliert.

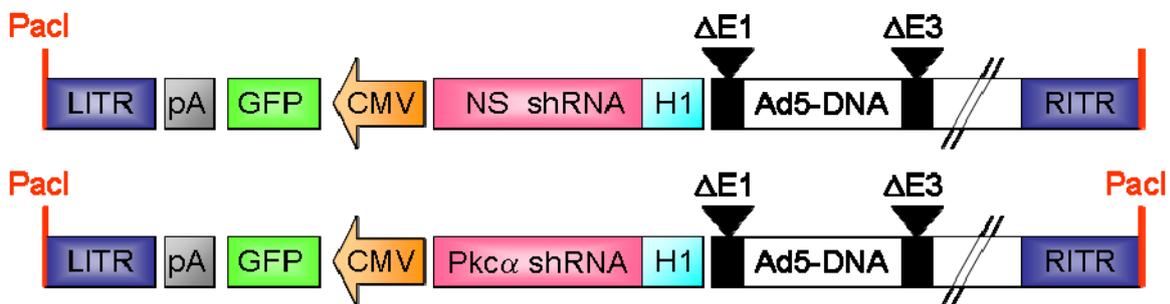
### 2.4.4 Vorbereitung der Transfervektor-DNA für die homologe Rekombination von pAdTrack und pAdEasy

Die pAdTrack-Transfervektoren wurden vor der homologen Rekombination mit der Restriktionsendonuklease *Pme I* linearisiert, wodurch der rechte und linke Arm für die homologe Rekombination voneinander getrennt wurden und so für den Rekombinationsvorgang zur Verfügung standen. Im späteren Verlauf der Klonierung wurden über das Kanamycinresistenzgen des pAdTrack die rekombinationspositiven Klone selektiert. 40 mg Transfervektor-DNA wurden mit insgesamt 80 U Restriktionsendonuklease *Pme I* (New England Biolabs, Frankfurt am Main) ü. N. nach den Angaben des Herstellers geschnitten. Die DNA-Lösung wurde ü.N. bei 4°C in Ethanol gefällt. Das Pellet konnte dann nach kurzem abzentrifugieren (30 sek., 34.000 rpm) in 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O in sterilem, bidest. Wasser resuspendiert werden. Anschließend wurde die Konzentration photometrisch (s. 2.1.10) bestimmt.

### 2.4.5 Homologe Rekombination

Bei der homologen Rekombination kommt es aufgrund identischer DNA-Sequenzen zum Austausch und in diesem Fall zur Integration von DNA-Abschnitten in einen Vektor. Hier wurde der H1-Promotor mit der sh-PKC $\alpha$ -cDNA bzw. sh-NS-cDNA im Shuttlevektor

pAdTracksh-PKC $\alpha$  bzw. pAdTrack-sh-NS in das adenovirale Plasmid pAd-Easy-1 kloniert. (s. Abbildung 7). Dazu wurden je 100 ng mit Hilfe des Restriktionsenzym *PmeI* (s. 2.1.1), linearisierte Transfervektoren in mit pAd-Easy-1 vortransformierte *E.coli* BJ5183 mittels Elektroporation eingebracht. Der Ansatz wurde, wie oben beschrieben (s. 2.1.6), elektroporiert, in LB-Medium inkubiert, ausplattiert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden einige der kleinsten gewachsenen Kolonien mit sterilen Pipettenspitzen zur Mini-Präparation isoliert. Positive Klone zeigten auf dem Agarosegel eine 33 kb-Bande des linearen AV-Genoms sowie eine 3 kb- (positiv) bzw. 4,5 kb- (negativ) Bande des rekombinierten Transfervektors. Die Plasmid-DNA wurde anschließend zur weiteren Amplifikation in thermoinstabile *E.coli* DH10B Bakterien transformiert.



**Abbildung 7.: Schematische Darstellung der generierten rekombinanten Adenoviren.**

Dargestellt sind die DNA-Sequenzen der generierten rekombinanten Adenoviren, die durch homologe Rekombination des jeweiligen pAdTrack.Shuttlevektors mit pAdEasy-1 und anschließende Linearisierung durch die Restriktionsendonuclease *Pac I* erhalten wurden. Ad5 DNA: genomische DNA des humanen Adenovirus Serotyp 5, CMV: Zytomegalievirus-Promotor, E1, E3: Deletionen in den frühen Genen E1 und E3 der adenoviralen Replikation, GFP: Grün Fluoreszierendes Protein, H1: Humaner RNA-Polymerase III-Promotor, shPKC $\alpha$  cDNA Sequenz, LITR/RITR: linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz, pA: Polyadenylierungssignal.

## 2.5 Methoden der Zellkultur

Die biologischen Arbeiten wurden im Labor der Sicherheitsstufe 1 und die virologischen Arbeiten wurden im Labor der Sicherheitsstufe 2 unter Laminarluftfluss durchgeführt. Sämtliche Medien, Flüssigkeiten, Kulturgefäße und Arbeitsmaterialien wurden steril eingesetzt.

### 2.5.1 HEK Erhaltungskultur

#### HEK 293T-Medium

Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM)

10% (v/v) FCS (inaktiviert)

1% (v/v) Glutamin

1% (v/v) Penicillin/Streptomycin

#### Citric saline:

135 mM KCl

15 mM Na-Citrat

ad 1 l A.dest

#### PBS, pH 7,4

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

6,5 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

ad 1 l Aqua destillata

Die adhärenen Zelllinien HEK 293 wurden als Monolayerkultur in Zellkulturschalen (Durchmesser von 3,5 cm, 6 cm, 10 cm bzw. 15 cm) kultiviert. Um zu vermeiden, dass die Zelldichte zu hoch wurde, die Proliferationsrate dadurch abnimmt und die Zellen schließlich absterben, mussten sie durch Passagieren regelmäßig verdünnt werden. Dies ist in der Regel alle 3-4 Tage notwendig. Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O-gesättigter Atmosphäre vermehrt. Bei einer Zelldichte >75% Konfluenz wurden in einem für die folgenden Versuche entsprechendem Verhältnis gesplittet: Die Zellen wurden hierfür einmal mit 1xPBS (RT) gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA (0,05% w/v Trypsin, 0,02% w/v EDTA) bzw. *citric saline* abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit serumfreien DMEM-Medium auf das zweifache Volumen aufgefüllt und 5 min bei RT, 600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in frischem serumhaltigem DMEM-Medium resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung in Zellkulturschalen überführt.

### 2.5.2 Transfektion von HEK 293-Zellen

Damit der Ad-shPKC (und Ad-shNS) in den HEK 293-Zellen hergestellt und vermehrt werden kann, müssen die Zellen mit dem durch homologe Rekombination hergestellten

Vektorkonstrukt aus pAd-Easy-1 und pAd-Track-shPKC (bzw. -shNS) transfiziert werden (s.2.5.6) Die Zellen wurden für 48 h im Brutschrank kultiviert. Die Transfektion und die beginnende Virusproduktion konnte über die Expression des GFP-Signals unter dem Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden. Nach drei Tagen wurde das Medium erneut gewechselt, dann bis zur Ernte der Zellen nicht mehr, um die sich langsam abrundenden Zellen nicht zu stören. Nach 8 Tagen erfolgte die erste Ernte.

### 2.5.3 Ernte virusinfizierter Zellen

Zur Ernte sollten bereits 30-50 % der transfizierten HEK 293-Zellen abgelöst sein. Dies war nach 8 Tagen der Fall, so dass die noch anhaftenden Zellen mit einer weitlumigen Pipette abgespült oder einem Zellschaber vorsichtig abgenommen wurden, um die abgerundeten Zellen nicht zu zerstören. Die Zellen wurden bei 4 °C und 600 rpm 7 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2 ml 1xPBS resuspendiert. Die Zellsuspension wurde, um die Zellen aufzubrechen und so das Virus freizusetzen, dreimal in flüssigem Stickstoff vollständig eingefroren, bei 37 °C wieder aufgetaut und kräftig gevortext. Die Zellfragmente wurden abzentrifugiert (4 °C, 600 rpm, 7 min, Hettich-Zentrifuge) und der virushaltige Überstand für die erste Infektion (s. u.) verwendet bzw. bei -80 °C gelagert.

### 2.5.4 Präparation eines hochtitrigen Virus-Stocks

Die Zellen der ersten Infektion wurden analog dem Verfahren nach der Transfektion geerntet (s.4.24.3). Das Virus wurde in drei weiteren Infektionszyklen mit steigenden Zellzahlen amplifiziert. Ein Infektionszyklus dauerte zwei bis drei Tage. Der vierte Infektionszyklus diente zur Generierung einer Virusstammlösung. Hierzu wurden in 28 15 cm-Zellkulturschalen mit je 20 ml des virushaltigen Überstandes des vierten Infektionszyklusses infiziert. Die Ernte erfolgte wenn etwa die Hälfte der Zellen sich abgelöst hatten, da ihre Zellwand dann noch ausreichend stabil war, um das Zentrifugieren unbeschadet zu überstehen. Die infizierten Zellen wurden mit 1xPBS pH 7,4 gewaschen und resuspendiert. Die Zellen wurden durch dreimaliges Frieren-Tauen aufgebrochen, das Virus freigesetzt und der nach Zentrifugation erhaltene Überstand als Virusstammlösung bezeichnet. Die Virusstammlösung wurde zur Titerbestimmung verwendet und bei -80 °C gelagert.

### 2.5.5 Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren

HEK 293-Zellen wurden auf 6-well- Platten mit einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  ausgesät. Zur Infektion wurden Verdünnungen von  $2 \times 10^{-1}$  bis  $10^{-4}$  der Virusstammlösung mit HEK-Medium hergestellt und die jeweilige verdünnte Lösung in die Kammern gegeben. Pro Verdünnung wurden zwei wells infiziert. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung der Zellvitalität wurden zwei wells nicht infiziert. Der Infektionsverlauf wurde nach 48 h ausgewertet. Dabei wurde

die Zahl der GFP exprimierenden Zellen je Kammer und Virusverdünnung ermittelt.

Die infektiösen Viruseinheiten sind analog zur Bezeichnung: *efu = expression forming unit* (He et al. 1998). Für eine Infektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten muss für einen identischen Effekt eine um etwa den Faktor 10 höhere Konzentration des Adenovirus eingesetzt werden. Ein gängiges Maß für die Quantifizierung einer Virusinfektion in Zellkulturen ist die Multiplizität der Infektion pro Zelle (MOI). Sie beschreibt die Anzahl der infektiösen Viruspartikel pro ausgesäter Zielzelle. Bei GFP koexprimierenden Adenoviren in kultivierten neonatalen Kardiomyozyten (NRKM) wurde angenommen, dass nach 48 h Infektion jede Zelle, die ein Viruspartikel inokuliert hat, gerade grün leuchten sollte. Dies bedeutet, dass die Multiplizität der Infektion pro Zelle (MOI) eins ist.

### 2.5.6 Transfektion von NIH 3T3 , NRKMs und HEK 293T Zellen

Die Transfektion mit Polyfect beruht auf dem Prinzip des aktivierten Dendrimers. Ein solches aktiviertes Dendrimer besteht aus von seinem zentralen Anteil zentrifugal ausgehenden Armen, an deren Ende sich positiv geladene Aminsoäuregruppen befinden. Seine definierte sphärische Struktur erleichtert die Bindung von kompakter DNA, wobei der Polyfect-DNA-Komplex eine positive Nettoladung besitzt. Diese ermöglicht die Bindung an negativ geladene Rezeptoren der Zelloberfläche von eukaryonten Zellen. Nach Endozytose des Komplexes in die Zelle bewirkt Polyfect eine Abpufferung des lysosomalen pH-Wertes, wodurch die lysosomalen Nukleasen inaktiviert werden. Auf diese Weise wird eine Degradation der DNA verhindert und der Polyfect-DNA-Komplex kann in den Kern aufgenommen werden. Für die Transfektion der Vektorkonstrukte aus pAd-Easy-1 und pAd-Track-shPKC (bzw. -shNS) wurden 60-80% konfluente Kulturschalen (Ø 6 cm) mit HEK 293-Zellen verwendet. Die mit Pacl linearisierte und mittels Ethanol-Fällung gereinigte Plasmid-DNA (4 g) wurde mit serumfreiem DMEM auf 150 µl aufgefüllt. Anschließend wurden zu dieser DNA-Lösung 40 µl Polyfect-Transfektionsreagenz (Qiagen) (s.u.) gegeben. Die Lösung wurde 5-10 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde der DNA-Polyfect-Komplex in das Medium zu den HEK 293T-Zellen gegeben. Die Transfektion von NRKM/NIH 3T3 mit siRNA wurde, nach oben genanntem Ablauf mit Polyfect oder alternativ mit dem Transfektionsreagenz RNAifect durchgeführt. Das Medium wurde hierbei über den gesamten Verlauf des Versuches (48 h) nicht mehr gewechselt. Im Vergleich zu Polyfect bildet RNAifect Liposomen aus, die die Oligonukleotide in sich aufnehmen können und durch ihren lipophilen Charakter die Zellmembran passieren können und ebenfalls endozytisch aufgenommen werden. Die Tabellen 3 und 4 zeigen die Transfektionsprotokolle der si-RNA Experimente. Die eingesetzte siRNA war gegen GFP gerichtet. Als Kontrolle wurde eine siRNA gewählt, die mit keiner mRNA des Rattengenoms komplementär war somit

erwartungsgemäß keinen Effekt haben sollte. Beide siRNAs trugen am 3'-Ende ein Rhodaminmolekül, ein rotfluoreszierender Farbstoff, welches mittels eines konfokalem Lasermikroskopes dargestellt werden kann und so die Lokalisation der siRNA detektierbar war. Vor der Transfektion wurden die KMNR-Kulturen mit einem GFP-exprimierenden Adenovirus (Ad-GFP) infiziert (MOI=3) und für 24 h bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zielsequenz der si-GFP: 3'CGG CAA GCT GAC CCT GAA GTT CAT5'

si-GFP Duplex-Sequenzen:

*sense*: 3'Rhodamin-GCA AGC UGA CCC UGA AGU UCA U5'

*antisense*: 3'Rhodamin-GAA CUU CAG GGU CAG CUU GCC G5'

si-GFP: MW: 16152.7 g/l

| si-GFP (µg) | si-GFP (µl) | Transfektions Reagenz (µl) |
|-------------|-------------|----------------------------|
| 0,6         | 1,85        | 10                         |
| 1,2         | 3,7         | 14                         |
| 2,4         | 7,4         | 20                         |
| 5           | 15,45       | 15                         |
| 10          | 30,9        | 25                         |
| 15          | 46,35       | 30                         |

**Tabelle 3: Transfektionsprotokoll von si-GFP in neonatale Rattenkardiomyozyten/NIH 3T3**

si-nonsense Duplex-Sequenzen:

*sense*: 3'Rhodamin-UUC UCC GAA CGU GUC ACG U5'

*antisense*: 3'Rhodamin-ACG UGA CAC GUU CGG AGA A 5'

si-nonsense: MW: 14841 g/l

| si-nonsense (µg) | si-nonsense (µl) | Transfektions-Reagenz (µl) |
|------------------|------------------|----------------------------|
| 0,6              | 1,95             | 10                         |
| 1,2              | 3,9              | 14                         |
| 2,4              | 7,8              | 20                         |
| 5                | 16,9             | 15                         |
| 10               | 33,7             | 25                         |
| 15               | 50,54            | 30                         |

**Tabelle 4: Transfektionsprotokoll von si-nonsense in neonatale Rattenkardiomyozyten**

### 2.5.7 Neonatale Rattenkardiomyozyten (NRKM)

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 dauert bei Kardiomyozyten erheblich länger, sodass die Zellsuspension mit deutlich reduzierter Fibroblastenzahl vorsichtig wieder von der Schale abgesaugt werden konnten. Nach dem Aufreinigen der Kardiomyozyten wurde die Zellsuspension in einer Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (Zentrifuge 5810 R, Eppendorf, Hamburg; 60 g, 15 min, 4 °C) und überstehendes Medium abgenommen, um die Kardiomyozyten anschließend in Kardiomyozyten-Medium (KM-Medium) vorsichtig zu resuspendieren. Die Zellen wurden in der Regel in einer Dichte von etwa  $1 \cdot 10^6$  Zellen/cm<sup>2</sup> Kulturschalen mit einem Durchmesser von 3,5 cm in 3 ml KM-Medium ausgesät. Um die Überwucherung der KM durch teilungsfähige Fibroblasten und Endothelzellen zu verhindern, enthielt das KM-Medium den Antimetaboliten 5-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU), der die DNA-Synthese und damit die Zellteilung hemmt. Die Kultur erfolgte bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank. Nach 24 h war ein großer Teil der KM angeheftet und die ersten spontanen Kontraktionen waren zu beobachten. Spätestens 36 h nach der Aussaat hatte sich ein dichter Zellrasen gebildet, der kohärent schlug. Zu diesem Zeitpunkt wurde der erste Mediumwechsel vorgenommen. Dazu wurde das vorhandene Medium vorsichtig am Rand der Schale abgesaugt und durch vorgewärmtes frisches Medium ersetzt.

#### KM-Medium

Minimum Essential Medium (MEM-Earle; 2,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>, ohne L-Glutamin)

10% FKS (inaktiviert)

1% BrdU

1% P/S

#### BrdU

BrdU 307,4 mg

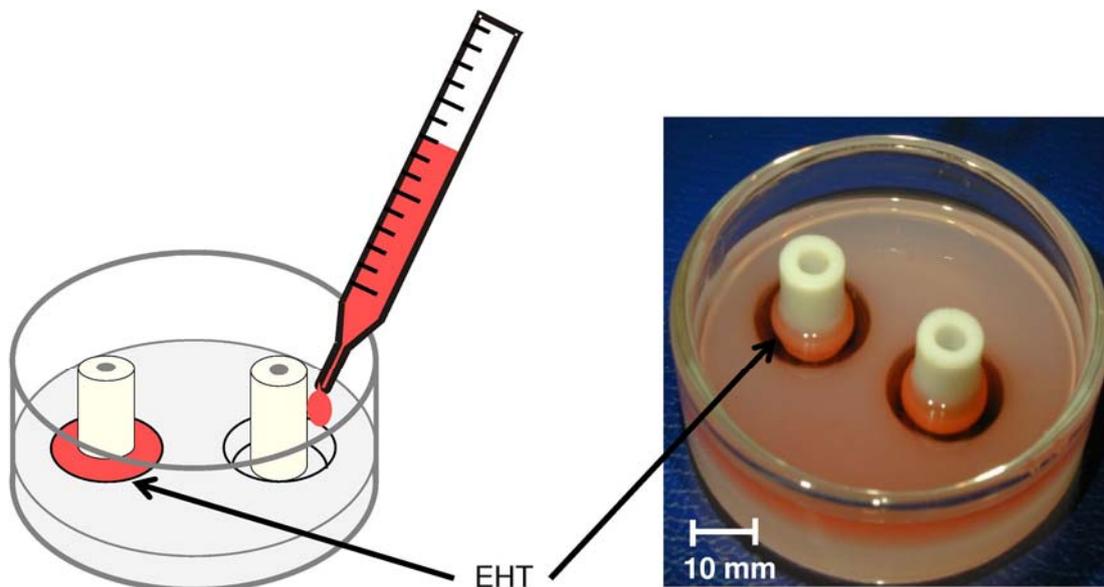
Aqua ad iniectabilia ad 100 ml → 10 mM

Steril filtrieren. Lagerung bei -20 °C im Dunkeln.

### 2.5.8 Herstellung von EHTs

Nach Einstellung der gewünschten Zellkonzentration im Sammelröhrchen zum Abschluss der Zellpräparation wurde die Zellsuspension bis zur weiteren Verwendung auf Eis gekühlt. Alle zur Herstellung der EHTs notwendigen Pipettierschritte wurden auf Eis mit vorgekühlten

Reaktionsgefäßen, Pipetten, Substanzen und Lösungen durchgeführt, um eine vorzeitige Aushärtung des Kollagens zu verhindern. Die Zugabe der Bestandteile erfolgte in immer gleicher Reihenfolge. Die gewünschte Menge Kollagen Typ I wurde vorgelegt und volumengleich mit zweifach konzentriertem EHT-Medium vermischt. Der zu diesem Zeitpunkt saure pH-Wert des Gemischs wurde mit NaOH (0,1 M) neutralisiert. Die Zugabe von Matrigel, eine extrazelluläre Matrix des Engelbreth-Holm-Swarm Tumors der Maus (Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA) erfolgte anschließend vor der Vermengung mit der Zellsuspension, deren Zellkonzentration zuvor auf den benötigten Wert eingestellt wurde. Nach wiederholter Resuspension des Kollagen-Zell-Gemischs wurde davon je 900 µl zügig in die Gussformen pipettiert (s. Abbildung7). Anschließend wurden die Kulturschalen für 1 h bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, um eine Aushärtung des Kollagen-Zell-Gemisches zu erreichen, und nachfolgend vorsichtig mit 6 ml EHT-Medium pro Kulturschale (je 2 EHTs) überschichtet.



**Abb.8 : Schematische Darstellung des Ausgießens von EHTs (links) und Fotografie einer Gussform mit EHTs am 6. Kulturtag (rechts)**

#### 10xDMEM

|                                    |        |
|------------------------------------|--------|
| 10xDMEM-Pulver                     | 133 mg |
| Aqua ad iniectabilia               | 10 ml  |
| steril filtriert. Bei 4°C gelagert |        |

Zweifach konzentriertes EHT-Medium

|                           |         |
|---------------------------|---------|
| 10x DMEM                  | 1,0 ml  |
| Pferdeserum (inaktiviert) | 1,0 ml  |
| Hühnerembryonenextrakt    | 0,2 ml  |
| P/S                       | 0,1 ml  |
| Aqua ad iniectabilia      | ad 5 ml |

Vor Herstellung der EHTs frisch hergestellt.

Standard-Pipettierschema zur Herstellung von vier EHTs:

|  |  |
|--|--|
| Kollagen (5,5 mg/ml)                         | 640 $\mu$ l $\rightarrow$ 0,8 mg/EHT                   |
| 2xEHT-Medium                                 | 640 $\mu$ l  |
| NaOH (0,1 M)                                 | 139 $\mu$ l  |
| extrazelluläre Matrix                        | 400 $\mu$ l $\rightarrow$ 10%                          |
| Zellsuspension ( $5,0 \cdot 10^6$ Zellen/ml) | 2181 $\mu$ l $\rightarrow$ $2,5 \cdot 10^6$ Zellen/EHT |

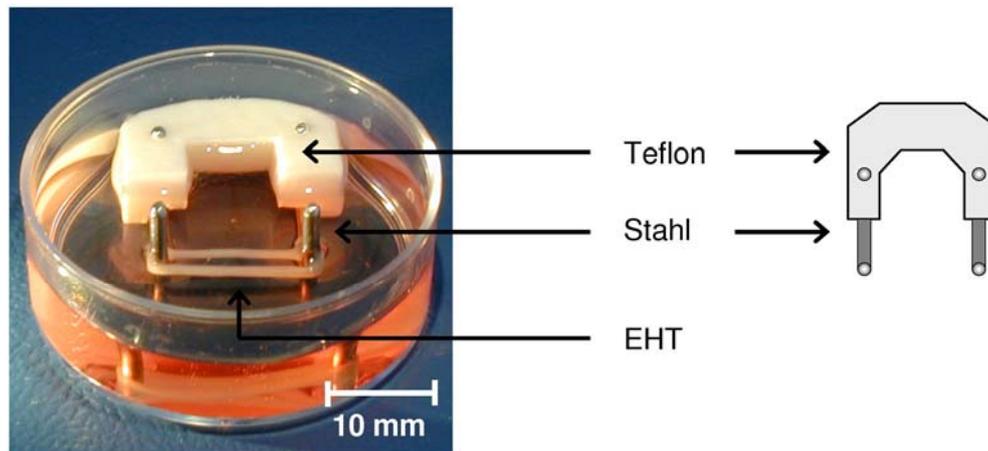
Das eingesetzte Volumen des Kollagens wurde dem Gehalt der jeweiligen Charge so angepasst, dass 0,8 mg pro EHT eingesetzt wurden. Das Volumen des Mediums und der NaOH wurde der Menge an Kollagen-Lösung angepasst. Da mit der Zellsuspension auf 4 ml aufgefüllt wurde, wurde die Zellkonzentration entsprechend eingestellt. Aufgrund der Viskosität der Mischung musste ein Pipettierverlust von 100  $\mu$ l pro EHT kalkuliert werden. Daher konnten mit einem Ansatz von 4 ml 4 EHTs mit einem Volumen von 900  $\mu$ l gegossen werden.

EHT-Medium

- Dulbeccos Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>)
- 10% Pferdeserum (inaktiviert)
- 2% Hühnerembryonenextrakt
- 1% P/S

**2.5.9 Kultivierung der EHTs**

Die Kultur der EHTs erfolgte unter sterilen Bedingungen bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> im Zellkulturschrank. Das Medium wurde am ersten, dritten und fünften Tag nach der Herstellung gewechselt. An Tag 6 wurden die EHTs auf Abstandshalter (s. Abbildung 9) transferiert, um eine bessere Versorgung zu gewährleisten. Die Kulturdauer betrug 11 Tage.



**Abb. 9: Abbildung eines Abstandhalters**

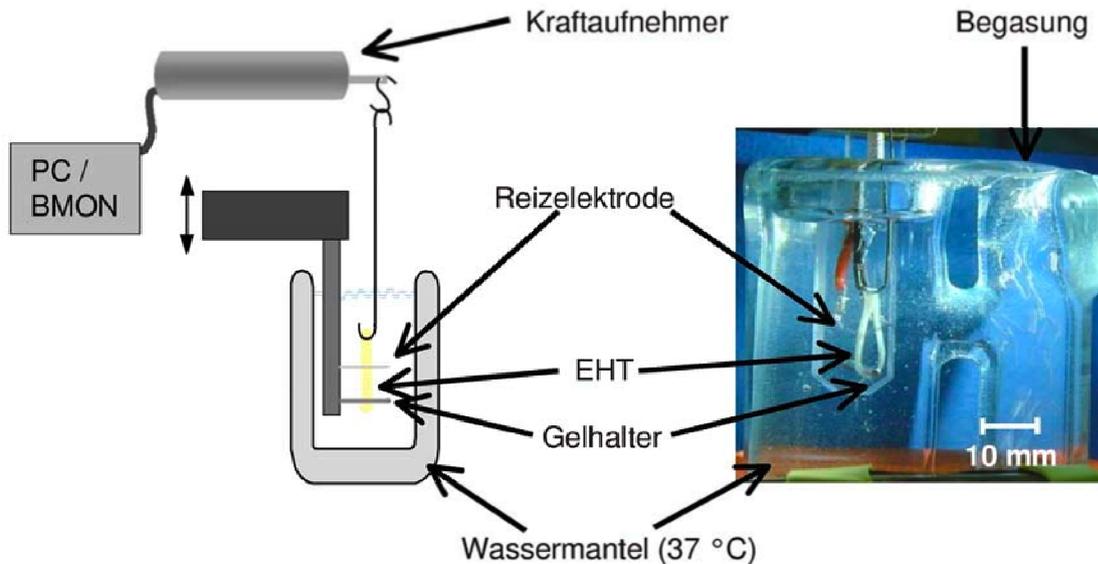
### 2.5.10 Virusinfektion von NRKM und EHT

Vor einer Infektion mit Adenovirus wurde das Medium der Kardiomyozytenkulturen abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Die gewünschte Menge an in VSB- (*virus storage buffer*) gelösten Viren wurden mit 500  $\mu$ l frischem Medium vermischt und dann auf die Zellen pipettiert. Für die Infektion der EHTs wurden diese an Tag 11 vom Stretcher genommen und in 12-Well-Kulturschalen überführt, die mit 2,5 ml frischem EHT-Medium gefüllt waren indem sich das Virus bereits befand. Die EHTs wurden für vier Stunden zur Inkubation belassen und danach wieder auf den Stretcher gespannt. Das Virusmedium wurde mit überführt. Nach 48 h erfolgte der Medienwechsel.

## 2.6 Erfassung der Kontraktionsdaten

### 2.6.1 Kontraktionsmessung

An Kulturtag 14 wurden die Kontraktionsparameter der EHTs in modifizierter Tyrode-Lösung (0,2 mM Calcium) in temperierten Standardorganbädern (s. Abbildung 10) ermittelt. Die Aufhängung der EHTs erfolgte zwischen induktiven Kraftaufnehmern und statischen Haltepolen. Die Kontraktionsexperimente wurden unter elektrischer Stimulation (Frequenz 1 oder 2 Hz, Pulsdauer 5 ms, Stromstärke 20% über der Reizschwelle) bei 37 °C und kontinuierlicher Begasung mit Carbogen (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) durchgeführt. Alle Interventionen wurden an optimal vorgedehnten Muskelpräparaten ( $L_{max}$ ) durchgeführt. Zwischen den einzelnen Schritten der Interventionen wurden zur Äquilibrierung Pausen von jeweils 5 min eingelegt. Als  $L_0$  wurde die durch die Dehnappatur im ungedehnten Zustand vorgegebene Gewebelänge (14,5 mm) definiert.



**Abbildung 10: Darstellung eines Organbades**

Nach 60 min Äquilibration in Tyrode-Lösung mit 0,2 Calcium wurde unter elektrischer Stimulation die Vordehnung in Schritten von 0,1 mm von  $L_0$  auf  $L_{max}$  gesteigert und damit die Kraft-Längen-Beziehung ermittelt. Anschließend wurde in Tyrode-Lösung mit 0,2 mM Calcium 15 min äquilibriert. Die Kontraktionsparameter wurden unter steigenden Konzentrationen von Calcium (0,2- 2,8 mM) ermittelt. Nach zweimaligem Wechsel der Tyrode-Lösung und Verminderung der Calcium-Konzentration auf 0,2 mM erfolgte die Bestimmung der Reaktion auf  $\beta$ -adrenerge Stimulation durch eine kumulative Konzentrations-Wirkungs-Kurve von Isoprenalin ( $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M). Nach den Kontraktionsversuchen wurde ein Großteil der EHTs in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80$  °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

#### Zusammensetzung der modifizierten Tyrode-Lösung

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| NaCl                             | 119,8 mM |
| KCl                              | 5,4 mM   |
| CaCl <sub>2</sub>                | 0,2 mM   |
| MgCl <sub>2</sub>                | 1,05 mM  |
| NaHCO <sub>3</sub>               | 22,6 mM  |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 0,42 mM  |
| Glucose                          | 5,05 mM  |
| Na <sub>2</sub> EDTA             | 0,05 mM  |
| Ascorbinsäure                    | 0,56 mM  |

CaCl<sub>2</sub>-Stamm 2,25 M:

CaCl<sub>2</sub> · (H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub> 165,57 g  
ad 500 ml Aqua destillata.

MgCl<sub>2</sub>-Stamm 1,05 M:

MgCl<sub>2</sub> · (H<sub>2</sub>O)<sub>6</sub> 106,83 g  
ad 500 ml Aqua destillata.

Stamm I für Tyrode-Lösung:

NaCl 175 g  
KCl 10 g  
CaCl<sub>2</sub>-Stamm 2,22 ml  
MgCl<sub>2</sub>-Stamm 25 ml  
ad 1000 ml Aqua destillata.

Stamm II für Tyrode-Lösung:

NaHCO<sub>3</sub> 50 g  
ad 1000 ml Aqua destillata

Modifizierte Tyrode-Lösung:

Stamm I 40 ml  
Stamm II 38 ml  
Stamm III 10 ml  
Glucose 1 g  
Ascorbinsäure 100 mg  
Na<sub>2</sub>EDTA 18,6 mg  
ad 1000 ml Aqua destillata.

Stamm III für Tyrode-Lösung:

NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5,8 g  
ad 1000 ml Aqua destillata

## 2.7. Proteinbiochemie

### 2.7.1 Proteinextraktion

Für die Proteinextraktion aus Monolayer-Zellkulturen wurden, nach Medientfernung, 500 µl Lämmli-Lösung in die 3,5 cm- Petrischalen hinzugegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber abgetragen und anschließend in 2 ml Eppendorf Tubes überführt. Durch wiederholtes auf- und abpipettieren erhielt man eine homogene Lösung.

Sechsfach konzentrierter Ladepuffer nach Lämmli (Laemmli 1970)

SDS 1,2 g  
Glycerol 6,0 g  
DTT 0,93 g  
Bromphenolblau 6 mg  
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 1,2 ml  
ad 10 ml Aqua destillata.

### 2.7.2 Diskontinuierliche SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteine wurden über ein denaturierendes, diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zuerst wurde ein Trenngel (10%) gegossen und darauf nach dessen Aushärten ein Sammelgel (4%), in dem durch einen Kamm Taschen zur Beladung mit den Proben freigehalten wurden. Zur späteren Zuordnung der Proteine wurde ein Molekulargewichtsstandard (Precision Plus All Blue, Biorad) in eine Tasche geladen. Die Elektrophorese wurde mit einer Stromspannung von 80 V für 10 min gestartet und dann auf 120 V erhöht. Wenn die Lauffront die Unterkante erreicht hatte (nach ca. 100 min), wurde die Elektrophorese beendet und das Sammelgel vom Trenngel abgetrennt. Anschließend wurden die geladenen Proteine im Gel auf eine Nitrozellulosemembran geblottet.

#### Trenngel (10%)

|   |        |
|---|--------|
| Acrylamid (30%, Mix 37,5 : 1)               | 3,3 ml |
| Aqua bidest.                                | 4,0 ml |
| Tris HCl (1,5 M, pH 8,8)                    | 2,5 ml |
| SDS (10%)                                   | 0,1 ml |
| Ammoniumpersulfat (10%)                     | 0,1 ml |
| N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) | 4,0 µl |

#### Sammelgel (4%)

|   |         |
|---|---------|
| Acrylamid (30%, Mix 37,5 : 1)               | 0,85 ml |
| Aqua bi dest.                               | 2,8 ml  |
| Tris HCl (0,5 M, pH 6,8)                    | 1,25 ml |
| SDS (10%)                                   | 0,05 ml |
| Ammoniumpersulfat (10%)                     | 0,05 ml |
| N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin (TEMED) | 5,0 µl  |

#### Laufpuffer

|              |            |
|--------------|------------|
| Tris         | 3,02 g     |
| Glycin       | 14,4 g     |
| SDS          | 1,0 g      |
| Aqua bidest. | ad 1000 ml |

### 2.7.3 Immunoblot

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden anschließend durch Nassblot-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Protein-Transfer erfolgte für 120 min bei einem konstanten Gleichstrom von 350 mA. Eine Quellung des Gels wurde durch das im Transferpuffer enthaltene Methanol verhindert. 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. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran mit TBS mit TWEEN 20 (TBST) gewaschen und zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen mit Trockenmilch-Lösung für 60 min inkubiert. Abhängig vom primären Antikörper wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST gewaschen (Antikörper in TBST verdünnt), oder der primäre Antikörper wurde sofort zugegeben (Antikörper in Trockenmilch-Lösung verdünnt). Die Inkubation mit dem primären, für das zu bestimmende 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 sekundären Antikörper, der gegen den ersten Antikörper gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettichs gekoppelt ist, 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-plus Western-Blot-Detektions-Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) inkubiert, das ein Substrat der Peroxidase enthält, welches nach Umsetzung eine Chemolumineszenz zeigt. Zur Visualisierung wurden Filme (AGFA), je nach Stärke der Lumineszenz für 2 bis 30 min, belichtet und anschließend entwickelt. Eine quantitative Erfassung und Auswertung der Banden erfolgte mit der Syngene Chemidoc-Bildgebungs-Apparatur (Synoptics Co., Cambridge).

| Primärer AK       | Verdünnung    | Hersteller | Erwartete Proteingröße | Sekundärer AK | Verdünnung               |
|-------------------|---------------|------------|------------------------|---------------|--------------------------|
| anti-PKC $\alpha$ | 1:200 (TBST)  | Santa Cruz | 80                     | anti-mouse    | 1:5000 in Trockenmilch   |
| anti-GAPDH        | 1:2000 (TBST) | Hi-Test    | 32                     | anti-mouse    | 1:30.000 in Trockenmilch |

**Tabelle 3: Antikörper für Immunoblot**

#### Transferpuffer

|              |            |
|--------------|------------|
| Tris         | 3,025 g    |
| Glycin       | 14,4 g     |
| Methanol     | 200 ml     |
| Aqua bidest. | ad 1000 ml |

#### Ponceaurot S-Lösung

|                   |          |
|-------------------|----------|
| Ponceaurot S      | 0,5 g    |
| Essigsäure (100%) | 1 ml     |
| Aqua bidest.      | ad100 ml |

10xTBS

|                                |            |
|--------------------------------|------------|
| Tris                           | 242,3 g    |
| NaCl                           | 175,3 g    |
| Aqua bidest.                   | ad 2000 ml |
| pH mit HCl auf 7,5 eingestellt |            |

TBST

|              |            |
|--------------|------------|
| 10xTBS       | 100 ml     |
| Tween 20     | 1 ml       |
| Aqua bidest. | ad 1000 ml |

Trockenmilch-Lösung

|                        |    |
|------------------------|----|
| TBST                   |    |
| Magermilchpulver       | 5% |
| Immer frisch angesetzt |    |

## 2.8 Quantitative RNA-Messung

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

### 2.8.1 Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen

Für die Isolierung der RNA aus den NRKM-Kulturen sowie den EHTs wurde das RNeasy Kit (Qiagen) eingesetzt und gemäß den Herstellerangaben verwendet. Das Präzipitat wurde in 25 µl DEPC-Wasser gelöst. 2 µl wurden abgenommen und mit DEPC-Wasser 1:50 verdünnt, um die RNA-Konzentration photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm zu ermitteln (s. 2.1.10). Eine optische Dichte (OD) von 1 entspricht einer RNA-Konzentration von 40 µg/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 1,8 und 2,0 lag.

### 2.8.2 Reverse Transkription der präparierten RNA

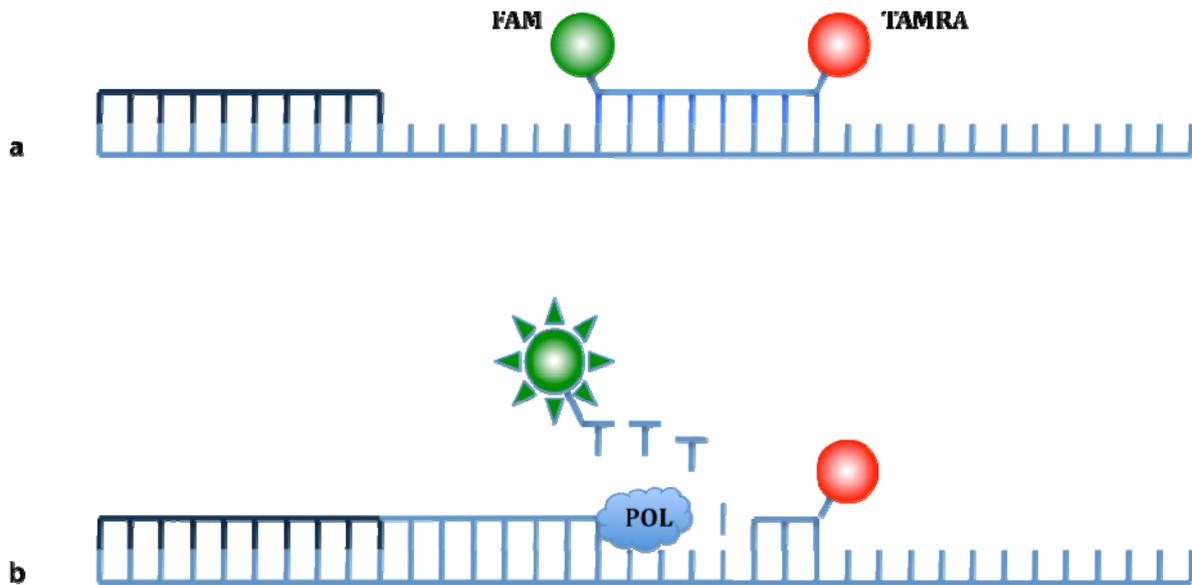
Bei der reversen Transkription wird die RNA in cDNA umgeschrieben und damit der PCR zugänglich gemacht. Es wurde das Kit „Super Script First-Strand Synthesis System for RT PCR“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Alle Schritte wurden gemäß Herstellerangaben vollzogen und dabei stets 1 µg RNA eingesetzt. Als Primer für die reverse Transkription wurden Oligo dTs verwendet. Diese können an das Poly-A-Ende binden und gewährleisten

so eine vorrangige Umschreibung von mRNA. Am Ende der Reaktion lag die cDNA in 20 µl Reaktionsgemisch gelöst vor.

### 2.8.3 Echtzeit PCR

#### Prinzip der Echtzeit PCR

Die mRNA-Expression wurde mittels quantitativer Echtzeit PCR der durch reverse Transkription erhaltenen cDNA auf einem „ABI PRISM 7900 Sequence Detection System“ (Applied Biosystems, Foster City, USA) bestimmt. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einer Detektion und Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit während der Amplifikation. Hierzu wurde für jedes Gen eine fluorogene Sonde konstruiert, die aus einem Oligonukleotid bestand, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszierenden *Reporter*-Farbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) markiert war, während das 3'-Ende einen *Quencher*-Farbstoff (6-Carboxytetramethylrhodamin; TAMRA) trug. Wird die intakte Sonde durch ultraviolettes Licht angeregt, so wird die Fluoreszenz des *Reporter*-Farbstoffs durch den *Quencher* aufgrund seiner räumlichen Nähe unterdrückt. Während der PCR hybridisiert die Sonde spezifisch mit dem komplementären Abschnitt des Matrizenstranges zwischen dem *forward*- und dem *reverse-Primer*. In der Extensionsphase hydrolysiert die im Reaktionsansatz enthaltene, Polymerase „AmpliTaQ Gold“ aufgrund ihrer 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die an die Zielsequenz hybridisierte Sonde (s. Abbildung 11). Durch die daraus resultierende Aufhebung der räumlichen Nähe zwischen *Reporter* und *Quencher* kommt es nach Anregung durch ultraviolettes Licht zu Fluoreszenz, die entsprechend der Akkumulation von PCR Produkt mit jedem PCR Zyklus ansteigt und in Echtzeit während des gesamten PCR-Laufes aufgezeichnet wird. Durch die statistische Anlagerung der Sonde und Primer ist die Geschwindigkeit des Anstiegs der Fluoreszenz direkt proportional zur Expression des entsprechenden Gens. Zur Quantifizierung kann der Zeitpunkt während des Laufes bestimmt werden, zu dem die Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert (*Threshold*) übersteigt (ct-Wert). Da bei jedem Zyklus der PCR eine Verdoppelung der Zielsequenzen stattfindet, gilt: Expression [Gen X] ist proportional zu  $2^{-(ct\text{-Wert})}$ .



**Abbildung 11:** a: Die TaqMan-Sonde, die an die Zielsequenz zwischen den beiden PCR-Primern hybridisiert, enthält den *Reporter*-Farbstoff „FAM“ am 5'-Ende und den *Quencher*-Farbstoff „TAMRA“ am 3'-Ende. Die räumliche Nähe von Reporter und Quencher supprimiert die Fluoreszenz. b: Während der PCR-Reaktion wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase die Sonde vom 5'-Ende her von der Zielsequenz verdrängt und der Reporter vom Quencher getrennt. Erst jetzt kann die Fluoreszenz des Reportermoleküls detektiert werden.

#### 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 PKC $\alpha$  so gewählt, dass ihre Zielsequenzen die Grenze zwischen zwei benachbarten Exons überschritten. 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 Biotec, Ebersberg) wurden verwendet:

Primer für die Echtzeit PCR für PKC $\alpha$  der Ratte (Accession code: XM\_343975.2)

|                               |   |                      |
|-------------------------------|---|----------------------|
| PKC $\alpha$ rat Taqm_Forward | 5' CCT TTC CTT CGG CGT CTC A 3'         | T <sub>m</sub> 60 °C |
| PKC $\alpha$ rat Taqm_Reverse | 5' TGT AGT ATT CAC CCT CCT CTT GGT T 3' | T <sub>m</sub> 60 °C |
| PKC $\alpha$ rat Taqm_Probe   | 5' AGT TTG AGA AAG CCA AGC TAG GTC C 3' | T <sub>m</sub> 63 °C |

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

|                        |   |                      |
|------------------------|---|----------------------|
| GAPDH rat Taqm_Forward | 5' ATG TTC CAG TAT GAC TCC ACT CAC G 3' | T <sub>m</sub> 63 °C |
| GAPDH rat Taqm_Reverse | 5' GAA GAC ACC AGT AGA CTC CAC GAC A 3' | T <sub>m</sub> 65 °C |
| GAPDH rat Taqm_Probe   | 5' AAG CCC ATC TTC CAG GAG CGA GA 3'    | T <sub>m</sub> 69 °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 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 Doppelbestimmung ausgeführt. Bei jedem PCR-Lauf wurde eine NTC (*No Template Control*, Kontrolle ohne DNA, Wasser-Kontrolle) mitgeführt.

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  $\mu$ l wurde 1  $\mu$ l (entspricht 100 ng) der cDNA-Lösung eingesetzt.

|  | Reaktionsansatz<br>GAPDH Ratte | Reaktionsansatz<br>PKC $\alpha$ Ratte |
|--|--------------------------------|---------------------------------------|
| 10x PCR Puffer                             | 1 $\mu$ l                      | 1 $\mu$ l                             |
| MgCl <sub>2</sub> (25mM)                   | 1,2 $\mu$ l                    | 1,2 $\mu$ l                           |
| dNTPs (je Nukleotid) (10mM)                | 0,8 $\mu$ l                    | 0,8 $\mu$ l                           |
| Taq-Polymerase (5U/ $\mu$ l)               | 0,1 $\mu$ l                    | 0,1 $\mu$ l                           |
| PKC $\alpha$ rat Taqm_Forward (10 $\mu$ M) | -                              | 0,4 $\mu$ l                           |
| PKC $\alpha$ rat Taqm_Reverse (10 $\mu$ M) | -                              | 0,4 $\mu$ l                           |
| PKC $\alpha$ rat Taqm_Sonde (100 $\mu$ M)  | -                              | 0,05 $\mu$ l                          |
| mGAPDH_Taqm_Forward (10 $\mu$ M)           | 0,4 $\mu$ l                    | -                                     |
| mGAPDH_Taqm_Reverse (10 $\mu$ M)           | 0,4 $\mu$ l                    | -                                     |
| mGAPDH_Taqm_Sonde (100 $\mu$ M)            | 0,05 $\mu$ l                   | -                                     |
| cDNA                                       | 2 $\mu$ l                      | 2 $\mu$ l                             |
| H <sub>2</sub> O                           | 4,05                           | 4,05                                  |

**Tabelle 4: Pipettierschema der 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 sek | 40                |
| 60 °C      | 1 min  |                   |

**Tabelle 5: Temperaturbedingungen für TaqMan PCR**

## 2.9. 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.

## 2.10 Verwendete Geräte und Materialien

|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| Acrylamid 30 % :                  | AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland                                       |
| Agar:                             | Bacto Agar, Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA                       |
| Agarose:                          | Invitrogen Ltd., Paisley, UK   |
| Electrophoresis Grade:            | Invitrogen Ltd., Paisley, UK   |
| Ampicillin:                       | SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland                          |
| Anti-Maus-Polyklonaler Antikörper |  |
| Meerrettichperoxidase-gekoppelt:  | SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA   |
| Ammoniumpersulfat:                | APS, Bio-Rad, Hercules, CA, USA  |
| Bovines Serumalbumin:             | BSA, SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA                                    |
| Bromphenolblau:                   | Bio-Rad, Hercules, CA, USA   |
| CaCl <sub>2</sub> :               | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland   |
| Complete Protease Inhibitor:      | Roche Applied Science, Indianapolis, USA                                     |
| CsCl:                             | Roth Chemie GmbH, Karlsruhe, Deutschland                                     |
| DMEM:                             | Biochrom AG, Berlin, Deutschland   |
| DNA-Längenstandard:               | GeneRuler 100 bp und 1 kb, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland         |
| Doppelt destilliertes Wasser:     | Aqua ad iniectabilia: Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim, Deutschland |
| dNTP-Mix:                         | PCR Reagenzien: Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland                             |
| ECL: ECL-Plus Western Blotting    |  |
| Detection System:                 | GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA   |
| Ethanol:                          | J.T. Baker, 7400 AA Deventer, Netherlands                                    |
| Ethidiumbromid:                   | Fluka Biochemica, Buchs, Schweiz   |

---

|                                    |  |
|------------------------------------|--|
| E.Z.N.A. Cycle Pure-Kit:           | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland              |
| Fötales Kälberserum:               | FCS, Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK                       |
| Glukose:                           | Roth Chemie GmbH, Karlsruhe, Deutschland                       |
| Glycerin:                          | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland                             |
| Hefeextrakt:                       | Bacto Yeast Extract, Becton, Dickinson and Company, Sparks USA |
| Hepes:                             | SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA                           |
| Kanamycin:                         | Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK                            |
| 6x loading dye (Ladepuffer):       | Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland                      |
| Matrigel                           | Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA                          |
| MEM:                               | Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK                            |
| 2-Mercaptoethanol:                 | SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA                           |
| Methanol:                          | J.T. Baker, 7400 AA Deventer, Netherlands                      |
| MgSO <sub>4</sub> :                | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland                             |
| MnCl <sub>2</sub> :                | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland                             |
| MOPS:                              | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland                             |
| NaCl:                              | J.T. Baker, 7400 AA Deventer, Netherlands                      |
| NaF:                               | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland                             |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland                             |
| Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> :  | Merck KgaA, Darmstadt, Deutschland                             |
| Natriumlaurylsulfat:               | SDS, SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA                      |
| Nitrozellulosemembran              | Protran, 0,45 µm Porengröße, Schleicher & Schüll, Dassel)      |
| NucleoBondPC 500®                  | MACHEREY-NAGEL GmbH & CO. KG, Düren, Deutschland               |

---

|  |  |
|--|--|
| NucleoSpin Plasmid:  | MACHEREY-NAGEL GmbH & CO. KG, Düren, Deutschland                           |
| Oligonukleotide (Primer):                                  | MWG Biotech AG, Ebersberg, Deutschland                                     |
| Orbitalschwenker:  | Heidolph Polymax 2040, Heidolph Elektro GmbH & CO KG, Kelheim, Deutschland |
| QIAquick Gel Extraction Kit:                               | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland   |
| QIAshredder-Kit:   | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland   |
| Penicillin:  | Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK  |
| Pepton:  | Becton, Dickinson and Company, Sparks, USA                                 |
| Phosphatgepufferte Salzlösung:                             | PBS, Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK                                   |
| Ponceau S:   | SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA                                       |
| Restriktionsendonukleasen:                                 | New England Biolabs GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland                   |
| RNeasy Mini Kit  | Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland   |
| Spectralphotometer   | SmartSpec 3000, BioRad Hercules, CA, USA                                   |
| Super Script III First Strand Synthesis System for RT-PCR: | Invitrogen Ltd., Paisley, UK   |
| Streptomycin:  | Gibco, invitrogen Ltd., Paisley, UK  |
| Syngene Chemidoc-Bildgebungs-Apparatur                     | Synoptics Co., Cambridge.  |
| Taq-Gold:  | Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland                               |
| Taq-Polymerase:  | PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland                          |
| TEMED:   | Bio-Rad, Hercules, CA, USA   |
| Tris Base:   | Trisma base, SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA                          |
| Tris-HCl:  | SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA                                       |

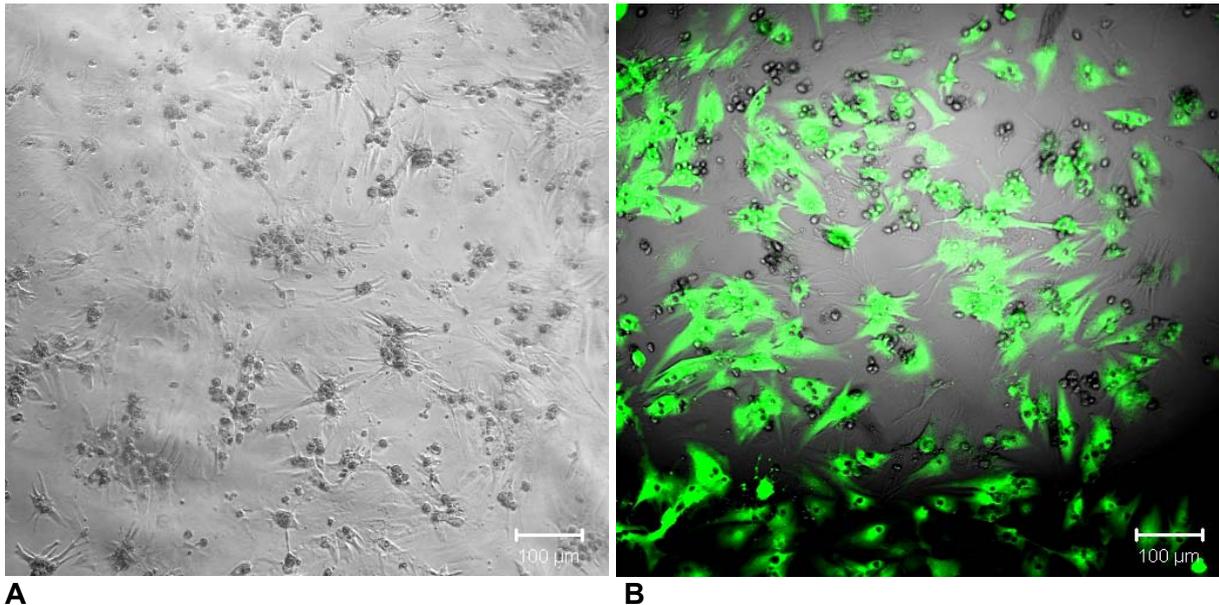
|                                     |  |
|-------------------------------------|--|
| Trypsin:                            | Trypsin-EDTA 0,5%, Gibco BRL Life Technologies,<br>Eggenstein, Deutschland |
| Trypton:                            | Bacto Tryptone, Becton, Dickinson and Company,<br>Sparks USA               |
| TWEEN 20:                           | SIGMA Corporation St. Louis, MO, USA                                       |
| T4-Ligase                           | New England Biolabs, Ipswich, USA  |
| Zentrifuge                          | 5810 R, Eppendorf, Hamburg   |
| 7900HT Sequence Detection<br>System | Applied Biosystems, Forster City, USA)                                     |

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Transfektionseffizienz von siRNA in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRKM)

Kardiomyozyten haben erfahrungsgemäß eine schlechte Erfolgsrate bei der Transfektion von sowohl DNA-, als auch RNA-Molekülen. Diese Eigenschaft stellt den limitierenden Faktor für den Einsatz von RNAi in Herzmuskelzellen, vermittelt durch direkte Einschleusung von siRNA dar. Im ersten Teil dieser Arbeit sollte zunächst die Transfektionseffizienz von solcher „nackter“ siRNA in neonatalen Rattenkardiomyozyten und der daraus resultierende *knockdown* eines intrazellulären Zielproteins untersucht werden. Als Zielprotein wurde GFP gewählt. GFP (Green Fluorescent Protein), ein aus der Qualle *Aequorea victoria* stammendes Protein, das nach UV-Anregung grün fluoresziert, kommt physiologisch nicht in Kardiomyozyten vor. NRKM wurden daher zunächst mit einem GFP-exprimierenden Adenovirus infiziert (s. 3.3.2). Die infizierten NRKM fluoreszierten nach 24 h sämtlich gleichmäßig grün und stellten somit eine optimale Ausgangslage für den geplanten GFP-*knockdown* dar (s. Abbildung 12). Anschließend wurde die Hälfte der so behandelten Zellkulturschalen mit siRNA transfiziert, die gegen GFP gerichtet war und im Folgenden als si-GFP bezeichnet wird. Als Negativkontrolle wurde für die übrigen Zellkulturschalen eine sogenannte „nonsense-siRNA“ (si-NS) eingesetzt. Die Sequenz der si-NS ist zu keiner mRNA des Rattengenoms komplementär und sollte daher erwartungsgemäß keinerlei mRNA-Degradation herbeiführen. Beide siRNA-Moleküle waren mit Rhodamin, einem rot fluoreszierenden Farbstoff gekoppelt. Hierdurch konnte ihre Lokalisation mittels eines konfokalen Lasermikroskops detektiert werden. Als Transfektionsreagenz dienten zwei unterschiedliche Substanzen, die sich in ihren Wirkmechanismen unterschieden und deren Effizienz miteinander verglichen werden sollte. Hierbei handelte es sich um einerseits RNAifect (Qiagen), einen Liposom-Bildner und andererseits um Polyfect (Qiagen), ein Polyamin.

Für die Durchführung der Transfektionsexperimente wurde auf zwei unterschiedliche Protokolle der Firma Qiagen zurückgegriffen. Hierzu wurden jeweils drei unterschiedliche Mengen an siRNA vorgeschlagen, welche für eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen einzusetzen waren (s.2.5.6) und einen möglichst ausgeprägten RNAi-Effekt bewirken sollten. Wurde anfänglich noch empfohlen, siRNA-Mengen von 5-15  $\mu\text{g}$  einzusetzen, so gab das zweite Protokoll mit 0,6-2,4  $\mu\text{g}$  weitaus geringere Mengen vor. Nach 8, 24 und 48 h wurden die Zellen unter einem konfokalen Lasermikroskop untersucht und das GFP- (Anregung 488 nm, Filter BP 503-530 nm) sowie das Rhodamin-Signal (Anregung 543 nm, Filter BP 560-615 nm) zur Darstellung gebracht.

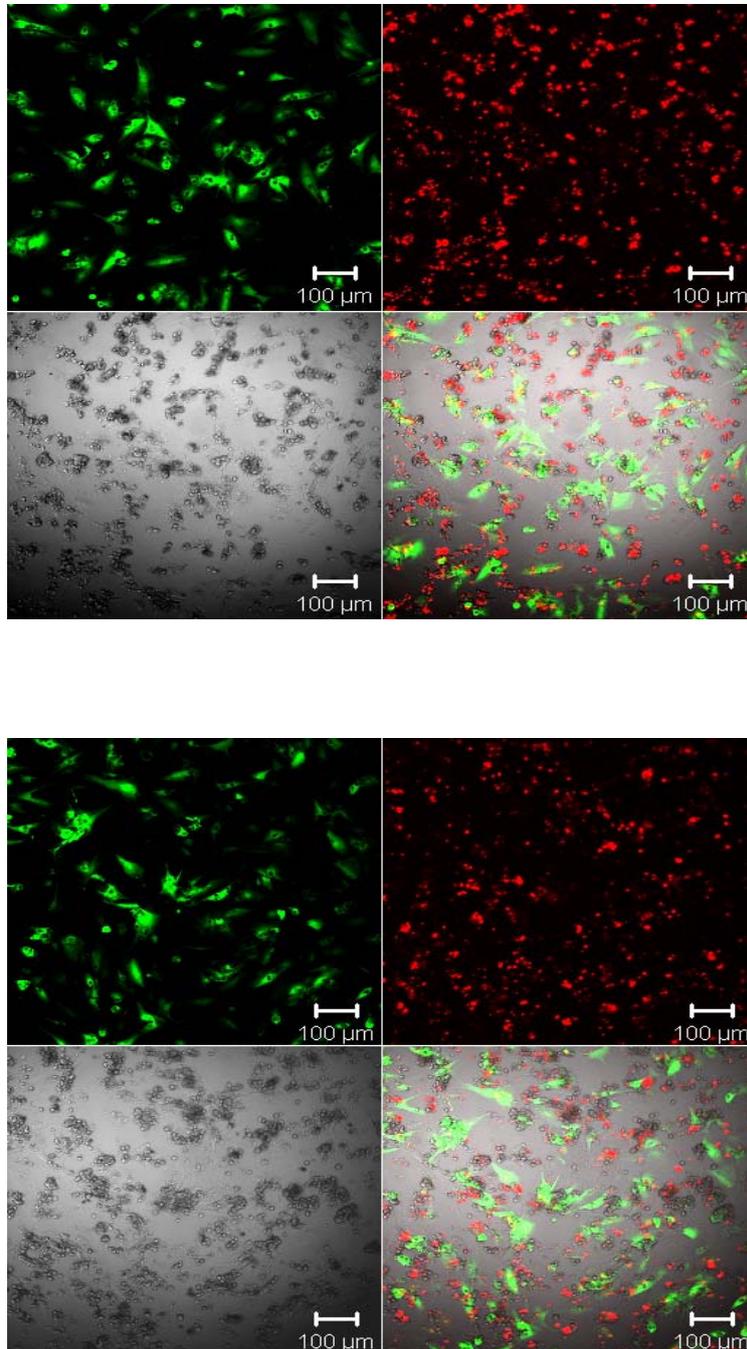


**A** **Abbildung 12: Neonatale Rattenkardiomyozyten vor und nach Ad-GFP-Infektion A:** Negativkontrolle, 2-D Monolayerkultur NRKM  $1 \times 10^6$  **B:** 24 h nach Infektion mit Ad-GFP (MOI 3). Die dunkleren abgerundeten Fragmente sind abgelöste, meist avitale Zellen.

Eine erfolgreiche Transfektion hätte sich durch ein intrazellulär detektierbares Rhodamin-Signal ausgezeichnet. Doch weder in den Zellen, die mit si-GFP behandelt wurden, noch in jenen, die mit si-NS transfiziert worden waren, ließ sich bei Verwendung von RNAifect ein intrazelluläres Rhodaminsignal in vitalen NRKM nachweisen. Die Rhodaminfluoreszenz wurde fast ausschließlich in toten Zellen bzw. Zelltrümmern detektiert. Diese stellten sich als abgerundete Fragmente dar, welche zum größten Teil vom Boden der Zellkulturschale abgelöst waren und an der Mediumoberfläche schwammen. Der größte Anteil der siRNA schien sich also vorzugsweise dort abzulagern und zu akkumulieren. Auch der Einsatz von Polyfect erhöhte den Anteil an intrazellulärem Rhodamin nicht.

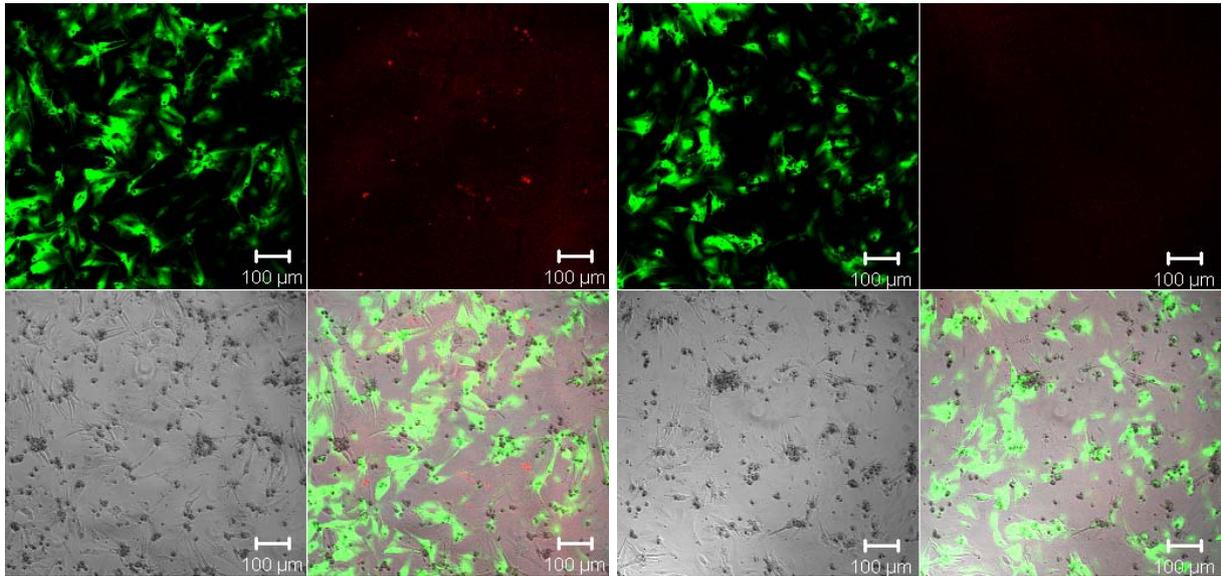
Die Intensität des GFP-Signals hätte bei erfolgreicher Transfektion der siGFP und erfolgreichem *knockdown* in den so behandelten NRKM erwartungsgemäß abnehmen sollen. Hingegen sollten die si-NS-transfizierten Zellen keine Änderung ihres Fluoreszenzmusters zeigen. Es wird dabei davon ausgegangen, dass der GFP-Gehalt einer Zelle mit der Fluoreszenzintensität korreliert. Miteinander verglichen wurde das GFP-Signal von solchen NRKM-Kulturen, die entweder mit si-GFP oder der gleichen Menge si-NS transfiziert wurden. Unterschiede in der GFP-Fluoreszenzintensität konnten allerdings nicht beobachtet werden (s. Abbildung 13). Auch der Vergleich von NRKM-Zellkulturschalen, die mit unterschiedlichen si-GFP Mengen transfiziert wurden, ergab keinerlei Veränderung im GFP-Signal (s. Abbildung 14). Ein deutlicher Unterschied in der GFP-Intensität zwischen Polyfect- und RNAifect-transfizierten Zellkulturen konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die Anzahl der toten Zellen hingegen schien mit steigender siRNA- und Transfektionsreagenz-Konzentration anzusteigen. Abbildung 14 gibt einen Überblick über Kardiomyozytenkulturen,

die unter unterschiedlichen Versuchsbedingungen transfiziert wurden. Exemplarisch werden nur die Aufnahmen der si-GFP behandelten Zellen gezeigt.

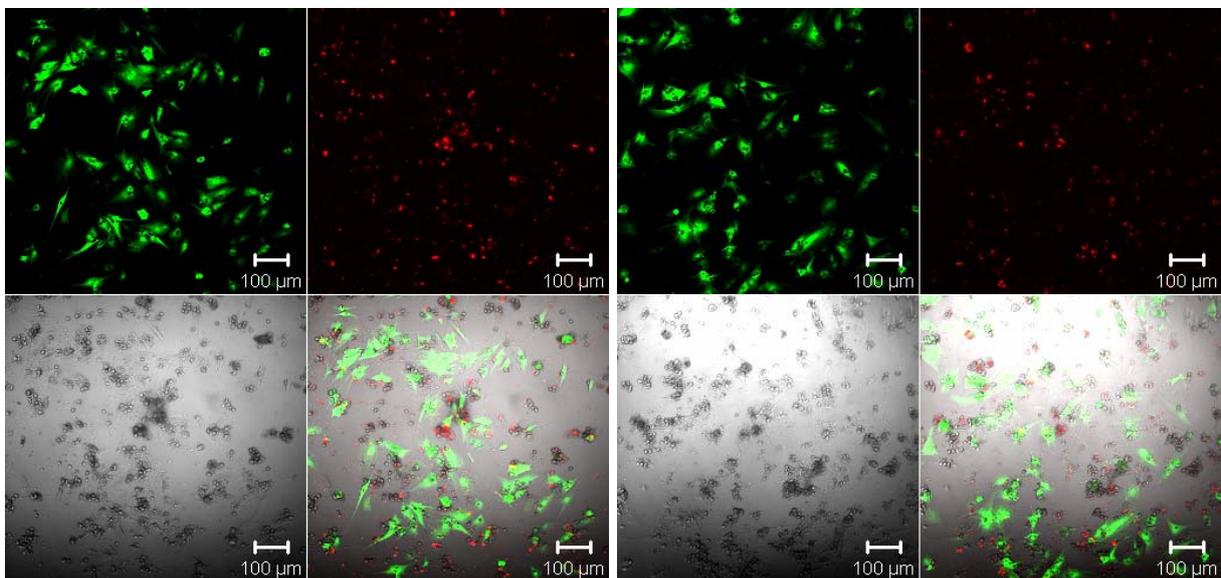


**Abbildung 13: Transfektion von NRKM ( $1 \times 10^6$  Zellen) mit siRNA nach 24 h. A: 15 µg si GFP. B: 15 µg si-NS. Transfektionsreagenz: RNAifect. Jeweils im oberen linken Quadranten Darstellung von GFP, oben rechts Darstellung des Rhodaminsignals, im unteren linken Quadranten Durchlichtaufnahme, unten rechts sind alle Signale kombiniert dargestellt.**

**Abbildung 14: Überprüfung der Transfektionseffizienz von Rhodamin-markierter siRNA unter Variation der eingesetzten Menge von siRNA und der Inkubationszeit.** Transfiziert wurden Neonatale Rattenkardiomyozyten ( $1 \times 10^6$  Zellen).

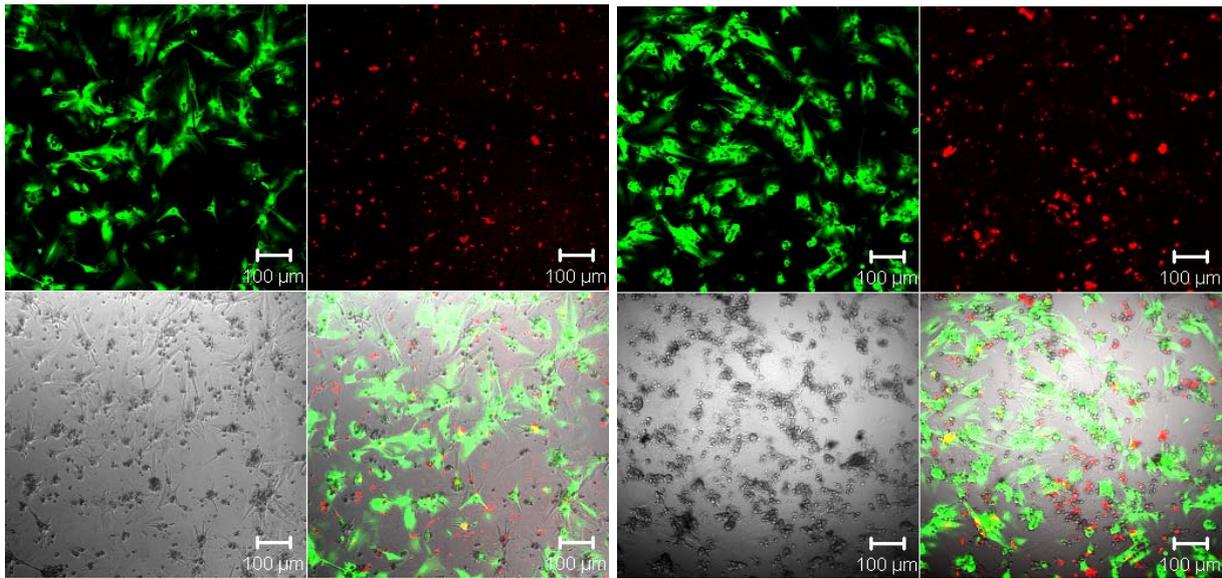


**A:** Links: 0,6 µg si-GFP mit 20 nM RNAiFect nach Standardprotokoll nach 24 h. Rechts: 0,6 µg si-GFP nach 48 h.



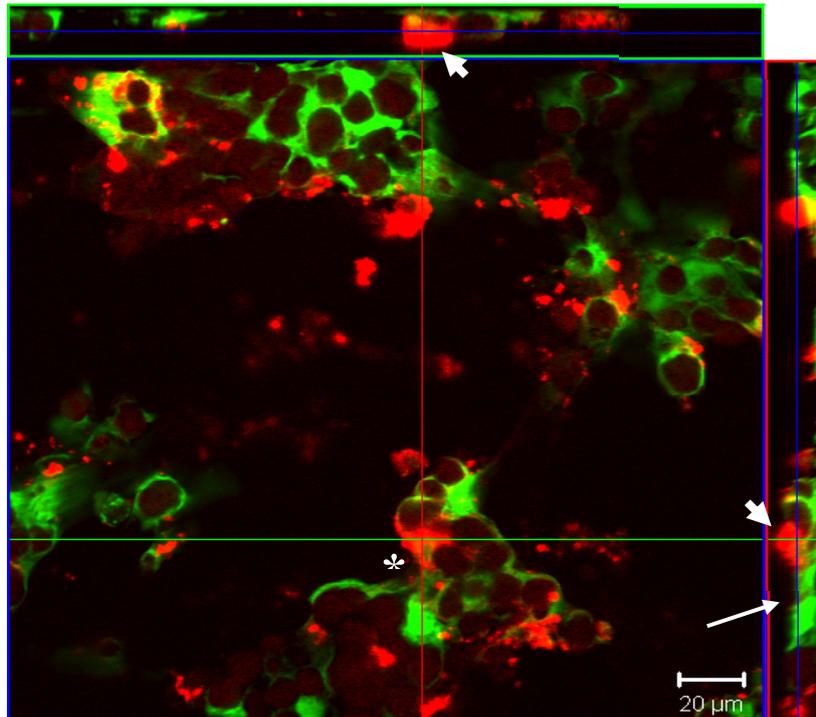
**B:** Links: 2,4 µg si-GFP mit 20 nM RNAiFect nach Standardprotokoll nach 24 h. Rechts: 2,4 µg si-GFP nach 48 h.

Fortsetzung von Abbildung 14:



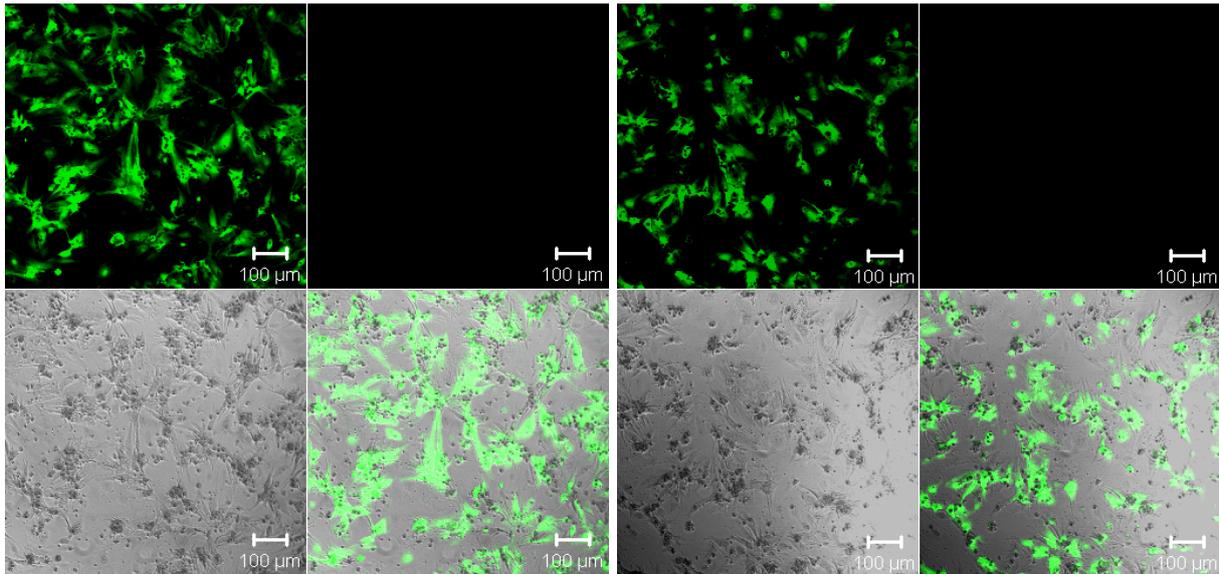
**C:** Links: 10  $\mu\text{g}$  si-GFP mit 30nM RNAiFect nach 48 h. Rechts: 10  $\mu\text{g}$  si-GFP mit 30 nM Polyfect nach 48 h.

Insbesondere bei den Versuchen, in denen höhere siRNA-Mengen eingesetzt wurden (5  $\mu\text{g}$  und mehr, s. Abbildung 14C) fielen jedoch Areale auf, die sich gelb-orangefarben darstellten. Es war unklar, ob es sich hierbei um eine räumliche Überlagerung eines roten Zelltrümmers und einer Ad-GFP-infizierten Zelle handelte oder ob das Rhodaminsignal vielleicht doch intrazellulär lokalisiert war. Um die Transfektion der Zellen mit siRNA noch genauer zu überprüfen, wurden daher zusätzlich Z-Stapel-Aufnahmen der Zellen angefertigt. Dabei wurde eine Serie von 29 Schnitten, jeweils in einer Schichtdicke von 0,73  $\mu\text{m}$ , aufgenommen. Alle Schnitte wurden digital zu einem dreidimensionalen Bild verarbeitet. Abbildung 15 zeigt eine solche Schnittaufnahme. GFP-positive Zellen waren komplett von GFP ausgefüllt. Die Rhodamin-gekoppelte siRNA stellte sich, wie bereits vermutet, als aggregiert in Projektion auf die Zelltrümmer der toten Kardiomyozyten dar. Durch die Z-Stapel-Schichtaufnahmen konnte nachgewiesen werden, dass es sich, wie vorher schon vermutet, nicht um intrazelluläre siRNA handelte, sondern lediglich um einen Überlagerungseffekt. Eine erfolgreiche Transfektion liess sich unter diesen Bedingungen somit ausschließen (s. Abbildung. 15).



**Abbildung 15: Konfokale Z-Stapel-Aufnahme zur Überprüfung der Lokalisation der siRNA.** Aufnahme von neonatalen Rattenkardiomyozyten, transfiziert mit 2,4  $\mu\text{g}$  rhodaminmarkierter siRNA (rot). GFP ist grün dargestellt. Im roten (rechts) bzw. grünen Kasten (oben) ist jeweils die Schnittebene, senkrecht zur Aufnahmeebene gezeigt. Ihre Lage ist in der Hauptabbildung jeweils als rote bzw. grüne Linie dargestellt. Am Schnittpunkt der beiden Achsenlinien liegt ein orangefarbenes Zellareal (\*). Die Darstellung der Schnittebenen zeigen, dass es sich hierbei um eine grünfluoreszierende Zelle handelt (dünner Pfeil), die von einem roten Zellfragment überlagert wird (dicker Pfeil).

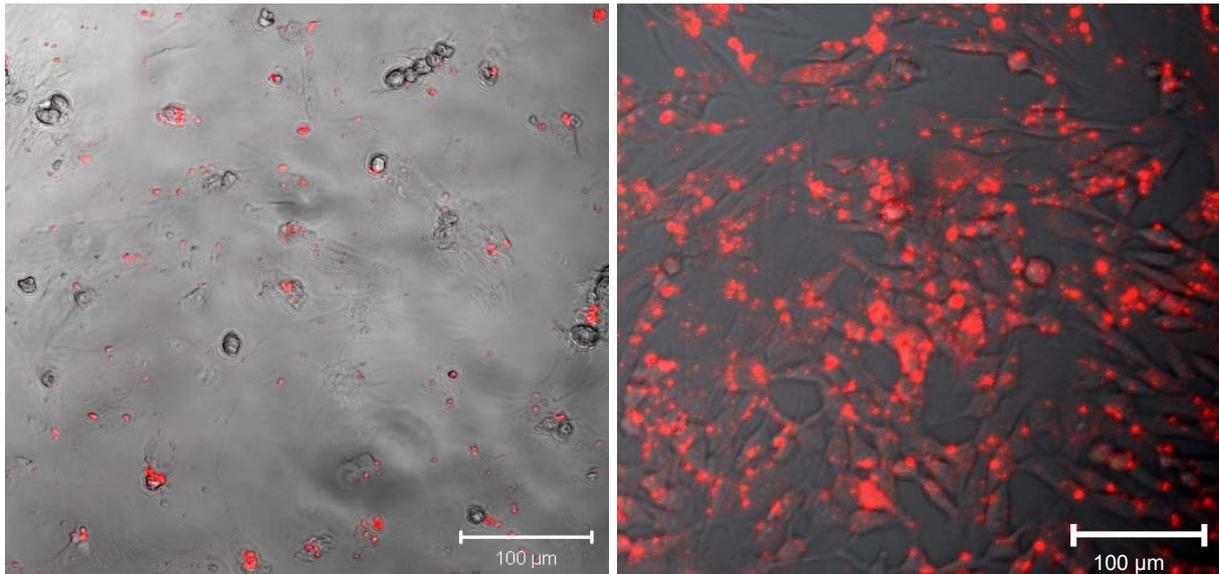
In der gesamten Versuchsreihe fiel auf, dass die Anzahl der toten Kardiomyozyten in den Zellkulturschalen 24 h nach Transfektion mit steigender Transfektionsreagenz- und siRNA-Menge zunahm. Unklar war, ob es sich hierbei um eine zytotoxische Auswirkung der siRNA, oder des Transfektionsreagenz handelte. Bekräftigt wurde die erstere Annahme durch die Tatsache, dass die siRNA vorrangig in den toten Zellen akkumulierte. GFP-exprimierende Kardiomyozyten wurden daher mit unterschiedlichen Konzentrationen von entweder nur Transfektionsreagenz oder nur siRNA behandelt. Die alleinige Behandlung der Kardiomyozyten mit einerseits nur Polyfect bzw. RNAitect und andererseits nur siRNA konnte nach 24 h Inkubation jedoch in keinem der beiden Fälle einen schwerwiegenden zytotoxischen Effekt auf die Kardiomyozyten aufdecken. Abbildung 16 zeigt exemplarisch die mikroskopischen Aufnahmen zweier durchgeführter Transfektionsversuche. In beiden Fällen konnte keine Zunahme der avitalen, abgerundeten Zellen ausgemacht werden, was für eine zytotoxische Wirkung der verwendeten Substanzen hätte sprechen können.

**A****B**

**Abbildung 16: Untersuchung potentieller zytotoxischer Effekte von Polyfect und siRNA.** A: Transfektion von NRKM mit 2,4 µg si-GFP ohne Transfektionsreagenz. B: 10 nM Polyfect auf NRKM ohne si-GFP.

### 3.1.1 Vergleich der Transfektionseffizienz in NRKM und NIH 3T3

Der Versuch, neonatale Kardiomyozyten mit siRNA zu transfizieren verblieb somit also erfolglos. Damit ergab sich allerdings die Frage, ob die Transfektionsreagenzien überhaupt in der Lage gewesen wären, positive Effekte zu erzielen. Um diese mögliche Fehlerquelle auszuschließen, wurden mitotische Zellen, welche der Transfektion unter standardisierten Bedingungen zugänglich sind, zum Vergleich herangezogen. Es wurden daher NIH 3T3-Zellen, eine stabile Mausfibroblasten-Zelllinie, nach demselben Protokoll transfiziert, wie zuvor die Kardiomyozyten. Zur besseren Detektierung des Rhodaminsignals wurde diesmal auf die vorherige Infektion der Zellen mit Ad-GFP verzichtet und ein Nachweis von intrazellulärem Rhodamin in den Fibroblasten als erfolgreicher Transfektionsprozess angenommen. In Abbildung 17 sind konfokale Aufnahmen der behandelten Zellkulturen gezeigt. Hierbei wurde Polyfect verwendet. Aufnahmen der Versuche mit RNAiFect sind nicht gezeigt, zeigten aber ein ähnliches Ergebnis.



**A** **B**  
**Abbildung 17 Vergleich von Rhodamin-gekoppelter siRNA-Transfektion in NRKM und NIH 3T3.** A: Neonatale Rattenkardiomyozyten mit 2,4 µg si-GFP nach 24 h. B: NIH 3T3 mit 2,4 µg si-GFP nach 24 h. Als Transfektionsreagenz diente Polyfect.

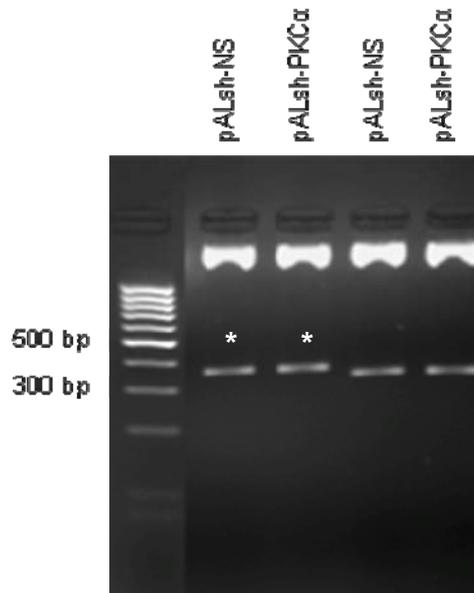
Nach 24 h Inkubation ließ sich eine Transfektionsrate von ca. 50% ohne vorherige Optimierung in den NIH 3T3-Zellen abschätzen. Die neonatalen Rattenkardiomyozytenkulturen zeigten hingegen nicht auch nur eine lebende Zelle, in der ein intrazelluläres Rhodamin-Signal nachzuweisen gewesen wäre. Dieser direkte Vergleich zeigte, dass sowohl Polyfect als auch RNAifect, die Einschleusung von Nukleotiden in eukaryotische Zellen ermöglichen und dass die gewählten Bedingungen im Prinzip richtig waren.

### 3.2. Klonierung des pALsh-PKC $\alpha$ und pALsh-NS

Da sich die Transfektion von NRKM mit „nackter“ siRNA als ineffizient herausgestellt hatte, wurde ein adenoviraler Vektor konstruiert, der in der Lage ist, Primärzellen zu infizieren, mit der Folge der endogenen Expression einer short-hairpin-RNA. Diese sollte nach Prozessierung an die mRNA der PKC $\alpha$  binden und so deren Degradation einleiten. Die shRNA-Expression erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch das Expressionsplasmid pALsh (Laatsch et al. 2003). Dieses wurde, wie oben (s.2.3.1) beschrieben, mit dem Restriktionsenzym *Bse*RI linearisiert und die shRNA-cDNA für die beiden verwendeten siRNAs wurde hineinkloniert.

Nach der Transformation ließen sich positive Klone mittels Restriktionsverdau durch die Enzyme KpnI und XbaI ermitteln. Die XbaI-Schnittstelle lag direkt vor dem H1-Promoter wobei die KpnI-Schnittstelle sich direkt hinter dem *Insert* befand. Die Größe der herausgeschnittenen Fragmente unterschied sich bei den positiven und negativen Klonen

lediglich um die Größe der shRNA-cDNA. Dieser Unterschied von 40 bp war auf einem üblichen 1%-Agarosegel schwierig zu erkennen, die Gelelektrophorese wurde deshalb auf einem 3%-Agarosegel angefertigt (s. Abbildung 18). Der Verdau ergab zwei Fragmente mit den Größen 2000 bp und 303 bp (negativ), beziehungsweise 347-349 bp (positiv).

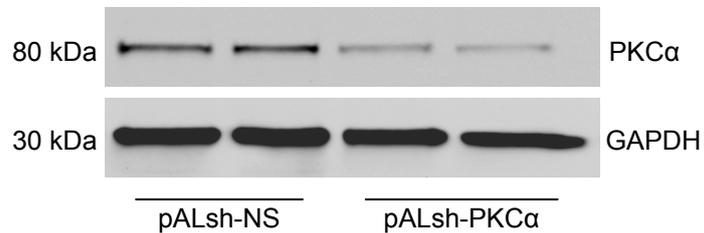


**Abbildung 18: Auszug aus Restriktionsverdau der pALsh-Klone mit KpnI und XbaI.** Spur 1: Standard 100 bp. Spur 2, 3: pALsh-NS und pALsh-PKC $\alpha$ -positive Klone (mit Sternchen markiert). 4, 5: pALsh-NS und pALsh-PKC $\alpha$ -negative Klone.

### 3.2.1. Evaluation von shRNA-Effekten gegen PKC $\alpha$ in NIH 3T3

Die Generierung eines Adenovirus ist bekanntermaßen zeit- und arbeitsaufwendig. Bevor also die positiven pALsh-Plasmide weiterverarbeitet wurden, galt es erst, deren Effektivität zu überprüfen. Hierfür wurden als Zielzellen erneut NIH 3T3-Zellen gewählt. Der Transfektionserfolg ließ sich jedoch nicht quantifizieren, da pALsh keine Proteine exprimiert, die, wie beispielsweise GFP, optisch oder anders hätten quantifiziert werden können. Nach 48 h Inkubationszeit erfolgte die Zellernte und Aufbereitung (s. Abbildung. 19). Als interne Ladekontrolle diente die Darstellung des Proteingehaltes von GAPDH. Als sogenanntes „*house keeping gene*“ wird GAPDH ubiquitär exprimiert und unterliegt keiner Regulation durch PKC $\alpha$ . Es wird angenommen, dass in jeder Zelle eine vergleichbare Menge von GAPDH exprimiert wird. Die mit pALsh-PKC $\alpha$  transfizierten Zellen zeigten nach 48 h einen um 50% verminderten PKC $\alpha$ -Proteingehalt im Vergleich zu den Zellen, die die *nonsense*-shRNA exprimierten. Die endogen gebildete shRNA und die daraus resultierende siRNA bewirkte also einen *knockdown* des Zielproteins, nämlich der PKC $\alpha$ . Für die weitere

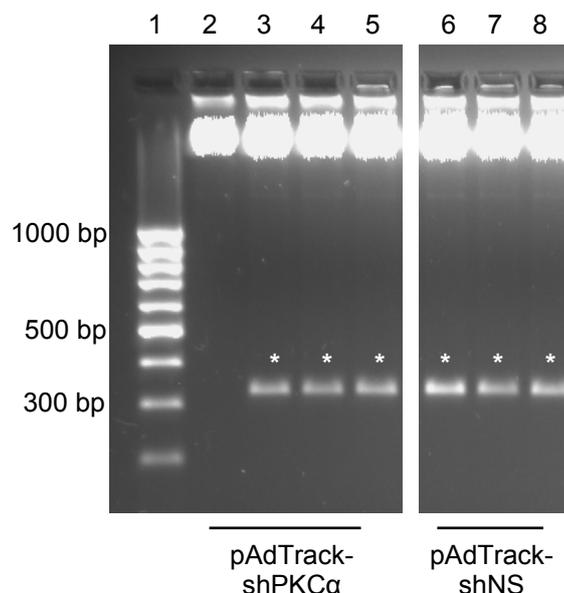
Generierung der Adenoviren wurde die shRNA-cDNA-Sequenz zusammen mit dem H1-Promotor durch den erneuten Verdau mit XbaI und KpnI aus dem pALsh-Plasmid isoliert.



**Abbildung 19: PKC $\alpha$ -Proteingehalt in NIH 3T3-Zellen nach Transfektion mit pALsh-Plasmiden.** Ausschnitt eines repräsentativen Westernblots. Die Zellen wurden nach 48 h geerntet und aufbereitet. Als Ladekontrolle diente GAPDH.

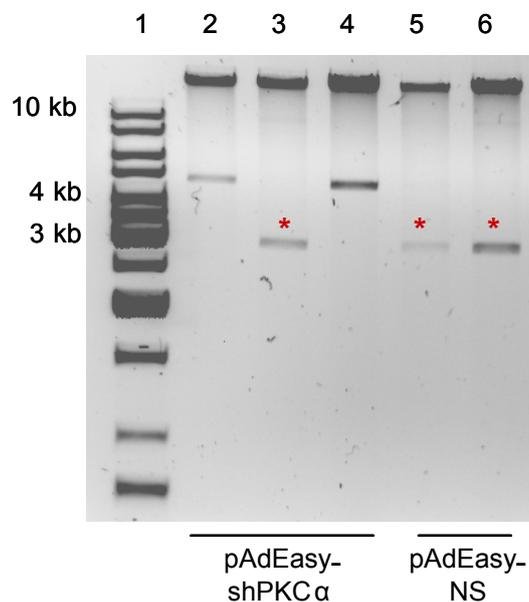
### 3.3. Generierung der rekombinanten Adenoviren Adsh-PKC $\alpha$ und Adsh-NS

Das Fragment aus dem pALsh-Vektor wurde nun mit dem pAdTrack-Transfektor, der ebenfalls mit KpnI und XbaI geschnitten wurde, über Nacht bei 14 °C ligiert. Der Ligationserfolg ließ sich nach der Transformation über den wiederholten Verdau mit den genannten Restriktionsendonukleasen verifizieren und ergab im Falle einer erfolgreichen Ligation Fragmente der Größen 8300 bp und 350 bp (s. Abbildung. 20).



**Abbildung 20: Kontrollverdau der pAdTrack-Klone vor der homologen Rekombination.** Spur 1: 100 bp-Standard. Spur 2: Negativer Klon. Spur 3-8: Positive Klone mit Sternchen markiert.

Die so kontrollierten und als positiv befundenen Konstrukte wurden anschließend in *E.coli* BJ5183 mit dem Virusgenom (pAdEasy-1) zur homologen Rekombination gebracht. Die rekombinations-positiven Klone konnten durch *PacI*-Restriktionsanalyse identifiziert werden. Der *PacI*-Restriktionsverdau der isolierten Plasmide zeigte nach erfolgreicher homologer Rekombination ein größeres DNA-Fragment (> 33,4 kb) und zusätzlich jeweils ein kleineres Fragment von rund 3,0 kb (positiv, s. Abbildung 20). In einigen Fällen trat ein 4,5 kb großes anstatt des 3,0 kb großen DNA-Fragments auf (s. Abbildung 21, Spur 3,5 und 6). Dies ließ sich dadurch erklären, dass bei einer alternativen homologen Rekombination des Replikationsursprungs stromaufwärts der Region die im normalen Fall rekombiniert wird, eine zweite *PacI*-Schnittstelle eingebracht wurde.

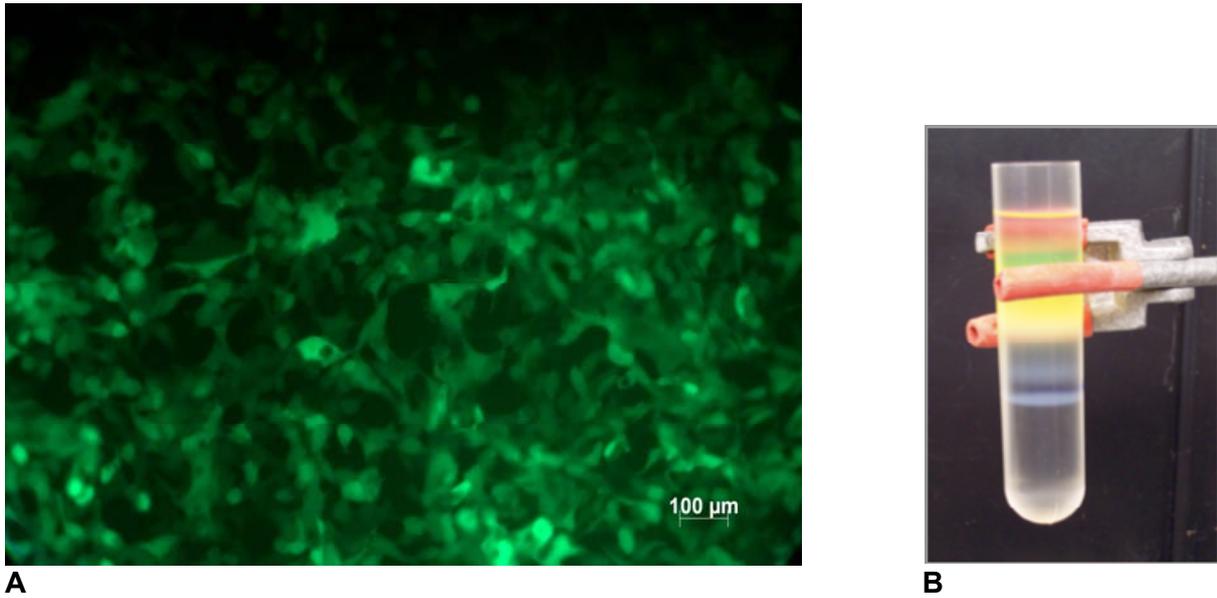


**Abbildung 21: Verdau von pAdEasy-shPKC $\alpha$  und pAdEasy-shNS nach der homologen Rekombination.** Die positiven Klone zeigen bei einer erfolgreichen homologen Rekombination DNA-Fragmente von 3 kb und rund 33 kb (Hier in Spur 3, 5, und 6 zu sehen und mit roten Sternchen markiert). In Spur 2 und 4 liegt das 4,5 kb-Fragment der alternativen homologen Rekombination des Replikationsursprungs vor.

Die regelrecht rekombinierten Plasmide (2,9 kb-Fragment) wurden mit *PmeI* linearisiert und die gefällte DNA in HEK 293T-Zellen transfiziert, in denen die Viren sich vermehren konnten (s. 2.5.6.). Nach der Transfektion in HEK 293T-Zellen zeigten die positiv transfizierten Zellen nach 2-3 Tagen eine grüne Fluoreszenz. Im ersten Infektionszyklus wiesen nur einige Zellen eine grüne Fluoreszenz auf und der Infektionsverlauf war mit durchschnittlich zehn Tagen relativ lang. Mit steigender Anzahl von Infektionszyklen nahmen die Geschwindigkeit des Infektionsverlaufs und die Zahl direkt infizierter Zellen stetig zu.

Nach der Präparation hochtitriger Virussuspensionen (s. Abbildung 22A; Abbildung 22B zeigt exemplarisch den Cäsiumchloridgradienten der Adsh-PKC $\alpha$ -Aufreinigung) wurde die

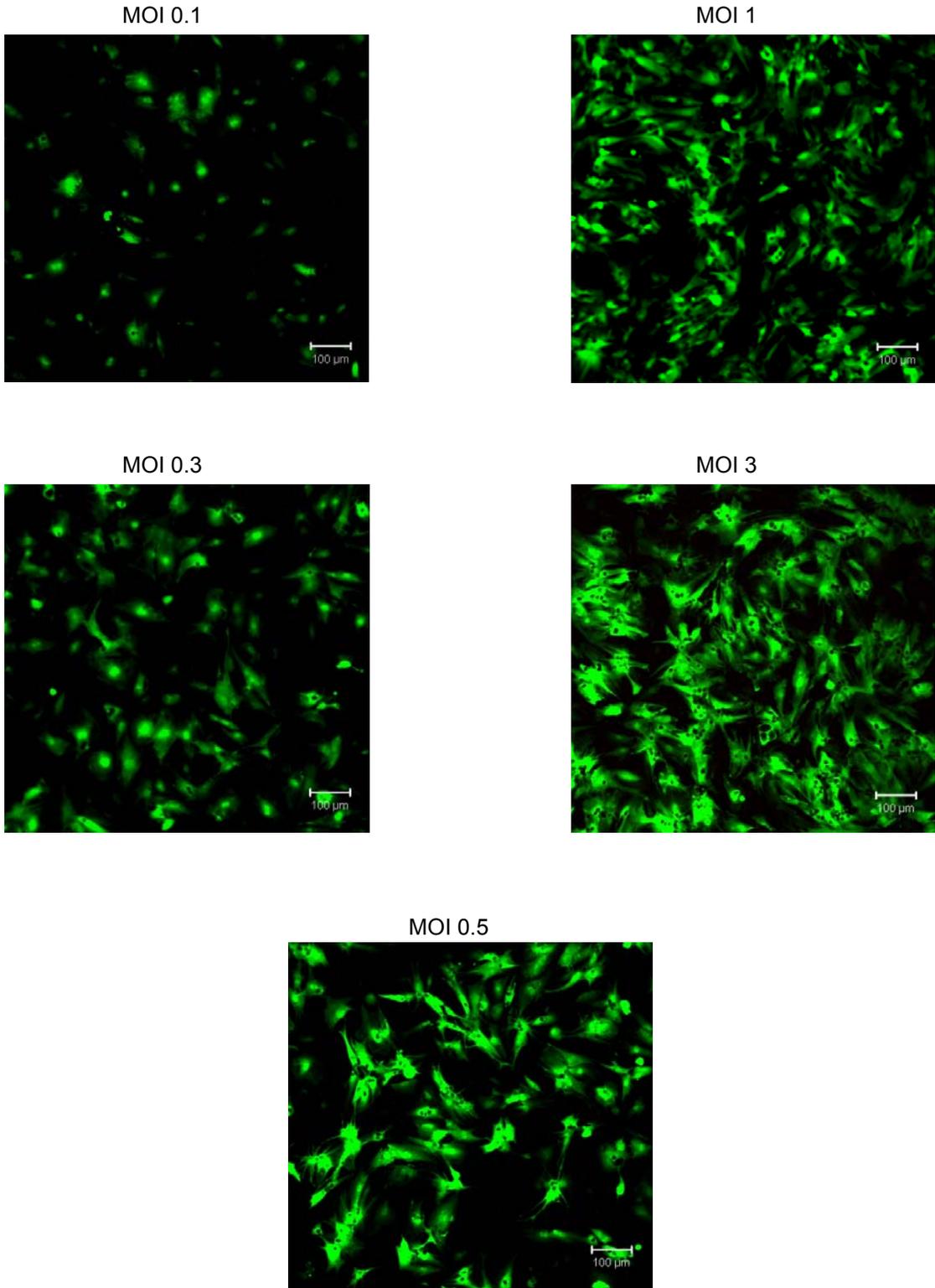
Konzentration der Viren titriert.



**A**  
**Abbildung 22:** A: HEK-293 Zellen infiziert mit Adsh-PKC $\alpha$  nach 24 h. Die Infektionsrate der Zellen beträgt 100%. B: Cäsiumchloridgradient des Adsh-PCK $\alpha$ . Obere graublau-bunte Bande: Zelldetritus. Untere Bande: Adenoviren.

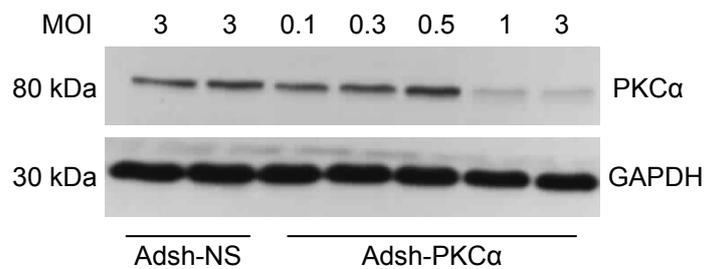
### 3.3.1. Titration der adenoviren Adsh-PKC $\alpha$ und Adsh-NS

Die Effizienz der adenoviralen Infektion wurde in neonatalen Rattenkardiomyozyten überprüft. Hierfür wurden NRKM-Kulturen mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen infiziert und für 48 h inkubiert (s. Abbildung 23). Ein gängiges Maß für die Quantifizierung einer Virusinfektion in Zellkulturen ist die Multiplizität der Infektion pro Zelle (MOI). Diese beschreibt die Anzahl der Viruspartikel pro ausgesäter Zielzelle. Da die Adenoviren GFP bicistronisch koexprimierten, konnte man davon ausgehen, dass jede Zelle, die mit einem Viruspartikel infiziert ist, nach 48 h unter UV-Licht grün leuchtet. Dies stellte eine MOI von 1 dar. Die NRKM wurden im Vorfeld in einer Dichte von  $1 \times 10^6$  Zellen pro 3,5 cm-Zellkulturschale ausgesät. Über das eingesetzte Volumen der Virussuspension, das man benötigte um eine MOI von 1 zu erreichen, ließ sich die Konzentration der infektiösen Viruseinheiten berechnen. Für den Adsh-PKC $\alpha$  ergab sich so eine Viruskonzentration von  $1 \times 10^9$  biologisch aktiven Viren/ml. Der Adsh-NS war stärker konzentriert mit  $2 \times 10^9$  biologisch aktiven Viren/ml.



**Abbildung 23: Virustitration von Adsh-PKCα in neonatalen Rattenkardiomyozyten nach 48 h. Aufnahmen mit dem konfokalen Lasermikroskop.**

Die anschließende Proteinanalyse mittels Immunoblot der Titrationsproben ergab, dass bei einer eingesetzten MOI von 1 eine schon optisch erkennbar geringere PKC $\alpha$ -Expression erreicht wurde. Die folgenden Experimente wurden daher stets mit einer MOI von 3 durchgeführt. Die Virustitration des Adsh-NS ist hier nicht dargestellt. Zur besseren Beurteilbarkeit der Proteinverhältnisse sind zwei Proteinproben aus der Adsh-NS-Titration mitgeladen worden (s. Abbildung 24).



**Abbildung 24: Virustitration von Ad-shPKC $\alpha$  in NRKM.** Auszug aus dem repräsentativen Immunoblot. Zum Vergleich sind zwei Proteinproben von Adsh-NS-infizierten Zellen mitgeladen worden. Die Zellen wurden nach 48 Stunden geerntet und aufbereitet.

### 3.4. Expression von sh-PKC $\alpha$ und sh-NS in neonatalen Rattenkardiomyozyten

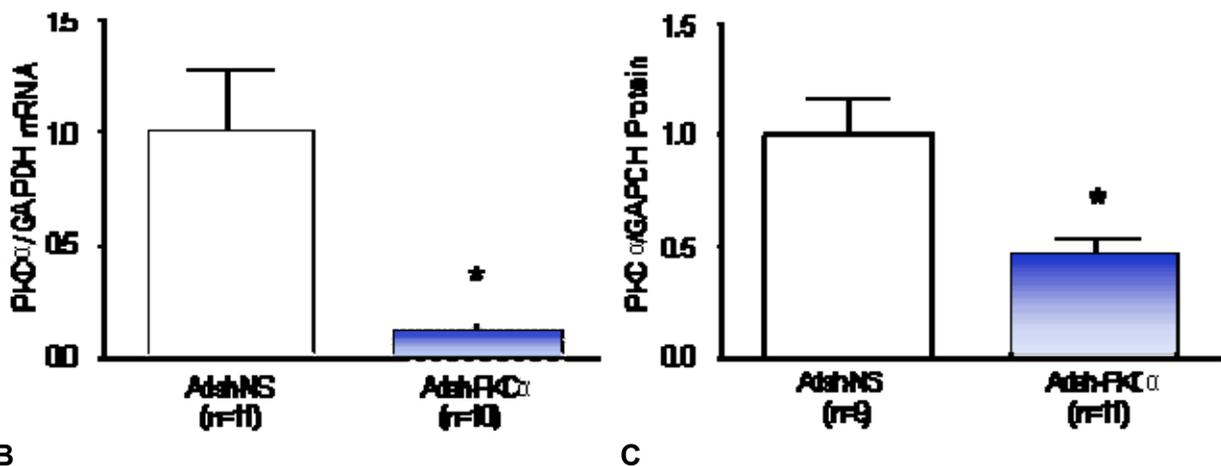
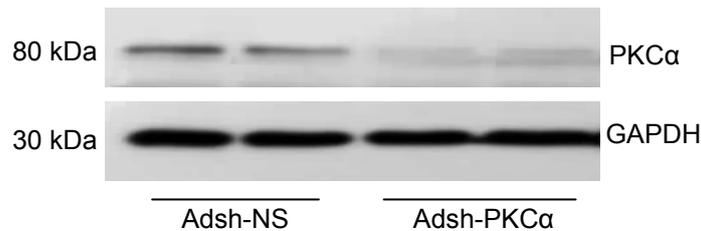
Um den erwarteten *knockdown* von PKC $\alpha$  in den mit Adsh-PKC $\alpha$  infizierten Zellen zu überprüfen, wurden jeweils NRKM entweder mit dem Kontrollvirus (Adsh-NS) oder mit dem shPKC $\alpha$  exprimierenden Adenovirus infiziert. Hierzu wurde eine theoretische MOI von 3 eingesetzt, so dass von einer sicheren Infektion jeder Zelle ausgegangen werden konnte. Nach 48 h Inkubation wurde die Hälfte der Proben für die anschließende Proteinkonzentrationsbestimmung in 1 ml einfach konzentrierter Lämmli-Lösung aufgenommen. Die andere Hälfte diente zur Isolierung der RNA aus den Zellen und wurde dementsprechend in 200  $\mu$ l Lysispuffer aufgenommen (s. 2.8.1). Im Anschluss ließ sich mit der Anfertigung von Westernblots eine Proteinanalyse durchführen und der mRNA-Gehalt der Zellen durch quantitative Echtzeit-PCR bestimmen.

#### 3.4.1. Auswirkungen der Expression von sh-PKC $\alpha$ und sh-NS in NRKM auf Protein- und RNA-Ebene.

Da die Zelllysate für die Proteinanalyse direkt in Lämmli-Lösung aufgenommen wurden, konnte im Vorfeld keine Proteinkonzentrationsbestimmung durchgeführt werden. Vor der Zellernte wurden die Zellschalen mikroskopisch beurteilt und keine erheblichen Schwankungen in der Zelldichte der infizierten Zellen festgestellt. Durch den Einsatz einer einheitlichen Volumenmenge des jeweiligen Zelllysats konnte von einer gleichmäßigen Beladung des Westernblots ausgegangen werden. Zusätzlich wurde stets GAPDH als

Ladungskontrolle mitgeführt. Die Expression von sh-PKC $\alpha$  führte nach 48 h zu einer um 50% verminderten Expression von PKC $\alpha$  im Vergleich zu den Adsh-NS-infizierten Zellen (s. Abbildung 24.C). Abbildung 24.A zeigt repräsentativ einen Ausschnitt aus einem Westernblot. Der mRNA-Gehalt der PKC $\alpha$  konnte letztlich auf 10% des mRNA-Gehaltes der Kontrollzellen gesenkt werden (s. Abbildung. 25.B).

A

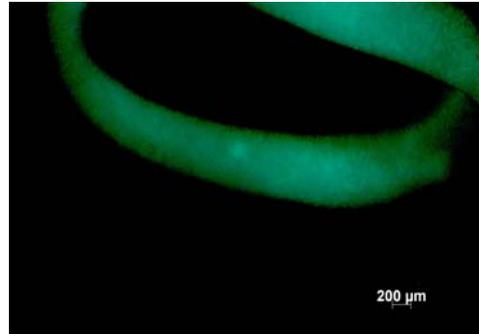


**Abbildung 25: Herabregulation von PKC $\alpha$ -Protein und -mRNA durch shRNA. A) :** Proteingehalt von PKC $\alpha$  und GAPDH aus den infizierten Kardiomyozyten. Auszug eines repräsentativen Immunoblots. **B):** Auswertung der Echtzeit-PCR zur Bestimmung des mRNA-Verhältnisses von PKC $\alpha$  zu GAPDH in Adsh-PKC $\alpha$  und Adsh-NS infizierten Kardiomyozyten nach 48 h. **C):** PKC $\alpha$ -Proteingehalt im Verhältnis zur GAPDH-Expression nach 48 h.

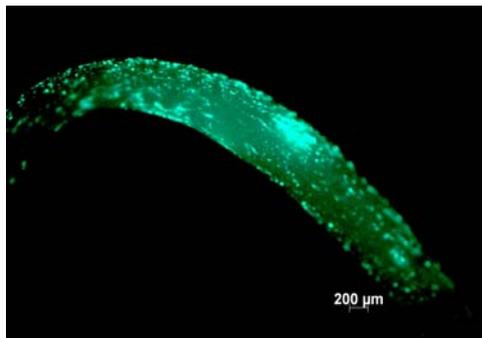
### 3.5. Effekte der shPKC $\alpha$ -Überexpression auf die Kontraktilität von EHTs

Ein wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit war es, neben der Suppression von PKC $\alpha$  auf mRNA- und Protein-Ebene und der Etablierung der adenoviralen Expression von endogenen short hairpin RNA-Molekülen in Kardiomyozyten, die funktionelle Konsequenz eines PKC $\alpha$ -*knockdowns* zu untersuchen. Um die Auswirkungen eines PKC $\alpha$ -*knockdowns* auf die Kontraktilität von Kardiomyozyten im Zellverband zu charakterisieren, wurde sh-PKC $\alpha$  in rekonstituiertem Herzgewebe aus NRKM (engineered heart tissue, EHT) überexprimiert und dessen Kontraktionsverhalten nach Zugabe steigender Calcium- und Isoprenalin-konzentrationen untersucht (s. Abbildung 27). Für die Infektion der EHT mit den sh-RNA-

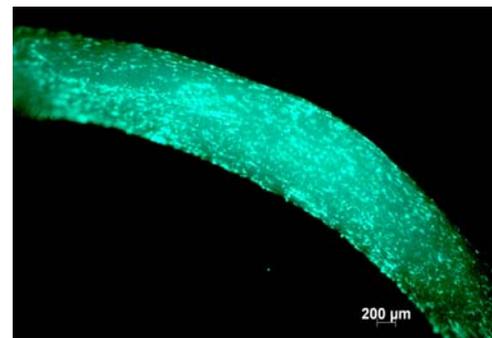
exprimierenden Adenoviren wurde im Vergleich zu den Kardiomyozyten eine sehr viel höhere Viruskonzentration eingesetzt, um möglichst alle Zellen des EHTs zu erreichen. Die Abbildung 26 zeigt exemplarisch adenoviral-infizierte EHT nach 48 h Inkubation.



Negativ-Kontrolle



Adsh-NS

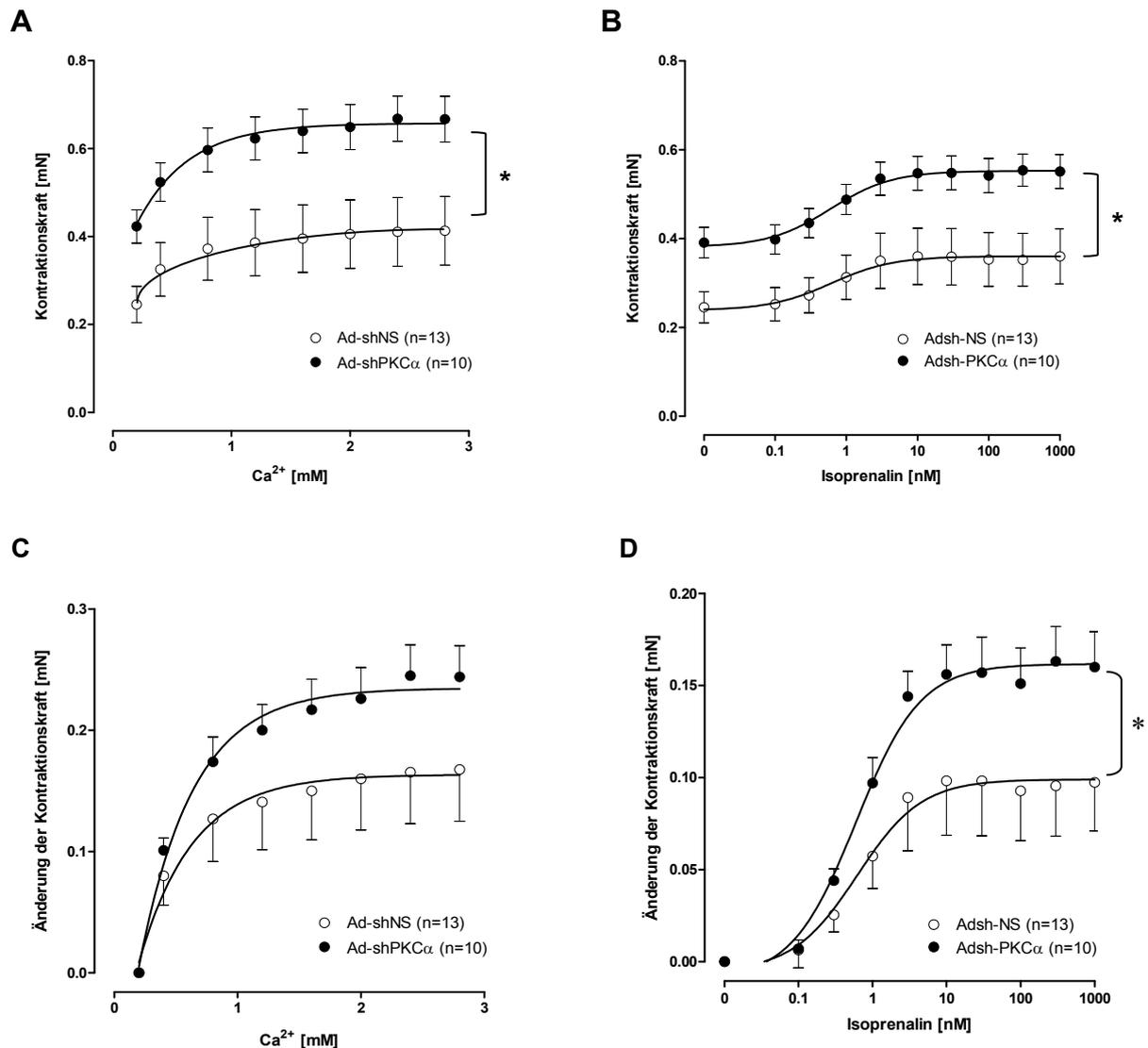


Adsh-PKCa

**Abbildung 26 Rekonstituiertes Herzmuskelgewebe (EHT) mit und ohne Virusinfektion**

Die obere Aufnahme zeigt ein unbehandeltes EHT, das unter UV-Licht aufgrund von Autofluoreszenz leicht grün erscheint. Die unteren beiden EHTs wurden mit Adenoviren infiziert (MOI 50) und für 48 h inkubiert. Die sehr hell und intensiv leuchtenden Areale stellen die GFP-exprimierenden und somit erfolgreich infizierten Zellen dar.

Die Kontraktionsexperimente wurden wie in Kap. 2.4. beschrieben durchgeführt und ausgewertet. Beide Konzentrationswirkungskurven, sowohl von Calcium, als auch von Isoprenalin zeigten bei allen EHTs einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Kontraktilität mit Erreichen eines Maximalwertes (s. Abbildung 27 A und B).

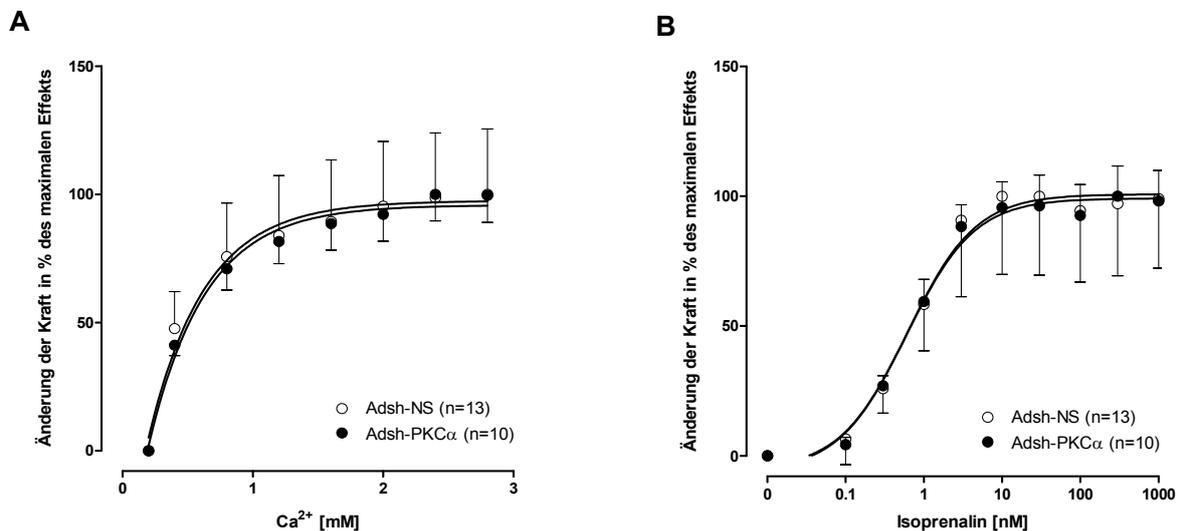


**Abbildung 27: Kontraktionskraft und Änderung Kontraktionskraft nach Zugabe von Calcium und Isoprenalin.**

A und B zeigen die Kontraktionskraft, C und D die Änderung der Kontraktionskraft. Die Ordinate gibt die Kontraktionskraft bzw. die Änderung der Kraft in Millinewton (mN) an. Die Abszisse gibt die Calcium- (A und C) und Isoprenalinkonzentration (B und D) an. \* $p < 0,05$ .

Bereits zu Beginn der Experimente ließen sich basale Unterschiede in der Kontraktionskraft feststellen. So lag die Ausgangskraft der mit Adsh-NS infizierten EHTs bei  $0,25 \pm 0,04$  mN. Die EHTs, welche zuvor mit dem sh-PKC $\alpha$ -exprimierenden Adenovirus infiziert wurden hingegen schlugen initial bereits mit einer Kraft von  $0,4 \pm 0,07$  mN. Die weitere Kraftzunahme unter steigenden Calcium- und Isoprenalinkonzentrationen war im Anschluss in den Adsh-PKC $\alpha$ -infizierten EHTs größer als in den Adsh-NS-EHTs und erreichte Maximalwerte von  $0,66 \pm 0,05$  mN und  $0,55 \pm 0,06$  mN im Falle der Adsh-PKC $\alpha$ -EHTs und  $0,41 \pm 0,07$  mN bzw.  $0,36 \pm 0,06$  mN im Falle der Adsh-Ns-EHTs ( $p < 0,05$  für alle Werte). Dies wird bei Betrachtung der Änderung der Kontraktionskraft deutlich (s. Abbildung 26). Insgesamt nahm die Kontraktionskraft unter Stimulation mit der maximalen Calciumkonzentration für die PKC $\alpha$ -

exprimierenden EHTs um  $0,26 \pm 0,03$  mN zu. Die nonsense-shRNA exprimierenden EHTs hingegen erreichten nur eine Zunahme von  $0,16 \pm 0,04$  mN. Unter der Wirkung von 1000 nM Isoprenalin stieg die Kontraktionskraft der Adsh-PKC $\alpha$ -EHTs um ca.  $0,16 \pm 0,01$  mN an. Die nonsense-EHTs wiesen hier mit  $0,1 \pm 0,02$  mN ebenfalls eine geringere Kraftzunahme auf.

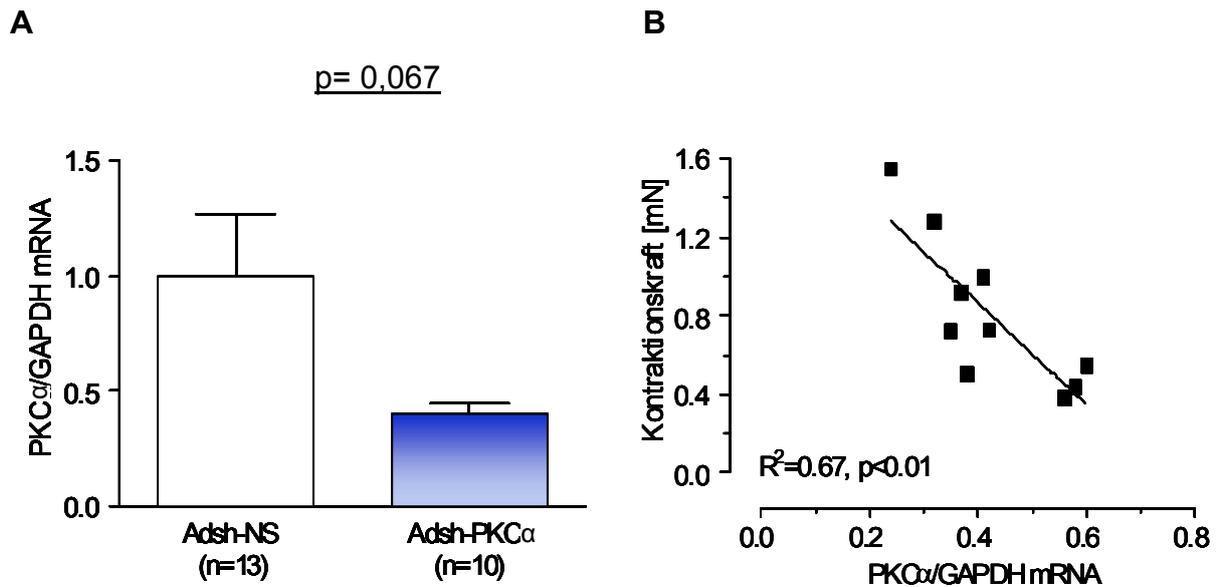


### Abbildung 28: Änderung der Kraft bezogen auf die Maximalkraft.

Die Ordinate gibt hier die Änderung der Kraft in Prozent vom Maximum an, während die Abszisse die Calcium (A) bzw. die Isoprenalinkonzentration (B) in Nanomol ausdrückt ( $p=0,97$  für B).

Wird die Konzentrationswirkungskurve von Calcium und Isoprenalin auf die Maximalkraft normiert und jeder Wert einer Kurve in Prozent des Maximums angegeben, lässt sich die Potenz von Isoprenalin und Calcium an den Adsh-PKC $\alpha$ - und Adsh-NS-infizierten EHTs sehr gut darstellen und vergleichen (s. Abbildung 28). Es lässt sich erkennen, dass die Kurven für die unterschiedlich behandelten EHTs annähernd gleich verlaufen und keine Verschiebung in Richtung niedrigerer bzw. höherer Dosen stattgefunden hat. Zum Erreichen der maximalen Kontraktionskraft wird in beiden Fällen dieselbe Konzentration an Calcium bzw. Isoprenalin benötigt. Auch die EC50 (Effektive Konzentration 50), sprich die Konzentration bei der die halbmaximale Kontraktionskraft erreicht wird, zeigt sowohl für Calcium als auch für Isoprenalin keinen Unterschied.

Nach den Kontraktionsexperimenten sollte anschließend der mRNA-Gehalt von PKC $\alpha$  in den untersuchten EHTs bestimmt werden. Hierfür wurden sie, wie in Kapitel 2.8 beschrieben, aufbereitet und der Echtzeit-PCR unterzogen.



**Abbildung 29: A:** PKC $\alpha$ -mRNA in EHTs, ins Verhältnis zu GAPDH gesetzt. Der mRNA-Gehalt der Adsh-NS-infizierten EHTs wurde mit 1,0 gleichgesetzt.  $p=0,067$  **B:** Korrelation der Kontraktionskraft und des mRNA-Gehaltes der EHTs,  $p<0,01$ .

Die Infektion von Kardiomyozyten im Zellverband mit AdshPKC $\alpha$  führte zu einem verminderten PKC $\alpha$ -mRNA-Gehalt gegenüber EHTs, die die sh-NS-RNA ausbildeten, wie auch in der Monolayerkultur schon gezeigt. Die mRNA-Expression wurde hierbei um über 50% verringert (s. Abbildung. 29.A). Die EHTs mit der endogen ausgebildeten short-hairpin-RNA gegen PKC $\alpha$  zeigten somit folgende Eigenschaften: 1. Eine erhöhte Kontraktionskraft basal und unter Calcium- und Isoprenalinstimulation. 2. Einen geringeren PKC $\alpha$ -mRNA Gehalt als sh-NS-exprimierende EHTs. Diese beiden Eigenschaften wurden nun zueinander ins Verhältnis gesetzt. In der Tat zeigte sich eine signifikante negative Korrelation zwischen dem PKC $\alpha$ -mRNA-Gehalt und der Kontraktionskraft (s. Abbildung 28.B). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Anwesenheit von PKC $\alpha$  in Kardiomyozyten an der Regulation der Kontraktilität beteiligt ist.

## 4. Diskussion

### 4.1 siRNA Transfektion in NRKM

Die RNA-Interferenz stellt eine sehr wirkungsvolle Methode dar, mit der eine hoch spezifische Gensuppression erreicht werden kann (Elbashir et al. 2001). Einen unter mehreren kritischen Faktoren, die den Erfolg von RNAi bestimmen, stellt selbstverständlich zunächst der Transport der siRNA in die Zielzelle dar. Wie andere negativ geladene Moleküle, können siRNA-Oligonukleotide unter physiologischen Bedingungen kaum die Zellmembran durchwandern und sind hierfür auf ein Vermittlungsreagenz angewiesen. Die Transfektionseffizienz von differenzierten, postmitotischen Zellen ist im Vergleich zu undifferenzierten Zelltypen sehr gering (Whitehead et al. 2009). Dieses Problem wirkt sich bei Transfektionsversuchen in vivo noch stärker beschränkend aus (Sumbilla et al. 1999; Aigner 2007).

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe von siRNA einen akuten *knockdown* von PKC $\alpha$  in neonatalen Rattenkardiomyozyten und rekonstituiertem Herzmuskelgewebe zu erzielen und die Auswirkungen dieser Herabregulation in Hinblick auf die Kontraktionskraft zu untersuchen. Arbeiten anderer Gruppen zeigten zu diesem Zeitpunkt bereits die limitierte Anwendbarkeit der RNAi-Technik in Kardiomyozyten (Davidson et al. 2003). Zu Beginn erschien es dennoch sinnvoll, die Transfektion von siRNA in Herzmuskelzellen anzustreben, da es sich an sich um eine einfache Methode handelte, die schnell verlässliche und reproduzierbare Ergebnisse versprach. In den durchgeführten Versuchsreihen gelang es jedoch nicht, eine suffiziente Transfektionseffizienz von siRNA-Molekülen in lebende, schlagende Kardiomyozyten zu erzielen. Zur direkten Überprüfbarkeit des Transfektionsergebnisses wurde eine Rhodamin-markierte siRNA gewählt, die gegen GFP gerichtet war. Bei erfolgreicher Transfektion hätte also erwartungsgemäß das GFP-Signal in NRKM, die mit zuvor Ad-GFP infiziert wurden und daher GFP exprimierten, abnehmen müssen. Das Fluoreszenzsignal des Rhodamin-Markers ließ sich jedoch in keinem Fall intrazellulär in den Kardiomyozyten nachweisen. Lasermikroskopisch detektierbares Rhodamin fand sich stattdessen fast ausschließlich in den vom Boden der Zellkulturschale abgelösten toten Zellen, bzw. in Zelltrümmern. Zugleich war keine Abnahme der GFP-Fluoreszenz festzustellen. Dies wirft die Frage auf, ob eine erfolgreiche Transfektion in lebende Zellen stattgefunden hatte, welche dann erst im Anschluss abgestorben waren oder ob sich das Rhodamin bzw. die siRNA bevorzugt an der Zelloberfläche toter Zellen aggregierte. Es bot sich daher an, die Zellen schon früh nach der Transfektion am konfokalen Lasermikroskop zu betrachten, um ein intrazelluläres Rhodaminsignal in

lebenden NRKM zu detektieren. 1 h und auch 8 h nach Transfektion ließ sich jedoch kein intrazelluläres Rhodaminsignal erkennen (Daten nicht gezeigt).

Transfektionsreagenzien wird ein zytotoxisches Potential zugesprochen (Bauer et al. 2006; Kiefer et al. 2004; Lv et al. 2006). Im Falle von kationischen Liposombildnern, wie z. B. RNAitect und Lipofectamin (Invitrogen), sollen freie Liposomen, die im Überschuss vorliegen und daher keine RNA/DNA komplexieren, Hauptursache für die toxische Wirkung sein (Djurovic et al. 2004). In der Tat schien es so, dass die Anzahl der abgestorbenen Zellen in den Kardiomyozytenkulturen, die mit höheren Mengen an Transfektionsreagenz und siRNA behandelt wurden, höher war, als in jenen bei deren Transfektion nur geringere Mengen eingesetzt wurden (s. Abbildung 14). Es konnte jedoch nicht bestätigt werden, dass dieser Effekt ausschließlich dem Transfektionsreagenz zuzuschreiben war, da die alleinige Applikation von RNAitect, bzw. Polyfect in unterschiedlichen Konzentrationen zu keiner Zunahme an abgestorbenen Zellen führten. Die Behandlung von Kardiomyozyten mit siRNA ohne Verwendung von Transfektionsreagenz führte zum gleichen Ergebnis. Hier liegt also vermutlich eher ein additiver toxischer Effekt der Kombination von Transfektionsreagenz und siRNA vor.

Die adenovirale Expression des GFPs erfolgte unter der Regulation des stark transaktivierenden CMV-Promotors. Die Möglichkeit, dass die siRNA zwar erfolgreich in das Zytosol gelangt war und zu einer Herabregulation der GFP-mRNA geführt hatte, die ausserordentlich starke Expression des GFP unter der Kontrolle des CMV-Promotors diesen Effekt jedoch unter die Grenze der Messbarkeit überlagert hat, ist unwahrscheinlich. GFP hat eine intrazelluläre biologische Halbwertszeit von etwa 26 h (Corish and Tyler-Smith 1999). Unterschiede in der GFP-Fluoreszenz hätten demnach erkennbar sein müssen. Laut den Herstellerangaben der verwendeten Transfektionsreagenzien hätte mit allen eingesetzten siRNA-Mengen ein ausreichender, feststellbarer *knockdown* zu erzielen sein müssen. Unklar bleibt, ob durch sensiblere Detektionsmethoden ein *knockdown* hätte festgestellt werden können. Die GFP-Menge wurde ausschließlich indirekt per Fluoreszenz, nicht aber beispielsweise direkt per Western-Blot oder auf mRNA-Ebene per RT-PCR bestimmt. Auf derart sensible Detektionsverfahren konnte allerdings verzichtet werden, da bei einem so geringen *knockdown* auch keine biologischen Effekte des *knockdowns* des eigentlichen Zielproteins PKC $\alpha$  zu erwarten gewesen wären.

Die Beobachtungen bestätigten, dass eine erfolgreiche Transfektion von siRNA ausgeblieben war. Verdeutlicht wurde dieses Ergebnis durch den direkten Vergleich mit der Transfektionseffizienz von mitotischen NIH 3T3-Zellen. Hier konnten mehr als 50% der Zellen unter den gleichen Versuchsbedingungen erfolgreich transfiziert werden und ein intrazelluläres Rhodaminsignal eindeutig detektiert werden.

Interessanterweise wurden zum Zeitpunkt dieser Arbeit in zwei Arbeitsgruppen, bei dem Versuch, sowohl neonatale als auch adulte Kardiomyozyten zu transfizieren, Erfolge berichtet ((Pedram et al. 2005; Zhang et al. 2006)). Es werden teils Transfektionsraten von mehr als 50% angegeben. Wei et al. erreichten unter Verwendung von Lipofectamine 2000 (Invitrogen) sogar einen Anteil von mehr als 90% transfizierten Zellen bei der Transfektion mit siRNA. Hierbei wurde sehr intensiv an der Optimierung der Versuchsbedingungen gearbeitet. Das Verhältnis von Liposomen zu RNA-Komplexen, das Ausmaß der positiven Ladung der Liposomen, deren Größe und die Interaktion zwischen der RNA und den kationischen Lipiden sind wichtige Faktoren, die die zelluläre Aufnahme von Nukleotiden bestimmen (Simoies et al. 1999; Clackson 2000). Es wäre sicherlich möglich gewesen, zum Zeitpunkt der durchgeführten Versuche unter Verwendung weiterer Transfektionsreagenzien und zusätzlichen Optimierungsschritten eine höhere Transfektionsrate zu erzielen, als es in dieser Arbeit der Fall war. Auf diese Strategie wurde jedoch verzichtet, da die Generierung eines adenoviralen Vektors sich deutlich vielversprechender darstellte, für das Ziel, einen *knockdown* von PKC $\alpha$  in Kardiomyozyten zu untersuchen.

Derzeit wird eine ständig steigende Zahl von Arbeiten publiziert, in denen durch non-virale Applikation von siRNA in Primärzellen, wie Kardiomyozyten, Zielgene herabreguliert wurden und die so zu den Kenntnissen über die Funktion dieser Gene beitragen (Deschenes et al. 2008). Die Einschleusung der siRNA wird hierbei durch unterschiedlichste Mechanismen vermittelt, die von PEGylierten, oder andersartig modifizierten Liposomen bis hin zu der Verwendung von Nanocarbontubes reichen (Zimmermann et al. 2006; Kim et al. 2008; Krajcik et al. 2008). Auch für die in-vivo Applikation von nicht viral codierter siRNA sind inzwischen neue Substanzen verfügbar und in Erprobung, die die Transfektion der RNA in ihre Zielzellen vermitteln (Aigner 2007; Kim and Kim 2009).

#### 4.2 shRNA-Design

Eine grundsätzliche Frage bei der Arbeit mit RNA-Interferenz besteht in der Vorhersehbarkeit von *knockdown*-Effekten durch eine bestimmte RNA-Sequenz. Schon für siRNA-Oligonukleotide lässt sich nur sehr schwierig vorhersagen, ob durch ihre Anwendung tatsächlich die Translation eines Gens herabreguliert wird. Dies gilt in noch verstärktem Maße für ein shRNA-Expressionssystem, da hier neben den Effekten, die die siRNA-Oligonukleotide selbst erzeugen, zusätzlich Ereignisse auf dem Weg zu ihrer Prozessierung zur funktionellen siRNA einen Einfluss auf ihre intrazelluläre Konzentration und damit ihre Effizienz haben können (siehe unten). Allerdings existieren einige anerkannte Regeln zum Design „effizienter“ siRNAs (Tuschl et al. 1999), die im Rahmen dieser Arbeit zur Anwendung kamen.

Eine neuartige, von Alexander Laatsch (Laatsch et al. 2004) entwickelte Auflage, bei der der gesamte *antisense*-Strang der shRNA inklusive des Loops komplementär zu der Ziel-mRNA sein soll, verringert die Gefahr eines *mismatches* bei der Bindung der prozessierten siRNA an die mRNA. Zu Beginn dieser Arbeit war bezüglich des optimalen shRNA-Aufbaus, der zu bevorzugenden Loop-Größe und des Aufbaus der Loop-Region noch kein anerkannter Algorithmus etabliert. Im Falle der hier synthetisierten shRNA-Sequenz lässt diese sich, im Gegensatz zu anderen publizierten Sequenzen, grundsätzlich nicht in Stamm- und Loop-Region unterteilen. Der *antisense*- wie auch der *sense*-Strang sind beide vollständig in sich palindromisch. Bei der spontanen zytosolischen Faltung des Transkripts würde es daher theoretisch zu einer kompletten Hybridisierung kommen, dies ist jedoch aufgrund sterischer hindernder Effekte nicht möglich. Ungepaarte aber komplementäre Basenpaare bilden so den Loop im Bereich der Umschlagsfalte.

Gesetzt den Fall, dass der Dicer-Enzymkomplex den Loop spaltet, riskiert man so keine Fehlpaarung mit der mRNA, da der Loop vollständig komplementär zur Zielsequenz der mRNA ist. Schon eine einzige Fehlpaarung im Hybrid kann zu einem Funktionsverlust der siRNA führen, abhängig davon, welches Nukleotid des *antisense*-Strangs betroffen ist (Haley and Zamore 2004). So bindet das 5'-Ende des *antisense*-Strangs an die mRNA, während das 3'-Ende eine weit weniger bedeutsame Rolle bei der Zielerkennung spielt. Trotzdem bedarf eine effiziente Spaltung der mRNA der fast vollständigen Komplementarität des 3'-Endes und mehr als drei Fehlpaarungen können zu einer signifikant verminderten Spaltungskinetik führen (Haley and Zamore 2004). Hingegen führt ein falsch gepaartes Nukleotid an der Position 10 oder 11 zu einem vollständigen Funktionsverlust der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz, da zwischen diesen Nukleotiden eine leicht spaltbare Phosphatbindung vorliegt und das siRNA-mRNA Hybrid immer an dieser Stelle gespalten wird (Haley and Zamore 2004). Heutzutage ist die Generierung einer shRNA mit einem Loop aus etwa 9 Basenpaaren, der weder komplementär zu der Ziel-mRNA ist, noch eine Palindromizität aufweist, eine etablierte Methode (Davidson B.L 2005), und eine große Anzahl von short hairpin RNA-Oligonukleotide sind kommerziell zu erwerben.

Inwiefern sich der neue Algorithmus für die Auswahl der Zielsequenz von shRNAs auf deren Funktionalität auswirkte, wurde in der vorliegenden Arbeit allerdings nicht näher untersucht. Laatsch et al. (2004) konstruierten mehrere shRNAs nach diesem Algorithmus und konnten eine Erfolgsrate von 100% an potenten shRNA-Molekülen erreichen, die eine signifikante Herabregulation des zu untersuchenden Zielgens bewirkten (Laatsch et al. 2004). Auch die Transfektion des Expressions-Plasmids pALsh-PKC $\alpha$  in Zellen der Mausfibroblastenlinie NIH 3T3 konnte, im Rahmen der vorliegenden Arbeit, nach 48 h eine Herabregulation der PKC $\alpha$ -Proteinkonzentration von etwa 40% erzielen.

Dieses Ergebnis hätte nicht zwangsläufig derart eindeutig sein müssen. Zunächst ist ein Expressionsplasmid, welches für eine siRNA codiert, weit größer als eine einzelne siRNA und demnach auch schwieriger zu transfizieren. Zwar führten die initialen Transfektionsversuche von siRNA mit Polyfect in NIH 3T3 bereits zu einer 50-prozentigen Transfektionsrate. Da das pALsh-Plasmid aber kein optisch detektierbares Kontrollprotein codiert, war eine einfache optische Quantifizierung der Transfektionsrate nicht möglich. Zusätzlich hat die PKC $\alpha$  eine relativ lange Halbwertszeit von etwa 6-24 h (McKay et al. 1996).

Eine Evaluation der Einzelschritte, welche die *knockdown*-Effizienz bestimmen, war daher schwierig und erst das Endergebnis der Herabregulation von PKC $\alpha$  um etwa 40% sprach erfreulicherweise für ein günstiges Zusammenwirken der einzelnen Faktoren.

### 4.3 Adenovirale shRNA-Expression

Der adenovirale Transfer von shRNA-Oligonukleotiden, die nach intrazellulärer Prozessierung in funktionsfähige siRNA-Moleküle umgewandelt werden, stellte zu Beginn der Arbeit schon eine etablierte Methode zur Suppression von Ziel-mRNA dar (Kasahara and Aoki 2005). Neuartig an diesem Versuchskonzept waren jedoch einerseits der angewandte Algorithmus des shRNA-Designs (Laatsch et al. 2004) und andererseits die Etablierung dieser Virus-vermittelten RNAi in Kardiomyozyten. Gegenüber konventionellen Methoden, wie liposomaler Transduktion, Elektroporation, Calciumphosphat-vermittelter Transduktion oder der direkten DNA-Injektion, bietet der adenovirale Gentransfer eine sehr hohe Effizienz (Kirshenbaum 1997; Sumbilla et al. 1999; Rinne et al. 2006). Darüber hinaus können mit Hilfe rekombinanter Adenoviren auch postmitotische, nicht-replizierende Zellen und damit auch Kardiomyozyten infiziert werden (Kasahara and Aoki 2005).

Eine Proteinexpression im Fall proteinexprimierender Adenoviren kann bereits nach einigen Stunden nachgewiesen werden und erreicht ihr Maximum nach etwa 48 Stunden (Kass-Eisler et al. 1993). Durch bicistronische Koexpression von GFP kann die Infektionseffizienz durch dessen Fluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop daher gut abgeschätzt werden (s. Abbildung 3.12 und 3.13). In den Experimenten, die dieser Arbeit zu Grunde liegen, wurden rekombinante Adenoviren verwendet, die *enhanced* GFP (EGFP) exprimieren. Die Expression von GFP zeigte in NRKM erwartungsgemäß eine Abhängigkeit von der eingesetzten Viruskonzentration, wie in Abbildung 22 dargestellt. Die Virustitration des Ad-shPKC $\alpha$  ergab eine positive Korrelation zwischen GFP-Fluoreszenz und der eingesetzten Viruskonzentration. Der zugehörige Westernblot zeigte, dass bei einer eingesetzten MOI von 1 und einer Inkubationszeit von 48 h eine im Westernblot optisch detektierbare Abnahme des Proteingehalts von PKC $\alpha$  in NRKM nachzuweisen war.

Erstaunlicherweise zeigt die Proteinquantifizierung im Westernblot keinen Viruskonzentrationsabhängigen stufenlosen *knockdown* der PKC $\alpha$  auf Proteinebene. Vielmehr ließ sich in den Zellen, die mit einer MOI von 0.1-0.5 infiziert wurden, keine Veränderung in der PKC $\alpha$ -Konzentration feststellen (s. Abbildung 24). Der PKC $\alpha$ -Proteingehalt blieb innerhalb dieser Zellpopulation und im Vergleich mit den Adsh-NS infizierten Zellen gleich. Als mögliche Ursache hierfür sei einerseits wiederum die lange Halbwertszeit des Zielproteins von bis zu 24 Stunden zu nennen. Hinzu kommt, dass die Infektion von NRKM mit einer MOI von 0.1-0.5 eine Situation darstellt, in der theoretisch nur jede 10. bis zu jeder zweiten Zelle (MOI=0.5), mit einer einzigen Viruskopie infiziert ist. Heutzutage werden für eine erfolgreiche Herabregulation durch adenovirale Expression von shRNA Viruskonzentrationen in einem weitaus höheren Maßstab empfohlen (Kasahara and Aoki 2005). So sollen MOI-Raten von 30–90 für die Infektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten eingesetzt werden. Allerdings verbleibt das virushaltige Medium hier nur für 3 h auf den Zellen und wird anschließend durch frisches ersetzt. Für andere Zelllinien gelten sogar MOI-Werte weit höher als 3000 (Ohki et al. 2001).

In unserem Fall traten signifikante Effekte schon bei einer MOI von 1 auf. Der Einsatz von einer MOI von 3 für die darauffolgenden Versuche stellte damit einerseits eine ausreichende Viruskonzentration in den Kardiomyozyten sicher, andererseits wurden toxische Effekte einer Infektion mit Adenoviren so minimal wie möglich gehalten. Der adenovirale *knockdown* der PKC $\alpha$  in NRKM ließ sich sowohl auf mRNA als auch auf Protein-Ebene eindeutig nachweisen (s. Abbildung 25). Die Abnahme der PKC $\alpha$ -mRNA in den Ad-shPKC $\alpha$ -infizierten Zellen von 90% verdeutlicht eindrucksvoll das Potential der RNAi. Der im Vergleich weniger ausgeprägte Effekt auf die Proteinkonzentration der PKC $\alpha$  ist wahrscheinlich auf ihre lange Halbwertszeit zurückzuführen. Hätte man die Zellen länger als 48 h inkubiert, so ist anzunehmen, dass sich nach mehreren Tagen eine ähnlich deutliche Herabregulation auch auf Proteinebene dargestellt hätte.

Als methodische Limitation sollte erwähnt werden, dass die hier ermittelten Ergebnisse durch Echtzeit-PCR und Westernblot im Gesamthomogenat immer nur einen durchschnittlichen *knockdown* widerspiegeln. Aussagen darüber, wie viele Zellen einen *knockdown*-Effekt zeigten und wie effektiv der *knockdown* in der einzelnen Zelle war, konnten nicht getroffen werden.

#### 4.4 Das EHT-Modell

Zur Erfassung der Kontraktionsparameter wurde das Modell des engineered heart tissue (EHT) gewählt. Dieses aus NRKM rekonstituierte Gewebe lässt sich in Kultur länger halten als NRKM-Monolayerkulturen. In der 3-D-Kultur wird die Differenzierung des Gewebes und die damit einhergehende Entwicklung von charakteristischen Merkmalen, die für das Myokard adulter Ratten typisch sind, ermöglicht (Zimmermann et al. 2002). Die Kardiomyozyten sind fähig, in der dreidimensionalen Kollagenmatrix Ausläufer auszubilden. Sie nehmen hierdurch Zellkontakte untereinander auf und können sich so zu einem synchron schlagenden Zellverband zusammenschließen. Die EHTs weisen so schon wenige Tage nach ihrer Herstellung Eigenschaften von differenziertem Herzgewebe auf (Zimmermann et al. 2002). Untersuchungen an diesem rekonstituierten Gewebe können also unter Umständen eine physiologische Situation besser widerspiegeln als isolierte adulte Kardiomyozyten und auch Kontraktionsmessungen entsprechen eher natürlichen Verhältnissen. EHTs lassen sich sehr effizient mit Adenoviren infizieren (Zimmermann et al. 2000). Für ihre Entwicklung benötigen sie besondere Bedingungen hinsichtlich der Zusammensetzung der Kulturmedien. Durch Verwendung von geeigneter Extrazellulärmatrix (Matrigel, Harbor Bio-Products, Norwood, MA, USA) zur Herstellung der EHTs wie auch durch Kultivierung in Medium, dem 10% Pferdeserum sowie 2% Hühnerembryonenextrakt zugesetzt sind, wird dieses Milieu geschaffen. Die Kultur im serumhaltigen Medium wirkt sich stark wachstumsfördernd aus (Freshney 2005). EHTs werden nicht aus aufgereinigten Kardiomyozyten hergestellt, sondern ihre zelluläre Zusammensetzung entspricht bei der Herstellung derjenigen des neugeborenen Herzens (Schneiderbanger et al. 2001). Von Naito et al. (2006) konnte im EHT-Modell der Ratte zudem nachgewiesen werden, dass Nicht-Kardiomyozyten bei der Ausbildung kontraktile Herzmuskelgewebe eine wichtige Rolle spielen (Naito et al. 2006). Im Verlauf der Kultur und Entwicklung überlebt in EHTs nur ein Teil der eingesetzten Zellen; von 2,5 Mio. eingesetzten Zellen überleben zwischen 0,5 und 1 Mio. Zellen. Dadurch kann auch eine Beeinflussung der Verhältnisse bei der zellulären Zusammensetzung im Verlauf der Kultur nicht ausgeschlossen werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass Fibroblasten im Verlauf des Unterganges von Kardiomyozyten und/oder glatten Muskelzellen verstärkt proliferieren und den entstehenden Raum nutzen. EHTs eignen sich gut für Kontraktionsmessungen und sind verhältnismäßig einfach zu handhaben und ermöglichen nach ca. 12-14 Tagen die Durchführung von Kontraktionsmessungen.

In EHTs wurden sh-PKC $\alpha$  bzw. sh-NS mit einer eingesetzten Infektionskonzentration entsprechend einer MOI von 50 adenoviral exprimiert, was ein Vielfaches der Virusmenge darstellt, die für eine Infektion von NRKM-Monolayerkulturen notwendig ist. Dieses Verhältnis

wurde in vorherigen Arbeiten etabliert und begründet sich wahrscheinlich aus dem gewebeartigen Verband, in den die Kardiomyozyten eingeschlossen sind und wodurch die Viruspenetration der einzelnen Zelle erschwert wird (El-Armouche et al. 2003).

Im Vergleich zu den sh-NS exprimierenden EHTs schlugen die mit Adsh-PKC $\alpha$  infizierten EHTs bereits basal mit einer fast doppelt so hohen Kontraktionskraft. Auch die absolute Zunahme der Kontraktionskraft unter steigenden Calcium- und Isoprenalinkonzentrationen war in den Adsh-PKC $\alpha$  infizierten EHTs höher. Neben den infizierten EHTs wurden zusätzliche unbehandelte EHTs mituntersucht (Daten nicht gezeigt). Ihre Kontraktionskraft war im Vergleich zu den virusinfizierten EHTs sowohl basal als auch unter steigenden Calcium- und Isoprenalinkonzentrationen stärker. So wiesen sie konstant eine 30% höhere Kontraktionskraft als die sh-PKC $\alpha$ -exprimierenden EHTs und eine 55% höhere Kontraktionskraft im Vergleich zu den Adsh-NS infizierten EHTs auf. Diese Beobachtung überraschte jedoch nicht, sondern war bereits im Vorfeld absehbar. So konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von GFP in EHTs eine signifikante Kontraktionsminderung zur Folge hat (Ditz 2007). Als mögliche Ursachen werden direkte toxische Effekte von GFP diskutiert (Huang et al. 2000) oder auch mechanische Störungen, die durch die Proteinüberladung von GFP in der Zelle entstehen können. Weitere Erklärungsansätze werden in einer möglichen Apoptoseaktivierung gesucht, die u.a. durch p38 vermittelt wird (Liao et al. 2002). Diese Beobachtungen erklären den starken Kraftverlust der infizierten EHTs gegenüber den unbehandelten Negativkontrollen. Es lässt sich jedoch ausschließen, dass die Ad-shPKC $\alpha$ -infizierten Zellen weniger toxischen Effekten des GFPs ausgesetzt waren als die sh-NS-exprimierenden EHTs und daher schon basal eine höhere Ausgangskontraktionskraft aufwiesen. Nach den Kontraktionsexperimenten wurden die EHTs einzeln unter einem konfokalen Laser-Mikroskop untersucht, wobei überraschenderweise die Ad-shPKC $\alpha$ -infizierten EHTs eine intensivere GFP-Fluoreszenz zeigten (s. Abbildung 26), so dass auch von einer höheren GFP-Expression im Vergleich zu den Ad-shNS-EHTs ausgegangen werden kann. Hätte der *knockdown* von PKC $\alpha$  in den EHTs keinen funktionalen Effekt auf die Kontraktionskraft gehabt, so hätte man erwarten müssen, dass die Kontraktilität aufgrund der höheren intrazellulären GFP-Konzentration noch schwächer gewesen wäre, als die der *nonsense*-Kontrollen. Ausgeschlossen werden kann jedoch nicht, dass auch die Expression der *nonsense*-shRNA sich negativ auf die Kontraktionskraft ausgewirkt haben könnte. Die Expression einer jeden shRNA bzw. siRNA kann potentiell zu Kollateraleffekten führen. Diese unbeabsichtigten „*off-target*“-Effekte beeinhalteten vor allem die gleichzeitige Herabregulation anderer mRNA durch eine zwar inkomplette Bindung der prozessierten siRNA, die aber zu einer Aktivierung der RNAi-Maschinerie führen kann. Im Vorfeld wurde zwar ausgeschlossen, dass die gewählte *nonsense*-siRNA-Sequenz in einer Folge von mehr als elf Basen komplementär zu mRNA-

Sequenzen des Rattengenoms ist, dennoch besteht die Möglichkeit, dass sich die gewählte *nonsense*-siRNA, mit einigen *mismatches*, in Bereichen wie beispielsweise der 3'UTR-Region einer mRNA binden und so Effekte einer microRNA imitieren kann (Svoboda 2007). Durch die Verwendung von zwei unterschiedlichen siRNA-Formen gegen PKC $\alpha$  und zwei *nonsense*-Kontrollen hätte man diesen möglichen Einfluss genauer untersuchen können.

Die mRNA-Konzentration der PKC $\alpha$  war in den Ad-shPKC $\alpha$  EHTs durchschnittlich um 50% geringer als in den sh-NS exprimierenden EHTs. Die höhere Virus- und GFP-Last, und deren toxischer Einfluss wiesen stark daraufhin, dass die dennoch gesteigerte Kontraktionskraft dieser EHTs eine direkte Folge eines aus dem *knockdown* der mRNA resultierenden verminderten PKC $\alpha$ -Proteingehaltes gewesen sein musste. Das Ausmaß des PKC $\alpha$ -*knockdowns* auf mRNA-Ebene variierte zwar, diese Schwankungen hielten sich aber in einem umschriebenen Rahmen und können durch unterschiedlich effektive Virusinfektionen bedingt sein. Zudem besitzen die EHTs einen Durchmesser von 1 mm, so dass deren Betrachtung unter einem Fluoreszenz-Mikroskop keine ausreichende Klärung der Frage zuließ, an welcher genauen Lokalisation innerhalb des EHTs sich fluoreszierende Zellen befanden. Die angenommene Rolle der PKC $\alpha$  als negativer Regulator der Inotropie wird durch die Beobachtung einer negativen Korrelation zwischen der PKC $\alpha$ -mRNA-Konzentration und der Kontraktionskraft mit Nachdruck unterstützt (s. Abbildung 29). Desweiteren weist dieser Zusammenhang darauf hin, dass die oben erwähnten möglichen Nebeneffekte der *nonsense*-siRNA-Expression wahrscheinlich nicht ursächlich für die geringere Kontraktionskraft jener EHTs sein können.

#### 4.4 Effekte der Beeinflussung von PKC $\alpha$

Die Erkenntnis, dass die PKC $\alpha$  wahrscheinlich einen negativen Einfluss auf die kardiale Kontraktionskraft hat, ist an sich nicht neu.

In einer Vielzahl von Studien der letzten Jahre gelang es, in verschiedenen Modellen und mit unterschiedlichem experimentellem Vorgehen übereinstimmende Ergebnisse hierzu zu erzielen. Gegenteilige Ergebnisse oder Hinweise auf eine andere Hauptfunktion der PKC $\alpha$  existieren dagegen nicht, auch wenn sie bekanntermaßen in zahlreichen anderen zellulären Signalwegen eine Rolle spielt. So ist die PKC $\alpha$  auch in Signalwegen involviert, die beispielsweise wichtig sind für die Entstehung der Atherosklerose (Churchill et al. 2008).

Ein Effekt von herausragender klinischer Bedeutung, zu dem auch derzeit die meisten Daten vorliegen, ist jedoch die negative Regulation der Inotropie. Die Daten, die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden bestärken diese Hypothese nicht nur, sondern gehen über das zuvor Bekannte hinaus.

Erste Hinweise ergaben sich bereits 2003 in den Arbeiten von Burkart et al. (2003) und Sumandea et al. (2003) in denen gezeigt werden konnte, dass die Phosphorylierung von TnI an Ser43 und Ser45 bzw. von cTnT an Thr206 u.a. auch durch die  $\alpha$ -Isoform der Proteinkinase C eine negative Regulation der kardialen Kontraktionskraft mit eingeschränkter Calciumsensitivität und verminderter Mg-ATPase-Aktivität zur Folge hat. Diese Daten beruhen auf Untersuchungen an isolierten linksventrikulären Maus-Papillarmuskeln, an denen unter anderem Kontraktions- bzw. Relaxationszeitmessungen und Western-Blot-Analysen durchgeführt wurden. Weil diese Phosphorylierungsstellen allerdings von mehreren PKC-Isoformen erkannt und phosphoryliert werden, ist dieser Effekt nicht sicher auf die PKC $\alpha$  zurückzuführen. In der vorliegenden Arbeit gelang eine Herabregulation der PKC $\alpha$  mit einer Zunahme der Kontraktilität als wahrscheinliche Folge. Die Sensitivität gegenüber externem Calcium nahm hierbei allerdings nicht zu, wie es nach den Arbeiten von Burkart et al., bzw. Sumandea et al. folgernd zu erwarten gewesen wäre. Die EC50 für Calcium war für die sh-PKC $\alpha$  und sh-NS exprimierenden EHTs annähernd gleich. Eine Linksverschiebung der Konzentrations-Kraft von Calcium durch die so vermittelte Herabregulation der PKC $\alpha$  ließ sich nicht nachweisen (s. Abbildung 27C). Dieses Ergebnis wirft Zweifel daran auf, dass eine verminderte PKC-vermittelte Phosphorylierung von TnI und TnT hauptsächlich für die beobachtete Kontraktilitätszunahme ist. Es erscheint wahrscheinlicher, dass es sich hierbei nur um einen Teil der Auswirkung eines PKC $\alpha$ -*knockdowns* handelt.

Eine vermutlich mechanistisch größere Rolle könnte die erst später durch Braz et al. (2004) aufgeklärte Funktion der Phosphorylierung von PPI-1 spielen. Es handelt sich hierbei um eine Arbeit, für die PKC $\alpha$ -*knockout*-Mäuse generiert wurden, die keinerlei endogene PKC $\alpha$  exprimieren. An diesen Tieren konnte die Einbettung der Proteinkinase in ihren intrazellulären Signalweg weiter aufgeklärt werden: So zeigten diese transgenen Mäuse eine Hyperphosphorylierung von Ser16 des PLB was für eine Hemmung der Proteinphosphatase 1 spricht. Diese geschieht wiederum durch eine Aktivierung ihres Inhibitors PPI-1 aufgrund dessen fehlender Phosphorylierung durch PKC $\alpha$ .

Hierdurch ergibt sich eine Verstärkung der elektromechanischen Koppelung und Erhöhung der Relaxationsgeschwindigkeit durch verstärkten Calcium-Umsatz bei Funktionszunahme der SERCA nach dieser PLB-Phosphorylierung. Dies konnte durch Calcium-Imaging an isolierten Kardiomyozyten der transgenen Tiere gezeigt werden. Zusätzlich konnte im Einklang mit diesen Ergebnissen durch Phosphatase-Assays gezeigt werden, dass ein *knockout* der PKC $\alpha$  die Aktivität von PP-1 deutlich vermindert, was wiederum für die Desinhibierung ihres Inhibitors PPI-1 spricht. In Bezug auf die stromabwärts von PKC $\alpha$  gelegenen Anteile der Signalkaskade, nämlich die direkte Interaktion zwischen PPI-1 und PP-1, konnte diese durch Co-Immunopräzipitation bestätigt werden. In derselben Arbeit

wurden die genannten Hypothesen zur der Funktion von PKC $\alpha$  dadurch untermauert, dass an transgenen Mäusen, die PKC $\alpha$  überexprimieren, gegensinnige Effekte gezeigt werden konnten.

In klinischeren Betrachtungen von Braz et al. (2004) an den von ihnen generierten transgenen Mäusen zeigten sich erste Hinweise auf die Funktion PKC $\alpha$  in ihrem Gesamtzusammenhang, die sich wiederum mit den hier diskutierten Ergebnissen dieser Arbeit decken.

So fielen PKC $\alpha$ -*knockout*-Mäuse durch einen hyperkontraktilen Phänotyp auf. PKC $\alpha$ -überexprimierende transgene Mäuse hingegen waren hypokontraktil. Im Vergleich zu wildtyp-Mäusen, vor allem aber zu PKC $\alpha$ -überexprimierenden Mäusen, zeigten jene signifikant erhöhte Werte in der relativen Verkürzung des Herzens in der Echokardiographie (FS, *fractional shortening*). Die erwachsenen *knockout*-Tiere wiesen darüber hinaus am explantierten Herzen in der Langendorff-Perfusion einen höheren maximalen systolischen linksventrikulären Druck auf als die beiden Vergleichsgruppen.

Die Beobachtung einer höheren Kontraktionskraft bei Ausschaltung der PKC $\alpha$  ist dabei die gleiche wie in der vorliegenden Arbeit. Ein wesentlicher Unterschied ergibt sich jedoch aus der Möglichkeit der bereits im embryonalen Stadium beginnenden Kompensation des Verlustes des ausgeschalteten Proteins. Hier handelt es sich um ein generelles Problem von Mausmodellen und im Besonderen nicht-konditionaler *knockout*-Systeme wie das von Braz et al. verwendete gilt (Molkentin et al. 2009). Dieses Problem gehen Braz et al. zwar an, indem es ihnen gelingt, zu zeigen, dass andere Isoformen der PKC in den *knockout*-Tieren nicht kompensatorisch hochreguliert werden. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere Systeme oder Regulationsmechanismen im selben System den Effekt des Fehlens der PKC $\alpha$  ausgleichen. Als zusätzlicher Kritikpunkt am *knockout* kann gelten, dass ein Fehlen der Proteinkinase von Geburt an nicht sonderlich geeignet scheint, eine Krankheitssituation wie bei der menschlichen Herzinsuffizienz widerzuspiegeln, die zudem mit einer Hochregulation der PKC $\alpha$  einhergeht (Belin et al. 2007).

Um dieser Kritik zu begegnen, fügten Braz et al. (2004) ein Modell der akuten Ausschaltung von PKC $\alpha$  hinzu. Auch an kultivierten Kardiomyozyten adulter Mäuse konnten bei adenoviralem knockdown der PKC $\alpha$  durch Überexpression dominant negativer nicht funktioneller PKC $\alpha$  ähnliche Effekte gezeigt werden. Hier gilt es jedoch zu bedenken dass an isolierten Kardiomyozyten keine direkte Kraftmessung möglich ist, sondern vielmehr durch Messung der Verkürzungsfraction auf die Kraft zurückgeschlossen wurde.

Eine objektive Kraftmessung an Kardiomyozyten gelingt am ehesten, wenn ihre Kraft unter standardisierten Bedingungen im Verbund gemessen wird. Das EHT-Modell bietet zu diesem Zweck sehr gute Bedingungen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte an EHTs in denen die PKC $\alpha$  durch shRNA-induzierten und adenoviral vermittelten *knockdown* auf RNA-Ebene herabreguliert worden war, bereits eine initiale Krafterhöhung beobachtet werden. In diesem Modell war es möglich, akute Auswirkungen einer Ausschaltung der Proteinkinase zu studieren, ohne dass die Möglichkeit einer langfristigen Kompensation bestünde. Darüberhinaus bietet shRNA den Vorteil, dass der so vermittelte *knockdown* relativ spezifisch ist (Paddison et al. 2002) gegenüber der Ausschaltung durch Überexpression einer mutierten Form des Proteins. Bei der letztgenannten Beeinflussung besteht vermutlich die Gefahr, den Zellmetabolismus durch Sättigung des Ubiquitin-Proteasom-Systems, also des wichtigsten zellulären Protein-degradationssystemes, mit dem mutierten Protein unphysiologisch zu beeinflussen (Mearini et al. 2008). Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Befunde zur Kraftentwicklung fügen sich ohne Probleme in den derzeitigen Kenntnisstand ein und füllen demnach die Wissenslücke.

#### 4.5 Die Rolle von PKC $\alpha$ in der Herzinsuffizienz

Das EHT-Modell bietet weitere Vorteile bei der Untersuchung einer funktionellen Beeinflussung der PKC $\alpha$ . Die hohe Objektivität, Reliabilität und Validität der in diesem Modell gewonnenen Kraftdaten lässt sich mit relativ geringem Aufwand auf Krankheitsmodelle ausweiten. So ist es prinzipiell möglich, EHTs auch aus Kardiomyozyten von Mäusen und hier im speziellen auch transgenen Mäusen im Rahmen von Krankheitsmodellen zu erstellen (unveröffentlichte Daten aus dem eigenen Institut). Diese können dann zur Untersuchung der Beeinflussung von PKC $\alpha$  bei kardialen Erkrankungen dienen und Hinweise zur Eignung einer möglichen therapeutischen Anwendung beim Menschen geben.

Als diejenige kardiale Erkrankung, bei der die Beeinflussung der Funktion von PKC $\alpha$  den höchsten Stellenwert zu haben scheint, gilt derzeit die Herzinsuffizienz (Molkentin et al. 2009; Hambleton et al. 2007). In verschiedenen experimentellen Ansätzen deutet derzeit vieles darauf hin, dass sich eine Herabregulation von PKC $\alpha$  günstig auf die Manifestation und Progression einer Herzinsuffizienz auswirken könnte. Braz. et al. (2004) unterzogen wildtyp-Mäuse und PKC $\alpha$ -*knockout*-Mäuse einer aortalen Teilligatur, zur Simulation einer akuten Linksherz-Druckbelastung. Die transgenen Tiere zeigten dabei im Gegensatz zu wildtyp-Tieren keinen Verlust der kardialen Auswurfleistung und damit keine kardiale Dekompensation. Dennoch zeigte sich nach einigen Wochen eine kardiale Hypertrophie, wie

bei einer Progression einer Herzinsuffizienz, so dass der protektive Effekt des *knockouts* allein auf die intrazelluläre Regulation der Kontraktilität zurückzuführen zu sein scheint.

Bei den den Phänotyp der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) bekanntermaßen imitierenden transgenen *Csrp3-/-*-Mäusen (Arber et al. 1997) konnte eine deutliche Abschwächung des Phänotyps nach Kreuzung mit *PKC $\alpha$ -knockout*-Mäusen beobachtet werden. Weitere Hinweise auf den günstigen Effekt einer *PKC $\alpha$ -Inhibition* beobachteten Hambleton et al. 2007. Sie generierten nach Erhebung der Daten, die dieser Arbeit zu Grunde liegen ein konditionales *PKC $\alpha$ -knockout*-Mausmodell. An diesem konnte gezeigt werden, dass nach künstlicher Myokard-Infarzierung die kardiale Auswurfleistung von *PKC $\alpha$ -knockout*-Mäusen zunächst besser erhalten bleibt, als bei Wildtyp-Mäusen. Dieses Phänomen nahm jedoch im zeitlichen Verlauf deutlich ab, bis nach 12-16 Wochen die ventrikuläre Auswurfleistung der transgenen Tiere in gleichem Maße eingeschränkt war, wie bei Wildtypen. Diese Beobachtung stützt die Kritik an nicht konditionalen *knockout*. Nicht konditionale *knockout*-Mäuse wurden zum Vergleich im selben Experiment mitgeführt und zeigten interessanterweise keine spätere Abnahme der Auswurfleistung, so dass sie offenbar nicht als repräsentativ für die Simulation einer post-embryonalen Herabregulation der *PKC $\alpha$*  im Krankheitsfall gelten können.

So bleibt offen, inwieweit eine Herabregulation der *PKC $\alpha$*  bei Patienten mit Herzinsuffizienz sich günstig auf die Langzeitprognose auswirken könnte.

#### 4.6 Ausblick

Das in dieser Arbeit etablierte Modell zur Messung der Kontraktionskraft an EHTs bei Beeinflussung der *PKC $\alpha$*  kann, wenn es auf krankheitssimulierende Modelle ausgeweitet wird, sicherlich dazu beitragen, die Frage zu klären, inwieweit eine Herabregulation der *PKC $\alpha$*  sich günstig auf die Kontraktionskraft im Fall der Herzinsuffizienz auswirken könnte. Es kann dazu dienen, die im Rahmen transgener Mausmodelle gewonnenen Daten zu ergänzen, indem es der Verfälschung der Daten durch Langzeitkompensation vorbeugt.

Ob eine Herabregulation der *PKC $\alpha$*  gerade bei der Herzinsuffizienz langfristig günstig ist, ist zumindest diskussionswürdig. Das kranke Herz erfährt im Stadium der Herzinsuffizienz eine dauerhafte katecholaminerge Stimulation. Dient diese Reaktion initial als Kompensationsmechanismus, um die Pumpleistung des Herzens aufrecht zu erhalten, so führt sie im Verlauf zu einer  $\beta$ -adrenergen Desensitivierung. Über die daraus resultierenden chronisch hohen Calciumspiegel bleibt die *PKC $\alpha$*  ebenfalls länger aktiv und könnte so die progrediente Störung der Kontraktilität des insuffizienten Herzens tatsächlich verstärken.

Prinzipiell könnte der Teufelskreis der Herzinsuffizienz durchbrochen werden, indem man die Kontraktionskraft des Herzens wieder erhöht. Dies würde die dauerhafte adrenerge Stimulation herabsetzen und das Herz wieder sensitiver auf katecholaminerge Stimulation reagieren lassen. Tatsächlich wirkt sich ein Phospholamban-*knockout* im Mausmodell günstig auf die Entstehung einer Herzinsuffizienz aus (Haghighi et al. 2001). Das Fehlen von Phospholamban und die sich daraus ergebende chronische Aktivität der sarcoendoplasmatischen Reticulum-ATPase SERCAII wirkte sich im Mausmodell der DCM (bedingt durch das Fehlen des *Csrp3*-Gens) protektiv auf das gesamte Spektrum der molekularen, funktionalen und strukturellen Störungen aus, die das fehlende Gen sonst mit sich bringt (Minamisawa et al. 1999). Allerdings zeigten sich keine oder eher gegensätzlichen Effekte in anderen Kreuzungsversuchen (Armand and De Windt 2004). Auch die Übertragung aus Tierexperimenten auf den Menschen ist aber nicht immer möglich. Menschen, die durch einen Gendefekt eine funktionslose Mutante von Phospholamban exprimieren, versterben schon in jungem Alter an einer dilatativen Kardiomyopathie (Haghighi et al. 2003). Auch beim Menschen wurde versucht, mit positiv inotrop wirksamen Substanzen einen Therapieansatz für die chronische Herzinsuffizienz zu finden. Die meisten klinischen Studien diesbezüglich zeigten jedoch eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu Placebo (Packer et al. 1996).

Es bleibt also nach wie vor die Frage, ob eine positiv inotrope Stimulation günstige oder ungünstige langfristige Effekte nach sich zieht. Die weiter abwärts in der Signalkaskade gelegene positiv inotrop wirksame Ausschaltung weiterer Mediatoren wie  $PKC\alpha$ , aber auch die Aktivierung von PPI-1 hat zunächst, wie auch die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Daten zeigen, kurzfristig günstige Effekte. Diese Art der positiv inotropen Stimulation unterscheidet sich jedoch unter Umständen deutlich von der Stimulation, für die ungünstige klinische Daten vorliegen, da sie mit keiner Erhöhung des intrazellulären cAMP-Gehaltes einhergehen, was wiederum zu einer unüberschaubaren Aktivierung auch anderer Signalwege führt, die zum Beispiel auch zur pathologischen Hypertrophie beitragen können. Darüber hinaus kommt es im Vergleich zu klassischen positiv inotropen Substanzen mit intrazellulärer cAMP-Erhöhung hier offenbar zu keiner katecholaminergen Desensitivierung (Hambleton et al 2007). Eine moderate positive Inotropie könnte im Übrigen günstiger sein als die Effekte der zuvor klinisch erprobten stark wirksamen Inotropika.

Vorherige Untersuchungen zeigten, dass die akute pharmakologische Inhibierung von  $PKC\alpha$  durch ihre Inhibitoren Ro-32-0432 und Ro-31-8220 in *Csrp3 knockout*-Mäusen die kardiale Funktion wieder herstellen konnte (Hambleton et al. 2006). Da diese Substanzen aber keine vollständige Selektivität bezgl. der  $\alpha$ -Isoform aufwiesen, lässt sich der beobachtete Effekt nicht sicher auf die Inhibierung der  $PKC\alpha$  zurückführen.

Die derzeit verfügbaren pharmakologischen Inhibitoren der PKC $\alpha$  sind gerade auch durch ihre eingeschränkte Selektivität nicht ohne weiteres für den klinischen Einsatz geeignet. Andere Möglichkeiten der Inhibition der PKC $\alpha$  umfassen neuere Prinzipien wie viral vermittelten *knockdown* durch shRNA. Auch diese Verfahren sind jedoch nicht ohne Probleme. Ein adenoviral vermittelter shRNA-Transfer, wie in dieser Arbeit, lässt sich nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen. Neben zahlreichen anderen Faktoren stellt besonders die Aktivierung des inflammatorischen Systems die bedenklichste therapielimitierende Nebenwirkung bei der Anwendung von adenoviralen Vektoren am Menschen dar (Ritter et al. 2002). So sind Adenoviren bekanntermaßen stark hepatotoxisch (Fechner et al. 2008). Ein Effekt der transduzierten siRNA nimmt des weiteren 10 Tage nach Verabreichung der Viren bereits deutlich ab und gewährleistet daher keine kontinuierliche Inhibition der PKC $\alpha$  (Fechner et al. 2008).

Eine vielversprechende Alternative könnte allerdings eine siRNA-Transduktion durch adenoassoziierte Viren (AAV) darstellen (Whithead 2008). Der Effekt einer AAV-vermittelten Transduktion scheint nicht nur länger vorzuhalten, auch das Nebenwirkungsprofil ist offensichtlich deutlich günstiger. Adenoassoziierte Viren sind bei weitem weniger toxisch (Smith 2008). Mehr oder minder herzspezifische AAV-Subtypen steigern dabei die Spezifität der Therapie (Bish et al. 2008). Es gilt hierbei jedoch zu beachten, dass die viral vermittelte unkontrollierte Überexpression von shRNA in Zielzellen in einer Funktionseinschränkung von endogen exprimierten micro RNA-Molekülen (miRNA) resultieren kann (Grimm et al. 2006). Die mi-RNA vermittelte RNAi ist ein essentieller Bestandteil in der Transkriptionsregulation. So sollen etwa 20-30 % der Gene im menschlichen Genom einer Kontrolle durch miRNA unterliegen (Lewis et al. 2005). Dieses komplexe System kann durch die Sättigung der für RNAi verantwortlichen Proteine durch überexprimierte shRNA gestört werden (Grimm et al. 2006). Durch induzierbare oder gewebsspezifische RNA-Polymerasen II könnte in Zukunft hierbei das Risiko einer unbeabsichtigten miRNA-Inhibition umgangen werden (Xia et al. 2002).

## 5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz und ihre Komplikationen stellen eine der häufigsten Todesursachen in den westlichen Industrienationen dar. Trotz leitliniengerechter Pharmakotherapie liegt die 5-Jahres-Sterblichkeit noch immer bei etwa 50%. Die Suche nach neuen medikamentösen Angriffspunkten, gerade auch innerhalb der Kardiomyozyten selbst, ist daher heute ein Hauptgegenstand der Herz-Kreislaufforschung. Ein mögliches Arzneimittel-Target ist die zur Familie der Serin/Threoninkinasen gehörige Proteinkinase C alpha (PKC $\alpha$ ), die kürzlich als ein negativer Regulator der Kontraktionskraft identifiziert worden ist. Mittels transgener Technologie konnte gezeigt werden, dass das genetische Ausschalten der PKC $\alpha$  die bei der Herzinsuffizienz charakteristischerweise herabgesetzte Kontraktionskraft wiederherstellen kann. Da eine selektive pharmakologische Inhibition der PKC $\alpha$  derzeit noch nicht möglich ist, bietet sich der akute *knockdown* mittels RNA-Interferenz (RNAi) als vielversprechende Alternative an.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die prinzipielle Eignung eines RNAi-vermittelten spezifischen PKC $\alpha$  *knockdown* als potentiellen therapeutischen Ansatz zunächst auf zellulärer Ebene in isolierten Kardiomyozyten und rekonstituiertem Herzmuskelgewebe (EHT) zu untersuchen. Transfektion mit kurzen, chemisch synthetisierten siRNAs erwies sich in einer Serie von Experimenten als ungeeignet, da sich die Kardiomyozyten, wie viele andere post-mitotische Zellen, als nur unzureichend transfizierbar erwiesen. Um diese Limitation zu umgehen, wurde eine adenovirale Transduktionsmethode entwickelt. Hierzu wurde eine geeignete sh-RNA-Sequenz entworfen und in eine Expressionskassette unter der Kontrolle des menschlichen H1 RNA-Polymerase III-Promotors kloniert. Nach erfolgreicher Testung der *knockdown*-Effizienz der gegen PKC $\alpha$ -gerichteten sh-RNA und dem Vergleich mit einer *nonsense*-Sequenz als Negativkontrolle, wurden beide Expressionskassetten in ein adenovirales Expressionssystem eingefügt. Durch die bicistronische Coexpression von GFP konnte anhand der Epifluoreszenz mikroskopisch die Transduktionseffizienz in Kardiomyozyten beurteilt werden. Eine fluoreszenzmikroskopisch beobachtete Transduktionseffizienz von 100% ging mit einer 80%igen Herabregulation der PKC $\alpha$  auf mRNA-Ebene und einem 50%igen *knockdown* auf Proteinebene im Vergleich zur *nonsense*-Kontrolle einher. Zur funktionellen Analyse eines PKC $\alpha$  *knockdowns* wurden EHTs mit den entsprechenden Viren transduziert. Auch hier ließ sich eine nahezu vollständige Transduktionseffizienz mit einer Reduktion des PKC $\alpha$ -mRNA Gehaltes auf 60% beobachten. Diese Herabregulation ging mit einer gegenüber den mit dem Kontrollvirus transduzierten EHTs um 60% gesteigerten Kontraktionskraft einher. Dabei bestand eine signifikante negative Korrelation zwischen Kontraktilität und PKC $\alpha$ -mRNA-Gehalt in den EHTs. Diese

Beobachtungen unterstreichen also einen kausalen Zusammenhang zwischen dem zellulärem PKC $\alpha$ -Gehalt und der Kontraktionskraft der jeweiligen Kardiomyozyten.

Zusammenfassend bestätigt diese Arbeit zum einen den Zusammenhang zwischen PKC $\alpha$ -Proteinmenge und der Kontraktionskraft des Herzens. Zum anderen spricht sie für die prinzipielle Eignung eines durch RNAi vermittelten Protein-*knockdowns* als viel versprechender gentherapeutischer Ansatz. Darüber sprechen die Daten dafür, dass die Kombination aus adenoviral vermittelter shRNA-Transduktion und dem EHT-Modell ein geeignetes Modell zur Target-Validierung ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- Adams, JR, K. F. (2001) „New epidemiologic perspectives concerning mild-to-moderate heart failure. *Am J Med* 110 Suppl 7A: 6S-13S
- Aigner A (2007). Nonviral in vivo delivery of therapeutic small interfering RNAs *Curr Opin Mol Ther* 9: 345-52.
- Arber S, Hunter JJ, Ross J, Jr., Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard JC, Chien KR and Caroni P (1997). MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure *Cell* 88: 393-403.
- Armand AS and De Windt LJ (2004). Calcium cycling in heart failure: how the fast became too furious *Cardiovasc Res* 62: 439-41.
- Barton M and Yanagisawa M (2008). Endothelin: 20 years from discovery to therapy *Can J Physiol Pharmacol* 86: 485-98.
- Belin RJ, Sumandea MP, Allen EJ, Schoenfelt K, Wang H, Solaro RJ and de Tombe PP (2007). Augmented protein kinase C- $\alpha$ -induced myofilament protein phosphorylation contributes to myofilament dysfunction in experimental congestive heart failure *Circ Res* 101: 195-204.
- Bish LT, Morine K, Sleeper MM, Sanmiguel J, Wu D, Gao G, Wilson JM and Sweeney L (2008). AAV9 Provides Global Cardiac Gene Transfer Superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the Mouse and Rat *Hum Gene Ther*.
- Braz JC, Bueno OF, De Windt LJ and Molkenin JD (2002). PKC  $\alpha$  regulates the hypertrophic growth of cardiomyocytes through extracellular signal-regulated kinase1/2 (ERK1/2) *J Cell Biol* 156: 905-19.
- Braz JC, Gregory K, Pathak A, Zhao W, Kleivitsky 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, Molkenin JD (2004). PKC  $\alpha$  regulates cardiac contractility and propensity toward heart failure. *Nat. Med.* 10: 248-254
- Bristow MR (1993). Changes in myocardial and vascular receptors in heart failure *J Am Coll Cardiol* 22: 61A-71A.
- Brodde OE, Bruck H and Leineweber K (2006). Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance *J Pharmacol Sci* 100: 323-37.
- Brodde OE and Michel MC (1999). Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart *Pharmacol Rev* 51: 651-90.
- Brown JH, Buxton IL and Brunton LL (1985). Alpha 1-adrenergic and muscarinic cholinergic stimulation of phosphoinositide hydrolysis in adult rat cardiomyocytes *Circ Res* 57: 532-7.
- Brummelkamp TR, Bernards R and Agami R (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells *Science* 296: 550-3.

- Burkart EM, Sumandea MP, Kobayashi T, Nili M, Martin AF, Homsher E and Solaro RJ (2003). Phosphorylation or glutamic acid substitution at protein kinase C sites on cardiac troponin I differentially depress myofilament tension and shortening velocity *J Biol Chem* 278: 11265-72.
- Chiu YL and Rana TM (2002). RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA *Mol Cell* 10: 549-61.
- Churchill E, Budas G, Vallentin A, Koyanagi T and Mochly-Rosen D (2008). PKC isozymes in chronic cardiac disease: possible therapeutic targets? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 48: 569-99.
- Clackson T (2000). Regulated gene expression systems *Gene Ther* 7: 120-5.
- Corish P and Tyler-Smith C (1999). Attenuation of green fluorescent protein half-life in mammalian cells *Protein Eng* 12: 1035-40.
- Davidson B.L HSQ (2005). Viral Delivery of Recombinant Short Hairpin RNAs *Methods in Enzymology* 392.
- Davidson SM, Stephanou A and Latchman DS (2003). FLIP protects cardiomyocytes from apoptosis induced by simulated ischemia/reoxygenation, as demonstrated by short hairpin-induced (shRNA) silencing of FLIP mRNA *J Mol Cell Cardiol* 35: 1359-64.
- Deschenes I, Aroundas AA, Jones SP and Tomaselli GF (2008). Post-transcriptional gene silencing of KChIP2 and Navbeta1 in neonatal rat cardiac myocytes reveals a functional association between Na and Ito currents *J Mol Cell Cardiol* 45: 336-46.
- Djurovic S, Iversen N, Jeansson S, Hoover F and Christensen G (2004). Comparison of nonviral transfection and adeno-associated viral transduction on cardiomyocytes *Mol Biotechnol* 28: 21-32.
- Dorn GW, 2nd and Brown JH (1999). Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation *Trends Cardiovasc Med* 9: 26-34.
- Dosemeci A, Dhallan RS, Cohen NM, Lederer WJ and Rogers TB (1988). Phorbol ester increases calcium current and simulates the effects of angiotensin II on cultured neonatal rat heart myocytes *Circ Res* 62: 347-57.
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J and Eschenhagen T (2003). Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes *Faseb J* 17: 437-9.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K and Tuschl T (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells *Nature* 411: 494-8.
- Elbashir SM, Lendeckel W and Tuschl T (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs *Genes Dev* 15: 188-200.
- Eschenhagen T (2008). Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die *Nat Med* 14: 485-7.

- Fechner H, Sipo I, Westermann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, Kurreck J, Zeichhardt H, Muller O, Vetter R, Erdmann V, Tschöpe C and Poller W (2008). Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy *J Mol Med* 86: 987-97.
- Fire A (1999). RNA-triggered gene silencing *Trends Genet* 15: 358-63.
- Graham RM, Perez DM, Hwa J and Piascik MT (1996). alpha 1-adrenergic receptor subtypes. Molecular structure, function, and signaling *Circ Res* 78: 737-49.
- Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F and Kay MA (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways *Nature* 441: 537-41.
- Grimm M, Haas P, Willipinski-Stapelfeldt B, Zimmermann WH, Rau T, Pantel K, Weyand M and Eschenhagen T (2005). Key role of myosin light chain (MLC) kinase-mediated MLC2a phosphorylation in the alpha 1-adrenergic positive inotropic effect in human atrium *Cardiovasc Res* 65: 211-20.
- 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 and Kranias EG (2003). Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human *J Clin Invest* 111: 869-76.
- Haghighi K, Schmidt AG, Hoit BD, Brittsan AG, Yatani A, Lester JW, Zhai J, Kimura Y, Dorn GW, 2nd, MacLennan DH and Kranias EG (2001). Superinhibition of sarcoplasmic reticulum function by phospholamban induces cardiac contractile failure *J Biol Chem* 276: 24145-52.
- Hahn HS, Marreez Y, Odley A, Sterbling A, Yussman MG, Hilty KC, Bodi I, Liggett SB, Schwartz A and Dorn GW, 2nd (2003). Protein kinase Calpha negatively regulates systolic and diastolic function in pathological hypertrophy *Circ Res* 93: 1111-9.
- Haley B and Zamore PD (2004). Kinetic analysis of the RNAi enzyme complex *Nat Struct Mol Biol* 11: 599-606.
- Hambleton M, Hahn H, Pleger ST, Kuhn MC, Klevitsky R, Carr AN, Kimball TF, Hewett TE, Dorn GW, 2nd, Koch WJ and Molkentin JD (2006). Pharmacological- and gene therapy-based inhibition of protein kinase Calpha/beta enhances cardiac contractility and attenuates heart failure *Circulation* 114: 574-82.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW and Vogelstein B (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2509-14.
- Huang WY, Aramburu J, Douglas PS and Izumo S (2000). Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy *Nat Med* 6: 482-3.
- Inoue M, Kishimoto A, Takai Y and Nishizuka Y (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain *J Biol Chem* 252: 7610-6.

- Jahnel U, Jakob H and Nawrath H (1992). Electrophysiologic and inotropic effects of alpha-adrenoceptor stimulation in human isolated atrial heart muscle *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346: 82-7.
- Kasahara H and Aoki H (2005). Gene silencing using adenoviral RNAi vector in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes *Methods Mol Med* 112: 155-72.
- Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, Rivera J, Buttrick PM, Wittenberg BA, Cipriani L and Leinwand LA (1993). Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 11498-502.
- Kiefer K, Clement J, Garidel P and Peschka-Suss R (2004). Transfection efficiency and cytotoxicity of nonviral gene transfer reagents in human smooth muscle and endothelial cells *Pharm Res* 21: 1009-17.
- Kikkawa U, Kishimoto A and Nishizuka Y (1989). The protein kinase C family: heterogeneity and its implications *Annu Rev Biochem* 58: 31-44.
- Kim SH, Jeong JH, Ou M, Yockman JW, Kim SW and Bull DA (2008). Cardiomyocyte-targeted siRNA delivery by prostaglandin E(2)-Fas siRNA polyplexes formulated with reducible poly(amido amine) for preventing cardiomyocyte apoptosis *Biomaterials* 29: 4439-46.
- Kim WJ and Kim SW (2009). Efficient siRNA delivery with non-viral polymeric vehicles *Pharm Res* 26: 657-66.
- Kirshenbaum LA (1997). Adenovirus mediated-gene transfer into cardiomyocytes *Mol Cell Biochem* 172: 13-21.
- Krajcik R, Jung A, Hirsch A, Neuhuber W and Zolk O (2008). Functionalization of carbon nanotubes enables non-covalent binding and intracellular delivery of small interfering RNA for efficient knock-down of genes *Biochem Biophys Res Commun* 369: 595-602.
- Kramer BK, Smith TW and Kelly RA (1991). Endothelin and increased contractility in adult rat ventricular myocytes. Role of intracellular alkalosis induced by activation of the protein kinase C-dependent Na(+)-H+ exchanger *Circ Res* 68: 269-79.
- Laatsch A, Ragozin S, Grewal T, Beisiegel U and Joerg H (2004). Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) *Eur J Cell Biol* 83: 113-20.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227: 680-5.
- Lewis BP, Burge CB and Bartel DP (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets *Cell* 120: 15-20.
- Liao P, Wang SQ, Wang S, Zheng M, Zhang SJ, Cheng H, Wang Y and Xiao RP (2002). p38 Mitogen-activated protein kinase mediates a negative inotropic effect in cardiac myocytes *Circ Res* 90: 190-6.

- Lv H, Zhang S, Wang B, Cui S and Yan J (2006). Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery *J Control Release* 114: 100-9.
- MacGowan GA, Evans C, Hu TC, Debrah D, Mullet S, Chen HH, McTiernan CF, Stewart AF, Koretsky AP and Shroff SG (2004). Troponin I protein kinase C phosphorylation sites and ventricular function *Cardiovasc Res* 63: 245-55.
- McKay RA, Cummins LL, Graham MJ, Lesnik EA, Owens SR, Winniman M and Dean NM (1996). Enhanced activity of an antisense oligonucleotide targeting murine protein kinase C- $\alpha$  by the incorporation of 2'-O-propyl modifications *Nucleic Acids Res* 24: 411-7.
- Mearini G, Schlossarek S, Willis MS and Carrier L (2008). The ubiquitin-proteasome system in cardiac dysfunction *Biochim Biophys Acta* 1782: 749-63.
- Molkentin JD and Dorn GW, 2nd (2001). Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy *Annu Rev Physiol* 63: 391-426.
- Murphy S and Frishman WH (2005). Protein kinase C in cardiac disease and as a potential therapeutic target *Cardiol Rev* 13: 3-12.
- Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T and Zimmermann WH (2006). Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle *Circulation* 114: 172-8.
- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC and Watanabe AM (1991). Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart *Circ Res* 69: 1450-7.
- Ohki EC, Tilkins ML, Ciccarone VC and Price PJ (2001). Improving the transfection efficiency of post-mitotic neurons *J Neurosci Methods* 112: 95-9.
- Packer M, Bristow MR, Cohn JN, Colucci WS, Fowler MB, Gilbert EM and Shusterman NH (1996). 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* 334: 1349-55.
- Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ and Conklin DS (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells *Genes Dev* 16: 948-58.
- Paddison PJ, Caudy AA and Hannon GJ (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 1443-8.
- Parker JS, Roe SM and Barford D (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex *Nature* 434: 663-6.
- Parker JS, Roe SM and Barford D (2006). Molecular mechanism of target RNA transcript recognition by Argonaute-guide complexes *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 45-50.
- Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M and Levin ER (2005). Estrogen inhibits cardiomyocyte hypertrophy in vitro. Antagonism of calcineurin-related hypertrophy through induction of MCIP1 *J Biol Chem* 280: 26339-48.

- Purcell NH, Wilkins BJ, York A, Saba-El-Leil MK, Meloche S, Robbins J and Molkentin JD (2007). Genetic inhibition of cardiac ERK1/2 promotes stress-induced apoptosis and heart failure but has no effect on hypertrophy in vivo *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 14074-9.
- Rana TM (2007). Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 23-36.
- Rayburn ER and Zhang R (2008). Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible? *Drug Discov Today* 13: 513-21.
- Reyland ME (2009). Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death *Front Biosci* 14: 2386-99.
- Rinne A, Littwitz C, Kienitz MC, Gmerek A, Bosche LI, Pott L and Bender K (2006). Gene silencing in adult rat cardiac myocytes in vitro by adenovirus-mediated RNA interference *J Muscle Res Cell Motil* 27: 413-21.
- Ritter T, Lehmann M and Volk HD (2002). Improvements in gene therapy: averting the immune response to adenoviral vectors *BioDrugs* 16: 3-10.
- Rockman HA, Koch WJ and Lefkowitz RJ (2002). Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function *Nature* 415: 206-12.
- Roman BB, Goldspink PH, Spaite E, Urboniene D, McKinney R, Geenen DL, Solaro RJ and Buttrick PM (2004). Inhibition of PKC phosphorylation of cTnI improves cardiac performance in vivo *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H2089-95.
- Scherr M and Eder M (2007). Gene silencing by small regulatory RNAs in mammalian cells *Cell Cycle* 6: 444-9.
- Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH and Chien KR (1990). Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy *J Biol Chem* 265: 20555-62.
- Simoes S, Pires P, Duzgunes N and Pedrosa de Lima MC (1999). Cationic liposomes as gene transfer vectors: barriers to successful application in gene therapy *Curr Opin Mol Ther* 1: 147-57.
- Simonis G, Briem SK, Schoen SP, Bock M, Marquetant R and Strasser RH (2007). Protein kinase C in the human heart: differential regulation of the isoforms in aortic stenosis or dilated cardiomyopathy *Mol Cell Biochem* 305: 103-11.
- Simpson P (1983). Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response *J Clin Invest* 72: 732-8.
- Smith RH (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector *Gene Ther* 15: 817-22.
- Starling EH and Visscher MB (1927). The regulation of the energy output of the heart *J Physiol* 62: 243-61.

- Stewart S, MacIntyre K, Capewell S and McMurray JJ (2003). Heart failure and the aging population: an increasing burden in the 21st century? *Heart* 89: 49-53.
- Sumandea MP, Pyle WG, Kobayashi T, de Tombe PP and Solaro RJ (2003). Identification of a functionally critical protein kinase C phosphorylation residue of cardiac troponin T *J Biol Chem* 278: 35135-44.
- Sumbilla C, Cavagna M, Zhong L, Ma H, Lewis D, Farrance I and Inesi G (1999). Comparison of SERCA1 and SERCA2a expressed in COS-1 cells and cardiac myocytes *Am J Physiol* 277: H2381-91.
- Svoboda P (2007). Off-targeting and other non-specific effects of RNAi experiments in mammalian cells *Curr Opin Mol Ther* 9: 248-57.
- Tabara H, Sarkissian M, Kelly WG, Fleenor J, Grishok A, Timmons L, Fire A and Mello CC (1999). The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans* *Cell* 99: 123-32.
- Tijsterman M and Plasterk RH (2004). Dicers at RISC; the mechanism of RNAi *Cell* 117: 1-3.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP and Sharp PA (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro *Genes Dev* 13: 3191-7.
- Whitehead KA, Langer R and Anderson DG (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery *Nat Rev Drug Discov* 8: 129-38.
- Williams BR (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation *Biochem Soc Trans* 25: 509-13.
- Wullner U, Neef I, Tur MK and Barth S (2009). Targeted delivery of short interfering RNAs--strategies for in vivo delivery *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 4: 1-8.
- Xia H, Mao Q, Paulson HL and Davidson BL (2002). siRNA-mediated gene silencing in vitro and in vivo *Nat Biotechnol* 20: 1006-10.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA and Bartel DP (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals *Cell* 101: 25-33.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E and Filipowicz W (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III *Cell* 118: 57-68.
- Zhang W, Anger T, Su J, Hao J, Xu X, Zhu M, Gach A, Cui L, Liao R and Mende U (2006). Selective loss of fine tuning of Gq/11 signaling by RGS2 protein exacerbates cardiomyocyte hypertrophy *J Biol Chem* 281: 5811-20.
- Zimmermann TS, Lee AC, Akinc A, Bramlage B, Bumcrot D, Fedoruk MN, Harborth J, Heyes JA, Jeffs LB, John M, Judge AD, Lam K, McClintock K, Nechev LV, Palmer LR, Racie T, Rohl I, Seiffert S, Shanmugam S, Sood V, Soutschek J, Toudjarska I, Wheat AJ, Yaworski E, Zedalis W, Koteliansky V, Manoharan M, Vornlocher HP and MacLachlan I (2006). RNAi-mediated gene silencing in non-human primates *Nature* 441: 111-4.
- Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J and Eschenhagen T (2000). Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes *Biotechnol Bioeng* 68: 106-14.

Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, Didie M, Munzel F, Heubach JF, Kostin S, Neuhuber WL and Eschenhagen T (2002). Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct *Circ Res* 90: 223-30.

Wesentliche Teile dieser Arbeit wurden 2007 im „Journal of Molecular and Cellular Cardiology“ veröffentlicht:

Titel: „Adenovirus-delivered short hairpin RNA targeting PKC alpha improves contractile function in reconstituted heart tissue“

Ali El-Armouche, Jasmin Singh, Hiroshi Naito, Katrin Wittköpper, Michael Didié, Wolfram-Hubertus Zimmermann, Thomas Eschenhagen

Journal of Molecular and Cellular Cardiology 43 (2007) 371–376

## 7 Danksagung

Zunächst möchte ich Prof. Dr. med. Thomas Eschenhagen für die Überlassung einer so vielseitigen und interessanten Aufgabenstellung danken.

Desweiteren danke ich Herrn PD. Dr. Ali El-Armouche für die stets freundliche und herzliche Betreuung. Das sehr familiäre Verhältnis zu ihm hat die Zusammenarbeit sehr angenehm gemacht.

Ein großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe El-Armouche. Jutta Starbatty, als Technische Assistentin, hat mich anfangs mit Geduld und Freude mit den Basislaborarbeiten vertraut gemacht. Auch im Laufe der experimentellen Arbeiten war sie stets eine große Hilfe und Unterstützung.

Florian Weinberger, als Mitdoktorand und guter Freund, hat mir in vielen Momenten der Resignation Kraft und Motivation gegeben. Christiane Neuber, die ich hier als eine liebe, zuverlässige Freundin gewinnen durfte und die ich auch in Zukunft nicht mehr missen möchte.

Mein größter Dank geht an Justus Stenzig. Dank seiner moralischen Unterstützung während der Zeit der schriftlichen Abfassung und der unzähligen Korrekturlesungen ist diese Arbeit erst möglich geworden. Justus einen Freund fürs Leben nennen zu können ist für mich eine große Ehre und ich hoffe, dass wir uns auch in Zukunft weiterhin so gut verstehen werden.

Schlußendlich bedanke ich mich ganz herzlich und mit viel Liebe bei meinen Eltern, Surjit und Hyunja Singh, für die Ermöglichung des Studiums sowie meiner Schwester Anju Singh. Sie haben mich in jeder schwierigen Situation unterstützt und standen mir in den vielen Entscheidungsfragen während des Studiums stets bei. Von den wissenschaftlichen Diskussionen mit meinem Vater konnte ich oftmals profitieren und dadurch so manche Schwierigkeiten im Labor überwinden. Für ihr unerschütterliches Vertrauen und ihre grenzenlose Liebe bin ich meinen Eltern endlos dankbar.

## 8 Lebenslauf

Name Jasmin Maya Annabel Singh  
Geburtsdatum 03 Mai 1981  
Eltern Surjit Singh und Hyunja Singh, geborene Chung

### Schulbildung

1987-1991 Grundschule Schottmüllerstrasse, Hamburg  
1991-2000 Gymnasium Eppendorf, Hamburg  
07/2000 Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

2001-2008 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg  
03/2003 Physikum  
2002-2004 Zusatzqualifikation „Grundlagen der Molekularen Medizin“  
06/2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
11/2008 Approbation

### Berufstätigkeit

Seit 11/2008 Assistenzärztin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf,  
Institut für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie

## 9 Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen nicht benutzt und die aus den Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Desweiteren habe ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben.