

Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie
(Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen)
Zentrum für Experimentelle Medizin
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

**Etablierung eines kardialen Langzeitgentransfers zur
Abschaltung des Phosphatase-Inhibitors-1 mittels
Adeno-assoziiierter Virus-Vektoren auf Basis von RNA-Interferenz**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
vorgelegt im Department Chemie der Fakultät für
Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
der Universität Hamburg

von
Christiane Neuber

Hamburg, April 2011

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

Tag der Disputation: 08. Juli 2011

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Herzinsuffizienz	1
1.2	Regulation der Herzfunktion	3
1.2.1	Die kardiale β -adrenerge Signalkaskade	3
1.2.2	Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	6
1.2.3	Serin/Threonin Protein-Phosphatasen	7
1.2.4	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1	8
1.2.5	β -Blocker in der Therapie der Herzinsuffizienz	11
1.3	RNA-Interferenz	12
1.3.1	Mechanismus	13
1.3.2	Experimentelle Voraussetzungen	15
1.3.3	Einsatz von RNAi	16
1.4	Adeno-assoziierte Viren	19
1.4.1	Vorkommen und Eigenschaften	19
1.4.2	Genomstruktur, Transkription und Translation	20
1.4.3	Latenter und produktiver Lebenszyklus	22
1.4.4	Replikation	23
1.4.5	Rekombinante AAV (rAAV) als Vektoren für die Gentherapie	25
1.5	Zielsetzung	28
2	Material und Methoden	30
2.1	Klonierung	30
2.1.1	Plasmidvektoren	30
2.1.2	Restriktionsverdau	30
2.1.3	Gelaufreinigung von DNA	30
2.1.4	Ligation	30
2.1.5	Herstellung von LB- Medium und Agarplatten	31
2.1.6	Herstellung chemisch-kompetenter E. coli	31
2.1.7	Transformation von E. coli durch Hitzeschock	32
2.1.8	Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation	32
2.1.9	Mini-Plasmidpräparation	32
2.1.10	Maxi-Plasmidpräparation	33

2.1.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	33
2.1.12	Klassische PCR (<i>polymerase chain reaction</i>)	34
2.1.13	Gelelektrophorese	35
2.1.14	DNA-Sequenzierung	36
2.1.15	Isolation zellulärer DNA	36
2.2	Zellkultur	36
2.2.1	Adhärente Zellen	36
2.2.1.1	Erhaltungskultur adhärenter Zellen	37
2.2.1.2	Stammkulturen	38
2.2.1.3	Transfektion	38
2.2.1.4	Selektion	38
2.2.1.5	Behandlung der Zellen mit Cycloheximid	39
2.2.2	Zellpräparation neonataler Rattenkardiomyozyten (nRKM)	39
2.2.2.1	Tierhaltung	39
2.2.2.2	Organentnahme	39
2.2.2.3	Enzymatischer Gewebeaufschluss	40
2.2.2.4	Neonatale Rattenkardiomyozyten in Monolayerkultur	42
2.2.2.5	Herstellung und Kultivierung von FBMEs im 24-Well Maßstab	43
2.2.3	Zellpräparation neonataler Mäusekardiomyozyten (nMKM)	46
2.2.3.1	Tierhaltung und Organentnahme	46
2.2.3.2	Enzymatischer Gewebeaufschluss	46
2.2.3.3	Neonatale Mauskardiomyozyten in Monolayerkultur	48
2.3	Erfassung der Kontraktionsdaten	49
2.3.1	Video-optische Messmethode	49
2.3.2	Funktionelle Analyse mittels <i>IonOptix</i>	50
2.3.2.1	Experimenteller Aufbau	51
2.3.2.2	Prinzip der Messung der Verkürzung	52
2.4	shRNA Konstruktion	54
2.4.1	siRNA Design	54
2.4.2	shRNA Generierung	56
2.4.2.1	Design und Herstellung der shRNA-Oligodeoxynukleotide	57
2.4.2.2	Klonierung des pALsh	58
2.5	Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren	59

2.5.1	Virale Expressionsvektoren	59
2.5.2	Virusproduktion, Virusaufreinigung und Virustitration	59
2.5.3	Virustransduktion <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	61
2.5.3.1	Transduktion von KM und FBMEs mit rAAV	61
2.5.3.2	<i>In vivo</i> Gentransfer	61
2.6	Proteinanalytische Methoden	62
2.6.1	Methoden zur Proteinextraktion	62
2.6.1.1	Proteinextraktion aus Monolayer-Zellkulturen	62
2.6.1.2	Homogenate für Western Blot Analysen	62
2.6.1.3	Membranpräparation aus Zellen zur β -Adrenozeptorenmessung	62
2.6.2	Proteinbestimmung nach Bradford	63
2.6.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	63
2.6.4	Western Blot Analyse	65
2.6.5	Bestimmung der β -Adrenozeptorendichte	66
2.7	RNA-Analysen	67
2.7.1	Isolation von RNA	67
2.7.2	Reverse Transkription	67
2.7.3	Quantitative RT-PCR	67
2.7.4	Northern Blot Analyse zum Nachweis kleiner RNAs	69
2.7.5	Genexpressionsanalyse mittels eines DNA-Mikroarrays	71
2.8	Histologische Untersuchungen	72
2.8.1	Fixierung von Gewebeschnitten, Zellen und FBMEs	72
2.8.2	Immunhistologische Färbungen	72
2.8.2.1	Färbeprotokoll von Gefrierschnitten und fixierten Zellen	72
2.8.2.2	Färbeprotokoll von FBMEs	73
2.8.3	Gefriereinbettung für Gefrierschnitte	73
2.8.4	Konfokale Lasermikroskopie	74
2.9	Physiologische Methoden	74
2.9.1	Echokardiographie	74
2.10	Statistische Auswertung	76
2.10.1	Statistische und bioinformatische Analyse des Mikroarrays	77

3	Ergebnisse	78
3.1	Etablierung der stabilen Zelllinien	78
3.1.1	Klonierung der Transfektionsvektoren	78
3.1.2	Transfektion und Selektion	80
3.1.3	Überprüfung der Stabilität der Zelllinien	81
3.2	Evaluierung der Zielsequenzen für die selektive Hemmung von Inhibitor-1 und β_1 -Adrenozeptor	82
3.2.1	Transfektionseffizienz von siRNA in HEK293 Zellen	82
3.2.2	Halbwertszeit von Inhibitor-1 in Kardiomyozyten	85
3.2.3	Quantifizierung des Inhibitor-1 und β_1 -AR <i>Knockdowns</i> auf mRNA-Ebene nach Transfektion von siRNA	86
3.2.4	Quantifizierung des Inhibitor-1 <i>Knockdowns</i> auf Proteinebene	87
3.3	Stabile intrazelluläre Expression von Inhibitor-1/ β_1 -AR short hairpin RNA88	
3.3.1	Quantifizierung des Inhibitor-1 und β_1 -AR <i>Knockdowns</i> auf mRNA-Ebene nach Transfektion mit shRNA-Expressionsvektoren	89
3.3.2	Quantifizierung des Inhibitor-1 und β_1 -AR <i>Knockdowns</i> auf Proteinebene nach Transfektion mit shRNA-Expressionsvektoren	90
3.4	Konstruktion und Produktion der AAV-shRNA-Vektorplasmide	92
3.4.1	Überprüfung der Funktionalität der AAV-shRNA-Vektorplasmide	93
3.5	Produktion und Titrierung der rAAV-shRNA-Vektoren	94
3.6	Virustransduktion <i>in vitro</i> mit rAAV6-shRNA-Vektoren	95
3.6.1	Virustransduktion von HEK293 Zellen	95
3.6.1.1	Quantifizierung des <i>Knockdowns</i> durch rAAV6-shRNA-Vektoren	96
3.6.1.2	Qualitative Analyse der shRNA-Expression im Northern Blot	98
3.6.2	Virustransduktion von nRKM	98
3.7	Virustransduktion von künstlichem Herzmuskelgewebe	100
3.7.1	Transduktionseffizienz der rAAV6-shRNA-Vektoren in FBMEs	100
3.7.2	Quantifizierung des β_1 -AR <i>Knockdowns</i> in FBMEs	102
3.7.3	Funktionelle Analyse der FBMEs nach Virustransduktion	102
3.7.3.1	Funktionelle Analyse der FBMEs (video-optisches Meßsystem)	103
3.7.3.1.1	Grundcharakterisierung	103
3.7.3.1.2	Pharmakologische Ansprechbarkeit	106

3.7.3.2	Funktionelle Analyse der FBMEs mittels <i>IonOptix</i> -System	108
3.7.3.2.1	Grundcharakterisierung	108
3.7.3.2.2	Charakterisierung des β_1 -AR <i>Knockdowns</i> in FBMEs	110
3.7.4	Genexpressionsanalyse der FBMEs mittels DNA-Mikroarray	112
3.8	<i>In vivo</i> Gentransfer von rAAV9	114
3.8.1	Effizienz und Herzselektivität von AAV9-CMV-MLC ₂₆₀ -eGFP	114
3.8.2	<i>In vivo</i> Gentransfer von rAAV9-H1-shRNA-CMV-eGFP	116
3.8.2.1	Transduktionseffizienz der rAAV9-shRNA-Vektoren <i>in vivo</i>	117
3.8.2.2	Kardiale Transduktion durch rAAV9-shRNA-Vektoren	118
3.8.2.3	Quantitative Analyse der Vektorgenome	119
3.8.2.4	Quantifizierung des Inhibitor-1 und β_1 -AR <i>Knockdowns</i> auf mRNA-Ebene	120
3.8.2.4.1	Fehlende Downregulation des β_1 -AR	120
3.8.2.5	Echokardiographie	122
3.8.2.6	Western Blot Analyse von Effektorproteinen	123
4	Diskussion	125
4.1	Vorarbeiten und methodische Aspekte	126
4.1.1	Stabile Übertragung des Inhibitor-1- bzw. des β_1 -AR in HEK293 Zellen und Halbwertszeit von Inhibitor-1 in Kardiomyozyten	126
4.2	Evaluierung der Zielsequenzen <i>in vitro</i>	127
4.2.1	Charakterisierung der siRNAs	127
4.2.2	Charakterisierung der shRNA-Expressionsvektoren	128
4.2.3	Charakterisierung von rAAV6-shRNA-Vektoren in den stabilen Zelllinien und neonatalen Kardiomyozyten	131
4.2.4	<i>Off-target</i> Effekte und Spezifität der si/shRNAs allgemein	133
4.2.5	Einfluss von GFP auf die shRNA-Expression	134
4.2.6	Einfluss der Spezies auf den <i>Knockdown</i>	136
4.3	Charakterisierung von AAV6-sh β_1 -AR-Vektoren im FBME-Modell	138
4.3.1	Virustransduktion und <i>Knockdown</i> -Effizienz von AAV6-sh β_1 -AR	139
4.3.2	Reifung und Entwicklung der FBMEs	139
4.3.3	Effekte der β_1 -AR Downregulation im FBME-Modell	140
4.3.3.1	Basale Charakterisierung und β -adrenerge Stimulation	140

4.3.3.2	Genexpressionsanalyse	142
4.4	Anwendung von rAAV9-Vektoren <i>in vivo</i>	145
4.4.1	Transduktionseffizienz von rAAV9	145
4.4.2	AAV9- <i>Knockdown</i> -Effizienz und Effekte der Inhibitor-1 Downregulation <i>in vivo</i>	148
4.5	Ausblick	150
5	Zusammenfassung	153
6	Summary	155
7	Literaturverzeichnis	157
8	Lebenslauf	170
9	Veröffentlichungen	171
9.1	Originalarbeiten	171
9.2	Kongressbeiträge	171
10	Eidesstattliche Erklärung	172
11	Danksagung	173
12	Anhang	175
12.1	Abkürzungsverzeichnis	175
12.2	R- und S-Sätze	178
12.3	Material	182
12.3.1	Substanzen	182
12.3.2	Antikörper	186
12.3.3	Primer und Sonden	187
12.3.4	Enzyme	189
12.3.5	Übersicht über verwendete Bakterien, Zellstämme und Plasmide	190
12.4	Hilfsmittel und Geräte	191
12.5	Genexpressionsanalyse	193

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Erkrankungen des Herz-/Kreislaufsystems sind in Deutschland immer noch die häufigste Todesursache. Auch im Jahr 2008 konnte fast jeder zweite Todesfall (42%; 148 452 Männer und 208 277 Frauen) auf eine kardiovaskuläre Erkrankung zurückgeführt werden, wobei 92% der Verstorbenen älter als 65 Jahre waren (Statistisches Bundesamt). An erster Stelle stehen chronisch ischämische Herzerkrankungen (9%), gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (7%) und der Herzinsuffizienz (6%). Die Ursache für die Häufigkeit dieser Erkrankungen mit zunehmendem Alter liegt vor allem in der steigenden Lebenserwartung der Bevölkerung (Kannel und Belanger 1991). Die Prognose bei Herzinsuffizienz ist sehr schlecht (Bouvy et al. 2003) und verschlechtert sich dabei weiter mit dem Lebensalter (MacIntyre et al. 2000).

Die Herzinsuffizienz stellt ein klinisches Syndrom dar und wird definiert als die Unfähigkeit des Herzens, den Körper ausreichend mit Blut und mit genügend Sauerstoff zu versorgen, um den Stoffwechsel unter Ruhe- wie unter Belastungsbedingungen zu gewährleisten (WHO 2005). Die klinischen Symptome sind Atemnot, Belastungsintoleranz und Flüssigkeitsretention. Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ist komplex und vielschichtig, sie ist die Folge einer Vielzahl von Grunderkrankungen, wie der koronaren Herzkrankheit, der arteriellen Hypertonie, primären und toxischen Kardiomyopathien sowie von verschiedenen Herzklappenerkrankungen. Initial führt die Schädigung bzw. der Verlust von funktionsfähigem Myokard zur Verminderung der Pumpleistung und zu einer daraus resultierenden Blutdrucksenkung. Kompensatorisch kommt es zu einer lokalen und systemischen neuroendokrinen Aktivierung, durch die eine ausreichende Durchblutung der Organe gewährleistet werden soll. Gleichzeitig wird dadurch das verbleibende Myokard stärker belastet, weshalb die Herzleistung weiter beeinträchtigt wird (Abbildung 1.1). Die dauerhafte kompensatorische Stimulation des sympathischen Nervensystems führt über funktionelle Veränderungen des Herzens (β -adrenerge Desensitivierung, Arrhythmien) und morphologische Umbauprozesse (Fibrose, Wandverdickung,

Kardiomyozytenhypertrophie) zur Verschlechterung der kardialen Pumpleistung und steht damit im Mittelpunkt eines *Circulus vitiosus* in der Herzinsuffizienz (Eschenhagen 2008).

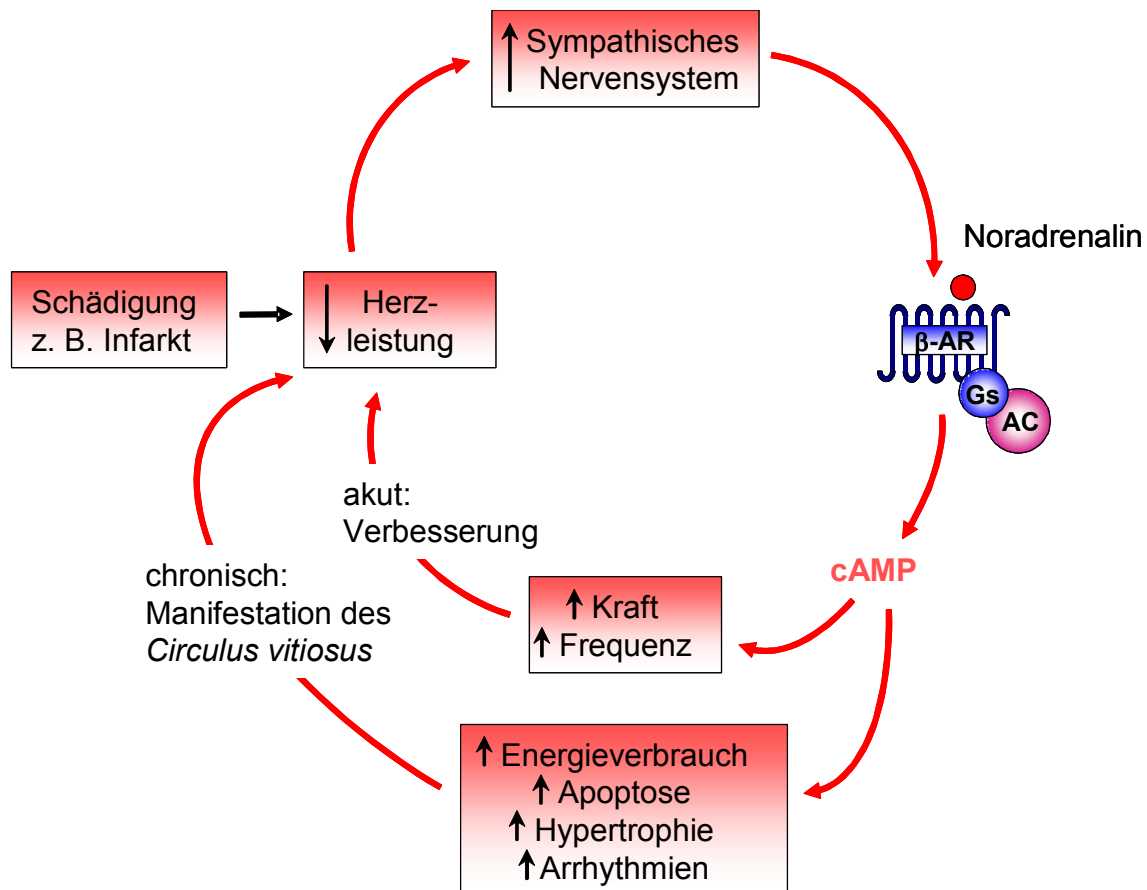


Abbildung 1.1 *Circulus vitiosus* der Herzinsuffizienz: Kardiale Schädigungen unterschiedlicher Genese führen zu einer verminderten Pumpleistung des Herzens. Der Körper reagiert mit einer Aktivierung des Sympathischen Nervensystems, was u. a. in einer Ausschüttung von Noradrenalin resultiert. Durch eine Steigerung der Kontraktionskraft und Frequenz führt Noradrenalin kurzfristig zu einer Verbesserung der eingeschränkten Auswurfsleistung des Herzens. Langfristig, bei Fortbestehen der insuffizienten Pumpleistung, wirkt sich die dauerhafte Stimulation des Sympathikus jedoch 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 (Abbildung nach Eschenhagen 2008).

Das Ziel der adäquaten Pharmakotherapie ist es, das Fortschreiten der Erkrankung zu verhindern und die Prognose der Patienten zu verbessern, indem man hemmend auf das aktivierte sympathische bzw. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System wirkt. Durch die neurohumorale Blockade soll eine Entlastung

des Myokards erreicht werden. Es kommen ACE-Hemmer, β -Adrenozeptor-Blocker, Diuretika, Aldosteron-Antagonisten und Herzglykoside zum Einsatz (Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie). In mehreren klinischen Studien konnte für diese Medikamente die Linderung der Symptomatik, die Verbesserung der Lebensqualität und die Senkung der Letalität beschrieben werden, u. a. für die Substanzklasse der ACE-Hemmer durch die SOLVD-Studie (1991), sowie CIBIS (1999a), MERIT (1999b) und COPENICUS (Packer et al. 2002) für die Antagonisten der adrenergen β -Rezeptoren. Dem entgegen erwiesen sich die Substanzklassen der Phosphodiesterase-Inhibitoren und der β -Sympathomimetika als unwirksam oder sogar schädlich (Packer et al. 1991). Trotz vieler neuer und optimierter Therapieansätze liegt die 5-Jahres-Überlebensrate immer noch nur bei etwa 50%.

1.2 Regulation der Herzfunktion

Das menschliche Herz schlägt im Ruhezustand etwa 60-80 Mal pro Minute und stellt dadurch die Durchblutung aller Organe sicher. Die Herzfunktion/-Leistung kann durch eine Vielzahl von regulatorischen Mechanismen, wie dem Frank-Starling-Mechanismus (Starling und Viesscher, 1927), dem Bowditch-Effekt (Bowditch 1871) und dem vegetativen Nervensystem an den aktuellen Bedarf, entsprechend der körperlichen Belastung, angepasst und reguliert werden. Der größte Teil der Kontraktilitätszunahme wird durch das sympathische Nervensystem gesteuert.

1.2.1 Die kardiale β -adrenerge Signalkaskade

Die physiologische Stimulation des Sympathikus vermittelt die Ausschüttung der Neurotransmitter Noradrenalin und Adrenalin, die zur Aktivierung der β -Adrenozeptoren (β -AR) und somit zur Steigerung der Kontraktilitätskraft (positiv inotrop), der Herzfrequenz (positiv chronotrop), der Relaxationsgeschwindigkeit (positiv lusitrop) und der Erregungsüberleitung (positiv dromotrop) führen. Im Herzen werden 3 Subtypen von β -AR unterschieden, wobei die kardiale Stimulation hauptsächlich über die β_1 - und β_2 -AR erfolgt (Brodde und Michel 1999; Rockman et al. 2002). Sie sind die dominant exprimierten Isoformen, das Verhältnis zwischen β_1 - und β_2 -AR im menschlichen Herzen beträgt 70:30. Zwar

konnte auch die kardiale Expression einer β_3 -AR Isoform nachgewiesen werden, deren funktionelle Bedeutung blieb jedoch bisher unklar (Heubach et al. 2002; Brodde et al. 2006).

β -Adrenozeptoren gehören zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPGR). Im Falle der Stimulation der β_1 -AR (Abbildung 1.2) führt ein stimulierendes G-Protein (Gs) zur Aktivierung der membranständigen Adenylzyklase, welche wiederum die Bildung des sekundären Botenstoffes zyklisches Adenosin-3'-5'-Monophosphat (cAMP) katalysiert. Die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A führt folglich zur Phosphorylierung wichtiger Regulatorproteine, die im Zusammenwirken maßgeblich die Steigerung der Herzfunktion vermitteln (Rapundalo 1998; Bers 2002; El-Armouche und Eschenhagen 2008). So kommt es durch die Phosphorylierung des spannungsabhängigen Calciumkanals (L-Typ-Calciumkanal), des Ryanidinrezeptors (RyR2) und von Phospholamban (PLB) zur Erhöhung der intrazellulären Calciumkonzentration bzw. zur schnelleren Wiederaufnahme von Calcium ins sarkoplasmatische Retikulum (SR). PLB ist direkt am SR lokalisiert und ist dort das wichtigste Regulatorprotein der SR-Calcium-ATPase (SERCA2a). In Abhängigkeit des Phosphorylierungszustandes bindet PLB an die SERCA2a und beeinflusst darüber deren Aktivität. Im unphosphorylierten Zustand bindet PLB an die SERCA und hemmt durch Abnahme der Calciumaffinität deren Aktivität. Die PKA-abhängige Phosphorylierung von PLB^{Serin16} dagegen führt zur Aufhebung des hemmenden Effektes, indem die Calciumaffinität der SERCA2a steigt und damit auch ihre Aktivität. Durch die steigende intrazelluläre Calciumkonzentration während der Systole kommt es außerdem zur Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase (CaMKII), die ihrerseits die Phosphorylierung von PLB^{Threonin17} zur Folge hat (Maier und Bers 2002). Dadurch wird die SERCA2a-Aktivität zusätzlich erhöht (Simmerman und Jones 1998). Beide Phosphorylierungen führen über eine gesteigerte Calciumaufnahme in das SR zu einer schnelleren Relaxation und einer erhöhten Beladung des SRs mit Calcium, sodass in der nächsten Systole mehr Calcium freigesetzt werden kann. Ein erhöhter Calciumeinstrom und die Steigerung der Kontraktionskraft sind die Konsequenz (Luo et al. 1994; MacLennan und Kranias 2003). Die PKA-vermittelte Phosphorylierung der

kardialen Myofilamente Troponin-Inhibitor^{Serin23/24} (cTnI) und Myosinbindendes Protein C^{Serin282} (cMyBP-C) verringert die myofibrilläre Calciumsensitivität und beschleunigt darüber die Relaxation (Kobayashi und Solaro 2005; Carrier 2007). Ein weiteres Effektorprotein der PKA ist Phospholemman (PLM), die inhibierende Untereinheit der Natrium/Kalium-ATPase (Na⁺/K⁺-ATPase) (Despa et al. 2005). In seiner phosphorylierten Form wird der inhibierende Einfluss auf die Na⁺/K⁺-ATPase aufgehoben. Die Hyperpolarisations-aktivierten Ionenkanäle (*hyperpolarisation activated cyclic nucleotide gated*, HCN) werden durch eine Membranhyperpolarisation aktiviert und durch cAMP gesteuert (Biel et al. 2002). Sie führen über einen erhöhten Natriumeinstrom zu einer beschleunigten Depolarisation (positiv chronotrop).

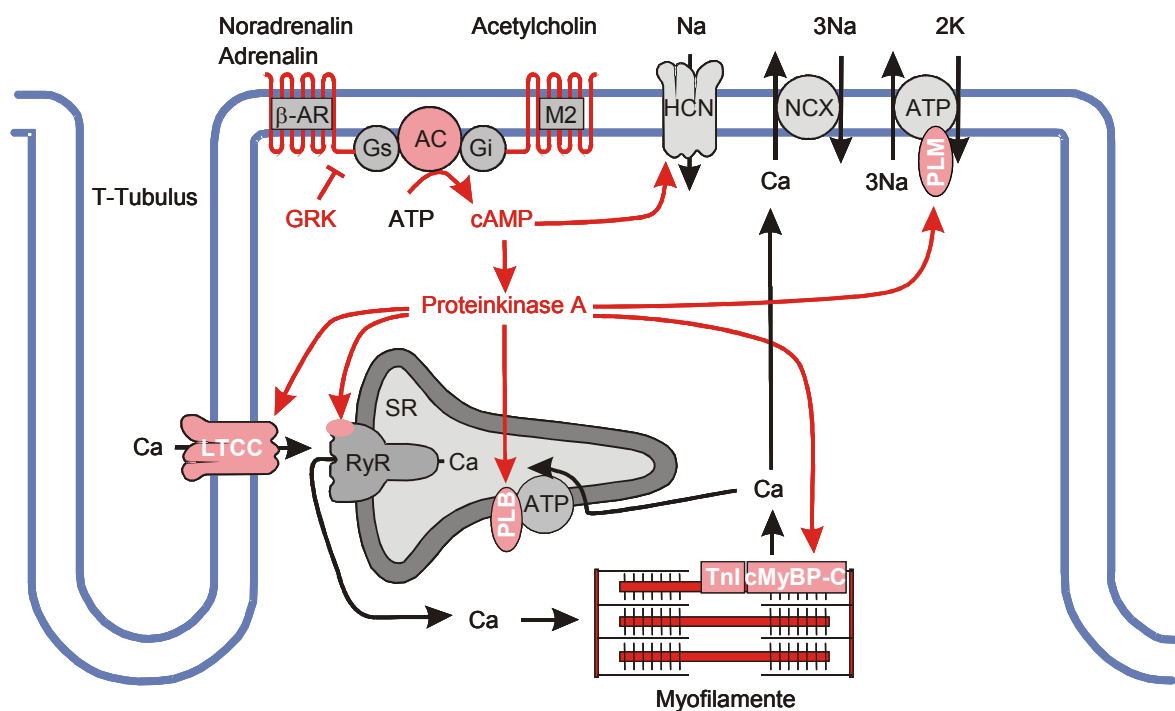


Abbildung 1.2 Kardiale β-adrenerge Signalkaskade (El-Armouche und Eschenhagen 2008). T-Tubulus bezeichnet den transversalen Tubulus; LTCC den L-Typ-Calciumkanal; β-AR die β-Adrenozeptoren; M2, M2-Cholinrezeptoren; Gs, stimulierendes G-Protein, Gi, inhibitorisches G-Protein; AC, Adenylzyklase; HCN, Hyperpolarisations-aktivierter Kationenkanal; NCX, Natrium-Calcium-Austauscher; ATP, sarkolemmale Na⁺/K⁺-ATPase oder sarkoplasmatisches Retikulum SR-Calcium-ATPase; PLM, Phospholemman, RyR, Ryanidinrezeptor; PLB, Phospholamban; GRK, G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase; TnI, Troponin Inhibitor; cMyBP-C, kardiales Myosinbindendes Protein C.

Das Gleichgewicht des cAMP/PKA-Signalweges wird einerseits durch cAMP-abbauende Phosphodiesterasen (PDE) und andererseits durch Protein-Phosphatasen (PP) (Kapitel 1.2.3) aufrecht erhalten (Herzig und Neumann 2000; Cohen 2002; Mansuy und Shenolikar 2006). Die Phosphorylierung wichtiger Phosphoproteine wird demnach nicht allein durch die Aktivität der entsprechenden Proteinkinase, sondern ebenso durch die Hemmung der zugehörigen Protein-Phosphatase reguliert. PP setzen sich neben katalytischen zusätzlich aus verschiedenen regulatorischen Untereinheiten zusammen. Eine regulatorische Untereinheit der kardial dominanten PP1 ist der Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 (Inhibitor-1), der selbst PKA-abhängig phosphoryliert und dadurch aktiviert wird (Kapitel 1.2.4).

1.2.2 Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Wie zuvor beschrieben (Kapitel 1.1) ist die chronische Herzinsuffizienz geprägt durch einen dauerhaft erhöhten Sympathikotonus, welcher zu einer verstärkten Katecholaminfreisetzung und somit zur permanenten Stimulation der Adrenozeptoren führt. Im weiteren Krankheitsverlauf kommt es zu einer β -adrenergen Desensitivierung gegenüber der Ansprechbarkeit auf Katecholamine und resultierend nimmt die Herzleistung weiter ab (Port und Bristow 2001; Lohse et al. 2003). Die Desensitivierung der β -adrenergen Signalkaskade geht einher mit einer Downregulation der β_1 -AR, wobei die Abnahme der mRNA-Menge (ca. 50%) mit dem Schweregrad der Erkrankung korreliert (Bristow et al. 1982; Engelhardt et al. 1996). Die Ursache hierfür liegt wahrscheinlich in einer erhöhten β -adrenergen Rezeptorkinaseaktivität (Ungerer et al. 1993), die zur Entkopplung der β_1 -AR von den Gs-Proteinen führt. Des Weiteren kommt es zu einer gesteigerten Expression inhibitorischer G-Proteine (Neumann et al. 1988; Bohm et al. 1990; Eschenhagen et al. 1992). Andererseits ist sowohl die Proteinmenge als auch die Phosphorylierung des Inhibitor-1 vermindert (EI-Armouche et al. 2003; EI-Armouche et al. 2004), wodurch die ebenfalls gesteigerte PP1-Aktivität am SR (Neumann et al. 1997) mit entsprechender PLB-Minderphosphorylierung (MacDougall et al. 1991) erklärt werden könnten. Die Störungen der β -adrenergen Signaltransduktion umfassen überwiegend Veränderungen (Phosphorylierungszustand, Proteinmenge) der PKA-Substrate, die an der

Aufrechterhaltung des Calciumhaushaltes beteiligt sind. Es kommt zu einer Verlangsamung der diastolischen Calciumaufnahme in das SR, wodurch in der nächsten Systole weniger Calcium für eine adäquate Herzaktion zur Verfügung steht. Die in der Literatur beschriebenen Minderphosphorylierungen von PLB, TnI und cMyBP-C könnten dieser Relaxationsstörung zugrunde liegen (Bartel et al. 1996; Bodor et al. 1997; El-Armouche et al. 2007b). Entgegen der β_1 -AR-Downregulation wird für den L-Typ-Calciumkanal (Schroder et al. 1998) und den RyR2 (Marx et al. 2000; Eschenhagen 2010) eine Hyperphosphorylierung diskutiert, die den sarkolemmalen Calciumeinstrom und gleichzeitig die Calciumfreisetzung während der Diastole erhöht und somit das Auftreten von Arrhythmien fördern könnte (Eisner und Trafford 2002).

Bei dem Phänomen der β -adrenergen Desensitivierung scheint es sich in erster Linie um einen Schutzmechanismus gegenüber den chronisch erhöhten Katecholamin-Plasmaspiegeln und den daraus resultierenden negativen Effekten, wie Hypertrophie, Apoptose, Arrhythmien und verstärkter Energieverbrauch zu handeln (Eschenhagen 2008).

1.2.3 Serin/Threonin Protein-Phosphatasen

Protein-Phosphatasen spalten kovalent gebundenes Phosphat von den Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin und werden dementsprechend benannt. Sie stellen neben den Proteinkinasen essentielle regulatorische Einheiten der reversiblen Phosphorylierung von Proteinen dar (Depaoli-Roach et al. 1994), wobei abhängig von ihrem Phosphorylierungszustand ihre Aktivität, subzelluläre Kompartimentierung und Interaktion mit anderen Proteinen beeinflusst wird. PP werden hinsichtlich ihrer Kofaktoren, Substratspezifität und Empfindlichkeit gegenüber spezifischen Inhibitoren in Typ 1, Typ 2A, 2B (Calcineurin) und 2C Phosphatasen eingeteilt (Cohen 1989; Shenolikar und Nairn 1991; Herzig und Neumann 2000). Die katalytische Aktivität der Proteinphosphatasen wird maßgeblich durch die Lokalisation sowie durch zahlreiche regulatorische Untereinheiten beeinflusst (Cohen 1997). Im menschlichen Herzen lassen sich bis zu 90% der Serin/Threonin Phosphatase-Aktivität auf die Typ 1 und Typ 2A (PP1 und PP2A) zurückführen (MacDougall et al. 1991; Luss et al. 2000). Es sind 4 verschiedene Isoformen der katalytischen Untereinheit der PP1 (α , β , γ_1 , γ_2)

bekannt (Sasaki et al. 1990). Die Beteiligung der ubiquitär vorkommenden PP1 an verschiedensten zellulären Prozessen, wie der Kontraktion der glatten und der quergestreiften Muskulatur, der Regulation der Calciumhomöostase, des Kohlenhydratstoffwechsels und der neuronalen Signaltransduktion (Cohen 2002) ist von großer Bedeutung. Die Vielfalt der Funktionen wird vor allem durch die Interaktion der katalytischen Untereinheit PP1c mit mehr als 50 verschiedenen regulatorischen Untereinheiten erreicht (Cohen 2002). Ein kurzes, hoch konserviertes Bindungsmotiv (RVxF-Aminosäuremotiv) ist dabei für das Zusammenspiel von regulatorischer und katalytischer Untereinheit verantwortlich (Cohen 2002). Die PP1 kann durch zwei regulatorische Untereinheiten (Inhibitor-1 und Inhibitor-2) gehemmt werden.

Weiterhin ist bekannt, dass die Herzinsuffizienz, sowohl beim Menschen als auch im Tiermodell, mit einem umfassenden Anstieg der Phosphatase-Aktivität, insbesondere der PP1c einhergeht (Gupta et al. 1996; Neumann et al. 1997). Die herzspezifische Überexpression der PP1c im Mausmodell führte zu Hypertrophie und Fibrose ähnlich der menschlichen Herzinsuffizienz (Carr et al. 2002), was eine pathophysiologische Rolle der PP1 unterstützt.

1.2.4 Protein-Phosphatase-Inhibitor-1

Der wichtigste endogene Regulator der kardial dominierenden PP1 ist der zytosolische Inhibitor-1 (Connor et al. 1998). Inhibitor-1 wird durch die cAMP-abhängige PKA an Threonin-35 phosphoryliert und dadurch aktiviert. Die potente Hemmung der PP1 erfolgt ausschließlich durch diese Form (Cohen et al. 1988) und könnte darüber den durch PKA-Aktivierung erhöhten Phosphorylierungszustand von Phosphoproteinen im Herzen erhöhen bzw. stabilisieren.

Erstmals wurde Inhibitor-1 als Verbindungsglied zwischen der PKA und PP1 nach der Isolation aus der Skelettmuskulatur von Kaninchen beschrieben (Huang und Glimsmann 1976). Inhibitor-1 wird vor allem im Gehirn, Skelettmuskulatur, Niere, Fettgewebe (MacDougall et al. 1989), aber auch im Herzen (Neumann et al. 1991; Gupta et al. 1996) exprimiert. Lange Zeit wurde er lediglich als Regulator des Glykogenhaushaltes in Leber und Skelettmuskel in Verbindung gebracht (Cohen und Cohen 1989). Die Primärsequenz des Inhibitor-1 ist hoch konserviert,

insbesondere weist der N-Terminus in den Spezies Ratte und Kaninchen eine 98%ige Strukturhomologie auf (Elbrecht et al. 1990). Dort liegen u. a. das PP1-Bindungsmotiv (KIQF) und die Threonin-35 PKA-abhängige Phosphorylierungsstelle (Egloff et al. 1997). Daneben sind noch zwei weitere Phosphorylierungsstellen an Serin-67 (Aitken und Cohen 1982) und an Threonin-75 (Rodriguez et al. 2006) bekannt, die durch die calciumabhängige Proteinkinase $C\alpha$ (PKC α) phosphoryliert werden (Braz et al. 2004; Sahin et al. 2006). Die Phosphorylierung von Serin-67 und/oder Threonin-75 führt entgegen des PKA-Effektes zu einer Zunahme der PP1-Aktivität und Abnahme der Kontraktilität (Braz et al. 2004; Rodriguez et al. 2006; Rodriguez et al. 2007). Die Aktivität des Inhibitor-1 wird in verschiedenen Geweben unterschiedlich reguliert (Mulkey et al. 1994; Higuchi et al. 2000). In Herzmuskelzellen konnte sowohl durch die spezifische Blockade von Calcineurin als auch von PP2A eine erhöhte PKA-Phosphorylierung von Inhibitor-1 und des nachgeschalteten Phospholambans gezeigt werden (El-Armouche et al. 2006), wodurch diese beiden als die kardialen, Inhibitor-1 dephosphorylierenden Phosphatasen identifiziert werden konnten.

Hinsichtlich der bisherigen Befunde stellt der Inhibitor-1 ein konditionelles, durch PKA-Phosphorylierung aktiviertes Protein mit doppelter endogener Rückkopplung (PKC α -Phosphorylierung/Calcineurin-Dephosphorylierung) und somit ein wichtiges Verbindungselement zwischen den Signaltransduktionswegen der PKA (cAMP-vermittelt) und PKC α (Calcium-vermittelt) dar. In Abbildung 1.3 sind die Regulation und Funktion von Inhibitor-1 zusammenfassend dargestellt. Durch zwei Arbeitsgruppen konnte unabhängig voneinander gezeigt werden, dass der adenovirale Gentransfer von Inhibitor-1 *in vitro* zu einer Sensitivierung gegenüber Katecholaminen führte und darüber hinaus zu einer gesteigerten Phosphorylierung von PLB (El-Armouche et al. 2003), wodurch eine Verbesserung der Kontraktilität nachgewiesen werden konnte (Carr et al. 2002). Möglicherweise könnte also auch der Inhibitor-1 in Bezug auf die Pathophysiologie und Pharmakotherapie der Herzinsuffizienz eine bedeutsame Rolle spielen.

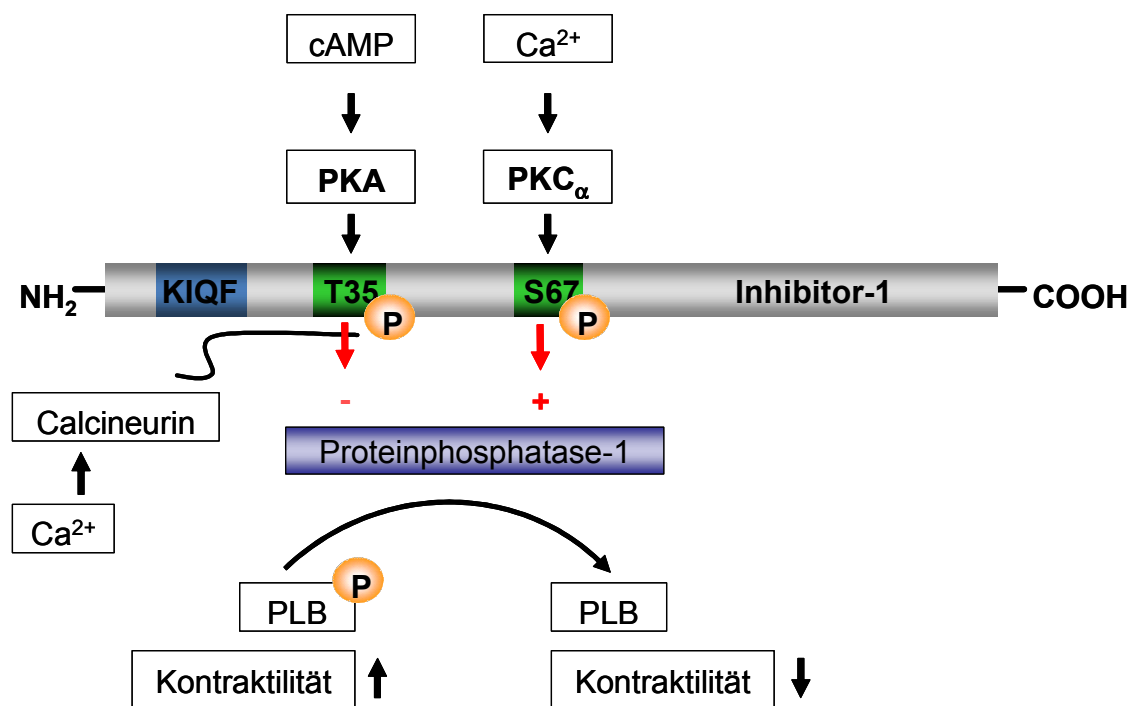


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung der Funktion und Regulation von Inhibitor-1. Inhibitor-1 erfährt eine positive und negative Regulation. Hier ist der Einfluss der verschiedenen Phosphorylierungsstellen gezeigt (El-Armouche 2008). β -adrenerge Stimulation führt über Aktivierung der cAMP-abhängigen PKA zur Phosphorylierung (P) von Inhibitor-1 an Threonin-35 (T35) und somit über die Hemmung der Typ-1-Phosphatasen (PP1) zu einer gesteigerten Phosphorylierung verschiedener Phosphoproteine, z. B. Phospholamban (PLB) und dadurch zur Steigerung der Kontraktilität. Die Phosphorylierung von PKC α an Serin-67 (S67) mindert die Aktivität von Inhibitor-1 und hat somit eine erniedrigte PLB-Phosphorylierung und Kontraktilität zur Folge. Die PKA-Phosphorylierung an Threonin-35 wird im Herzen calciumabhängig durch die Typ-2B-Phosphatase Calcineurin dephosphoryliert.

In der menschlichen Herzinsuffizienz sind sowohl die Inhibitor-1 mRNA- und Proteinmenge als auch der PKA-Phosphorylierungsgrad stark erniedrigt (El-Armouche et al. 2003; El-Armouche et al. 2004). Ähnlich der Desensitivierung in der menschlichen Herzinsuffizienz führte die chronische Behandlung mit Katecholaminen im Tiermodell zu einer stark verminderten Inhibitor-1 mRNA- und Proteinkonzentration (El-Armouche et al. 2007a).

Die transgene Überexpression einer konstitutiv aktiven Form (cAMP/PKA unabhängig) von Inhibitor-1 (I-1c) milderte die kardialen Umbauprozesse in der druckinduzierten Herzinsuffizienz im Mausmodell. Außerdem konnte in demselben Modell bei Ratten mittels eines adenoviralen Gentransfers das Fortschreiten der

Herzinsuffizienz reduziert werden. Somit könnte die Gentherapie mit I-1c in der Herzinsuffizienz nutzbringend sein (Pathak et al. 2005). Demgegenüber stehen die Beobachtungen von Wittköpper et. al 2010b. In einem konditionell-regulierbaren transgenen Mausmodell wurde ebenfalls eine konstitutiv aktive Form von Inhibitor-1 überexprimiert. Die verbesserte Herzfunktion konnte in jungen Mäusen bestätigt werden, wohingegen alte Mäuse verstärkt kardiale Dysfunktion, linksventrikuläre Dilatation und tödliche Arrhythmien unter Katecholamingabe entwickelten. Diese negativen Effekte waren durch das konditionelle Abschalten der Inhibitor-1 Transgenexpression reversibel, was für die Spezifität des Effektes spricht.

Die Charakterisierung von Inhibitor-1 Knockout-Mäusen (Allen et al. 2000) zeigte *in vitro* wie erwartet eine Desensitivierung gegenüber β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin. *In vivo* wiesen die Tiere sowohl eine normale basale Herzfunktion als auch eine normale maximale kontraktile Reserve nach Katecholamingabe auf. Die chronische Behandlung der Mäuse mit Katecholaminen führte im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen nur zu einer abgeschwächten β -adrenergen Desensitivierung und einer milden Hypertrophie-Entwicklung sowie zu einem geringeren Arrhythmierisiko (El-Armouche et al. 2008). Die Tiere blieben ihr Leben lang herzgesund und entwickelten weder Hypertrophie noch kardiale Dysfunktion. Auf molekularer Ebene zeigten die Herzen dieser Mäuse eine verminderte Phosphorylierung von PLB und RyR2, während alle anderen untersuchten Phospho-Regulatorproteine nicht beeinflusst waren. Diese Befunde könnten darauf hindeuten, dass der Inhibitor-1 ein eher ungünstiges Element der β -adrenergen Signalkaskade ist und seine Downregulation in der Herzinsuffizienz protektiv ist. Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass eine Hemmung von Inhibitor-1, als eine Art „intrazelluläre β -Blockade“, ein neues Wirkprinzip zur Therapie der Herzinsuffizienz darstellen könnte (Wittköpper et al. 2010a).

1.2.5 β -Blocker in der Therapie der Herzinsuffizienz

Durch den Einsatz von β -Blockern konnte, wie in 3 großen Studien (Kapitel 1.1) für Bisoprolol, Metoprolol und Carvedilol beschrieben wurde, die Sterblichkeit um ein Drittel gesenkt und die Prognose signifikant verbessert werden. Heute stellen sie zusammen mit ACE-Hemmern und Diuretika die Basistherapie dar (Bristow 2000).

Erstmals wurde 1979 ein Erfolg unter β -Blocker-Therapie bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie beschrieben (Swedberg et al. 1979; Bristow 2000). Lange Zeit galten sie jedoch aufgrund ihrer negativ inotropen Wirkung als kontraindiziert. Unter β -Blocker-Therapie kommt es durch die direkte Wirkung auf die Herzmuskelzelle zur Heraufregulation der β -AR, Abnahme inhibitorischer G-Proteine, Zunahme der Kontraktionskraft und Schutz vor toxischer Katecholaminwirkung. Insgesamt kommt es über eine Resensitivierung des β -adrenergen Systems zur Wiederherstellung des sympathovagalen Gleichgewichts.

Allerdings werden durch die Blockade eines Rezeptors, insbesondere der β -AR durch β -Blocker, neben den prognostisch nachteiligen Signalwegen auch prognostisch günstige blockiert (Aktories et al. 2008). So kommt es z. B. durch die negativ inotropen und chronotropen Effekte initial zu einer unerwünschten Reduktion der kontraktilen Reserve. Dies schließt letztlich eine Anwendung von β -Blockern bei akuter Herzinsuffizienz oder instabilem Herzinfarkt aus. Ein weiteres Problem ist auch die mangelnde Spezifität der Blockade, sodass auch β_2 -Adrenozeptoren blockiert werden. Dies führt bei Patienten mit obstruktiven Atemwegserkrankungen oder peripherer arterieller Verschlusskrankheit zu starken Nebenwirkungen (Aktories et al. 2008). Dieses dichotome Profil der Pharmakotherapie mit β -Blockern legt nahe, Prinzipien zu testen, die spezifische Teilaspekte der β -adrenergen Signalkaskade blockieren bzw. das β -AR/cAMP/PKA-System selektiv in spezifischen subzellulären Kompartimenten modulieren.

1.3 RNA-Interferenz

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein potenter und hochspezifischer Mechanismus, bei dem es zur Stilllegung von Genen kommt (*gene silencing*). Dabei führen doppelsträngige RNA-Moleküle in der Zelle zum sequenzspezifischen Abbau der homologen mRNA und somit zur Unterdrückung der Genexpression (Fire et al. 1998). Die physiologische Bedeutung der RNA-Interferenz liegt neben dem Schutz des Organismus vor einer Infektion mit einem RNA-Virus (Waterhouse et al. 2001) und der Regulation von mobilen genetischen Elementen (Sijen und Plasterk 2003), den Transposons („springende Gene“), hauptsächlich in der Genregulation.

Mit dem Wissen, dass in Säugetierzellen durch das Einbringen von 21 Nukleotide langen RNA-Molekülen eine effektive Gensuppression erzielt werden kann (Elbashir et al. 2001a), entwickelte sich der Einsatz von RNA-Interferenz als Werkzeug zur Untersuchung und Charakterisierung von Genen und deren Funktionen bis hin zur Aufklärung pathophysiologischer Prozesse.

1.3.1 Mechanismus

Die direkten Auslöser der RNA-Interferenz sind kleine doppelsträngige RNA-Oligonukleotide, die als *short interfering* RNA (siRNA) bezeichnet werden. Sie bestehen aus 21 Basenpaaren und besitzen am 5'-Ende eine Phosphatgruppe sowie am 3'-Ende eine freie Hydroxylgruppe und einen Überhang aus zwei Nukleotiden, welche nicht notwendigerweise komplementär zur Ziel-mRNA sein müssen (Elbashir et al. 2001c). Die Einzelstränge werden als *Sense* (S) bzw. *Antisense*-Strang (AS) in Bezug zur Ziel-mRNA bezeichnet, wobei sich der Antisense-Strang komplementär zu dieser verhält. Im Zytosol der Zelle wird die siRNA unter Energieverbrauch (Nykanen et al. 2001) in einen Proteinkomplex mit Enzymaktivität, den sogenannten *RNA induced silencing complex* (RISC) aufgenommen. Durch die Helikaseaktivität des RISC (Robb und Rana 2007) kommt es zur Strangtrennung, wodurch lediglich der Antisense-Strang in den RISC-Komplex inkorporiert wird, während der Sense-Strang abgebaut wird. Weiterhin essentiell für die Funktionalität der siRNA ist die 5'-Phosphatgruppe (Chiu und Rana 2002), wodurch die Erkennung und Spaltung der Ziel-mRNA durch die Ribonukleaseaktivität des Argonaut-2 Proteins (AGO2) ermöglicht wird (Liu et al. 2004; Meister et al. 2004). Die Ziel-mRNA wird dadurch spezifisch 10 bis 11 Nukleotide stromaufwärts des 5'-Ende des Antisense-Stranges gespalten (Elbashir et al. 2001b) und abgebaut.

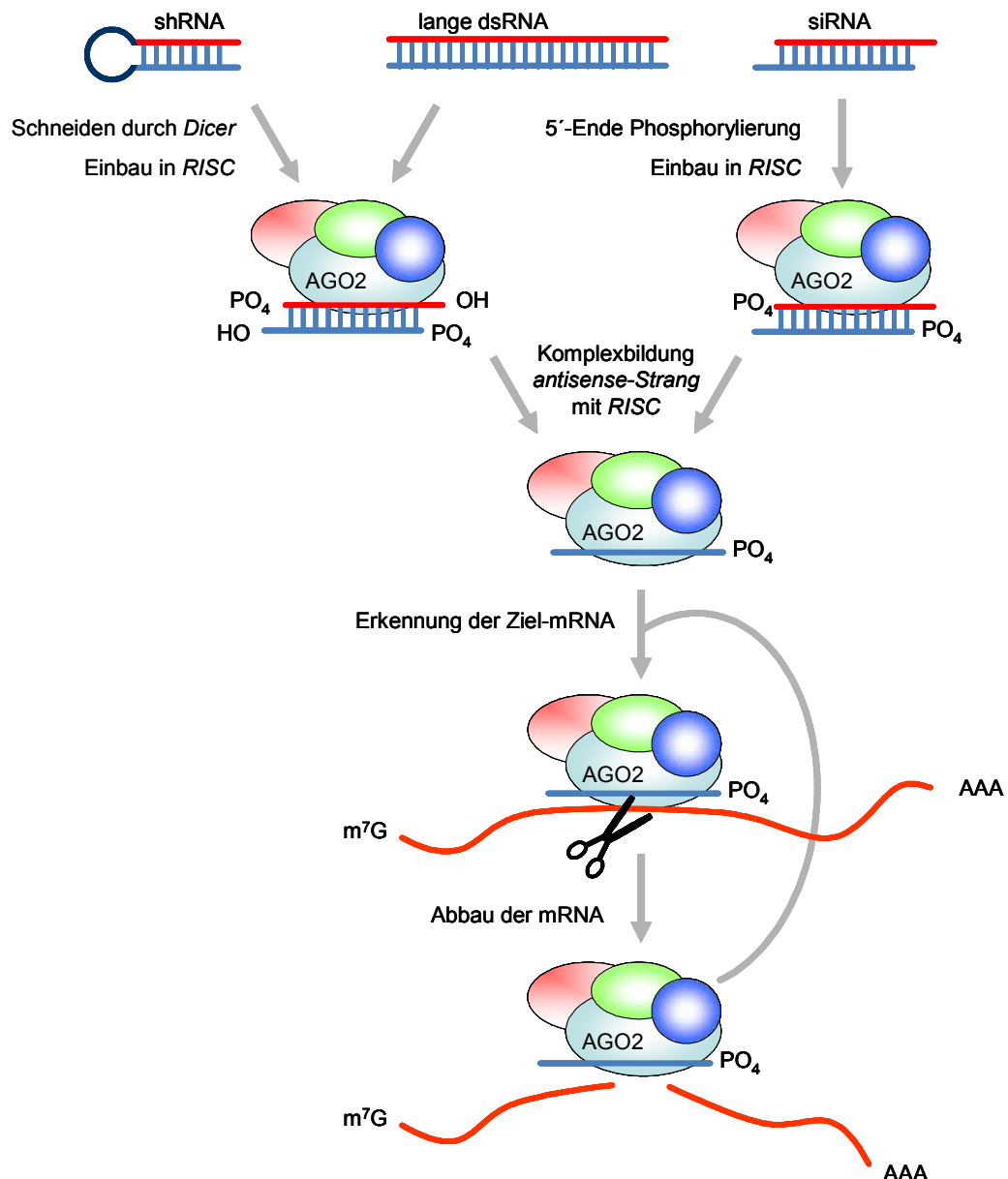


Abbildung 1.4 Funktionsweise von RNAi. Doppelsträngige siRNA-Moleküle führen zur Aktivierung des RISC und damit zum Abbau der komplementären Ziel-mRNA. Längere dsRNA oder shRNA werden zuvor durch die RNase Dicer prozessiert und aktivieren anschließend ebenfalls den RISC, Abbildung nach Rana (2007).

Die Lokalisation der Spaltung ist konstant und hochspezifisch. Dies erklärt sich aus der näheren Betrachtung des RISC. Sogenannte Argonaut-Proteine bilden dabei die Kernelemente des Multienzymkomplexes. Sie enthalten zwei konservierte Domänen PAZ und PIWI. Die zentrale PAZ-Domäne erkennt spezifisch kleine RNA-Helices mit dem typischen zwei Nukleotid-3'-Überhang (Ma et al. 2004) und bindet diese. Die PIWI-Domäne hat große strukturelle Ähnlichkeit

zur RNase H (Parker et al. 2006) und katalysiert durch ihre Endonukleaseaktivität die Spaltung der Ziel-mRNA. Durch die Kristallstrukturanalyse der PIWI-Domäne zusammen mit einer siRNA-ähnlichen Struktur, an welche eine Ziel-mRNA gebunden ist, konnte gezeigt werden, wie das 5'-Ende des Antisense-Stranges in einer Tasche der PIWI-Domäne gebunden wird und dabei der RNA-RNA-Komplex so fixiert wird, dass sich die Phosphatgruppe zwischen dem 10. und 11. Nukleotid der Ziel-mRNA in räumlicher Nähe zur potentiellen katalytischen Einheit der RNase befindet (Parker et al. 2005). Wie in Abbildung 1.4 dargestellt ist, stellen längere doppelsträngige RNAs (dsRNA) oder *short hairpin* RNAs (shRNA) endogene Vorläufer-RNA-Moleküle dar, die ebenfalls in der Lage sind PTGS zu induzieren. Dies geschieht ausschließlich im Zytoplasma (Zeng und Cullen 2002) und erfolgt nach ihrer vorherigen Prozessierung zu reifen siRNAs durch die Inkorporation in den RISC-Proteinkomplex und Spaltung durch den Dicer (Carmell und Hannon 2004). Der Dicer, ebenfalls ein Bestandteil des RISC, enthält einerseits eine PAZ-Domäne zur Bindung der RNA und andererseits zwei RNase III Domänen mit Endonukleaseaktivität (Zhang et al. 2004), die zur spezifischen Spaltung der langen dsRNA in kleinere (21-23 Bp) siRNAs mit dem typischen Muster des zwei Nukleotid-Überhangs am 3'-Ende und der 5'-Ende-Phosphatgruppe (Hannon und Rossi 2004) führen. Da die Phosphorylierung der siRNA am 5'-Ende essentiell für den Einbau in den RISC ist, werden nicht phosphorylierte siRNAs umgehend durch eine endogene Kinase phosphoryliert (Schwarz et al. 2002) und es kommt zur Degradation der Ziel-mRNA.

1.3.2 Experimentelle Voraussetzungen

Die spezifische Effizienz von siRNAs ist selbst bei kompletter Homologie zur Ziel-mRNA sehr heterolog und nicht vorhersehbar. Es gibt eine Vielzahl von Kriterien, die die Auswahl einer effektiven siRNA beschreiben und auf die im folgenden Abschnitt kurz eingegangen werden soll.

Es gibt verschiedene Sequenzmotive AA(N19)TT, NA(N21), NAR(N17)YNN (A: Adenosin, N: frei wählbares Nukleotid, R: Purinbase, T: Thymidin, Y: Pyrimidinbase), die mit einer effizienten Genstilllegung einherzugehen scheinen. Repetitive Basenfolgen von Guanin bzw. Cytosin sowie intronische Sequenzen des Zielgens sind zu vermeiden. Der Guanin/Cytosin (G/C) Anteil sollte zwischen

30-70% liegen. Der zwei Nukleotide lange Überhang am 3'-Ende besteht zumeist aus 2'-Desoxythymidinen (TT), die genauso effizient wie Ribonukleotidüberhänge sind, aber gegenüber ihnen den Vorteil haben leichter synthetisierbar zu sein und eine erhöhte Exonukleasestabilität aufweisen (Elbashir et al. 2002). Des Weiteren ist die Lokalisation der Zielsequenz auf der mRNA zu beachten, wobei diese frühestens 50-100 Bp stromabwärts des Startkodons und möglichst nicht in der 5'-UTR (*untranslated region*) Region liegen sollte, da sich in diesen Bereichen zahlreiche regulatorische Proteinbindungsstellen befinden können, die eine effiziente Anlagerung des siRNA/Nukleasekomplexes an die mRNA verhindern würden. Die Effizienz der siRNA hängt weiterhin von ihren thermodynamischen Eigenschaften ab. Dabei wird der Strang, der am 5'-Ende weniger stabil an den komplementären Strang gebunden ist, als Antisense-Strang in den RISC inkorporiert (Schwarz et al. 2003). Außerdem spielt die innere Bindungsstärke im 5'-Ende des Antisense-Stranges eine Rolle, d. h. die Positionen N 9-14 weisen eine geringe Stabilität auf, während der nicht-funktionelle Teil der siRNA in diesem Teil eine hohe innere Stabilität zeigt (Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003). Möglicherweise wird durch eine gewisse Flexibilität im 5'-Ende des Antisense-Stranges die Bindung und Spaltung der Ziel-mRNA erleichtert. Je geringer die Strangbindung an der Schnittstelle ist, desto schneller löst sich der RISC-Komplex und steht nach Regeneration wieder bereit.

Um die Spezifität der so gewählten siRNA gegenüber dem Zielgen zu gewährleisten, ist ein Vergleich mit den Gensequenzen des Zielorganismus unabdingbar.

1.3.3 Einsatz von RNAi

Bis zum heutigen Tage hat sich die RNAi-Technik hoch entwickelt und ist in der Genomforschung weit verbreitet. Da durch den Einsatz von RNA-Interferenz nahezu jedes Gen zielgenau ausgeschaltet werden kann, gewinnt die therapeutische Abwendung immer mehr an Bedeutung (Mello und Conte 2004; Rayburn und Zhang 2008). Mit der transienten Transfektion von synthetisch hergestellten siRNAs ist es möglich, schnell und effizient Zielgene in Säugerzellen auszuschalten. Im Vergleich zu anderen Methoden, wie Antisense-Oligonukleotide und Ribosomen, sind doppelsträngige siRNA-Moleküle relativ stabil. Durch

verschiedene Modifikationen der siRNA-Duplexe, wie Desoxyribonukleotide an den 3'-Überhängen, Phosphorothioate (Choung et al. 2006), *locked nucleic acid* LNA Bausteine (Elmen et al. 2005) und Modifikation an der 2'-Position der Ribose (Chiu und Rana 2003) konnte die Stabilität und der Schutz vor Nukleasen weiter erhöht werden. Als Transfektionsagenzien werden vorzugsweise kationische Lipide verwendet, durch die hohe Transfektionsraten in den meisten Zelllinien erreicht werden (Dalby et al. 2004). Jedoch ist der Effekt exogen zugeführter siRNA relativ kurzweilig (3 bis 7 Tage) und die intrazelluläre siRNA-Konzentration wird durch Zellteilung und den Abbau durch Nukleasen reduziert. Um die Wirkdauer zu verlängern, wurden Expressionskonstrukte zur endogenen Expression von siRNA in Zellen entwickelt (Brummelkamp et al. 2002; Paddison et al. 2002). Es kommen Promotoren des Polymerase III Typs (Pol III) zum Einsatz, diese steuern die Transkription von kurzen RNAs ohne 5'-Cap-Struktur und Poly-(A)-Schwanz. Ein einfaches Muster aus 5 aufeinanderfolgenden Thymidinbasen dient der Polymerase als Stoppsignal (Myslinski et al. 2001). Es werden überwiegend zwei humane Promotoren verwendet, der U6 oder der H1-Promotor. Der U6-Promotor setzt im Gegensatz zum H1-Promotor als erste Base Guanosin voraus. Die beiden siRNA-Stränge können entweder von getrennten Promotoren exprimiert werden und sich später zusammenlagern, oder sie werden als ein durchgängiges Molekül transkribiert, welches sowohl die Sense als auch die Antisense-Sequenz verbunden über eine Haarnadelschleifen-Struktur (*Loop*) enthält (Abbildung 1.5). Daraus ergibt sich der Name *short hairpin* RNA (shRNA). Die gebildete shRNA wird durch den Dicer in reife funktionsfähige siRNA prozessiert. Mit Hilfe von Plasmidvektoren lassen sich verschiedenste Zellen stabil und längerfristig mit shRNA transfizieren. Dennoch kann es vorkommen, dass die Transfektion vor allem von Primärzellen oder Stammzellen mit Plasmidvektoren unzureichend ist. Ein effizienter Gentransfer wird durch den Einsatz verschiedener viraler Vektoren (Adenoviren, Lentiviren und Adeno-assoziierte Viren) erreicht, indem die Pol III-Promotor-shRNA-Sequenz in die virale Expressionskassette eingebracht wird. Der Einsatz von RNAi-induzierenden viralen Vektoren ist vielfältig.

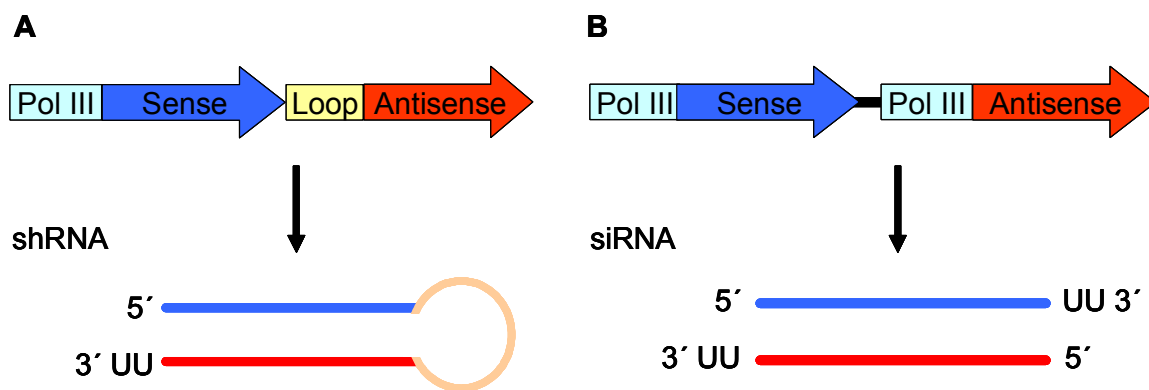


Abbildung 1.5 Expression von shRNA (A) und siRNA (B) durch einen oder distinkte Pol III Promotoren.

Der Organismus selbst ist auch in der Lage, endogen kleine (19-25 N), nicht kodierende, hoch konservierte *micro* RNAs (miRNAs) zu exprimieren, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung, Proliferation und Genregulation spielen (Lee et al. 1993). Die Kontrolle der Genexpression erfolgt posttranskriptional (He und Hannon 2004). Die Gene für miRNAs sind im Genom u. a. in Intronregionen lokalisiert und werden von dort aus durch die RNA-Polymerase II (Pol II) transkribiert. Das entstandene Primärtranskript hat noch eine Länge von 500-3000 N und trägt am 5'-Ende eine 7-Methylguanosin-Kopfgruppe (Cap) und am 3'-Ende einen Poly-(A)-Schwanz. Diese *primary microRNA* (pri-miRNA) lagert sich zu einer Art Schleife zusammen, wodurch sowohl zueinander komplementäre als auch nicht komplementäre Bereiche (Wölbungen) entstehen. Die nukleäre RNase III Drosha und das dsRNA-Bindeprotein DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*) formen einen Mikroprozessor-Komplex, durch den die pri-miRNA zu einer etwa 70–80 N großen *precursor microRNA* (pre-miRNA) prozessiert wird, die ebenfalls eine charakteristische Haarnadelstruktur aufweist (Tang 2005). Im nächsten Schritt verlässt die pre-miRNA mit Hilfe des nukleären Transporters Exportin-5 in Anwesenheit von RanGTP den Zellkern (Bohnsack et al. 2004; Lund et al. 2004) und wird im Zytoplasma durch den Dicer in reife miRNA prozessiert und dem RISC zugeführt. Durch diesen miRISC-Komplex kann die Aktivität der Zielgene durch zwei Arten reguliert werden (Kim und Nam 2006). miRISC bindet an der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) der Ziel-mRNA und in Abhängigkeit der Komplementarität zwischen der miRNA, der Ziel-mRNA sowie den RNA-Bindeproteinen der Argonaut-Familie kommt es bei teilweiser Übereinstimmung

der Bindesequenz zur Hemmung der Translation, wohingegen es bei hoher Komplementarität zur Spaltung und Degradation Ziel-mRNA kommt (Zeng et al. 2002). Die Komplexe aus miRNA, RISC und mRNA können in sogenannte P-Körperchen eingelagert werden, wodurch sie der Translationsmaschinerie entzogen werden und letztendlich abgebaut werden (Liu et al. 2005). Die Genregulation durch miRNAs ist ein hoch komplexer Mechanismus, da jede miRNA im Durchschnitt etwa 200 Zielgene reguliert (Krek et al. 2005). Zusätzlich haben Gene mehrere Bindungsstellen für entweder eine oder mehrere miRNAs. Meistens ist das Zusammenspiel verschiedener Zielsequenzen nötig um Gene entsprechend zu regulieren (Brennecke et al. 2005). Die Expression der miRNAs korreliert stark mit dem Entwicklungsstand der Zelle (Zellteilung, Differenzierung und Apoptose). Klinische Studien belegen miRNA-Funktionen bei verschiedensten Entwicklungsprozessen, wie Neurogenese (Makeyev et al. 2007), Hämatopoese (Chen et al. 2004), Kardiogenese (Zhao et al. 2005) sowie eine Beteiligung bei verschiedenen Krankheitsbildern und der Tumorbildung (Calin et al. 2004).

1.4 Adeno-assoziierte Viren

1.4.1 Vorkommen und Eigenschaften

Adeno-assoziierte Viren (AAV) gehören zur Familie der Parvoviridae (Unterfamilie Parvovirinae) und damit zu den kleinsten bekannten Viren (Abbildung 1.6). Das ikosaedrisch geformte Kapsid hat einen Durchmesser von 18-30 nm und umgibt das einzelsträngige, lineare DNA-Genom (Siegl et al. 1985). Parvoviren sind unbehüllt und deshalb relativ unempfindlich gegenüber vielen äußeren Einflüssen, wie Enzymen, pH-Schwankungen und Hitze (Muzyczka 2001). Adeno-assoziierte Viren gehören weiterhin zur Gattung der Dependoviren, d. h. sie benötigen für ihre Replikation eine Koinfektion mit einem Helfervirus (Casto et al. 1967), wie Adenoviren, humane Papillomaviren (Walz et al. 1997) oder Herpesviren (Buller et al. 1981; McPherson et al. 1985; Thomson et al. 1994). Bis heute sind 11 verschiedene Serotypen beschrieben, die aus Menschen (Serotypen 2, 3, 5 und 9) und aus Primaten isoliert und analysiert wurden. Die Durchseuchung der Bevölkerung ist sehr hoch, etwa 70% der Erwachsenen weisen Antikörper gegen die AAV-Serotypen auf. Dennoch konnte ihnen bisher kein Krankheitsbild zugeordnet werden, weshalb sie immer noch als apathogen gelten.

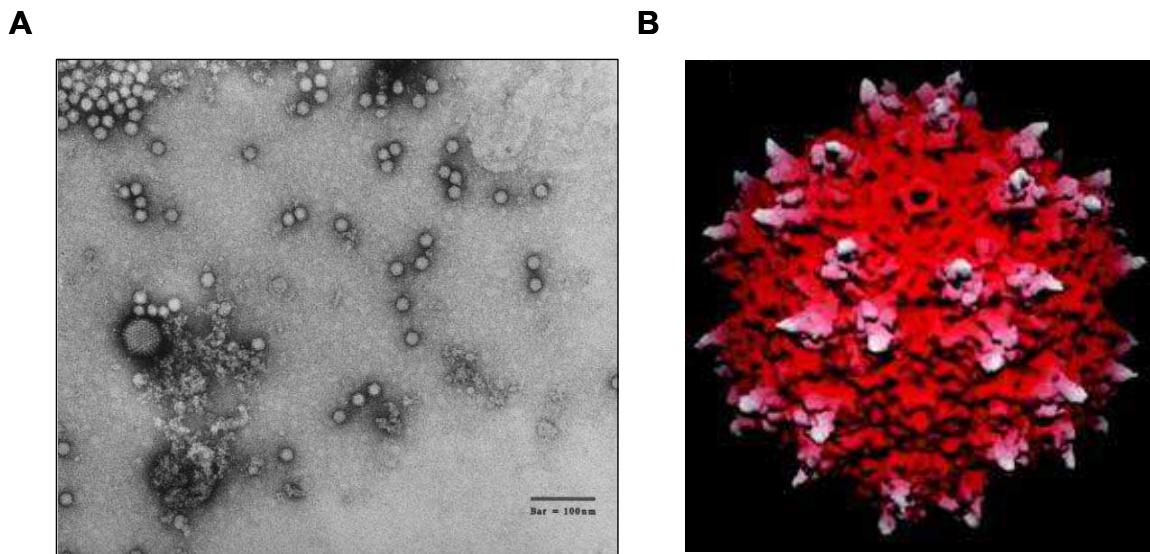


Abbildung 1.6 Adeno-assoziierte Viren. (A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Adenoviren mit Adeno-assoziierten Viren. Maßstab entspricht 100 nm. (B) Kristallstruktur des Adeno-assoziierten Virus (Xie et al. 2002).

Der Ursprung von AAV6 ist dagegen weiterhin unbekannt, es handelt sich wahrscheinlich um eine homologe Rekombination zwischen AAV1 und 2 (Xiao et al. 1999). Die Serotypen 1, 4, 7, 8, 10 und 11 wurden aus Affengewebe isoliert, wobei die Typen 1 und 4 auch in der Lage sind, *in vitro* humane Zellen zu infizieren. Dennoch konnte bislang keine natürliche Infektion beim Menschen bzw. spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

1.4.2 Genomstruktur, Transkription und Translation

Das lineare, einzelsträngige Genom hat eine Größe von 4675 Basenpaaren und wird entweder in positiver oder negativer Polarität mit gleicher Häufigkeit verpackt. Es kodiert für zwei offene Leserahmen (*open reading frame*, ORF) Rep und Kap (Abbildung 1.7 A). Der linke Leserahmen kodiert für 4 nicht-strukturelle Rep-Proteine, denen wichtige regulatorische Funktionen während aller Phasen des Infektionszyklus zukommen, wie z. B. die Genexpression und DNA-Replikation sowie die ortsspezifische chromosomale Integration ins humane Genom in Abwesenheit eines Helfervirus. Der rechte Leserahmen kodiert für die 3 Strukturproteine VP1, VP2 und VP3, die das Kapsid bilden. Die Transkription wird von 3 Promotoren, die nach ihren Kartenpositionen p5, p19, und p40 benannt

Polyadenylierungsstelle an Position p96 (Srivastava et al. 1983). Zwischen der Genomposition p42 und p46 befindet sich ein Intron, sodass alle Transkripte in gespleißter und ungespleißter Form vorliegen. Die Transkripte von p5 und p19 werden in die 4 verschiedenen Rep-Proteine translatiert, die entsprechend ihres ungefähren Molekulargewichtes als Rep78, Rep68 bzw. als Rep52 und Rep40 bezeichnet werden (Lusby und Berns 1982; Mendelson et al. 1986). Ausgehend vom p40 Promotor erfolgt die Transkription der für die 3 Kapsidproteine VP1, VP2 und VP3 kodierenden mRNAs. Durch einen ineffizienten alternativen Spleißvorgang entstehen zwei Transkripte. VP1 wird vom selteneren ungespleißten Transkript translatiert, während VP2 und VP3 von der hauptsächlich gebildeten Spleißvariante kodiert werden. Die Translation von VP3 erfolgt vom Startkodon AUG* und ist zehnmal häufiger als die Translation von VP2, die am ACG-Kodon beginnt. Daraus ergibt sich das Mengenverhältnis für VP1:VP2:VP3 von 1:1:10, wie es im AAV-Kapsid vorkommt (Rose et al. 1971; Buller und Rose 1978).

1.4.3 Latenter und produktiver Lebenszyklus

Der AAV-Lebenszyklus erfolgt in zwei Phasen. In Abwesenheit von Helferviren entwickelt sich eine latente Infektion, dabei liegt das AAV-Genom episomal oder im humanen Genom integriert vor. Wird eine solche latent infizierte Zelle mit einem Helfervirus superinfiziert bzw. kommt es zur Koinfektion von AAV und Helfervirus beginnt die produktive Infektion. Das Provirus der ehemals latent infizierten Zelle wird reaktiviert (Samulski et al. 1983). Im Zellkern beginnen die DNA-Replikation und Transkription sowie der Zusammenbau der reifen Viren, während im Zytoplasma die Synthese der viralen Proteine erfolgt. Die Aufnahme der Viruspartikel in die Zelle erfolgt durch rezeptorvermittelte Endozytose (Bartlett et al. 2000). Als zelluläre Rezeptoren sind bisher der Heparin-Sulfat-Proteoglykan-Rezeptor (Summerford und Samulski 1998), der Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptor (Qing et al. 1999), der Hepatozyten-Wachstumsfaktor (Kashiwakura et al. 2005) und die Integrine $\alpha_v\beta_5$ (Summerford et al. 1999) als Korezeptoren identifiziert worden. Wobei für viele Serotypen noch kein spezifischer Rezeptor bekannt ist. Die Freisetzung des Genoms (*uncoating*) erfolgt vor oder während des Transports in den Zellkern (Xiao et al. 2002). Beim Fehlen der

Helfervirusfunktionen werden nach Umwandlung des einzelsträngigen AAV-Genoms zum Doppelstrang nur geringe Mengen an Rep-Proteinen gebildet. Diese binden an das *Rep binding element* des p5-Promotors und unterdrücken dadurch jede weitere Transkription (Kyostio et al. 1995; Pereira et al. 1997). Daneben gibt es noch weitere Mechanismen, die zur Suppression der viralen Genexpression führen (Owens et al. 1993; Weger et al. 1999). In den infizierten Zellen etabliert AAV eine latente Infektion, wobei das Genom entweder in die Wirtszell-DNA integriert oder als stabiles Episom persistiert (Russell 2003). Die Integration erfolgt in mehr als 70% der Fälle ortsspezifisch auf dem humanen Chromosom 19 an der Stelle 19q13.3-qter durch nicht-homologe Rekombination (Kotin et al. 1990; Kotin et al. 1991; Samulski et al. 1991). Der spezifische Integrationsort wird als AAVS1 bezeichnet (Kotin et al. 1992) und enthält ein *Rep binding element* sowie eine verkürzte *terminal resolution site* in einem definierten räumlichen Abstand (Wonderling und Owens 1997; Young et al. 2000). Wahrscheinlich bringen die großen Rep-Proteine das AAV-Genom in räumliche Nachbarschaft zum Integrationsort, indem sie sowohl an das RBE in der AAVS1-Region als auch in den AAV-ITRs binden (Weitzman et al. 1994). Die meisten infizierten Zellen tragen mehrere Kopien des AAV-Genoms in tandemartiger Anordnung (McLaughlin et al. 1988). Durch die Superinfektion mit einem Helfervirus kann das integrierte AAV-Genom reaktiviert und eine produktive Vermehrung eingeleitet werden. In Gegenwart eines Helfervirus wirken die initial gebildeten Rep-Proteine Rep78/68 nicht mehr hemmend, sondern als Transaktivatoren und induzieren die Transkription an allen 3 Promotoren p5, p19 und p40 (Labow et al. 1986). Die Aktivierung der AAV-Promotoren durch Rep-Proteine erfolgt durch die Bindung an das RBE in den ITRs und der p5-Region (Pereira et al. 1997) sowie an weitere Elemente im p19- und p40-Promotor (McCarty et al. 1991).

1.4.4 Replikation

Die Replikation des AAV-Genoms erfolgt nach dem sogenannten *single strand displacement*-Mechanismus (Straus et al. 1975; Tattersall und Ward 1976; Hauswirth und Berns 1977; Hauswirth und Berns 1979; Lusby et al. 1980). Die flankierenden palindromischen ITRs an den Strangenden bilden durch ihre Rückfaltung eine T-Struktur aus, wodurch das 3'-Ende als Primer für die DNA-

Polymerase zugänglich wird und dadurch die DNA-Synthese initiiert (Abbildung 1.8). Unter Auflösung der T-Struktur am 5'-Ende wird ein vollständig komplementärer Strang synthetisiert. Um auch die ursprüngliche 3'-ITR zu replizieren, muss zunächst die noch bestehende T-Struktur aufgelöst werden (Im und Muzyczka 1990; Brister und Muzyczka 1999; Brister und Muzyczka 2000). Dieser Prozess wird als terminale Auflösung bezeichnet und findet an der *terminal resolution site* statt. Über eine Rep-assoziierte Helikase wird die T-Struktur entwunden und die trs zugänglich gemacht. Rep78/68 binden an das RBE und die trs und durch die Nukleaseaktivität kommt es zum Einzelstrangbruch (Snyder et al. 1993), wodurch ein neues freies 3'-Ende entsteht. Dieses dient wiederum als Primer für Polymerisation zum vollständigen Doppelstrang. Die Genomenden können denaturieren und erneut doppelte T-Strukturen ausbilden, sodass es zur Reinitiation der DNA-Synthese am 3'-Ende und gleichzeitig zur Strangverdrängung kommt. So entsteht pro Zyklus ein neuer Einzelstrang, welcher in ein Kapsid verpackt wird, sowie ein an einem Ende geschlossener Doppelstrang, der erneut in den Prozess der terminalen Auflösung und Reinitiation eingehen kann. Kommt es vor dem Strangbruch zu einer Polymerisierungs- und Verdrängungsreaktion am anderen Ende, bilden sich dimere Replikationsformen, die zwei Genome in invertierter Orientierung durch eine ITR getrennt, enthalten.

Helferviren können Adeno- oder Herpesviren sein (Atchison et al. 1965; Buller et al. 1981). Im Falle von Adenoviren werden 4 adenovirale Proteine E1A, E1B, E4orf6 und E2A sowie die VA-RNA als Helfer, vor allem für die Regulation der Genexpression, benötigt (Janik et al. 1981; Richardson und Westphal 1981; Samulski und Shenk 1988). Die Helferviren induzieren verschiedene Veränderungen in der zellulären Genexpression, wie den Eintritt der Zellen in die S-Phase des Zellzyklus und damit die Synthese der Replikationsproteine. Zugleich schaffen sie dadurch ein geeignetes zelluläres Milieu für die AAV-Replikation. Die HSV-Helfergene kodieren ausschließlich für Replikationsproteine, wie dem Helikase-Primase-Komplex aus UL5, UL8 und UL52 und dem Einzelstrangbindenden Protein ICP (UL29) sowie der HSV-Polymerase (UL30) (Weindler und Heilbronn 1991).

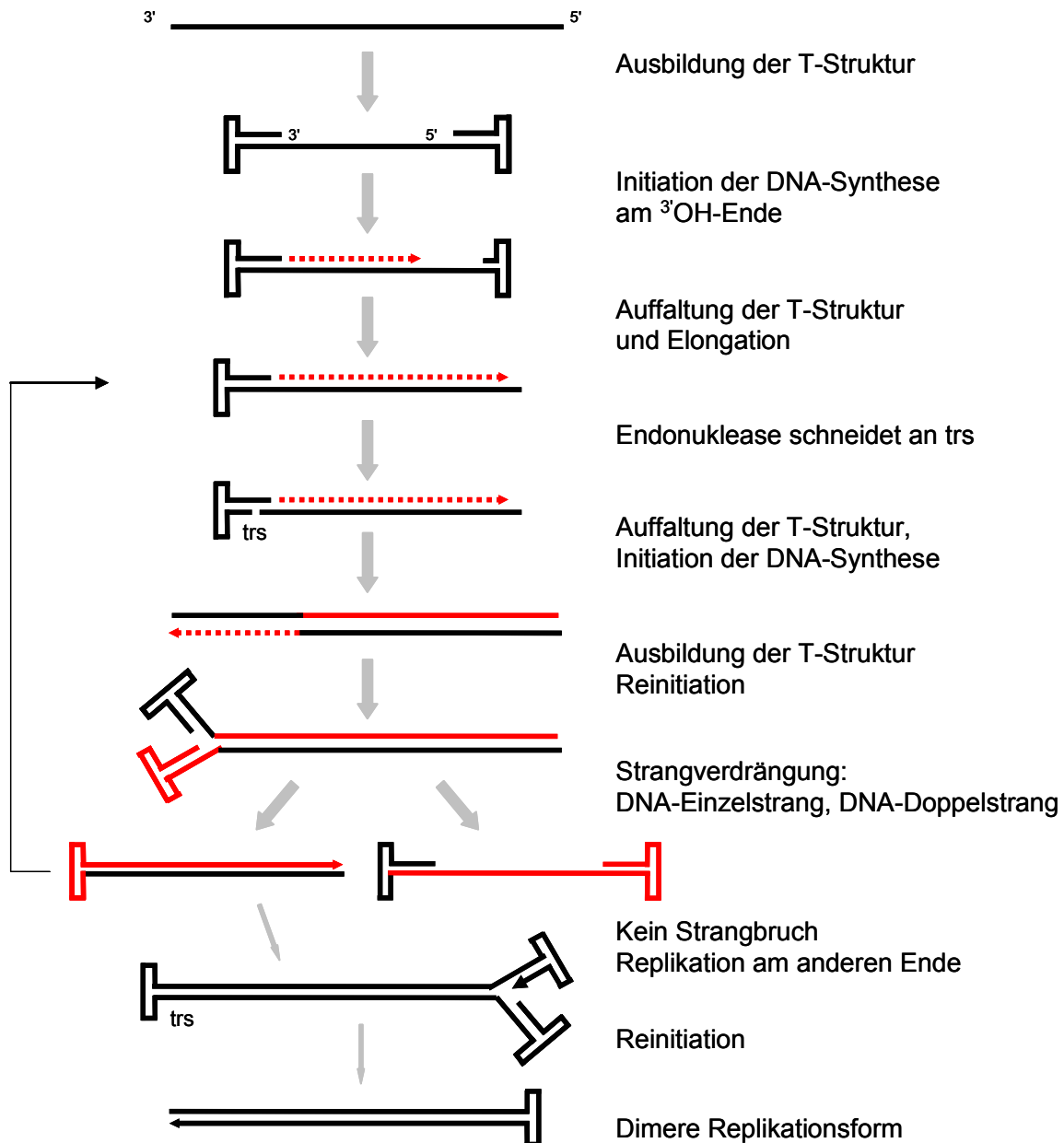


Abbildung 1.8 Schematische Darstellung der Genomreplikation von AAV.

1.4.5 Rekombinante AAV (rAAV) als Vektoren für die Gentherapie

Das zentrale Ziel der Gentherapie besteht darin, Gene von außen in die Zellen des Organismus einzubringen, um dadurch Gendefekte oder bestimmte Krankheiten kausal zu behandeln. Ein optimaler Gentherapievektor zeichnet sich durch (1) die Transduktion von ruhenden und proliferierenden Zellen, (2) eine zell- und gewebespezifische Anwendung sowie (3) eine stabile Langzeitexpression des Transgens aus. Der Vektor stellt dabei (4) keine Größenbeschränkung an das

Transgen, (5) ist nicht toxisch, (6) löst keine Immunantwort aus und (7) lässt sich in hochtitrigen Virusstocks produzieren.

AAV gelten als apathogen, da ihnen bis heute kein Krankheitsbild beim Menschen zugeordnet werden konnte (Monahan et al. 2002). Der Einsatz von rekombinanten AAVs gilt als sehr sicher, da alle viralen Gene deletiert sind. Sie bestehen lediglich aus dem jeweiligen Transgen, welches von den ITRs flankiert wird. Aufgrund seiner gut untersuchten Eigenschaften sowie der optimierten Produktion und Aufreinigung ist der Serotyp 2 (Hauswirth et al. 2000) das am häufigsten verwendete Vektorgenom. AAVs sind in der Lage, eine Vielzahl verschiedener Zelltypen (Samulski et al. 1999) und sowohl ruhende als auch sich teilende Zellen zu transduzieren. In den letzten Jahren wurde auf verschiedenste Art und Weisen versucht, den Tropismus der Viren auf ein spezielles Zielgewebe zu lenken und zu beschränken. Eine Möglichkeit besteht darin, das Vektorgenom mit den Kapsiden anderer Serotypen zu pseudotypisieren (Girod et al. 1999; Rabinowitz und Samulski 2000; Grimm 2002) und der Verwendung von Korezeptoren (Summerford und Samulski 1998; Qing et al. 1999; Summerford et al. 1999). Zum anderen kann das Kapsid chemisch durch bispezifische Antikörper (Bartlett et al. 1999; Nettelbeck et al. 2001) oder genetisch über das Einfügen von receptorspezifischen Epitopen (Yang et al. 1998; Rabinowitz et al. 1999; Wu et al. 2000) modifiziert werden. Dadurch kann einerseits der Tropismus beeinflusst werden und gleichzeitig die Reaktion mit neutralisierenden Antikörpern bei wiederholter Applikation verhindert werden. Ein weiteres Konzept besteht im Targeting zellspezifischer Rezeptoren, für deren Evaluierung Phagen-Peptidbanken und spezielle AAV-Peptidbanken, bei denen randomisierte Peptide direkt auf der Kapsidoberfläche der Viren exprimiert werden, entwickelt wurden (Müller et al. 2003; Perabo et al. 2003). Kürzlich wurden AAV-Vektoren durch sogenanntes DNA-*shuffling* modifiziert (Maheshri et al. 2006; Grimm et al. 2008; Li et al. 2008). Bei diesem Verfahren entstehen durch *in vitro* Rekombination viele neue genetische Variationen. 2009 wurde erstmals ein Verfahren zur *in vivo* Selektion beschrieben (Yang et al. 2009). In anderen Ansätzen werden für einen zelltypgerichteten Gentransfer zell- oder gewebespezifische Promotoren verwendet (Müller et al. 2006) oder durch mechanische Verfahren die organspezifische Anreicherung der AAVs beschrieben (Müller et al. 2008).

Die relativ geringe Verpackungskapazität (<5 Kb) der AAVs konnte durch die Möglichkeit der Heterodimerisierung und dem späteren Herausspleißen der viralen DNA verdoppelt werden (Nakai et al. 2000; Sun et al. 2000; Yan et al. 2000). Eine weitere Optimierung der Vektoren erfolgte durch die Entwicklung von selbst-komplementären (McCarty et al. 2001) und den verbesserten doppelsträngigen Vektoren (Wang et al. 2003), die den zeitlimitierenden Schritt der Umwandlung des Einzelstranggenoms in das Doppelstranggenom umgehen, wodurch es zu einem Anstieg der Transgenexpression kommt. Daneben ist für die Etablierung einer stabilen, langfristigen Expression die Ausbildung von hochmolekularen konkatemeren Strukturen, die über lange Zeit episomal persistieren können, entscheidend (Xiao et al. 1996; Snyder et al. 1997). Die lang anhaltende Transgenexpression scheint weiterhin auch auf die geringe Immunogenität der AAVs zurückzuführen zu sein. AAV-Vektoren infizieren Antigen-präsentierende Zellen nur schlecht und exprimieren keine viralen Gene. Sie induzieren deshalb nur eine milde Immunantwort (Fisher et al. 1997; Jooss et al. 1998). Dennoch ist eine humorale Immunantwort durch das AAV-Kapsid möglich, und auch das Transgen selbst kann immunstimulierend wirken. Es ist nicht ausgeschlossen, dass sich in diesem Zusammenhang die hohe Seroprävalenz von AAV-Antikörpern in der Bevölkerung als nachteilig erweisen könnte, obwohl sich nur etwa bei 1/3 neutralisierende Antikörper finden lassen (Chirmule et al. 1999). Außerdem sind die Auswirkungen einer hochdosierten Vektorgabe auf das Immunsystem unklar und bedürfen noch weitere Studien.

Der direkte Vergleich verschiedener natürlich vorkommender Serotypen zeigte für AAV9 die höchste Effizienz des myokardialen Gentransfers nach intravenöser Injektion in Mäusen (Inagaki et al. 2006; Pacak et al. 2006; Zincarelli et al. 2008). Der systemische Transfer von AAV9-Vektoren, die die α -Glukosidase exprimieren, führte zu einem reduzierten kardialen Glykogengehalt in einem Mausmodell der Glykogenspeicherkrankheit II, die in betroffenen Kindern zum Tod durch Herzversagen führen kann (Pacak et al. 2006). Weiterhin konnte in δ -Sarkoglykan KO-Mäusen, einem Modell einer hereditären dilatativen Kardiomyopathie, durch AAV9-vermittelten Transfer der intakten δ -Sarkoglykan-cDNA ein transmuraler Gentransfer erzielt werden (Goehring et al. 2009). Diese Ergebnisse

unterstreichen die prinzipielle Eignung der AAV-Vektoren zum systemischen Gentransfer in Mäusen. Auch in Patienten mit Herzinsuffizienz werden AAV-Vektoren bereits im Rahmen einer klinischen Studie zum Gentransfer der SERCA2a cDNA eingesetzt (Jaski et al. 2009), deren grundsätzliche Eignung zur Verbesserung der kardialen Kontraktilität in mehreren präklinischen Studien gezeigt werden konnte (Müller et al. 2003b). Des Weiteren konnte der prinzipielle Einsatz von AAV-vermitteltem Gentransfer zur siRNA bzw. short shRNA Expression mit folgender selektiver Stilllegung von Genen bereits von mehreren Arbeitsgruppen erfolgreich *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden (del Monte et al. 2002; Fechner et al. 2007; Grimm et al. 2008; Suckau et al. 2009).

Für eine effiziente *in vitro*-Transduktion von primären kardialen Zellen, insbesondere von neonatalen Rattenkardiomyozyten, neonatalen Mäusekardiomyozyten und künstlichem Herzmuskelgewebe, wurde der Serotyp 6 verwendet (Sipo et al. 2007; Fechner et al. 2008). Bei diesem Projekt ist die Wahl und Qualität des richtigen Vektors von zentraler Bedeutung und erfolgte daher in enger Zusammenarbeit mit Dr. Müller (DKFZ, Heidelberg).

1.5 Zielsetzung

Die Pharmakotherapie der humanen Herzinsuffizienz mit β -Blockern führt zu einer eindrucklichen Prognoseverbesserung. Aus klinischer und pathophysiologischer Sicht ist die Blockade aller β -adrenerg-vermittelten Effekte jedoch nicht immer sinnvoll bzw. erwünscht. Dies impliziert, Therapieprinzipien zu entwickeln, die ihren primären Angriffspunkt innerhalb des Kardiomyozyten haben und dort die β -adrenerge Signalkaskade spezifischer modulieren. Das Abschwächen (*Knockdown*) von Inhibitor-1 ist eine interessante Option, da es das β -adrenerge Signal präferentiell am SR moduliert und die genetische Defizienz dieses Proteins in Mäusen vor Katecholamin-induzierten Arrhythmien, Hypertrophie und Fibrose eindrucklich schützt. Bisher ist eine pharmakologische Beeinflussung des Inhibitor-1 mittels niedermolekularer Substanzen nicht möglich, weshalb in diesem Projekt eine gentherapeutische Inhibitor-1-Abschaltung mittels Adeno-assoziiierter Virus-Vektoren auf Basis der RNA-Interferenz etabliert und mit einer Genabschaltung des prominenten β_1 -ARs verglichen werden soll.

Das Ziel sollte in folgenden Arbeitsschritten erreicht werden:

- o Evaluierung von Zielsequenzen zum effektiven *Knockdown* von Inhibitor-1 und β_1 -AR *in vitro*.
- o Konstruktion, Produktion und Titration von shAAV-Vektoren, die die effizientesten Inhibitor-1 bzw. β_1 -AR Zielsequenzen kodieren.
- o Optimierung des Inhibitor-1 bzw. β_1 -AR *Knockdowns* nach AAV6-shRNA Transduktion in Kardiomyozyten und/oder künstlichem Herzmuskelgewebe *in vitro*.
- o Erfassung der Auswirkungen der Inhibitor-1 und β_1 -AR Herunterregulation in Kardiomyozyten und/oder künstlichem Herzmuskelgewebe *in vitro*.
- o Optimierung des Inhibitor-1 bzw. β_1 -AR *Knockdowns* nach AAV9-shRNA Transduktion *in vivo*.
- o Erfassung der Auswirkungen der Inhibitor-1 und β_1 -AR Herunterregulation auf die Herzfunktion *in vivo*.
- o Histologische, proteinbiochemische und molekularbiologische Analyse der transduzierten Mäuseherzen und Korrelationen mit den *in vivo* Daten.

2 Material und Methoden

2.1 Klonierung

2.1.1 Plasmidvektoren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmidvektoren sind im Anhang in Tabelle 12.12 aufgeführt.

2.1.2 Restriktionsverdau

Die gewünschte DNA wurde mit der erforderlichen Menge des jeweiligen Restriktionsenzymys 1-2 h gemäß Herstellerangaben (Puffer, Temperatur; New England Biolabs, NEB) inkubiert. Die Reaktionen wurden bei 65 °C für 10 min gestoppt und die entstandenen Fragmente gelelektrophoretisch analysiert und bei Bedarf aufgereinigt. Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme sind im Anhang in Tabelle 12.8 aufgeführt.

2.1.3 Gelaufreinigung von DNA

Die Reaktionsprodukte aus PCR oder Restriktionsverdau wurden auf ein 1%iges Agarosegel 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, die Banden unter UV-Belichtung markiert, dann wieder an das restliche Gel angelegt. Anschließend konnte mit Hilfe der Markierung die Bande als Gelblock ausgeschnitten werden. Die Gelelution erfolgte mit dem Gelextraktions-Kit (Nucleo Spin[®] Extract II, Macherey-Nagel). Dabei wurde zunächst der Gelblock aufgelöst, die DNA an eine Silikasäule gebunden und anschließend mit bidestilliertem Wasser aus der Säule eluiert.

2.1.4 Ligation

Alle Ligationsreaktionen wurden mit der T4-DNA-Ligase (New England Biolabs, NEB) durchgeführt. In einem Ligationsvolumen von 10-20 µl wurden 10-30 ng Vektor-DNA mit einem dreifachen molaren Überschuss an Fragment-DNA mit T4-DNA-Ligase im entsprechenden Ligationspuffer (ATP-haltig) über Nacht bei 14 °C inkubiert. Der Ansatz wurde direkt zur Transformation eingesetzt.

2.1.5 Herstellung von LB- Medium und Agarplatten

LB-Medium für Schüttelkulturen

Trypton	1% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	171 mM

in wässriger Lösung, mit NaOH auf pH 7,4 eingestellt, sterilisiert.

LB-Agarplatten

Agar	15 g
------	------

ad 1000 ml mit LB-Medium, sterilisiert und nach dem Abkühlen auf 37 °C mit Ampicillin (100 mg/l) oder Kanamycin (50 mg/l) versetzt.

2.1.6 Herstellung chemisch-kompetenter E. coli

Zur Herstellung chemisch-kompetenter E. coli (Inoue et al. 1990) wurde eine Bakterienkolonie auf einer LB-Platte ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde von einem Klon eine 10 ml Vorkultur in LB-Medium angeimpft und für 4 h bei 37 °C kultiviert. 2 ml dieser Vorkultur wurden mit 250 ml LB-Medium versetzt und bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte OD₅₉₅ 0,45 kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde für 5 min auf Eis gekühlt, um das Bakterienwachstum zu stoppen und dann für 5 min (4000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 80 ml eisgekühltem TFB I-Puffer resuspendiert, 5 min auf Eis inkubiert und erneut für 5 min (4000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 10 ml TFB II-Puffer resuspendiert, nochmals 15 min auf Eis inkubiert und anschließend in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Alle in dieser Arbeit eingesetzten Bakterienstämme sind im Anhang in Tabelle 12.10 aufgeführt.

TFB I

K-Acetat	30 mM
CaCl ₂	10 mM
MnCl ₂	50 mM
RbCl	100 mM
Glycerin	15%

in wässriger Lösung mit 0,2 M Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt, sterilfiltriert.

TFB II

MOPS	10 mM
CaCl ₂	75 mM
RbCl	10 mM
Glycerin	15%

in wässriger Lösung mit 1 M KOH auf pH 6,5 eingestellt, sterilfiltriert.

SOB-Medium

Trypton	2% (w/v)
Hefeextrakt	0,5% (w/v)
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM (sterilfiltriert)
MgSO ₄	10 mM (sterilfiltriert)

in wässriger Lösung mit 5 M NaOH auf pH 7,4 eingestellt, autoklaviert und vor Gebrauch erfolgte die Zugabe von MgCl₂, MgSO₄.

2.1.7 Transformation von E. coli durch Hitzeschock

Für die Transformation wurden 100 µl chemisch kompetenter Bakterien zusammen mit der zu transformierenden DNA (5 µl Ligationsansatz oder 5-20 ng Plasmid-DNA) für 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 30 s auf 42 °C erhitzt (Hitzeschock) und dann für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 300 µl LB-Medium und Inkubation für 60 min bei 37 °C wurden die Bakterien auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

2.1.8 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 Übernachtskultur wurde für 16 h bei 37 °C mit 200 rpm geschüttelt.

2.1.9 Mini-Plasmidpräparation

Hierfür wurden 2 ml der Übernachtskultur (Kapitel 2.1.8) in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt und 1 min (13000 rpm) zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen

und das Pellet in 200 µl Puffer P1 resuspendiert. Die Bakterien wurden mit 200 µl des Puffers P2 lysiert und die Lyse anschließend mit 200 µl des Puffers P3 gestoppt. Der entstandene weiße Niederschlag aus präzipitierten Proteinen und Bakterienfragmenten wurde für 10 min (13000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Der DNA-haltige Überstand wurde vorsichtig abgenommen und mit 500 µl reinem Isopropanol versetzt und für 20 min (13000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, nochmals bei 10 min (13000 rpm, 4 °C) zentrifugiert, luftgetrocknet und in 30 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Kapitel 2.1.11). Positive Klone wurden mittels Restriktionsanalyse (Kapitel 2.1.2) verifiziert.

Puffer P1	50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0
Puffer P2	200 mM NaOH, 1% (w/v) SDS
Puffer P3	3 M Kaliumacetat, pH 5,5

2.1.10 Maxi-Plasmidpräparation

Mit der präparativen Plasmidisolierung wurden Plasmide aus Übernachtskulturen mit einem Volumen von 250 ml bis 2 l gewonnen, die tags zuvor aus einer 10 ml Vorkultur angeimpft wurden. Die Aufarbeitung erfolgte mit Hilfe des Plasmid-Maxi-Kits (NucleoBond® PC 500, Macherey-Nagel) gemäß dem Herstellerprotokoll. Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Kapitel 2.1.11) und die qualitative Analyse der Plasmide erfolgte mittels Restriktionsanalyse (Kapitel 2.1.2).

2.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Spektrophotometer (NanoDrop® ND-1000, PeqLab). Zur Überprüfung der Reinheit der Nukleinsäuren dient der Quotient A260/A280 (NS/Proteine). Aus dem Verhältnis der A260/280 erhält man eine Aussage über Proteinkontaminationen, da die aromatischen Aminosäuren (Tyrosin, Tryptophan) von Proteinen bei 280 nm ein Absorptionsmaximum besitzen, sodass der Quotient A260/280 bei deren Vorhandensein abnimmt. Der

optimale Quotient A260/280 für DNA liegt zwischen 1,7-1,9 und für RNA zwischen 1,9-2,1.

2.1.12 Klassische PCR (*polymerase chain reaction*)

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels nicht-quantitativer PCR verschiedene cDNA-Sequenzen mit unterschiedlichen Primern (Anhang: Tabellen 11.4-11.6) für folgende Untersuchungen amplifiziert: (1) die Umklonierung der Vektoren für die Herstellung stabiler Zelllinien (Kapitel 3.1.1), (2) die Herstellung der AAV-Vektoren (Kapitel 3.4) und (3) für Sequenzierungsanalysen (Kapitel 2.1.14). Der PCR-Reaktionsansatz (Tabelle 2.1) und die PCR-Temperaturbedingungen zur Amplifikation (Tabelle 2.2) wurde entsprechend den Angaben der AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase (Applied Biosystems) gewählt.

Tabelle 2.1 Reaktionsansatz einer PCR mit AmpliTaq Gold® DNA-Polymerase.

Bestandteil	Endkonzentration
10X PCR Puffer	1X
dNTPs	0,2 mM je Nukleotid
MgCl ₂	3 mM
Primer for	0,2 µM
Primer rev	0,2 µM
Taq-DNA Polymerase	0,1 U/µl
Template	5-500 ng
Wasser	ad 50 µl

Tabelle 2.2 PCR-Temperaturbedingungen für GeneAmp® PCR System 9700.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Denaturierung	94	7:00	1
Denaturierung	94	00:30	35
Hybridisierung	55	00:45	
Elongation	72	00:45	
Elongation	72	07:00	1

Der Hybridisierungsschritt ist hier mit einer Temperatur von 55 °C angegeben. Dieser variierte aber je nach der Schmelztemperatur T_m der Primer. Die Hybridisierungstemperatur wurde 5 °C unter der T_m des Primers gewählt. Die

Oligonukleotidprimer hybridisieren an komplementäre Regionen des zu amplifizierenden DNA-Fragments (*Template*). Die hitzestabile *Taq*-DNA-Polymerase hängt Nukleotide an die 3'-OH-Primer-Enden (*Annealing*) und synthetisiert das zwischen den Primern liegende DNA-Fragment in Gegenwart von freien Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs; *Elongation*). Darauf folgt ein neuer Zyklus, bestehend aus Denaturierung, Hybridisierung und DNA-Synthese. Der Zyklus wurde 20 bis 40-mal wiederholt.

2.1.13 Gelelektrophorese

Die mittels RT-PCR amplifizierte cDNA wurde entsprechend ihrer Größe über 0,5-2%ige Agarosegele aufgetrennt und die Größe der separierten Fragmente über einen Molekulargewichtsmarker bestimmt (Gene Ruler™ 1 Kb und Gene Ruler™ 100 Bp, Fermentas). Die Agarose wurde durch Aufkochen in TAE-Puffer gelöst und mit 0,03% Ethidiumbromid (EtBr) versetzt und nach dem Abkühlen in eine Gelkammer gegossen.

Das Gel wurde mit der DNA mit Ladefarbe (im Verhältnis 6:1) und dem Molekulargewichtsmarker beladen und mit TAE-Puffer bedeckt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von ca. 5 V/cm oder 1 V/cm bis zur gewünschten Auftrennung in einer Elektrophoresekammer (Bio-Rad). Unter UV-Licht (302 nm) konnten die DNA-Banden, durch das in der DNA interkalierte EtBr, sichtbar gemacht und durch ein Kamerasystem (Chemie Genius² Bio-Imaging System, Syngene) elektronisch festgehalten werden.

1X TAE-Puffer

Tris-Base	40 mM
EDTA	1 mM
Essigsäure	40 mM

in wässriger Lösung, pH 8,3 eingestellt.

6X Ladefarbe

Bromphenolblau	75 mg
Xyclencyanol	25 mg
Glycerol	100 ml

2.1.14 DNA-Sequenzierung

Für die DNA-Sequenzierung wurde ein kommerzieller Sequenzierdienst von Eurofins MWG Operon in Anspruch genommen. Dazu wurde zunächst eine PCR zur Amplifikation der entsprechenden Ziel-DNA durchgeführt. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 3 M Natriumacetat (0,1 Volumenteile) und absolutem Ethanol (2,5 Volumenteile) für 30 min (14000 rpm, 4 °C) gefällt, mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde luftgetrocknet, in bidestilliertem Wasser aufgenommen (5 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl) und schließlich mitsamt Primern (2 pmol/µl; Mindestvolumen: 15 µl) zur Sequenzierungsanalyse versandt. Alternativ wurde auch gereinigte Plasmid-DNA (50-100 ng/µl in einem Gesamtvolumen von 15 µl), ohne vorherige PCR, sequenziert.

2.1.15 Isolation zellulärer DNA

Die Gewinnung und Aufreinigung von Gesamt-DNA aus Zellen oder Gewebe erfolgte mit Hilfe eines kommerziellen *DNeasy Blood & Tissue Kits* (Qiagen) nach Herstellerprotokoll. Für die Isolation von Gesamt-DNA aus Gewebe wurden 10 mg pulverisiertes Gewebe eingesetzt.

2.2 Zellkultur

Alle nachfolgend aufgeführten Arbeiten wurden im Labor der Sicherheitsstufe 1 unter sterilen Bedingungen, unter Laminarluftstrom in der Zellkultur, durchgeführt.

2.2.1 Adhärente Zellen

Als Nährlösung für die verwendeten Zelllinien dienten die unten aufgeführten Medien der Firma Invitrogen, angereichert mit inaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS), L-Glutamin, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml). Die Zellen wurden in Zellkulturschalen bei 37 °C und 7% CO₂ inkubiert.

HEK293 Medium

Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃)

FCS (inaktiv) 10% (v/v)

L-Glutamin 1% (v/v)

Penicillin/Streptomycin 1% (v/v)

FCS wurde durch Erhitzen im Wasserbad auf 56 °C für 1h inaktiviert.

CHO Medium

F12 Medium

Penicillin/Streptomycin 1% (v/v)

2.2.1.1 Erhaltungskultur adhärenter Zellen

Die adhärenenten Zelllinien wurden als Monolayerkultur in Zellkulturschalen (Durchmesser von 3,5 cm, 6 cm, 10 cm) im Inkubator bei 37 °C, 7% CO₂ in gesättigter H₂O-Atmosphäre kultiviert. Durch regelmäßige Passagierung alle 4-5 Tage wurden die Zellen vermehrt. Bei einer Zelldichte >80% Konfluenz wurden die Zellen im gewünschten Verhältnis gesplittet. Die Zellen wurden hierfür einmal mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit Trypsin/EDTA bzw. Citratlösung für 1-5 min bei 37 °C abgelöst. Die Zellsuspension wurde mit serumfreiem DMEM-Medium auf das zweifache Volumen aufgefüllt und 5 min bei RT, 600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in frischem serumhaltigen Nährmedium resuspendiert. Die Zellen wurden zur weiteren Kultivierung in Zellkulturschalen überführt. Der Mediumwechsel erfolgte alle zwei Tage.

10X Citratlösung

KCl 50,3 g

Na-Citrat 22 g

in 500 ml wässriger Lösung, sterilisiert.

Trypsin/EDTA

Trypsin 0,05% (w/v)

EDTA 0,02% (w/v)

PBS

NaCl 137 mM

KCl 2,7 mM

Na₂HPO₄ 6,5 mM

KH₂PO₄ 1,4 mM

in wässriger Lösung, sterilisiert.

2.2.1.2 Stammkulturen

Etwa 10^7 Zellen wurden wie bei der Passagierung behandelt (Kapitel 2.2.1.1), nach Zentrifugation wurde das Zellpellet in 2 ml eiskaltem Einfriermedium aufgenommen und zu 1 ml in Kryogefäße aliquotiert, langsam über Nacht auf $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ abgekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert. Zur Rekultivierung wurden die Zellen schnell aufgetaut ($37\text{ }^{\circ}\text{C}$) und zügig in 10 ml serumfreiem DMEM-Medium resuspendiert, gewaschen und dann 5 min bei RT, 600 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in der gewünschten Menge Nährmedium aufgenommen und in Zellkulturschalen überführt.

Einfriermedium

FCS (aktiv)	50%
DMEM	40%
DMSO	10%

2.2.1.3 Transfektion

Alle Transfektionsexperimente mit Plasmid-DNA bzw. siRNA wurden mit dem Agens *Lipofectamine™ 2000* (Invitrogen) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Die Zellen wurden einen Tag vor Transfektion in antibiotikafreiem Nährmedium ausplattiert, sodass sie am Tag der Transfektion zu etwa 90% konfluent waren. Entsprechend dem Zellkulturfomat wurden die Mengen an DNA/siRNA und Transfektionsagens angepasst. Die zu transfizierende DNA-Menge wurde in serumfreiem Medium (OptiMEM, Invitrogen) verdünnt. Lipofektamin wurde ebenfalls mit OptiMEM verdünnt, für 5 min bei RT inkubiert und dann mit der DNA-Lösung vermischt und für weitere 25 min bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann auf die Zellen gegeben und vorsichtig gleichmäßig verteilt. Die Zellen wurden bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 7% CO_2 für mindestens 48 h kultiviert, bevor auf Transgenexpression bzw. Genrepression untersucht wurde.

2.2.1.4 Selektion

Die Selektion der Zellen zur Generierung der stabilen Zelllinien erfolgte mit Hilfe des Selektionsantibiotikums Geneticin (Invitrogen) in einer Konzentration von 1 mg/ml Medium. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion im Verhältnis 1:5 gesplittet und nach weiteren 24 h wurde das Selektionsmedium zugegeben. Die

Erhaltungskultur der stabilen Zelllinien wurde weiterhin in Selektionsmedium gehalten.

2.2.1.5 Behandlung der Zellen mit Cycloheximid

Cycloheximid (Sigma-Aldrich) inhibiert während der Translation die Peptidyltransferase bei Eukaryonten und damit die komplette zelluläre Proteinbiosynthese, was zum Absterben der Zelle führt. Mittels Western Blot Analyse konnte der Proteingehalt eines bestimmten Proteins im gesamten Proteinlysate einer Zellkultur untersucht und damit der Abbauprozess des Proteins dargestellt werden. Cycloheximid lag in DMSO gelöst vor, sodass Kontrollkulturen mit der äquivalenten DMSO-Menge versetzt wurden.

2.2.2 Zellpräparation neonataler Rattenkardiomyozyten (nRKM)

Die Präparation neonataler Rattenkardiomyozyten erfolgte in unserem Hause standardisiert durch die Technischen Assistentinnen Frau Marianne Flato und Frau June Uebeler.

2.2.2.1 Tierhaltung

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

2.2.2.2 Organentnahme

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

CBFHH

NaCl	136,9 mM
KCl	5,36 mM
MgSO ₄ (x 7 H ₂ O)	0,81 mM
Glucose	5,55 mM
KH ₂ PO ₄	0,44 mM
Na ₂ HPO ₄ (x 7 H ₂ O)	0,34 mM
HEPES	20 mM

in wässriger Lösung, pH 7,5, sterilfiltriert. Die Herstellung erfolgte aus sterilen Stammlösungen (autoklaviert oder sterilfiltriert). Lagerung bei 4 °C.

HEPES-Stammlösung

HEPES	0,2 M
-------	-------

in wässriger Lösung, sterilfiltriert, Lagerung bei 4 °C.

2.2.2.3 Enzymatischer Gewebeaufschluss

Nach der Herzentnahme erfolgten die Zellpräparation, Herstellung der künstlichen Herzmuskelgewebe und die anschließende Zellkultur unter sterilen Bedingungen. Alle für den Verdau verwendeten Lösungen wurden vor jeder Präparation frisch angesetzt, sterilfiltriert oder autoklaviert. Das Präparationsbesteck wurde vor jeder Präparation autoklaviert.

Nach Säuberung der Herzen und Abtrennung des Gefäßstiels sowie der Vorhöfe wurden die Herzen in der Mitte zweigeteilt und in eine neue Kulturschale mit steriler eisgekühlter CBFHH-Lösung transferiert. Nach dreimaligem Spülen mit je 10 ml CBFHH wurden die Herzen in einem Gesamtvolumen von ca. 2 ml CBFHH mit einer gebogenen chirurgischen Präparationsschere bis auf eine Größe von weniger als 1 mm³ zerkleinert. Mit einer mit CBFHH benetzten, weitlumigen Pipette erfolgte die Überführung der zerkleinerten Gewebestücke in ein 50 ml Sammelgefäß. Nach weiterem dreimaligen Spülen mit je 10 ml CBFHH und Verwerfen des jeweiligen Überstandes wurde anschließend der enzymatische Gewebeaufschluss mit Trypsin/DNase nach einer modifizierten Methode von Webster et al. 1993 durchgeführt.

Der Beginn des Verdaus erfolgte durch Zugabe von 7 ml (bei etwa 30 Herzen) Trypsin-Arbeitslösung für 10 min. Die Inkubation der Gewebestücke mit der Trypsin-Arbeitslösung erfolgte jeweils bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schwenken auf einer Kippwippe (Neigungswinkel 15 °, 60 Kippbewegungen/min). Nach der Sedimentation der Gewebestücke wurde der trübe Überstand verworfen. Die Gewebestücke wurden in 7 ml Trypsin-Arbeitslösung resuspendiert und bis zur Trübung der Suspension, jedoch maximal 90 s, inkubiert und sedimentiert. Danach wurde der Überstand erstmalig in ein steriles 50 ml Sammelgefäß, das 5 ml aktives fetales Kälberserum (FCS) zur Inaktivierung des Trypsins enthielt, überführt und mit 6 ml DNase-Arbeitslösung inkubiert und trituriert (auf und ab pipettieren mit einer weitlumigen Pipette, 25-30X). Der Überstand wurde anschließend ebenfalls in das Sammelgefäß überführt. Dieser Wechsel von Protein/DNA-Verdau und reinem DNA-Verdau wurde unter langsamer Reduktion der Arbeitslösungsvolumina durchgeführt. Dabei wurde bei jedem Wechsel des Sammelgefäßes die Menge der Arbeitslösung um 0,5 ml reduziert bis die Mindestmenge von 6 ml (Trypsin-Arbeitslösung) bzw. 5 ml (DNase-Arbeitslösung) erreicht wurde. Die Dauer der weiteren Inkubationen mit Trypsin-Arbeitslösung richtete sich nach der Trübung des Überstandes. Der komplette Verdau der Gewebestücke dauerte im Mittel 4 h. Sobald ein Sammelgefäß vollständig gefüllt war, wurde es unmittelbar in einer Zentrifuge mit Schwenkbecherrotor zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C). Der klare Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Zellen wurden in den Sammelgefäßen in jeweils 2 ml Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM-Medium) aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gelagert.

Sobald alle Sammelgefäße gefüllt, zentrifugiert und die pelletierten Zellen in NKM-Medium resuspendiert waren, wurden die Zellsuspensionen in einem sterilen 50 ml Sammelgefäß vereinigt. Zusätzlich wurden die leeren Sammelgefäße mit 2 ml NKM gespült und auch diese Volumina zusammen mit der Zellsuspension gepoolt. Das Sammelvolumen wurde schließlich mit DNase-Stammlösung versetzt (0,8% des Gesamtvolumens), trituriert und für eine bessere DNase-Aktivität kurz für 2 min bei 37 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (60 g, 15 min, 4 °C) des Sammelgefäßes und Abnahme des Überstandes wurde das Zellpellet in 5 ml NKM aufgenommen und resuspendiert.

Die Zellsuspension wurde dann durch ein mit NKM-Medium vorgespültes Zellsieb (Maschengröße 100 µm) filtriert und das Sammelgefäß sowie das Zellsieb mit jeweils 2 ml NKM-Medium gespült. Nach einer 1:20 Verdünnung der Zellen und Färbung mit Trypanblau (150 µl Trypanblau, 800 µl NKM-Medium, 50 µl Zellsuspension) wurde die Anzahl der vitalen, ungefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden dann direkt für die Herstellung von FBMEs oder für die Monolayerkultur weiter verwendet.

Trypsin-Stammlösung

100 mg Trypsin pro ml CBFHH bei 4 °C ü. N. rotierend gelöst, sterilfiltriert.

DNase-Stammlösung

100 mg DNase (806 U/mg) in 50 ml PBS, sterilfiltriert. Lagerung bei -20 °C.

Trypsin-Arbeitslösung

Trypsin-Stammlösung	1,5 ml
DNase-Stammlösung	0,7 ml
Penicillin/Streptomycin	0,5 ml
CBFHH	ad 50 ml, frisch hergestellt, Lagerung auf Eis.

DNase-Arbeitslösung

FCS (inaktiv)	1,0 ml
DNase-Stammlösung	0,7 ml
Penicillin/Streptomycin	0,5 ml
CBFHH	ad 50 ml, frisch hergestellt, Lagerung auf Eis.

2.2.2.4 Neonatale Rattenkardiomyozyten in Monolayerkultur

Kardiomyozyten (KM) wurden stets als Zellsuspension in NKM-Medium übernommen. Um das Wachstum von Fibroblasten in der Kultur zu verringern, wurden die Zellen zunächst in eine Kulturschale überführt (maximal $20 \cdot 10^6$ Zellen pro 10 cm Schale) und 90 min bei 37 °C präinkubiert. Dabei wurden die Fibroblasten adhärent, wohingegen dieser Prozess bei Kardiomyozyten erheblich länger dauerte, sodass dies zur Anreicherung der Kardiomyozyten im Überstand führte. Die Zellsuspension wurde abgenommen und die Schale mehrmals mit NKM-Medium gespült. Alle Überstände wurden in einem Sammelgefäß vereinigt

und zentrifugiert (60 g, 15 min, 4 °C). Das überstehende Medium wurde vorsichtig abgenommen und die Kardiomyozyten anschließend in Kardiomyozyten-Medium (KM-Medium) vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden in der Regel mit einer Dichte von etwa $1 \cdot 10^5$ Zellen/cm² Kulturschalen ausgesät. Um die Überwucherung der KM durch teilungsfähige Fibroblasten und Endothelzellen zu verhindern, enthielt das KM-Medium außerdem den Antimetaboliten 5'-Brom-2'-deoxyuridin (BrdU, Sigma-Aldrich), der die DNA-Synthese und damit die Zellteilung hemmt. Die Kultur der KM erfolgte bei 37 °C und 7% CO₂. Nach 24 h war ein großer Teil der KM angeheftet und die ersten spontanen Kontraktionen waren zu beobachten. Spätestens 48 h nach Aussaat hatte sich ein dichter kohärent schlagender Zellrasen gebildet. Zu diesem Zeitpunkt wurde der erste Mediumwechsel vorgenommen.

Nicht-Kardiomyozyten-Medium (NKM-Medium)

Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃)

FCS (inaktiv) 10% (v/v)

L-Glutamin 1% (v/v)

Penicillin/Streptomycin 1% (v/v)

Kardiomyozyten-Medium (KM-Medium)

Minimal Essential Medium (MEM-Earle; 2,2 g/l NaHCO₃, ohne L-Glutamin)

FCS (inaktiviert) 10% (v/v)

L-Glutamin 1% (v/v)

Penicillin/Streptomycin 1% (v/v)

BrdU (10 mM) 1% (v/v) frisch zugesetzt

BrdU (5'-Brom-2'-deoxyuridin)

BrdU 10 mM

in wässriger Lösung, sterilfiltriert. Eine Woche bei 4 °C stabil.

2.2.2.5 Herstellung und Kultivierung von FBMEs im 24-Well Maßstab

Für 24 Fibrin-basierte Mini-EHTs (FBMEs) wurde bei jeder Präparation eine neue Gussform vorbereitet. Dafür wurden Platzhalter aus Teflon in eine 24-Well Kulturschale gesetzt, die dann pro Well mit 1,6 ml 2%iger Agarose in PBS aufgefüllt wurde. Nach Aushärtung der Agarose wurden die Platzhalter vorsichtig

entfernt und durch Silikonhalterungen ersetzt, sodass in jede einzelne Gussform zwei Halterungen (Silikonposts) hineinragten, an denen die FBMEs nach ihrer Aushärtung fixiert waren. Die Herstellung der FBMEs erfolgte wie in Abbildung 2.1 A dargestellt.

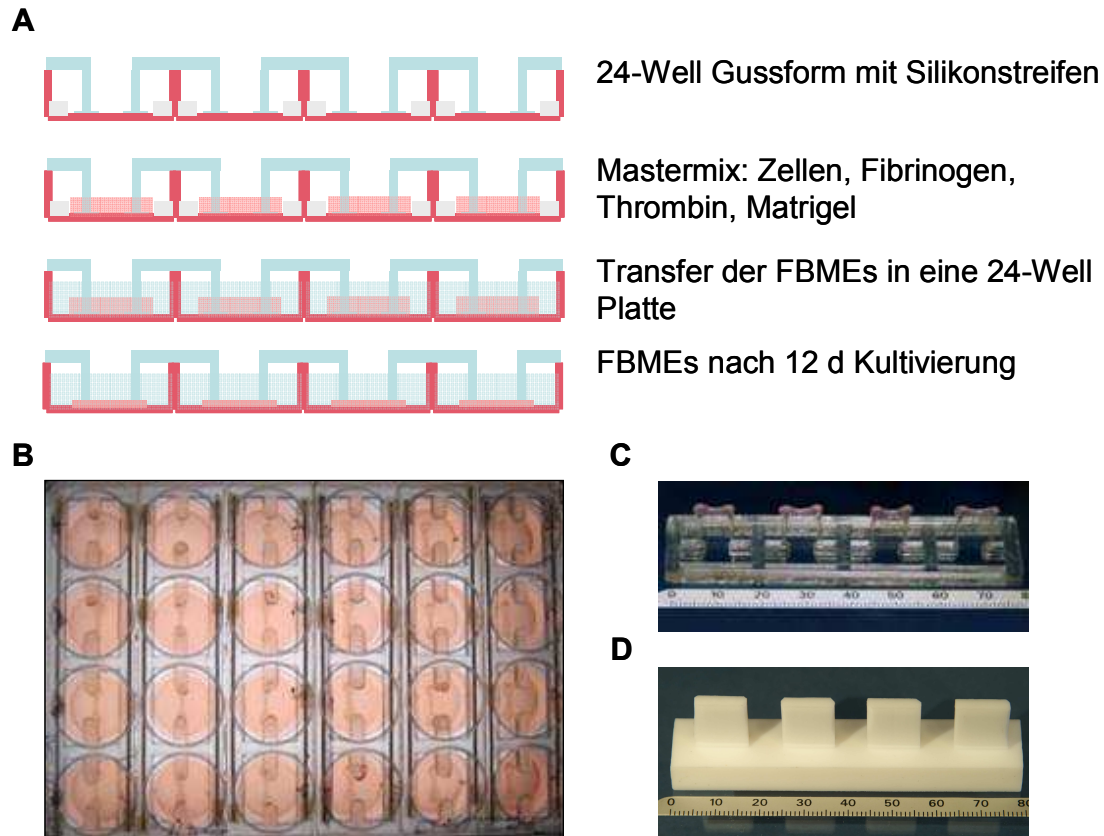


Abbildung 2.1 FBME-Generierung im 24-Well Maßstab. (A) Schematische Darstellung der FBME-Herstellung im 24-Well Format. (B) Eine 24-Well Platte mit FBMEs. (C) Ein Silikonstreifen mit 4 FBMEs in einer Reihe. (D) Platzhalter aus Teflon.

Alle Schritte bis zur Zugabe des Thrombins wurden auf Eis durchgeführt. Für 24 FBMEs wurde ein Mastermix (Tabelle 2.3) mit einem Volumen von 5 ml hergestellt. Zunächst wurde die benötigte Anzahl von Kardiomyozyten in einem Sammelgefäß vorgelegt und schrittweise NKM-Medium, 2X DMEM und Fibrinogen zugegeben. Die Zellsuspension wurde wiederholt resuspendiert, um eine homogene Verteilung aller Komponenten zu erzielen. Erst bei der Pipettierung der einzelnen FBMEs wurden 5 μ l Thrombin zu 145 μ l des Mastermixes zugefügt und dann zügig in die 24-Well-Gussform mit der Silikonhalterung überführt. Zur Polymerisation des Fibrinogens wurden die FBMEs für 2 h bei 37 °C, 7% CO₂ inkubiert und nach ihrer Aushärtung vorsichtig in eine neue 24-Well Kulturschale

mit 1,5 ml frischem FBME-Medium pro Well überführt und im Inkubator bei 37 °C, 7% CO₂ kultiviert, wobei an jedem zweiten Tag ein Mediumwechsel erfolgte.

Aprotinin-Stammlösung

Aprotinin 33 mg/ml

in wässriger Lösung, steril.

Fibrinogen-Stammlösung

Fibrinogen 200 mg/ml

Aprotinin 0,5 µg/mg Fibrinogen

in 0,9% NaCl, steril.

10X DMEM

DMEM (4500 mg/l Glucose, Pyruvat, NaHCO₃)

DMEM 630 mg/5 ml

in wässriger Lösung, sterilfiltriert.

2X DMEM

10X DMEM 20% (v/v)

Pferdeserum (inaktiv) 20% (v/v)

CEE 4% (v/v)

Penicillin/Streptomycin 2% (v/v)

in wässriger Lösung, steril.

Insulin (Sigma-Aldrich) 10 mg/ml

Thrombin (Sigma-Aldrich) 100 Einheiten/ml

FBME-Medium

Dulbecco Minimal Essential Medium (DMEM; 1 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃)

Pferdeserum (inaktiv) 10% (v/v)

CEE 2% (v/v)

Penicillin/Streptomycin 1% (v/v)

Insulin 0,1% (v/v)

Aprotinin 0,1% (v/v)

Tabelle 2.3 Zusammensetzung des Mastermixes für die FBME-Herstellung.

FBME-Mastermix	
Zellen	4,1x10 ⁶ Zellen/ml
Fibrinogen-Stammlösung	5 mg/ml
2X DMEM	56 µl
Thrombin (100 U/ml)	30 µl
in NKM-Medium ad 1 ml	

2.2.3 Zellpräparation neonataler Mäusekardiomyozyten (nMKM)

Die Präparation neonataler Mäusekardiomyozyten erfolgte standardisiert nach einem abgewandelten Protokoll von Laugwitz et al. 2005 durch Frau June Uebeler.

2.2.3.1 Tierhaltung und Organentnahme

Männliche und weibliche C57BL/6J-Mäuse aus der Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurden ebenfalls bei handelsüblichem Labortierfutter (Ssniff®) und Leitungswasser gehalten. Für die Versuchsdurchführung wurden neugeborene (1.-4. Tag postnatal) Tiere verwendet. Die Organentnahmen wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (Org #366).

Die Tiere wurden dekapitiert und thorakotomiert. Nach zügiger Entnahme der Herzen wurden diese umgehend in *Hank's balanced salt solution* ohne Calcium (HBSS) gelagert. Um eine ausreichende Ausbeute an Zellen zu erhalten, wurden mindestens 30 Herzen präpariert. Die Herzentnahme, Zellpräparation und die anschließende Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen (Kapitel 2.2.2.3).

2.2.3.2 Enzymatischer Gewebeaufschluss

Die Herzen wurden von anhängendem Gewebe wie Blutgefäßen befreit und mit kaltem HBSS gewaschen. Nach Teilung der Herzen in 4 Stücke erfolgte ein weiterer Waschschrift mit kaltem HBSS. Die Herzen wurden über Nacht in 35 ml Trypsin-HBSS-Lösung bei 4 °C in einem 100 ml Sammelgefäß unter Rotationsbewegung vorverdaut.

Trypsin-HBSS-Lösung

19,2 mg Trypsin in 40 ml HBSS (ohne Calcium und Magnesium) frisch hergestellt und sterilfiltriert.

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

Kollagenase II-Lösung

36 µl Kollagenase II (100mg/ml) in 40 ml HBSS (steril).

Dark Medium

Light Medium	70 ml
Pferdeserum (inaktiv)	8,3 ml
FCS (inaktiv)	4,1 ml

Light Medium

Medium M 199	25 ml
Penicillin/Streptomycin	1 ml
HEPES (1 M)	1 ml

in 75 ml DMEM (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium: 4,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l NaHCO₃, 862 mg/l stabiles Glutamin, ohne Natriumpyruvat) unter sterilen Bedingungen frisch hergestellt.

2.2.3.3 Neonatale Mauskardiomyozyten in Monolayerkultur

Für eine optimale spätere Kultivierung der Kardiomyozyten musste die Zellsuspension zunächst weitgehend von Nicht-Kardiomyozyten befreit werden. Hierfür wurden die Zellen in eine T-75-Zellkulturflasche überführt und in zwei Schritten jeweils für 75 min im Brutschrank (37 °C, 10% CO₂) inkubiert. So wurde eine Anreicherung der Kardiomyozyten im Überstand durch eine langsamere Anheftung erreicht (*Preplating*). Anschließend wurde die Suspension in ein 50 ml Sammelgefäß überführt. Beide T-75-Zellkulturflaschen (Schritt 1 und 2) wurden nach Entnahme der Zellen mit 5 bzw. 7,5 ml warmen *Dark Medium* gewaschen und zur gesamten Suspension hinzugefügt. Im letzten Schritt wurde die Zellsuspension zentrifugiert (320 rpm, 5 min, RT). Der Überstand wurde in ein neues Sammelgefäß transferiert und erneut pelletiert (320 rpm, 5 min, RT). Beide Pellets wurden in je 2 ml warmen *Dark Medium* resuspendiert und anschließend die Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Kapitel 2.2.2.3) ermittelt.

Die Zellen wurden auf Laminin-beschichtete Kulturschalen mit einer Dichte von $1 \cdot 10^5$ Zellen/cm² ausgesät und im Inkubator (37 °C, 10% CO₂) kultiviert. Um die Überwucherung der KM durch teilungsfähige Fibroblasten und Endothelzellen zu verhindern, enthielt das Kulturmedium den Antimetaboliten Cytarabin (Ara-C, Sigma), der die DNA-Synthese und damit die Zellteilung hemmt. Am dritten Tag nach Aussaat hatte sich ein dichter kohärent schlagender Zellrasen gebildet. Zu diesem Zeitpunkt wurde der erste Mediumwechsel vorgenommen.

Kulturmedium

Dark Medium mit Ara-C (25 µM).

Ara-C Stammlösung (25 mM)

608 mg Cytosin β -D-Arabino-Furanosid in 100 ml Aqua ad iniectabilia, sterilfiltriert und bei -20 °C im Dunkeln gelagert.

2.3 Erfassung der Kontraktionsdaten

2.3.1 Video-optische Messmethode

Die Kraft und die Frequenz der FBMEs wurden über ein video-optisches System analysiert. Die FBMEs befanden sich zum Zeitpunkt der Messung in einer Box (Abbildung 2.2 A), in der Temperatur (37 °C), CO₂-Gehalt (7%) und relative Luftfeuchte (95%) konstant gehalten wurden. Bei der Analyse wurde jedes einzelne FBME des 24-Well-Formates von einer Kamera, welche an ein XYZ-System montiert war, für einen bestimmten Zeitraum (variabel) gefilmt. Die Auswertung der Filme erfolgte automatisiert mittels einer speziell entwickelten Software (CTMV, Pforzheim). Die Software erkannte jeweils beide Enden der FBMEs in Höhe der *Posts* und berechnete deren Abstand zueinander und zeichnete diesen über die Zeit auf. Anhand der Geometrie der *Posts* (Durchmesser und Länge), des Elastizitätsmoduls (2,6 kPa) des verwendeten Silikons (Sylgard 184) und der Ablenkung der Silikonposts (Längenänderung) während der Kontraktion konnte die Kraft entsprechend berechnet werden (Vandenburgh et al. 2008). Die Aufzeichnung der Kontraktionen wurde durch Kriterien, wie Schwellenwert und minimale Relaxation bestimmt. Darüber identifizierte Kontraktionen wurden hinsichtlich ihrer Frequenz, Kraft, Flächenverkürzung (*fractional shortening*, FS), Kontraktionszeit (T1=Zeit bis zum Peak) und Relaxationszeit (T2=Zeit vom Peak bis 80% Relaxation) näher analysiert. Aus diesem Diagramm ergaben sich u. a. die maximale Kraftentwicklung und die Frequenz der Kontraktionen (Abbildung 2.2 B). Die Messungen in diesem Meßsystem erfolgten weder frequenzstimuliert noch unter Perfusion.

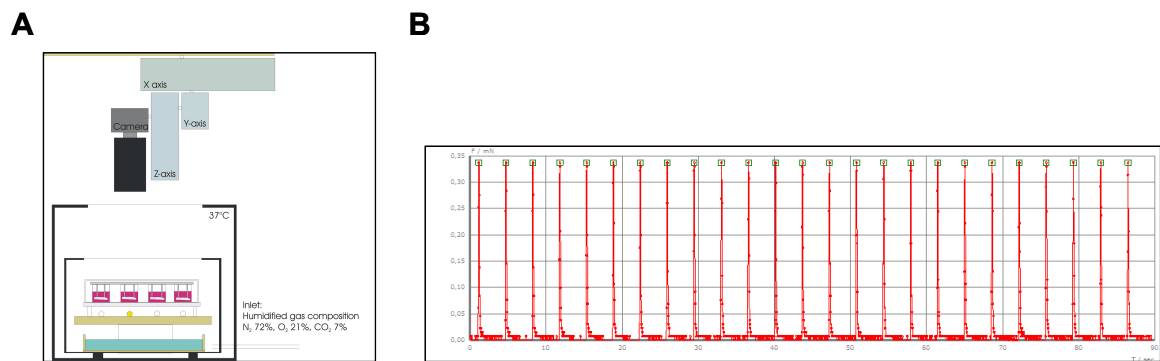


Abbildung 2.2 Video-optische Meßmethode zur Kraftentwicklung der FBMEs. (A) Aufbau der Messeinheit mit Kamera- und Computersystem. (B) Beispiel einer Messung und Darstellung als Diagramm, wobei die Kraft (mN) gegen die Zeit (s) aufgezeichnet wurde.

2.3.2 Funktionelle Analyse mittels *IonOptix*

Mit dem *IonOptix*-Meßsystem (IonOptix LLC, USA) konnten FBMEs unter Perfusion sowie unter Temperatur-, CO₂-Kontrolle und Frequenzstimulation untersucht werden. Es handelte sich dabei um ein Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200M, Carl Zeiss, Deutschland) mit einem entsprechenden Aufsatz zur Einhaltung der optimalen Umgebungsbedingungen. An das Mikroskop war weiterhin ein Kamerasystem (MyoCam, Fluorescence System Interface) mit der dazugehörigen Software (IonWizard 6.0 Software) gekoppelt. Normalerweise werden in diesem System Kontraktions-, und Calciumaufnahmen von isolierten Kardiomyozyten aufgezeichnet und ausgewertet, z. B. Messung der Sarkomerlänge und intrazelluläre Calciumtransienten. Prinzipiell ließen sich damit auch die Kontraktionsbewegungen der FBMEs über die Zeit aufzeichnen (Abbildung 2.3). Bisher konnten die Konstrukte nur einzeln analysiert werden. Außerdem erfolgte die Messung nicht unter sterilen Bedingungen, sodass es sich um ein finales Experiment handelte, welches zwischen Tag 18-21 der Kulturdauer durchgeführt wurde.

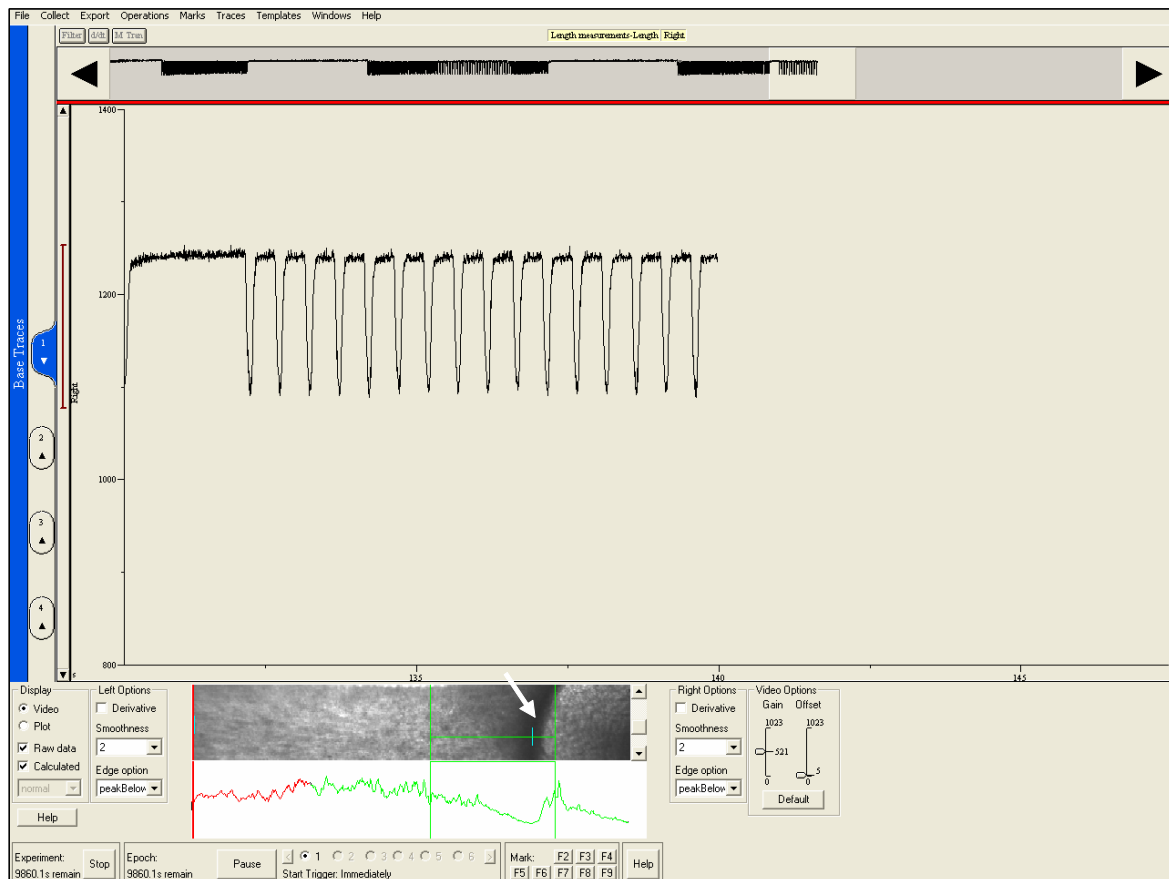


Abbildung 2.3 Monitor während einer Längenmessung. Im unteren Bildabschnitt ist das Live-Kamerabild des rechten Silikonposts dargestellt. Der Pfeil markiert die Stelle der Postererkennung. Im oberen Bildabschnitt wird die Verkürzung (Y-Achse: Länge in μm) der Silikonposts während der Kontraktion als Ausschläge nach unten gegen die Zeit (X-Achse: Zeit in s) aufgezeichnet. Das Konstrukt wurde mit einer Frequenz von 2 Hz stimuliert.

2.3.2.1 Experimenteller Aufbau

Die FBMEs wurden über den gesamten Zeitraum der Messung mit frischer calciumhaltiger Tyrodelösung bei 37 °C mit einer Flussrate von 6 ml/min perfundiert und gleichzeitig durch zwei in die Tyrodelösung tauchende Platinelektroden mit einer Frequenz von 2 Hz bei 30 Volt elektrisch stimuliert (SD 9 Stimulator, Grass Technologies, USA). Sowohl die Tyrodelösung als auch die Messkammer, in der sich die Konstrukte zum Zeitpunkt der Messung befanden, wurden mit Carbogen bzw. CO₂ begast, sodass die Kontraktionsmessungen bei 37 °C und 7% CO₂ erfolgten. So wurden die FBMEs nacheinander folgendem Messprotokoll ausgesetzt:

<u>Schritt</u>	<u>Tyrode mit c_{Ca} [mM]</u>	<u>$C_{Isoprenalin}$ [nM]</u>	<u>Zeit [min]</u>
1. Waschen	Ø	Ø	15-30
2.	0,05	Ø	10
3.	0,1	Ø	10
4. Stimulation	0,1	100	10
5. Waschen	Ø	Ø	10
6.	1,6	Ø	10

Tyrolöslösung ohne Calcium

NaCl	119,8 mM
KCl	5,4 mM
CaCl ₂	Ø
MgCl ₂	1,05 mM
NaHCO ₃	22,6 mM
NaH ₂ PO ₄	0,42 mM
Glucose	5,05 mM
Ascorbinsäure	0,28 mM
Titriplex (Na ₂ EDTA)	0,05 mM

in wässriger Lösung, pH 7,4 durch Begasung mit 95% O₂, 5% CO₂ (Carbogen).

CaCl₂-Stammlösung (2,25 M)

2.3.2.2 Prinzip der Messung der Verkürzung

Ähnlich der Sarkomerlängenmessung erkannte die IonOptix MyoCam™ einen Hell-Dunkel-Kontrast. Die regelmäßige Anordnung der Myofilamente Myosin und Aktin in der Herzmuskelzelle führte zur charakteristischen Querstreifung, die im Lichtmikroskop sichtbar war. Im Falle der FBMEs erschienen die kreisrunden Posts schwarz neben dem hellen Gewebeverband und erzeugten darüber den Kontrast. Dieser Unterschied in der optischen Dichte wurde von der Kamera erkannt und aufgezeichnet. Mittels der Einstellung der Längenmessung der IonWizard Software wurde das optische Signal in ein Signal der Verkürzung/Längenänderung der FBMEs während der Kontraktion umgewandelt und als Ausschlag nach unten gegen die Zeit aufgetragen (Abbildung 2.4). Die Kamera zeichnete 240 Bilder pro Sekunde auf.

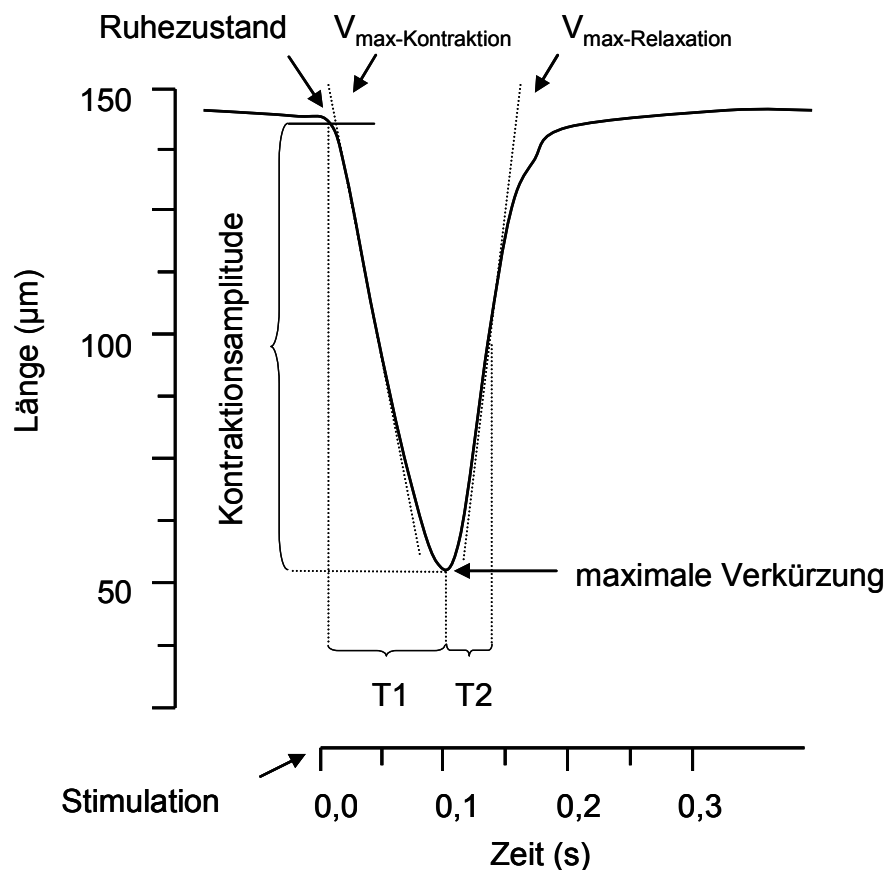


Abbildung 2.4 Beispiel einer Kontraktion mit den entsprechenden Parametern. Geschwindigkeit (V).

Ein Nachteil der Messmethode bestand darin, dass aufgrund des verwendeten Objektivs nicht das gesamte Konstrukt im Messbereich lag und somit die Verkürzung lediglich an einem Silikonpost gemessen werden konnte. Die Verkürzung konnte deshalb nicht automatisiert als Veränderung der absoluten Länge dargestellt werden, weshalb die exakte Kraft der FBMEs nicht automatisch berechnet wurde. Nachträglich wurde die absolute Postverkürzung x2 multipliziert und ins Verhältnis zur FBME-Länge gesetzt und darüber die Verkürzungsfraction (FS in %) während der FBME-Kontraktion bestimmt. Die Auswertung wurde mit der IonWizard Software 6.0 durchgeführt. Pro Experiment wurde der Mittelwert von 7 einzelnen Ausschlägen (Peaks) errechnet und so folgende Parameter ermittelt:

Ruhezustand:	FBME im relaxierten Zustand, vor Stimulation, entspricht der Grundlinie (relativer Wert).
Maximale Verkürzung:	Verkürzung des FBMEs bei maximaler

	Postauslenkung in Bezug zur Grundlinie, entspricht der Kontraktionsamplitude.
Kontraktionsamplitude:	Die Differenz der Postposition im Ruhezustand zur Postposition zum Zeitpunkt der maximalen Verkürzung (= Verkürzungsamplitude).
Maximale Kontraktionsgeschwindigkeit: ($V_{\text{max-Kontraktion}}$)	Die maximale Kontraktionsgeschwindigkeit wird als die größte Steigung des absteigenden Schenkels der Verkürzungszacke errechnet (Kontraktionsphase).
Maximale Relaxationsgeschwindigkeit: ($V_{\text{max-Relaxation}}$)	Analog zur oben genannten Kontraktion, die maximale Geschwindigkeit der Entspannung des FBMEs während der Relaxationsphase.
Verkürzungsfraction (FS)	Prozentuale maximale Postauslenkung während der Kontraktion (x 2) in Bezug zur FBME-Länge.
T1-Zeit zur Kontraktion $\times\%$	Dauer der Verkürzung bis zur Kontraktion (z. B. 90%) während der Kontraktionsphase.
T2-Zeit zur Grundlinie 50%	Dauer der Verkürzung bis zur Wiederherstellung der FBME-Länge entsprechend 50% der Ruhelänge während der Relaxationsphase.

2.4 shRNA Konstruktion

2.4.1 siRNA Design

Das Design der Inhibitor-1 und β_1 -AR siRNAs erfolgte grundsätzlich nach dem „*The siRNA user guide*“ (Tuschl et al. 1999). Die entsprechenden Zielsequenzen wurden unter Zuhilfenahme der Internetseite des *Whitehead Institute* ausgewählt (<http://jura.wi.mit.edu/bioc/siRNAext/>). Die dort zur Verfügung gestellte Datenbank berücksichtigt bei der Suche die von der Arbeitsgruppe Tuschl publizierten Kriterien für wirksame siRNA (Elbashir et al. 2001a; Elbashir et al. 2001c). Als Zielsequenz konnten folgende Sequenzmotive: AA(N19)TT oder NA(N21) verwendet werden, wobei N für ein beliebiges Nukleotid stand. Wir wählten das NA(N21)-Motiv, da mit dem AA(N19)TT-Motiv keine entsprechenden Sequenzen gefunden wurden. Für die möglichen siRNA-Sequenzen wurde frühestens 100 Nukleotide unterhalb des Startkodons gesucht, da sich davor zahlreiche

regulatorische Proteinbindungsstellen befinden können, die eine effiziente Anlagerung des siRNA/Nukleasekomplexes an die mRNA verhindern. Die spezifischen siRNA-Moleküle hatten eine Länge von 21 Nukleotiden und folgende Struktur: (N19)NN (Abbildung 2.5), wobei die letzten beiden Nukleotide frei wählbar waren. Der G/C-Gehalt sollte zwischen 30-70% liegen. Des Weiteren sollten die Sequenzen einen negativen thermodynamischen Wert haben, d. h. das 5'-Ende war instabiler als das 3'-Ende. Dadurch wurde gewährleistet, dass nur der Antisense-Strang in den Nukleasekomplex inkorporiert und der Sense-Strang abgebaut wurde. Letztlich wurden die so ausgewählten Zielsequenzen mit Hilfe des Blast-Programms (*Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information, NCBI) gegen das Genom der Maus bzw. der Ratte abgeglichen, um die Beeinflussung anderer Gene auszuschließen. Nach diesem Schema wurden 4 siRNA-Sequenzen gegen den Inhibitor-1 und 3 gegen den β_1 -AR sowie eine *scrambled* siRNA-Sequenz gegen den β_1 -AR, als Negativkontrolle ausgewählt.

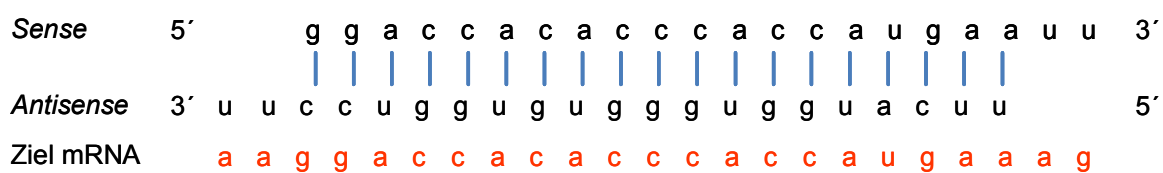


Abbildung 2.5 Beispiel für eine siRNA gegen den Inhibitor-1.

Die β_1 -AR siRNA-Sequenzen waren sowohl zum murinen als auch zum humanen β_1 -AR homolog. Somit konnten sie *in vitro* an Zelllinien evaluiert werden, die den humanen β_1 -AR überexprimierten und trotzdem später *in vivo* zur Anwendung an der Maus eingesetzt werden. Die Sequenzen gegen den Inhibitor-1 richteten sich, bis auf die vierte, lediglich gegen die Inhibitor-1 mRNA der Maus. Alle siRNA-Oligonukleotide (Tabelle 2.4) wurden gebrauchsfertig in nukleasefreiem Wasser (100 μ M) geliefert (Ambion).

Tabelle 2.4 Übersicht der verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen den Inhibitor-1 und gegen den β_1 -AR. In der rechten Spalte ist die Sequenzhomologie zur Maus (Mm), zur Ratte (Rn) und zum Menschen (Hs) angegeben.

Nummer	Strang	Sequenz	Spezies
I-1 (1)	Sense	5' ggaccacacccaccaugaauu 3'	Mm

	Antisense	3'	uuccuggugugggugguacuu	5'	
I-1 (2)	Sense	5'	ccacacccaccaugaagauu	3'	Mm
	Antisense	3'	uuggugugggugguacuuucu	5'	
I-1 (3)	Sense	5'	guccaccuugucaaugucuuu	3'	Mm
	Antisense	3'	uucagguggaacaguuacaga	5'	
I-1 (4)	Sense	5'	gggagccacugagagcacauu	3'	Mm, Rn
	Antisense	3'	uucccucggugacucucgugu	5'	
β_1 -AR (1)	Sense	5'	cgcucaccaaccucuucuuu	3'	Mm, Rn, Hs
	Antisense	3'	uugcgagugguuggagaagua	5'	
β_1 -AR (2)	Sense	5'	uggccuucguguaccugcguu	3'	Mm, Hs
	Antisense	3'	uuaccggaagcacauaggacgc	5'	
β_1 -AR (3)	Sense	5'	cuggcugggcuacgccaacuu	3'	Mm, Rn, Hs
	Antisense	3'	uugaccgacccgaugcgguug	5'	
Kontrolle	Sense	5'	ugcccauacuacaccuccuuu	3'	
	Antisense	3'	uuacggguaugauguggagga	5'	

2.4.2 shRNA Generierung

Da wir an einer stabilen, langfristigen Genstilllegung interessiert waren, wurden alle siRNA-Sequenzen in einen RNA-Expressionsvektor zur endogenen Expression von shRNA kloniert (pSuper-RNAi System). Es wurde der *pALsh*-Vektor (Laatsch et al. 2004) verwendet, welcher sich vom pSuper-Vektor (Brummelkamp et al. 2002) ableitete und durch zwei *BseRI* Schnittstellen modifiziert war. Die shRNA-Expressionskassette (siehe Abbildung 2.6) bestand aus einem H1-Polymerase III Promotor, gefolgt von der jeweils genspezifischen shRNA-Sequenz. Diese setzte sich aus der 19 Nukleotide langen Sense-Sequenz, einer 4 Nukleotide langen Schleifen-Sequenz und der komplementären Antisense-Sequenz zusammen. Das Terminationssignal bestand aus 5 aufeinander folgenden Thymidin-Nukleotiden. Das entstandene Transkript faltete sich auf sich selbst zurück, dadurch bildete sich eine kurze Haarnadelstruktur-RNA (daher *short hairpin* RNA, shRNA), die durch das Enzym Dicer zur funktionstüchtigen siRNA prozessiert wurde (Mello und Conte 2004).

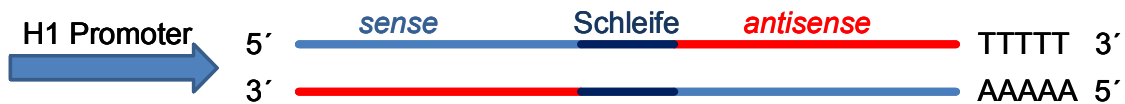


Abbildung 2.6 Funktionsweise des pSuper-Vektors. Der H1-Promotor steuert die Transkription von shRNA in der Zelle, die 3' Thymidine dienen als Stoppsignal für den H1-Promotor. Mit Hilfe des Dicers erfolgt die Prozessierung zur siRNA.

2.4.2.1 Design und Herstellung der shRNA-Oligodeoxynukleotide

Die für die Klonierung verwendeten einzelsträngigen DNA-Oligos enthielten die Sense-Sequenz und die komplementäre Antisense-Sequenz, welche durch eine 4 Nukleotide lange palindromische DNA-Sequenz verbunden wurden, wodurch der Einzelstrang in sich palindromisch wurde. Das 3'-Ende der Oligos wurde mit TT-Überhängen aufgefüllt, die für die Klonierung in den Expressionsvektor benötigt wurden. Die ersten beiden Nukleotide der Schleifen-Sequenz wurden so gewählt, dass auch sie zur Ziel-mRNA komplementär waren. Auf diese Weise wurden die in Tabelle 2.5 aufgeführten Sequenzen erstellt und kommerziell synthetisiert (Eurofins MWG Operon).

Tabelle 2.5 Übersicht der verschiedenen Oligonukleotidsequenzen für die Klonierung in den shRNA-Expressionsvektor.

Nummer	Oligonukleotidsequenzen
shl-1 (1)	5' ggaccacacccacatgaaagctttcatggtgggtgtggtcctt 3'
shl-1 (2)	5' ccacacccacatgaaagagcgctctttcatggtgggtgtgggt 3'
shl-1 (3)	5' gtccacctgtcaatgtctccggagacattgacaaggtggactt 3'
shl-1 (4)	5' gggagccactgagagcacaggcctgtgctctcagtggtccctt 3'
sh β_1 -AR (1)	5' cgctaccaacctttcatcatgatgaagaggttggtgagcgtt 3'
sh β_1 -AR (2)	5' tggccttcgtgtacctgcgggcccgcaggtacacgaaggccatt 3'
sh β_1 -AR (3)	5' ctggctgggctacgccaactcgagttggcgtagcccagccagtt 3'
shKontrolle	5' tgcccatactacacctctacgtaggaggtgtagtatgggcatt 3'

Die Einzelstrangoligos wurden vor der Ligation zunächst zu Doppelstrangoligos hybridisiert. Da die Sequenzen bis auf die beiden Thymidine am 3'-Ende palindromisch waren, konnten sich immer zwei Stränge zusammenlagern. Es wurde ein 10 μ M Reaktionsansatz mit 10% PCR 10X Puffer hergestellt und dieser

im Thermocycler (GeneAmp® PCR System 9700) zunächst auf 95 °C erhitzt und 60 min in Schritten von 1 °C pro min auf 35 °C abgekühlt.

2.4.2.2 Klonierung des *pALsh*

Der verwendete shRNA-Expressionsvektor *pALsh* wurde freundlicherweise von Dr. Alexander Laatsch (Institut für Biochemie, Universität Hamburg) zur Verfügung gestellt. Durch die Modifikation der zusätzlichen *Bse*RI Schnittstellen stromabwärts des H1-Promotors konnte der Vektor durch die Restriktionsendonuklease *Bse*RI geöffnet werden, dessen Erkennungssequenz zweimal in entgegengesetzter Orientierung im *pALsh* vorkam. *Bse*RI schnitt beide DNA-Stränge außerhalb seiner Erkennungssequenz, jedoch an zwei unterschiedlichen Stellen, wodurch das Fragment mit der Erkennungssequenz verloren ging. Durch eine entsprechende Wahl der flankierenden Sequenzen verblieben am geöffneten Vektor zwei 3'-AA-Überhänge. Dadurch wurde die Religation des Vektors verhindert und die Oligonukleotide konnten über ihren 3'-TT-Überhang eingebaut werden. Die Ligation des ds-cDNA-Fragments komplettierte das in der Sequenz vom *pALsh* angelegte Terminationssignal von 5 Thymidinbasen für die RNA-Polymerase III, die am H1-Promotor rekrutiert wurde und die Transkription an der ersten Base der Sequenz des dsDNA-Fragments initiierte. Die RNA-Polymerase III beendete die Transkription nach Erreichen des Terminationssignal, indem es zwei der Thymidinreste transkribierte (Abbildung 2.7). Die entstandene shRNA besaß somit immer einen 3'-UU-Überhang, welcher sich als besonders günstig auf die Funktionalität der späteren prozessierten siRNA auswirkte.

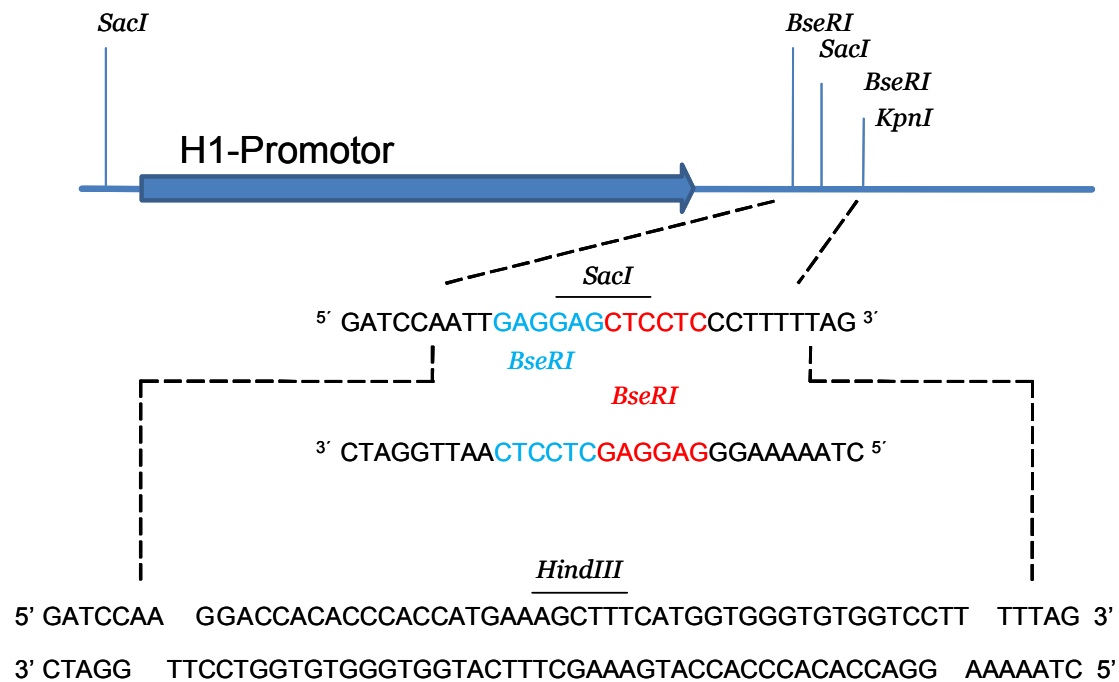


Abbildung 2.7 Klonierungsstrategie des pSuper-Vektors *pALsh*. Der Vektor wurde mit *BseRI* linearisiert und so das Fragment mit den beiden Erkennungssequenzen herausgeschnitten. Das palindromische, selbstkomplementäre Oligonukleotid, hier als Beispiel Inhibitor-1 (1), verfügte über 3'-TT-Überhänge, die mit den 5'-AA-Überhängen des Vektor ligiert werden konnten. Abbildung modifiziert nach Laatsch et al. 2004.

2.5 Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren

Die Produktion der rekombinanten AAV erfolgte ausschließlich durch die Mitarbeiter des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ, Heidelberg) der Arbeitsgruppe um Dr. Müller.

2.5.1 Virale Expressionsvektoren

Die Herstellung der rekombinanten AAV-Vektoren erfolgte durch Tripel-Plasmidtransfektion mit (1) dem Reporterplasmid, welches das Transgen flankiert von den ITRs enthielt, (2) dem p5E18-VD2/9, welches die AAV-Kapsidinformation trug und (3) dem pDGdeIVP, welches für die adenoviralen Helferproteine kodierte.

2.5.2 Virusproduktion, Virusaufreinigung und Virustitration

Die Transfektion der HEK293T-Zellen wurde mittels Polyethylenimin (PEI) durchgeführt. Am Vortag der Transfektion erfolgte die Aussaat von $2,3 \cdot 10^8$ Zellen pro 1 Liter Kulturmedium in Zellkulturkammern (Corning® CellSTACK™) mit einer

Grundfläche von ca. 40 x 175 cm². Am nächsten Tag wurde die Transfektion nach Vorschrift vorgenommen. Dazu wurde eine Mischung der Plasmide: aus 325 µg Reporterplasmid, 1525 µg Adenohelferplasmid, 392 µg Kapsidplasmid und 34,5 ml NaCl (300 mM) in 34,5 ml wässriger Lösung hergestellt, sowie eine Mischung des Transfektionsagens: 15,5 ml PEI (0,323 g/l), 34,5 ml NaCl (300 mM) in 19 ml wässriger Lösung. Beide Ansätze wurden gut vermischt, für 10 min bei RT inkubiert, anschließend in die Zellkulturkammern überführt und durch siebenmaliges Drehen des Zellstapels mit dem Medium gemischt.

Die Ernte der rAAV-Vektoren erfolgte 3 Tage nach Transfektion durch Resuspension der Zellen im Medium. Die Zellsuspension wurde in einen Zentrifugenbecher überführt und für 5 min bei 4000 rpm (4 °C) zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal mit 10 ml PBS gewaschen. Zur Lyse der Zellen und Freisetzung der Viren wurden die Zellen in 10 ml Lysepuffer aufgenommen anschließend abwechselnd dreimal in flüssigem Stickstoff schockgefroren und im 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm (4 °C). Der Überstand, welcher die freigesetzten Viren enthielt, wurde in einem 50 ml Reaktionsgefäß gesammelt und das Pellet erneut in 5 ml Lysepuffer aufgenommen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen zweimal gefroren und aufgetaut, anschließend zentrifugiert und der Überstand gesammelt. Das Pellet wurde letztmalig mit 5 ml Lysepuffer versetzt und einmal gefroren und aufgetaut. Zur Entfernung unerwünschter DNA-Bestandteile (Plasmid, genomisch) im Überstand, welche die spätere Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung der Viren beeinflussen könnte, wurden sowohl der bereits gesammelte Überstand als auch die Zellen in Lysepuffer mit 50 U/ml Benzonase für 30 min bei 37 °C im Wasserbad inkubiert. Danach wurde die Lysepuffer-Zellsuspension ebenfalls zentrifugiert und der Überstand mit den bereits gesammelten Überständen vereinigt.

Die Aufreinigung der im Überstand befindlichen rAAV-Vektoren erfolgte mittels Iodixanol-Stufengradienten. Bei diesem Verfahren wurde das Viruslysats mit 4 verschiedenen Lösungen unterschiedlicher Dichte (15%, 25%, 40% und 60% Iodixanol) unterschichtet und anschließend zentrifugiert, sodass sich die rAAV ihrer Dichte entsprechend in einer spezifischen Bande konzentrierten. Nach der

Ultrazentrifugation für 2 h bei 50000 rpm (4 °C) reicherten sich die Viruspartikel in der 40%igen Iodixanolfraktion an und konnten mit einer Spritze abgezogen werden. Die Lagerung der Viren erfolgte bei -20 °C. Die Quantifizierung rAAV erfolgte nach Anleitung mittels qRT-PCR (Hauswirth et al. 2000; Veldwijk et al. 2002).

2.5.3 Virustransduktion *in vitro* und *in vivo*

2.5.3.1 Transduktion von KM und FBMEs mit rAAV

Die Transduktion der KM mit rAAV6 erfolgte am dritten Tag nach Aussaat der Zellen während des ersten Mediumwechsels, dabei wurde die gewünschte Menge an Virus mit frischem Medium (500 µl pro Well einer 12-Well Kulturschale) vermischt und vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Um die Transduktionseffizienz zu erhöhen wurden die Zellen zunächst für 4 h mit wenig Medium (+Virus) inkubiert, bevor die Mediummenge wieder auf das normale Volumen (1,5 ml pro Well einer 12-Well Kulturschale) aufgefüllt wurde. Für die Transduktion der FBMEs mit rAAV6 wurde während ihrer Herstellung die entsprechende Virusmenge direkt zum Mastermix zugegeben und ansonsten wie in Kapitel 2.2.2.5 verfahren.

2.5.3.2 *In vivo* Gentransfer

Die Tierhaltung sowie sämtliche Versuche wurden durch die Behörde für Soziales, Gesundheit und Verbraucherschutz der Freien und Hansestadt Hamburg genehmigt (G07/15). Die Applikation der Vektoren rAAV9 erfolgte in die laterale Schwanzvene von 14 Wochen alten männlichen C57BL/6J-Mäusen aus der Eigenzucht des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bzw. aus der Zucht von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) als 150 µl Bolusinjektion mit einer sterilen Spritze (29-Gauge Nadel). Nach 6-8 Wochen wurden die Mäuse mittels zervikaler Dislokation nach vorheriger CO₂-Narkose getötet. Anschließend wurden sie gewogen, der Thorax eröffnet und die entsprechenden Organe entnommen. Das Gewebe wurde in 0,9% Kochsalzlösung gespült, kurz getrocknet und gewogen. Bei der Herzentnahme wurden die Vorhöfe entfernt und das Ventrikelgewicht bestimmt. Die gewogenen Gewebe wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert. Vor Verwendung wurde das jeweilige Gewebe mittels Stahlmörser unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff pulverisiert.

2.6 Proteinanalytische Methoden

2.6.1 Methoden zur Proteinextraktion

2.6.1.1 Proteinextraktion aus Monolayer-Zellkulturen

Für die Proteinextraktion aus Monolayer-Zellkulturen wurden, nach Medumentfernung und waschen mit 500 µl PBS, 300 µl Lysispuffer pro 1,5 cm Kulturschale hinzugegeben. Die Zellen wurden mit dem Zellschaber abgelöst und anschließend in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt.

Lysispuffer

Tris-Base	30 mM, pH 8,8
NaF	30 mM
Glycerol	10% (v/v)
EDTA	5 mM
SDS	3% (w/v)

2.6.1.2 Homogenate für Western Blot Analysen

Pulverisiertes Ventrikelgewebe (30-40 mg) wurde mit einem Lysispuffer (Kapitel 2.6.1.1) im Verhältnis 1:10 versetzt und mit dem TissueLyser (Qiagen) homogenisiert. Grobe Gewebeteile wurden für 10 min (13000 rpm, RT) abzentrifugiert. Der Überstand wurde zum immunologischen Nachweis (Kapitel 2.6.4) von Proteinen verwendet.

2.6.1.3 Membranpräparation aus Zellen zur β -Adrenozeptorenmessung

Zellen einer 10 cm Schale wurden nach Medumentfernung und waschen mit 10 ml PBS in 2 ml PBS aufgenommen, mit dem Zellschaber abgelöst und anschließend für 5 min (1000 rpm, 4 °C) zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit Membranpuffer aufgenommen und mit dem Homogenisationsapparat (Polytron, Kinematic AG) homogenisiert und für weitere 20 min (17000 rpm, 4 °C) zentrifugiert, um die Membranfraktion von der zytosolischen Fraktion zu trennen. Das Pellet wurde in 500 µl Membranpuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde durch die Proteinbestimmung nach Bradford (Kapitel 2.6.2) ermittelt. Die Membranproben wurden bei -80 °C gelagert.

Membranpuffer

KHCO ₃	25 mM
Aprotinin	50 mg/l

2.6.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Diese Methode basiert auf der Farbveränderung einer sauren Coomassie Brilliant Blau-Lösung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Der Farbveränderung liegt eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 465 nach 595 nm zugrunde, die bei Proteinbindung erfolgt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration aus der Absorption nach dem Lambert-Beerschen Absorptionsgesetz wurde mit IgG aus Rinderserum (Sigma-Aldrich) eine Standardreihe erstellt. IgG wurde in einer Konzentration von 10 mg in 2,94 ml Aqua ad iniectionem gelöst. Diese Stammlösung (3,4 mg/ml) wurde zur Erstellung der Standardreihe in 0,1 M NaOH auf 1:10 verdünnt. Die Standardreihe wurde nach folgendem Schema pipettiert:

Tabelle 2.6 Bradford Standardkurve

Proteinkonzentration [mg/ml]	0	85	170	340	510	680	850	1020
IgG-Standard (1:10) [µl]	0	5	10	20	30	40	50	60
NaOH (0,1 M) [µl]	800	795	790	780	770	760	750	740

Zu 800 µl Standard bzw. Probe wurden jeweils 200 µl Bradfordreagenz (Nanoquant, Roth) gegeben und gut gemischt. Nach Inkubation für 10 min wurde die Absorption in Einmalküvetten (Sarstedt) im Spektrometer (Smart Spec® 3000, Bio Rad) bei 595 nm gemessen. Aus der Absorption ließ sich nach dem Lambert-Beer-Gesetz die Proteinkonzentration errechnen. Ein Probenansatz enthielt dabei 790 µl NaOH (0,1 M), 10 µl 1:10 vorverdünnte Proteinprobe und 200 µl Bradfordreagenz. Die Proben wurden in NaOH so vorverdünnt, dass die gemessenen Absorptionen im mittleren Bereich der Standardkurve lagen und dann mindestens in Doppelbestimmung gemessen.

2.6.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS (Natrium-Dodecyl-Sulfat)-PAGE wurde nach der Lämmli-Methode durchgeführt. Die Proben wurden in 6X Probenpuffer im Verhältnis 6:1

aufgenommen und für 5 min bei 95 °C denaturiert. Die Gelelektrophorese erfolgte mit 10-15% Polyacrylamidgelen in Abhängigkeit des zu separierenden Protein-Molekulargewichtes. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 80 V für 10 min und anschließend bei 120 V in dem *Mini Protean 3* Elektrophoresesystem (Bio-Rad) in einem Elektrophoresepuffer. Auf jedem Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker mitgeführt (Precision Plus Protein Standard™, Bio-Rad).

6X Probenpuffer

SDS	2%
Glycerol	10%
Tris-Base	10 mM, pH 6,8
DTT	100 mM
Bromphenolblau	0,01%

Trenngel

Tris-Base	375 mM, pH 8,8
Acrylamid/Bis-Acrylamid	10-15%
SDS	0,1%
APS	0,1%
TEMED	0,03%

Sammelgel

Tris-Base	125 mM, pH 6,8
Acrylamid/Bis-Acrylamid	5%
SDS	0,1%
APS	0,1%
TEMED	0,03%

Elektrophoresepuffer

Tris-Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1%

2.6.4 Western Blot Analyse

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in dem *Mini Trans-Blot Cell System* (Bio-Rad) im elektrischen Feld auf eine Nitrocellulosemembran (Protan[®], Whatman) oder PVDF-Membran (Nachweis von PLB; Amersham Hybond[™]-P, GE Healthcare) übertragen. Der Transfer wurde stromkonstant bei 400 mA für 90 min in Transferpuffer I durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran mit Ponceau S-Lösung angefärbt, um den Transfer zu kontrollieren. Die Membranen wurden vollständig in TBS-T Puffer entfärbt und anschließend zur Blockade unspezifischer Antikörperbindungen in einer 5%igen Milchpulver-Lösung für 1 h bei RT inkubiert.

Nach Inkubation mit dem Primärantikörper (Tabelle 12.1) über Nacht bei 4 °C, wurde die Membran dreimal mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen und anschließend für 1 h bei RT mit dem sekundären Antikörper (HRP-konjugiert; Tabelle 12.2) inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBST-T für jeweils 10 min entfernt und die Membran mit dem ECL-Substrat (*Enhanced Chemiluminescence*, Pierce) nach Angaben des Herstellers inkubiert. Das Chemilumineszenz-Signal wurde durch Fotofilme visualisiert. Die Filme/Membranen wurden mit Hilfe des Chemie Genius² Bio-Imaging Systems (Syngene) photographisch festgehalten und mittels Gene Tool Software quantifiziert.

Transferpuffer I

Tris-Base	50 mM
Glycin	380mM
Methanol	20% (v/v)

Ponceau S-Lösung

Ponceau S	0,1% (w/v)
Essigsäure	1% (v/v)

TBS-T Puffer

Tris-Base	100 mM, pH 7,5
Tween 20	0,1% (v/v)
NaCl	150 mM

5% Milchpulver-Lösung

Magermilchpulver 5% in TBS-T Puffer

2.6.5 Bestimmung der β -Adrenozeptorendichte

Die Dichte der β -Adrenozeptoren wurde mit dem hydrophilen, nicht selektiven β -Adrenozeptoragonisten [^3H]-CGP 12177 in Zellkulturhomogenaten nach Membranpräparation (Kapitel 2.6.1.3) mittels Radioligandenbindung (Joseph et al. 2004) durchgeführt. Aufgrund der Hydrophilie des Liganden wurden nur die Rezeptoren an der Zelloberfläche erfasst. Der Bindungsassay wurde in einer 96-Well PVDF-Filtrationsplatte (Millipore) durchgeführt. 30 μg Membranprotein wurden zusammen mit 3 nM des Radioliganden [^3H]-CGP 12177 (Amersham) für 90 min inkubiert und anschließend mittels Vakuum abgesaugt, sodass lediglich der Liganden-Rezeptor-Komplex auf der Membran zurückblieb.

Jede Probe wurde zusätzlich mit dem Radioliganden in Anwesenheit des kompetitiven, nicht-radioaktiv markierten Antagonisten Propranolol in 1000-fach höherer Konzentration (3 μM) inkubiert, um die unspezifische Bindung zu bestimmen. Anschließend wurden die Membranen zweimal mit 200 μl Assay-Puffer gewaschen. Die Menge des gebundenen Liganden wurde im Flüssigkeitsszintillationszähler (Counter Wallac 1409, Perkin Elmer Wallac) bestimmt. Hierzu wurden die PVDF-Membranen mit dem Liganden-Rezeptor-Komplex ausgestanzt und mit Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold™, Packard) überschichtet. Die spezifische Bindung von [^3H]-CGP 12177 ergab sich aus der Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung. Die Bindung des Radioliganden wurde ausgedrückt als Counts pro Minute (cpm) und ist direkt proportional zur Anzahl an Rezeptorbindungsstellen. Über die Effektivität des Szintillationszählers, die spezifische Aktivität des Ligandens und die Proteinmenge konnten die Zerfälle pro Minute (*decays per minute*, dpm) und somit die Dichte der Bindungsstellen in fmol/mg Protein berechnet werden. Alle Bestimmungen wurden als Dreifachmessung durchgeführt.

Assay-Puffer

NaCl	100 mM
EDTA	0,5 mM
Tris-HCL	50 mM, pH 7,5
MgCl ₂	5 mM

2.7 RNA-Analysen**2.7.1 Isolation von RNA**

Gesamt-RNA wurde aus ~20 mg gefrorenem und pulverisiertem Ventrikelgewebe bzw. aus kultivierten Zellen mittels TRIzol® (Invitrogen) gemäß dem Herstellerprotokoll isoliert. Diese Methode basiert auf der RNA-Extraktion mit Phenol- und Guanidin-Isothiocyanat-Lösungen, gefolgt von organischer Extraktion und Alkoholpräzipitation. Die RNA wurde anschließend in DEPC (Diethylpyrocarbonat) behandeltem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mit dem Spektrophotometer (NanoDrop® ND-1000, PeqLab) ermittelt. Die Lagerung der isolierten RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C.

2.7.2 Reverse Transkription

Nach der Konzentrationsbestimmung wurde 500 ng RNA mittels Reverser Transkriptase unter Verwendung von *Random-Primern* in cDNA gemäß Herstellerangaben des *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits* (Applied Biosystems) umgeschrieben und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Zusätzlich wurde von jeder Probe eine Kontrolle ohne Reverse Transkriptase mitgeführt.

2.7.3 Quantitative RT-PCR

Die mRNA-Mengen wurde mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) mit einem *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System* (Applied Biosystems) laut Herstellerhandbuch bestimmt. Die Quantifizierung des Amplifikationsproduktes in Echtzeit beruhte auf der Verwendung spezifischer Taqman®-Sonden (DNA-Sonden), die am 5'-Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (6-Carboxyfluorescein; FAM) und am 3'-Ende mit einem Quencher-Farbstoff (6-

Carboxytetramethylrhodamin; TAMRA) markiert wurden. Wenn die DNA-Polymerase (AmpliTaQ Gold[®], Applied Biosystems), die zusätzlich zur Polymeraseaktivität eine 5'-3'-Exonukleaseaktivität besaß, die Sonde während der Synthese des Gegenstranges am 5'-Ende abbaute, entfernten sich dadurch Quencher und Reporter voneinander und eine steigende Reporter-Fluoreszenz konnte gemessen werden. Diese stieg entsprechend der Akkumulation des PCR-Produktes mit jedem PCR-Zyklus an. Die Analyse erfolgte unter Verwendung des *TaqMan[®] Universal PCR-Master Mixes* (Applied Biosystems), welcher in geeigneter Weise AmpliTaq Gold[®] DNA-Polymerase, AmpErase[®] UNG (Uracil-N-Glykosylase), dNTPs und dUTP in einem Puffer kombinierte. Durch den Zusatz des Enzyms AmpErase wurde gewährleistet, dass Kontaminationen durch PCR-Produkte aus vorangegangenen Ansätzen verhindert wurden. Anstelle von Thymin (dTTP) wurde Uracil (dUTP) verwendet, sodass durch den der PCR vorgeschalteten Reaktionsschritt der Uracil-N-Glykosylase bei 50 °C (Schritt 1), Uracil enthaltende Produkte abgebaut werden konnten, während Thymin enthaltende cDNAs nicht angegriffen wurden.

Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) oder Calsequestrin-2 (CSQ) wurden als interne Standards verwendet. Die cDNA wurde 1:10 verdünnt eingesetzt. Der Reaktionsansatz einer qRT-PCR sowie das PCR-Programm sind in Tabelle 2.7 und Tabelle 2.8 dargestellt. Die verwendeten Primer- bzw. Sondensequenzen sind im Anhang (Tabelle 12.6, Tabelle 12.7) aufgeführt. Alle Messungen wurden als Dreifachbestimmung mit der *ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System Software, Version 2.1.2* (Applied Biosystems) analysiert. Die mRNA-Menge wurde über den Vergleich der relativen Ct-Werte unter Verwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel bestimmt. Dabei wurden die Ct-Werte des Standards von den Ct-Werten der zu bestimmenden RNA subtrahiert (ΔCt). Der Mittelwert der ΔCt -Werte der Kontrollgruppe wurde wiederum von jedem einzelnen ΔCt -Wert abgezogen, wodurch die $\Delta\Delta Ct$ -Werte erhalten wurden. Die Anwendung der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Formel zeigte dann den relativen mRNA-Gehalt bezogen auf die Kontrolle an. Der Ct-Wert (*Cycle Threshold* für Schwellenwert-Zyklus) gab den PCR-Zyklus an, bei dem erstmalig die Reporter-Fluoreszenz signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz anstieg und bestimmte dadurch den Beginn der exponentiellen Phase.

Tabelle 2.7 Reaktionsansatz einer qRT-PCR (TaqMan® Universal PCR Master Mix).

Bestandteil	Volumen/Probe	Endkonzentration
2X PCR Master Mix	5 µl	1X
Primer for (10 µM)	0,3 µl	300 nM
Primer rev (10 µM)	0,3 µl	300 nM
Sonde (10 µM)	0,1-0,3 µl	100-300 nM
Template cDNA (1:10)	2 µl	1-100 ng
DEPC-H ₂ O	ad 10 µl	

Tabelle 2.8 PCR-Temperaturbedingungen für das ABI PRISM 7900HT Detection System.

PCR-Schritt	Temperatur (°C)	Zeit (min:sec)	Zyklen
Schritt 1	50	2:00	1
Schritt 2	95	10:00	1
Schritt 3	95	0:15	40
	60	1:00	

2.7.4 Northern Blot Analyse zum Nachweis kleiner RNAs

Die Ausführung der Northern Blots erfolgte durch Dr. Thomas Christalla (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg) nach dem Protokoll von Sullivan et al. 2005.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung insbesondere der kleinen RNAs wurden hochprozentige 8,5 x 8,5 cm Acrylamid/Harnstoff-Gele (15%) verwendet. Bei der Herstellung der Gele wurde die TBE/Harnstofflösung zunächst auf 65 °C erwärmt, um den Harnstoff zu lösen. Nach Abkühlung der Lösung wurden APS und TEMED nacheinander hinzugefügt und die Lösung zügig in das Gelsystem gegossen, in welcher die Gele dann für etwa 1 h polymerisieren konnten. Die fertigen Gele wurden dann in 1X TBE (Elektrophoresepuffer) für 1 h bei 65 mA vorinkubiert. Währenddessen konnten die RNA-Proben auf das gleiche Volumen (15 µl, 1 µg/µl) eingestellt, mit Ladepuffer versetzt und für 3 min auf 70 °C erhitzt werden. Für ein optimales Ergebnis wurden jeweils 15 µg RNA geladen. Als Molekulargewichtsmarker von 10-300 Bp wurde ein DNA-Marker (*Ultra low Range*, Fermentas) mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte für ca. 45 min bei 35 mA. Der Transfer auf die Membran (Zeta-Probe GT, Bio-Rad) erfolgte mittels *Semi-Dry-Blotter* für 2 h bei 3 mA/cm² Gel bzw. Membran. Nach dem Blotten wurde die

Membran für 10 min bei RT luftgetrocknet und die RNA wurde dann durch UV-Quervernetzung (120 mJ/cm^2) auf der Membran fixiert. Als Sonden (Tabelle 2.9) wurden zum Antisense-Strang (siRNA) komplementäre Oligonukleotide (19 N) verwendet und diese mit [^{32}P] ATP mittels T4 Polynukleotid-Kinase markiert. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte über Nacht bei 37°C in Hybridisierungspuffer (ExpressHyb, Clontech), zuvor sollten die Membranen jedoch mit Hybridisierungspuffer allein wenigstens für 30 min bei 37°C vorinkubiert werden. Danach wurden die Blots 4 x 30 min mit Waschpuffer (2X SSC, 0,1% SDS) bei RT gewaschen und dann je nach Signalstärke, aber mindestens für einen Tag, ein Film entwickelt.

Ladepuffer

Formamid	95%
Bromphenolblau	0,05%
Xylencyanol	0,05%
EDTA	10 mM

15% Polyacrylamidharnstoffgel

Polyacrylamid	15%
APS	0,68%
TEMED	0,068%

in 1X TBE mit 8 M Harnstoff.

2X SSC

NaCl	300 mM
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$	30 mM

Tabelle 2.9 DNA-Oligonukleotidsequenzen für die Northern Blot Analyse.

DNA-Sonde	Sequenz
north- β_1 -AR	5' cgctcaccaacctttcat 3'
north- β_1 -AR Kontrolle	5' tgccatactacacctct 3'
north-I1	5' ccacaccacccatgaaaga 3'
north-I1 Kontrolle	5' gcccaaccaccccgaaacaa 3'

2.7.5 Genexpressionsanalyse mittels eines DNA-Mikroarrays

Zur Charakterisierung des RNA-Expressionsprofils der in dieser Arbeit untersuchten FBMEs wurde eine Mikroarray-Analyse durchgeführt. Es wurde ein „*Whole-Genome Gene Expression BeadChip*“ der Firma Illumina® (RatRer-12 Expression) verwendet. Dieser *BeadChip* bestand aus DNA-Oligonukleotiden, die über sogenannte *Beads* auf der Array-Matrix (Silica-Oberfläche) immobilisiert vorlagen. Ein *Bead* enthielt bis zu 10^8 Kopien ein und desselben Oligos. Eine Oligonukleotidsequenz bestand aus einer 29 Nukleotide langen Adresssequenz, die zur späteren Lokalisierung und Identifikation des *Beads* auf dem Array benötigt wurde sowie einer 50 Nukleotide langen genspezifischen Sondensequenz. Die *Beads* eines Oligotyps kamen zufällig auf dem Array verteilt in durchschnittlich 30 Replikaten vor, wodurch die Validität der Messung maßgeblich erhöht wurde. Pro Chip konnten 12 Proben parallel durch insgesamt 22519 Sondensequenzen (NCBI RefSeq-Datenbank) analysiert werden. Während der Hybridisierung wurde die amplifizierte biotinylierte cRNA über den Sondenanteil des Oligos am *Bead* gebunden. Mit Hilfe der Adresssequenz und einer speziellen Dekodierungssoftware konnte jeder *Bead* des Arrays bei der Auswertung korrekt zugeordnet werden. Die Durchführung des Arrays (RNA-Amplifikation und Biotinmarkierung, Hybridisierung, Scannen und Auswertung) bis auf die Gewinnung der Gesamt-RNA erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. Monika Stoll am Leibniz-Institut für Arterioskleroseforschung an der Universität Münster (Lifa, Münster), insbesondere durch Dr. Anika Sietmann und Dr. Frank Rühle.

Für die Mikroarray-Analyse wurde Gesamt-RNA aus FBMEs mittels TRIzol® isoliert (Kapitel 2.7.1) und diese durch einen anschließenden DNase-Verdau mit dem *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Reinheit und Qualität der isolierten RNA wurde mit dem UV/Vis Spektrophotometer (NanoDrop® ND-1000, PeqLab) bestimmt. Die Herstellung von biotinylierter cRNA erfolgte durch *in vitro*-Transkription einer Gesamtmenge von 140 ng RNA mit Hilfe des Illumina® *TotalPrep™ RNA Amplification Kits* (Applied Biosystems).

Je 1,5 µg der biotinylierten cRNA wurden auf dem *RatRer-12 Expression BeadChip Array* (Illumina, Inc.) hybridisiert. Das Scannen und die Analyse des Chips erfolgten mit einem *BeadArray Reader* und der dazugehörigen *BeadScan*

software 3.6.17.15868 (Illumina, Inc.). Die Originaldaten der einzelnen Replikate wurden mit der *GenomeStudio software 2010* (Illumina, Inc.) ausgewertet und nach der Methode der quantilen Normalisierung gleichmäßig skaliert, sodass für die weitere Analyse 21791 Gene zur Verfügung standen. Differentiell regulierte Gene wurden mit Hilfe verschiedener statistischer Analysenmethoden (*Illumina custom error model*), Signifikanzberechnungen sowie über einen Schwellenwert der X-fachen Expressionsänderung ermittelt (Kapitel 2.10.1).

2.8 Histologische Untersuchungen

2.8.1 Fixierung von Gewebeschnitten, Zellen und FBMEs

Die Fixierung von Kryoschnitten (Kapitel 2.8.3) wurde grundsätzlich in eisgekühltem Aceton (100%) für 10 min durchgeführt. Anschließend wurden die Objektträger luftgetrocknet und bei -25 °C bis zur immunhistochemischen Färbung gelagert.

Zellen, die einer immunhistologischen Analyse unterzogen werden sollten, mussten zuvor auf mit Laminin beschichteten Deckgläschen ausplattiert und kultiviert werden. Für die Fixierung wurden die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und mit *Roti[®]-Histofix* (Roth) für 15 min behandelt. Die Deckgläschen mit den darauf fixierten Zellen wurden zur besseren Handhabung auf Objektträger gesetzt.

FBMEs wurden als Gesamtpräparate (*whole mount*) vorsichtig von ihrer Halterung gelöst und in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4 °C mit Histofix inkubiert. Alle Präparate wurden vor der Immunfärbung 2 x 5 min bei RT mit Waschpuffer gespült.

2.8.2 Immunhistologische Färbungen

2.8.2.1 Färbeprotokoll von Gefrierschnitten und fixierten Zellen

Die Objektträger wurden mit etwa 0,5–1 ml Blockierlösung pro Objektträger beschichtet, für 1 h bei RT belassen und wiederum 2 x 5 min vorsichtig mit Waschpuffer gespült. Die Behandlung der Präparate mit dem in der Antikörperlösung verdünnten Primärantikörper (Tabelle 12.1) erfolgte über Nacht bei 4 °C. Die Schnitte wurden danach erneut 4 x 5 min bei RT gewaschen und

dann mit einem Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörper (Tabelle 12.2) sowie dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4',6-Diamidin-2'-phenylindoldihydrochlorid) in Antikörperlösung für 1–2 h unter Lichtausschluss bei 4 °C inkubiert. Letztlich wurden die Objektträger 3 x 10 min bei RT gewaschen und mit *Fluoromount G* (Southern Biotech) eingedeckelt. Generell war das Austrocknen der Gewebeschnitte während der Färbung unbedingt zu vermeiden, weshalb alle Schritte in einer feuchten Kammer bei 4 °C durchgeführt wurden.

Blockierlösung

FCS (aktiv)	10%
BSA	1%
Triton X-100	0,5%
NaN ₃	0,01%
in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4.	

Antikörperlösung

BSA	1%
Triton X-100	0,5%
NaN ₃	0,01%
in 0,05 M Tris-HCl, pH 7,4.	

Waschpuffer

0,05 M Tris-HCl, pH 7,4.

2.8.2.2 Färbeprotokoll von FBMEs

Da die FBMEs als intakte Konstrukte (*whole-mount*) verwendet wurden, mussten die einzelnen Färbe- und Waschschrte verlängert werden, damit eine gleichmäßige Durchdringung erreicht werden konnte. Die Inkubation der Konstrukte mit Blocklösung, mit dem primären und sekundären Antikörper und sowohl der Waschlösung erfolgte jeweils über Tag bzw. Nacht bei 4 °C unter Rotationsbewegung.

2.8.3 Gefriereinbettung für Gefrierschnitte

Die entnommenen Organe wurden sofort in Isopentan bei -196 °C in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die schockgefrorenen Organe wurden zunächst im

Kryostat (Leica CM 3050 S, Leica) bei -20 °C für 1 h äquiliert und dann im Einbettungsmedium (Tissue Tek[®] O.C.T[™] Compound, Sakura) fixiert. Mit dem Kryostat wurden 10 µm dünne Schnitte angefertigt und diese auf Objektträger (Superfrost/Plus, Hecht-Aisstent) überführt und mit Fluoromount G (Southern Biotech) eingedeckelt oder für immunhistochemische Färbungen (Kapitel 2.8.2.1) weiter verwendet.

2.8.4 Konfokale Lasermikroskopie

Die konfokale Lasermikroskopie diente zur Untersuchung von fixierten FBME-Präparaten (*whole-mount*) sowie von 10 µm Gefrierschnitten von verschiedenen murinen Organen. Die Technik der konfokalen Lasermikroskopie beruht auf einer Lochblende (*Pinhole*), die sich im Brennpunkt des Mikroskops, konfokal zum beleuchteten Punkt im Präparat, befindet und nur exakt fokussiertes Licht passieren lässt. Durch das Ausblenden nicht fokussierten Lichtes können Signale ober- bzw. unterhalb der gewünschten Schärfenebene den Detektor nicht erreichen und tragen nicht zur Bildentstehung bei. Alle konfokalen Darstellungen wurden mit der Lasermikroskopie 510 Meta Software (LSM, Carl Zeiss) auf einem Axiovert 200 M Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) erstellt. Die Fluoreszenzaufnahmen erfolgten nach Kopplung der zugehörigen Laserlinie. Die Detektorempfindlichkeit und Laserintensität pro Kanal wurden je nach Präparat so gewählt, dass die größte im Experiment vorliegende Intensität im Bereich der Detektorsättigung lag. Alle übrigen Einstellungen wie Auflösung, Scangeschwindigkeit und Signalmittelung wurden entsprechend den Anforderungen der Fragestellung und den Gegebenheiten des Präparates so gewählt, dass unter Berücksichtigung der Probenstabilität eine möglichst hohe Signalqualität erhalten wurde. Diese einmal festgelegten Einstellungen wurden während der Aufnahme der Präparate einer experimentellen Serie nicht verändert.

2.9 Physiologische Methoden

2.9.1 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden von Frau Birgit Geertz und Herrn Thomas Schulze (Institut für Experimentelle Pharmakologie und

Toxikologie, Hamburg) durchgeführt und ausgewertet. Sowohl die Messungen als auch die Auswertungen erfolgten verblindet.

Die Ultraschalluntersuchungen wurde mit dem Vevo 770[®] System (Visual Sonics, Toronto) mit einem 30 MHz Schallkopf durchgeführt. Zur Einleitung der Narkose wurde die Maus in eine Induktionskammer mit Isofluran (3 vol%) gesetzt. Die anästhesierte Maus wurde in Rückenlage auf eine Wärmeplatte gelegt und mit den Pfoten auf EKG-Elektroden fixiert.

Die Messungen erfolgten bei einer Herzfrequenz von 500-600 Schlägen/min und die Körpertemperatur wurde konstant bei 37 °C gehalten. Die Narkose wurde über eine Gesichtsmaske (1-2 vol% Isofluran, 1,5 l/min Carbogen) aufrechterhalten. Der Brustkorb wurde enthaart und mit vorgewärmtem Ultraschallgel (Sonogel, Bad Camberg) bedeckt. Mit einer Framerate von 60 Hz wurde zunächst im B-Mode die parasternale lange Achse des Herzens dargestellt. Sichtbare Strukturen waren hierbei die Herzspitze, der linke Ventrikel und dessen Übergang in die Aorta, das interventrikuläre Septum und rechter bzw. linker Vorhof. Anschließend wurde der linke Ventrikel in der parasternalen kurzen Achse auf der mittleren Ebene der Papillarmuskeln aufgenommen. Die Ebene diente auch der Erstellung von M-Mode Aufnahmen. Zusätzlich wurden Kurz- und Langachse als EKV[®]-Mode aufgenommen. Bei dem EKV handelt es sich um eine Technik, bei der eine hohe Anzahl von Schlägen zu einem wird.

Die Darstellung der Pulmonalarterie erfolgte im B-Mode. Dopplersonographisch mittels *continuous wave* (CW)-Doppler wurde die Flussgeschwindigkeit über die rechte Pulmonalarterie bestimmt. Anschließend wurde der Maus 10 mg/kg Dobutamin i. p. (Carinopharm) injiziert und die Aufnahmen, wie zuvor beschrieben, wiederholt. Gemessen wurden verschiedene Parameter sowohl in der Systole als auch in der Diastole (Tabelle 2.10 und Abbildung 2.8). Die Messungen erfolgten mit dem Vevo 770 V2.2.3 Messprogramm.

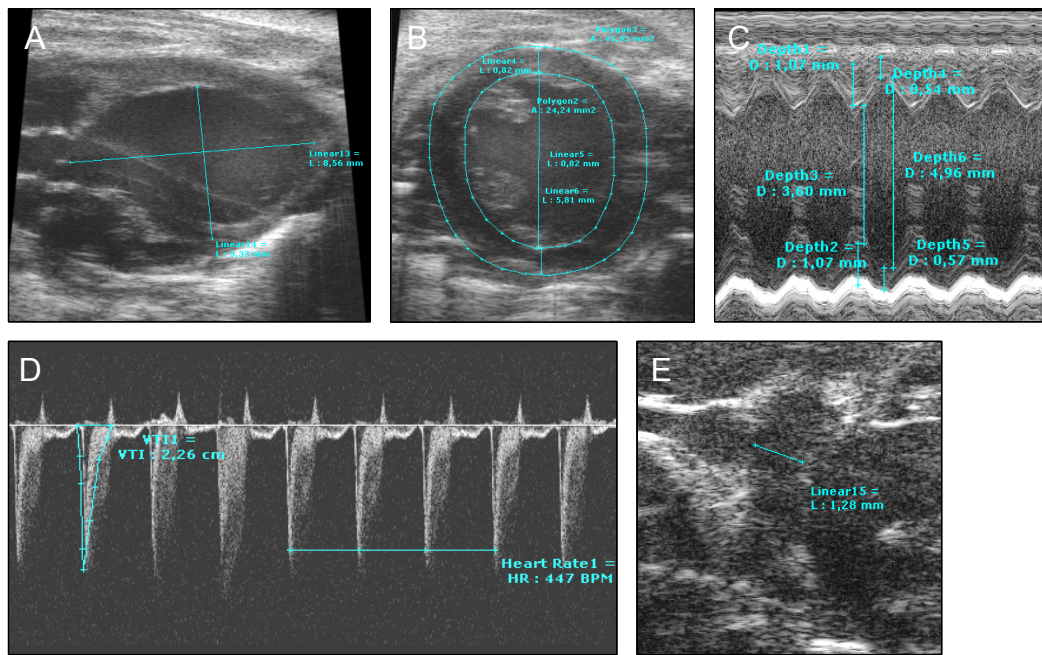


Abbildung 2.8 Beispiele für echokardiographische Aufnahmen. (A) Längsschneidung in der Diastole, (B) Querschnitt in der Diastole, (C) M-Mode, (D) Dopplechokardiographische Darstellung des systolischen Ausstroms aus dem rechten Ventrikel, (E) rechte Pulmonalarterie.

Tabelle 2.10 Echokardiographisch gemessene Parameter.

Parameter	Abkürzung
Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. –systolischer Längendurchmesser	Long D d/s
Innere/äußere linksventrikuläre Fläche	Area endo/epi d/s
Linksventrikuläre enddiastolische bzw. –systolische Vorderwand- bzw. Hinterwandstärke	AwTh d/s bzw. PwTh d/s
Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. –systolischer Durchmesser	LVEDD/LVESD

Aus den gemessenen Parametern wurde die linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraction (FAS) berechnet:

$$\text{FAS (\%)} = (\text{Area endo d} - \text{Area endo s}) / \text{Area endo d} \times 100$$

2.10 Statistische Auswertung

Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetisches Mittel +/- der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM) dargestellt, berechnet aus den

Einzelwerten (n). Die statistische Signifikanz wurde, wenn nicht anders gekennzeichnet, mittels t-Test nach Student für unverbundene bzw. verbundene Stichproben ermittelt. P-Werte kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikant bewertet und als solche gekennzeichnet (*).

2.10.1 Statistische und bioinformatische Analyse des Mikroarrays

Die statistische Analyse der Mikroarray-Daten wurde freundlicherweise durch Dr. Anika Sietmann und Dr. Frank Rühle (Lifa, Münster) durchgeführt.

Normalisierung und Identifizierung differentiell regulierter Gene

Um eine Auswertung vornehmen zu können, mussten die Rohdaten der Expressionswerte zunächst normalisiert werden, wodurch systemische Variationen nicht biologischen Ursprungs beseitigt werden konnten. Die Normalisierung erfolgte mit der *GenomeStudio software 2010* nach dem Algorithmus der quantilen Normalisierung (Bolstad et al. 2003). Dadurch erfolgte eine Angleichung der mittleren Signalintensitäten und Streuungen aller untersuchten Proben, weil man grundsätzlich davon ausgeht, dass alle Proben eine ähnliche Verteilung der Transkriptmenge aufzeigen. In der weiteren Analyse wurde die durchschnittliche Genexpression der 6 untersuchten Replikate pro FBME-Gruppe ermittelt, wobei die Signalintensitäten im Vergleich zur Negativkontrolle (Hintergrundsignal) statistisch durch den sogenannten *detection p-value* beurteilt wurden ($p < 0,05$).

Um Unterschiede in der Genexpression der behandelten FBMEs festzustellen, wurde für jedes Gen das Expressionsverhältnis zwischen zwei verschiedenen Bedingungen (S vs. K, B vs. K, B vs. S) untersucht. Dieses Ergebnis wurde als Expressionsveränderung ($FC = \text{fold change}$), d. h. dem Verhältnis der durchschnittlichen Signalintensitäten der Intervention zur Kontrolle dargestellt. Die Veränderung zur jeweiligen Kontrollgruppe wurde außerdem nach dem *Illumina Custom* Fehlermodell als statistisch signifikant gekennzeichnet ($p < 0,05$). Alle Gene, die sich um mehr als einen festgelegten Wert ($0,66 \geq FC \geq 1,5$) unterschieden, galten als differentiell exprimiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der stabilen Zelllinien

Es wurden zwei Zelllinien (HEK293) etabliert, die den Inhibitor-1 bzw. β_1 -AR stabil exprimierten. Hierfür wurde der pIRES2-eGFP Vektor verwendet, der u. a. einen Selektionsmarker enthielt. Dieser trug zusätzlich ein *enhanced green fluorescent protein* eGFP-Reportergen zur Überprüfung der Transfektionseffizienz am Fluoreszenzmikroskop und eine *internal ribosome entry site* (IRES). Dadurch wurde das Zielgen Inhibitor-1 bzw. β_1 -AR und das eGFP ausgehend von einem CMV-Promotor über eine gemeinsame mRNA transkribiert, aber die Translation erfolgte getrennt, d. h. die Expression beider Gene resultierte in der Bildung von zwei unabhängigen Proteinen (Abbildung 3.1). Die Generierung der stabilen Zelllinien erfolgte in Zusammenarbeit mit Felix Hansen (ehemaliger Doktorand, AG El-Armouche). Die cDNA des Inhibitor-1 (*Accession code*: NM_021391) der Maus, welche am 5'-Ende zusätzlich mit einer *KpnI* Schnittstelle sowie am 3'-Ende mit einer *NotI* Schnittstelle versehen und darüber bereits in den PCR2.1 Vektor kloniert worden war, wurde uns freundlicherweise von Katrin Wittköpper aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt.

Der humane β_1 -AR (*Accession code*: NM_000684) wurde uns als cDNA im pcDNA3 Vektor von Prof. Stefan Engelhardt (Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt.

3.1.1 Klonierung der Transfektionsvektoren

Zunächst wurde die Inhibitor-1 cDNA mit *EcoRI* aus dem PCR2.1 Vektor ausgeschnitten und in den zuvor mit *EcoRI* linearisierten pIRES2-eGFP Vektor ligiert und in kompetente Bakterien transformiert. Die korrekte Orientierung des Inserts wurde mit einem Restriktionsverdau mit *NotI* überprüft (Abbildung 3.2), da sowohl das Inhibitor-1 Insert am C-Terminus als auch der pIRES2-eGFP Vektor eine *NotI* Schnittstelle enthielten.

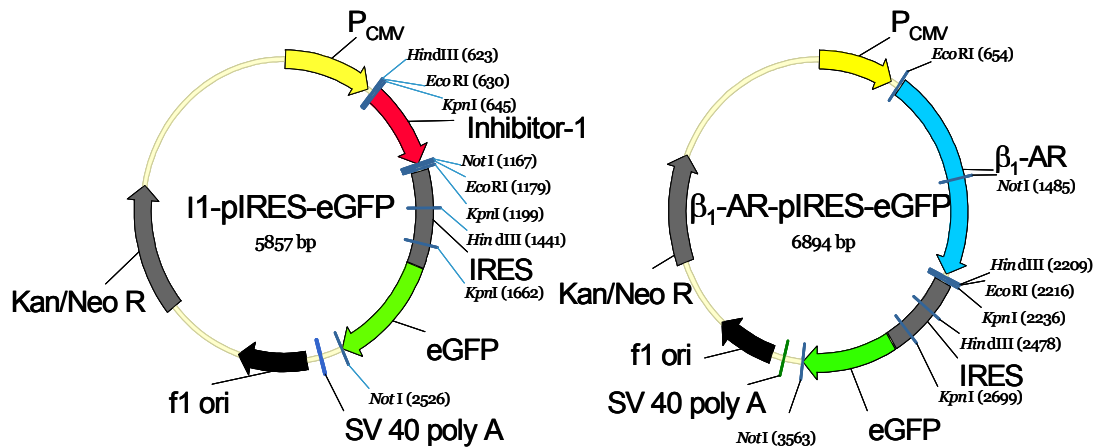


Abbildung 3.1 Plasmidkarten der pIRES-eGFP Vektoren für die Etablierung der stabilen Zelllinien. Die Expression der Zielgene Inhibitor-1 und β_1 -AR erfolgte unter Kontrolle des CMV-Promotors (P_{CMV}).

Die cDNA für den humanen β_1 -AR wurde im pcDNA3 Vektor übernommen. Die Klonierung in den pIRES2-eGFP Vektor erfolgte über die *SacI* Schnittstelle. Zur Verifikation der korrekten Orientierung wurde ein Verdau des Konstruktes mit *EcoRI* durchgeführt (Abbildung 3.2). Eine *EcoRI* Schnittstelle flankierte die β_1 -AR-Sequenz im Insert N-terminal. Der pIRES2-eGFP Vektor enthielt eine weitere *EcoRI* Schnittstelle hinter der *SacI* Schnittstelle. Alle Klone wurden mittels Sequenzierungsanalyse zum Ausschluss von Mutationen untersucht.

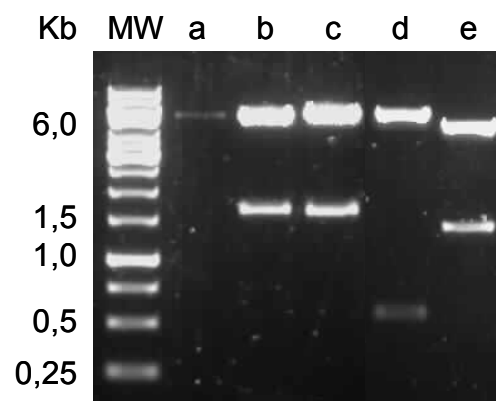


Abbildung 3.2 Restriktionsanalyse der pIRES-eGFP Vektoren. Restriktionsverdau des Vektors pIRES-eGFP mit *SacI* (a). Restriktionsverdau des β_1 -AR-pIRES-eGFP mit *SacI* (b) und *EcoRI* (c), sowie der Restriktionsverdau von I-1-pIRES-eGFP mit *EcoRI* (d) und der asymmetrische Verdau mit *NotI* (e) bestätigen die korrekte Orientierung der Klone.

3.1.2 Transfektion und Selektion

Am Vortag der Transfektion wurden für jedes Plasmid HEK293 Zellen in einer 10 cm Kulturschale ausplattiert, sodass ihre Dichte zum Zeitpunkt der Transfektion am Folgetag 95% betrug (Abbildung 3.3 a). Die Lipofektion erfolgte nach Protokoll (Kapitel 2.2.1.3). Nach 24 h wurde anhand der GFP-Epifluoreszenz unter UV-Licht die Transfektionseffizienz ermittelt, diese betrug durchschnittlich etwa 50% (Abbildung 3.3 b).

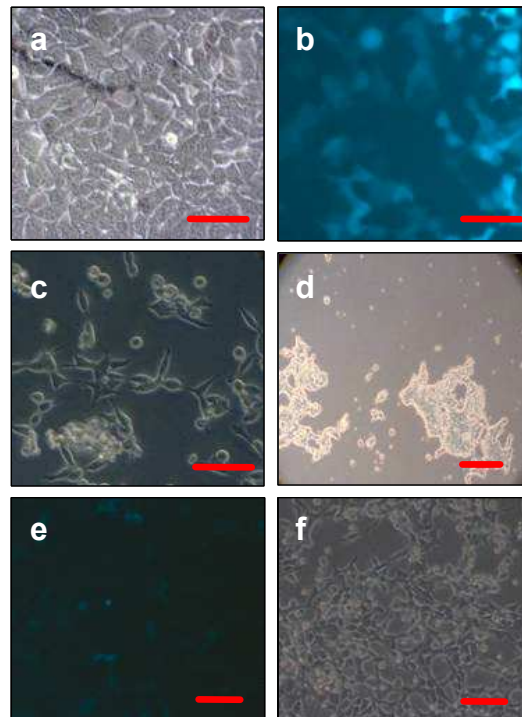


Abbildung 3.3 Etablierung der stabilen Zelllinien in HEK293 Zellen. (a) Darstellung der Zelldichte vor Transfektion. (b) GFP-Epifluoreszenz 24 h nach Transfektion mit I-1-pIRES-eGFP. (c) I-1-pIRES-eGFP transfizierte Zellen nach dreitägiger Selektion mit G418 1 mg/ml Medium. (d) Bildung von Zellnestern nach zehntägiger Selektion mit G418 1 mg/ml Medium. (e) GFP-Epifluoreszenz 13 Tage nach Transfektion und zweimaliger Passagierung und (f) Lichtmikroskopische Darstellung der Zelldichte. Maßstab (d) entspricht 280 μm , Maßstab (a, b, c, e, f) entspricht 70 μm .

In den folgenden Schritten erfolgte die Selektion der Zellen, die den Vektor stabil in das Genom integriert hatten. Dazu wurden die Zellen zunächst im Verhältnis 1:5 gesplittet. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen erstmalig mit dem Selektionsantibiotikum Geneticin G418 in einer Konzentration von 1 mg/ml Medium behandelt, wodurch es zum Absterben des Großteils der Zellen kam, die

den Vektor nicht stabil ins Genom integriert hatten. Nach 3 Tagen waren alle nicht transfizierten HEK293 Zellen (Kontrolle) eliminiert, während einzelne Zellen der transfizierten HEK293 Zellen (Abbildung 3.3 c) überlebten. Nach zehntägiger Selektion entstanden daraus Zellkolonien (Abbildung 3.3 d), die durch Passagierung weiter vermehrt werden konnten (Abbildung 3.3 e, f).

3.1.3 Überprüfung der Stabilität der Zelllinien

Hierfür konnte die GFP-Epifluoreszenz (Abbildung 3.3 e) der Zellen herangezogen, wobei die GFP-Expression in stabilen Zelllinien im direkten Vergleich zu transient transfizierten Zellen viel geringer war, da erheblich weniger Genkopien in das Zellgenom integriert wurden. Teilweise konnte mittels Fluoreszenzmikroskopie, im Gegensatz zur konfokalen Lasermikroskopie, kaum ein GFP-Signal detektiert werden. Des Weiteren war das Signal je nach Zelle sehr heterogen, was ebenfalls auf die unterschiedliche Anzahl von eingebauten Kopien zurückzuführen ist.

Im Western Blot konnte die Inhibitor-1 Proteinexpression nachgewiesen werden (Abbildung 3.4). In Wildtyp HEK293 Zellen (Bahn a) konnte im Vergleich zur stabilen I-1-pIRES-eGFP Zelllinie (Bahn b) kein Signal bei 32 kDa für den Inhibitor-1 detektiert werden. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin (45 kDa) mitgeführt.

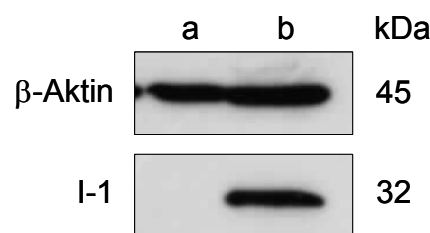


Abbildung 3.4 Nachweis der stabilen Proteinexpression der Inhibitor-1-Zelllinie. Western Blot Analyse zur Detektion des Inhibitor-1 (32 kDa) in der stabilen Zelllinie (b) im Vergleich mit HEK293 Zellen (a) und β -Aktin (45 kDa) als Ladekontrolle.

Der Nachweis der β_1 -AR Proteinexpression im Immunoblot erwies sich dagegen als problematisch (Abbildung 3.5 A), insofern als das mit dem verwendeten β_1 -AR-Antikörper (Santa Cruz) kein spezifisches Signal erzeugt werden konnte, trotz entsprechender Literatur (Dincer et al. 2001). Aufgrund dessen wurde ein Bindungsassay zur Detektion der β -Adrenozeptorendichte mit [3 H]-CGP 12177 als

Radioligand (Kapitel 2.6.5) durchgeführt. Als Negativkontrolle dienten wiederum Wildtyp HEK293 Zellen. Als Positivkontrolle wurde eine stabile β_1 -AR CHO Zelllinie (Hamsterfibroblasten) von Prof. Stefan Engelhardt (Universität Würzburg) verwendet. Alle Messungen wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt.

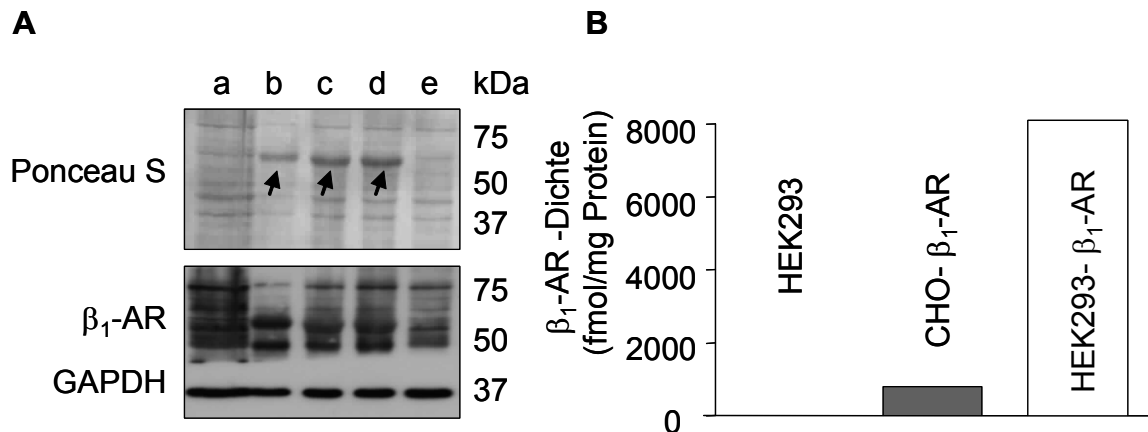


Abbildung 3.5 Nachweis der stabilen Proteinexpression der β_1 -AR-Zelllinie. (A) Western Blot Analyse zur Detektion des β_1 -AR in der stabilen Zelllinie mit folgender Beladung: (a, e) HEK293 Zellen, (b-d) HEK293- β_1 -AR Zellen. Obere Membran: reversible Proteinfärbung mit Ponceau S, die Pfeile markieren die vermutete β_1 -AR Bande (65 kDa). Untere Membran: Immunoblot von β_1 -AR (65 kDa) und GAPDH (36 kDa) als Ladekontrolle. (B) Bestimmung der β_1 -Adrenozeptordichte mittels [3 H]CGP 12177-Bindungsassay in verschiedenen Zelllinien. Dargestellt ist die spezifische Bindung.

Die Expression des β_1 -AR in dieser Zelllinie mit einer Dichte von etwa 8000 fmol/mg Membranprotein war immens (Abbildung 3.5 B) und zugleich um mehr als das fünffache stärker als die Positivkontrolle.

3.2 Evaluierung der Zielsequenzen für die selektive Hemmung von Inhibitor-1 und β_1 -Adrenozeptor

3.2.1 Transfektionseffizienz von siRNA in HEK293 Zellen

Eine Voraussetzung für die erfolgreiche Genausschaltung durch RNAi war die effiziente Transduktion der HEK293 Zellen mit siRNA. Dies sollte zunächst durch die Transfektion von Rhodamin-markierter siRNA, die gegen GFP gerichtet war, in Zellen der stabilen Zelllinie I-1-pIRES-eGFP überprüft werden. Dafür wurden die Zellen zunächst auf Deckgläschen ausplattiert und nach 24 h mit unterschiedlichen Konzentrationen von siGFP (Qiagen) und Lipofektamin transfiziert. Da bereits 8 h nach Transfektion das Rhodaminsignal am stärksten

war, wurden die Zellen zu diesem Zeitpunkt mit 4% PFA fixiert und auf Objektträger gebracht. Anschließend wurden mittels konfokaler Lasermikroskopie das GFP (Anregung: 488 nm, Filter: BP 505-530 nm) sowie das Rhodaminsignal (Anregung: 543 nm, Filter: BP 560-615 nm) untersucht. Es wurde deutlich, dass die Transduktionseffizienz in Abhängigkeit von den Transfektionsbedingungen stark schwankte, wobei die Standardbedingungen gemäß des Herstellerprotokolls bereits optimal erschienen (Abbildung 3.6 b). Die Verwendung einer höheren siRNA-Konzentration führte zwar zur Verstärkung des Rhodaminsignals, aber nicht zur Erhöhung der Transfektionseffizienz (Abbildung 3.6 f), wobei die siRNA-Moleküle größtenteils an der Zelloberfläche anhafteten. Weiterhin konnte durch die erfolgreiche Transfektion der siGFP die Abnahme der Intensität des GFP-Signals in den Zellen und damit der *Knockdown* von GFP nachgewiesen werden.

Um die Transfektion der Zellen mit siRNA noch genauer zu überprüfen, wurde eine sogenannte Z-Stapel-Aufnahme der Zellen angefertigt. Dabei wurde eine Serie von 29 Schnitten (Schichtdicke jeweils 0,73 μm) aufgenommen und digital zu einem dreidimensionalen Bild verarbeitet. GFP-positive Zellen waren komplett von GFP ausgefüllt. Das Rhodaminsignal erstreckte sich ebenfalls über das gesamte Zellvolumen (Abbildung 3.7), wodurch die erfolgreiche Transfektion gezeigt werden konnte.

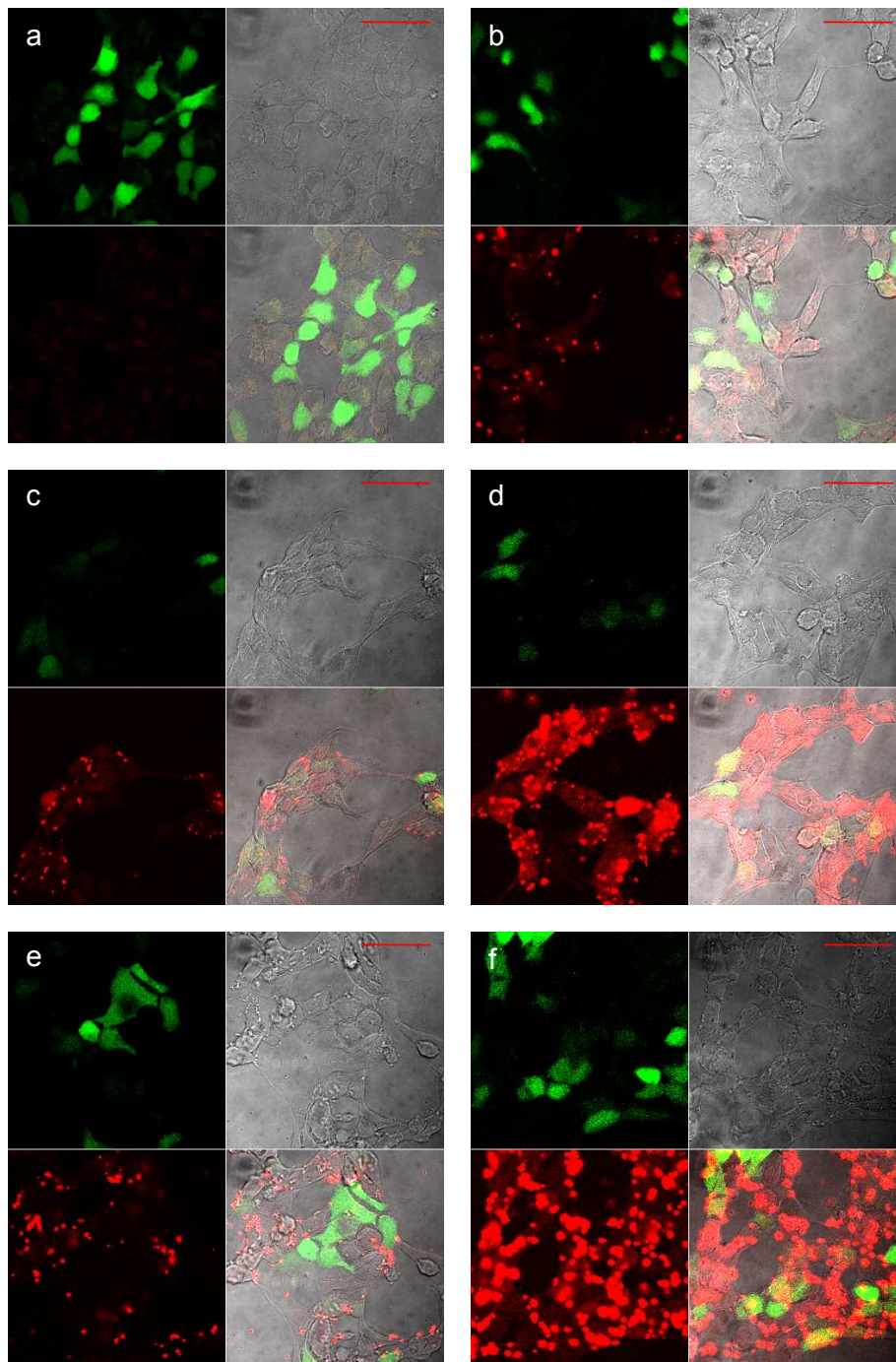


Abbildung 3.6 Überprüfung der Transfektionseffizienz von Rhodamin-markierter siRNA. Stabile HEK293-Inhibitor-1 Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von siRNA und Lipofektamin transfiziert: (a) OptiMEM, (b) OptiMEM mit 0,2% Lipofektamin und 40 nM siRNA entsprechend dem Standardprotokoll von Invitrogen, (c) OptiMEM mit 0,1% Lipofektamin und 40 nM siRNA, (d) OptiMEM mit 0,4% Lipofektamin und 40 nM siRNA, (e) OptiMEM mit 1,2% Lipofektamin und 40 nM siRNA, (f) OptiMEM mit 1% Lipofektamin und 120 nM siRNA. In allen Abbildungen erfolgt die Darstellung von GFP (oben links), Durchlichtaufnahme (oben rechts), Rhodamin (unten links) sowie die Überlagerung aller Signale (unten rechts). Maßstab entspricht 50 μ M.

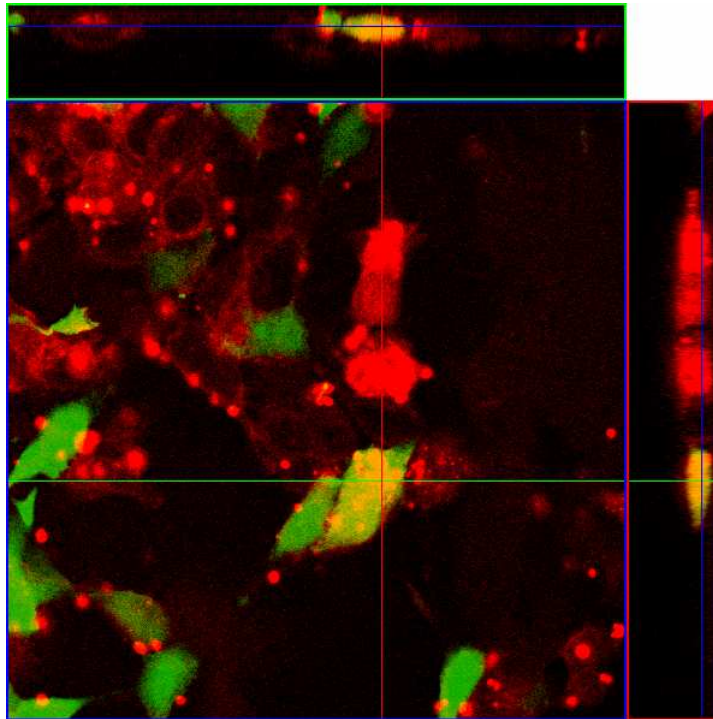


Abbildung 3.7 Konfokale Z-Stapel-Aufnahme zur Überprüfung der Lokalisation der siRNA. Aufnahme von stabilen HEK293-Inhibitor-1 Zellen transfiziert mit Rhodamin-markierter siRNA (rotes Signal). GFP ist grün dargestellt. Im roten (rechts) bzw. grünen Kasten (oben) ist jeweils die Schnittebene, senkrecht zur Aufnahmeebene gezeigt. Ihre Lage ist in der Hauptabbildung jeweils als rote bzw. grüne Linie dargestellt. Am Schnittpunkt beider Linien ist ein orangefarbenes Zellareal erkennbar. In der Darstellung der Schnittebenen ist eine grün-fluoreszierende Zelle mit intrazellulär lokalisierter siRNA (rotes Signal) abgebildet.

3.2.2 Halbwertszeit von Inhibitor-1 in Kardiomyozyten

Da die Halbwertszeit des Inhibitor-1 Proteins bis dato nicht bekannt war und deren Kenntnis aber von Vorteil für die nachfolgenden Untersuchungen u. a. für die Transfektionsdauer sein würde, wurde sie im Rahmen dieser Arbeit bestimmt.

Die sich schnell teilenden HEK293 Zellen reagierten besonders anfällig gegenüber der Behandlung mit dem Zytostatikum Cycloheximid (Kapitel 2.2.1.5), weshalb der Versuch an neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt wurde. Diese wurden zur Verfolgung des Abbauprozesses von Inhibitor-1 über mehrere Tage in Cycloheximid-haltigem Medium kultiviert.

Die Kultivierung der Kardiomyozyten erfolgte wie in Kapitel 2.2.2.4 beschrieben. Da die endogene Expression des Inhibitor-1 in den nRKM zu gering für einen Nachweis im Immunoblot war, wurde eine Überexpression durch die Transduktion

mit einem für Inhibitor-1 kodierenden Adenovirus AdPPI-1 (El-Armouche et al. 2003) durchgeführt (MOI 1). Beim Mediumwechsel 24 h nach Virustransduktion erfolgte die Zugabe von Cycloheximid (100 µg/ml). Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 24, 48 und 96 h) geerntet und die Inhibitor-1 Proteinmenge im Western Blot analysiert (Abbildung 3.8). Daraus ließ sich eine Halbwertszeit von <24 h ableiten. Der Vergleich der Ponceau S-Banden aller behandelten Zellen zeigte die relativ gleichmäßige Proteinbeladung. Eine genauere Einschätzung mittels radioaktiv markierter Aminosäuren war im Rahmen dieser Arbeit nicht nötig, da bei allen Transfektionsexperimenten mit siRNA gegen den Inhibitor-1 mindestens 72 h zwischen Transfektion und Zellernte lagen.

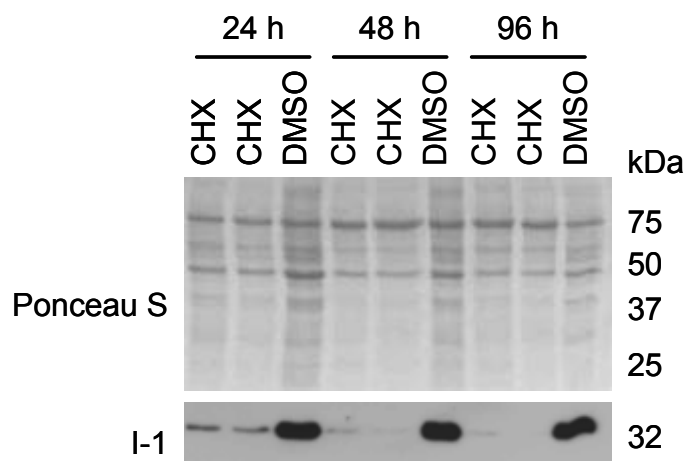


Abbildung 3.8 Untersuchung der Halbwertszeit von Inhibitor-1 in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Western Blot Analyse des Proteinlysates neonataler Rattenkardiomyozyten nach Behandlung mit Cycloheximid (CHX) und adenoviraler Inhibitor-1 Überexpression. Obere Membran: reversible Proteinfärbung mit Ponceau S. Untere Membran: Immunoblot von Inhibitor-1.

3.2.3 Quantifizierung des Inhibitor-1 und β_1 -AR *Knockdowns* auf mRNA-Ebene nach Transfektion von siRNA

Das Ausmaß der Inhibitor-1 und β_1 -AR Genstilllegung durch die entsprechenden siRNAs in den etablierten Zelllinien I1-pIRES-eGFP und β_1 -AR-pIRES-eGFP wurde auf mRNA-Ebene 72 h nach Transfektion von 40 nM siRNA und 0,2% Lipofektamin im 12-Well Maßstab gemessen. Die Inhibitor-1 und β_1 -AR mRNA-Mengen wurden nach RNA-Extraktion und reverser Transkription mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) und mit Hilfe der spezifischen Primer und

Sonden für Inhibitor-1, β_1 -AR und GAPDH als interner Standard (Tabelle 12.6, Tabelle 12.7) ermittelt.

Den größten *Knockdown*-Effekt der Inhibitor-1 Expression auf mRNA-Ebene (Abbildung 3.9 A) zeigte die Sequenz I-1 (4) mit einer Abnahme auf $20 \pm 2\%$, gefolgt von Sequenz I-1 (1) auf $35 \pm 6\%$ und Sequenz I-1 (2) auf $41 \pm 9\%$ ($n=3$, $p<0,05$), lediglich Sequenz I-1 (3) zeigte keine signifikante Reduktion der I-1 mRNA-Menge ($68 \pm 14\%$). Die β_1 -AR Expression (Abbildung 3.9 B) wurde durch die Sequenz β_1 -AR (1) auf mRNA-Ebene signifikant auf $10 \pm 2\%$ gesenkt ($n=3$, $p<0,05$), wohingegen die Sequenzen β_1 -AR (2) und β_1 -AR (3) keine signifikanten Effekte zeigten ($81 \pm 20\%$ und $53 \pm 6\%$).

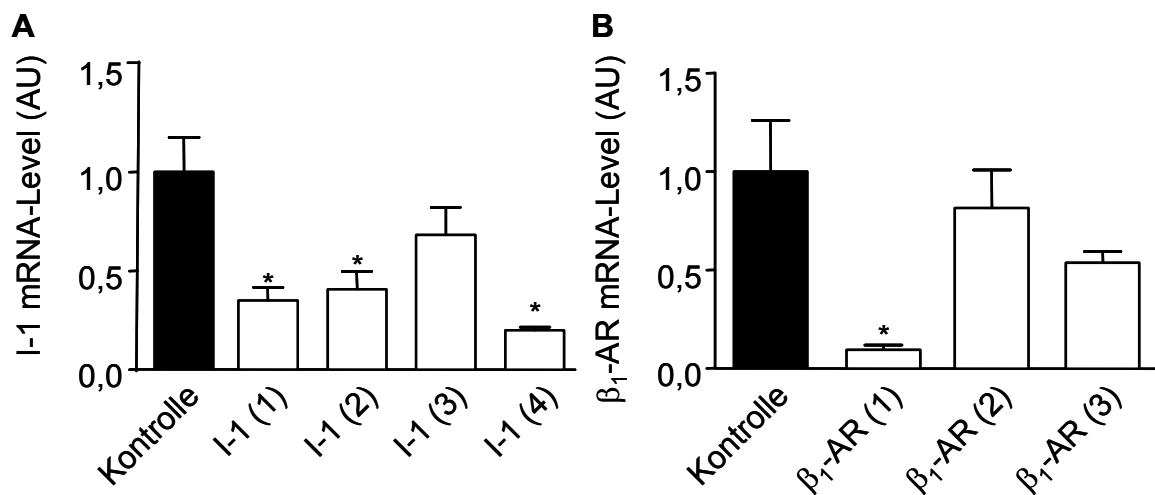


Abbildung 3.9 Analyse der mRNA-Konzentrationen nach Applikation der verschiedenen siRNA-Sequenzen. qRT-PCR Analyse der Inhibitor-1 mRNA-Menge (A) und der β_1 -AR mRNA-Menge (B) 72 h nach siRNA-Transfektion. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH. $n=3$, * $p<0,05$ vs. Kontrolle.

3.2.4 Quantifizierung des Inhibitor-1 *Knockdowns* auf Proteinebene

Die Inhibitor-1 Proteinmenge wurde mittels Western Blot mit spezifischen Antikörpern gemessen (Tabelle 12.1, Tabelle 12.2) und auf das Protein β -Aktin normalisiert. Die Proteinisolation erfolgte 72 h nach Transfektion mit Lysispuffer (Kapitel 2.6.1.1). Die Inhibitor-1 Proteinmenge (Abbildung 3.10) wurde mit Sequenz I-1 (1) auf $39 \pm 17\%$, mit Sequenz I-1 (2) auf $54 \pm 13\%$ und mit Sequenz I-1 4) auf $49 \pm 11\%$ signifikant reduziert ($n=3$, $p<0,05$). Die Sequenz I-1 (3) zeigte wie erwartet keine Reduktion der Inhibitor-1 Proteinmenge ($74 \pm 10\%$).

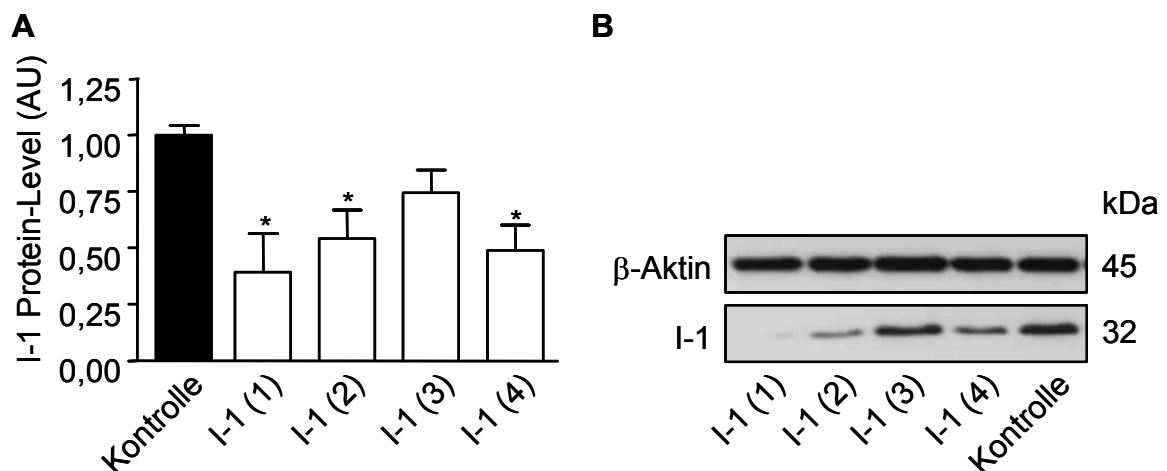


Abbildung 3.10 Analyse der Inhibitor-1 Proteinmenge nach Applikation der verschiedenen siRNA-Sequenzen. (A) Western Blot Analyse der Inhibitor-1 Proteinmenge normalisiert auf die β -Aktin Proteinmenge 72 h nach siRNA-Transfektion. $n=3$, $*p<0,05$ vs. Kontrolle. (B) Western Blot-Auszug.

Die Quantifizierung des β_1 -AR auf Proteinebene mittels Western Blot wurde nicht durchgeführt, da kein spezifischer Antikörper gegen den β_1 -AR zur Verfügung stand (Kapitel 3.1.3).

3.3 Stabile intrazelluläre Expression von Inhibitor-1/ β_1 -AR short hairpin RNA

Da wir an einer stabilen und langfristigen Genstilllegung interessiert waren, wurden alle siRNA-Sequenzen in den RNA-Expressionsvektor *pALsh* (Kapitel 2.4.2.2) zur endogenen Expression von shRNA kloniert (pSuper-RNAi System). Nach entsprechender Transformation wurden die Klone einerseits durch die Sequenzierungsanalyse und andererseits mittels Restriktionsverdau durch die Enzyme *SacI* und *KpnI* verifiziert (Abbildung 3.11).

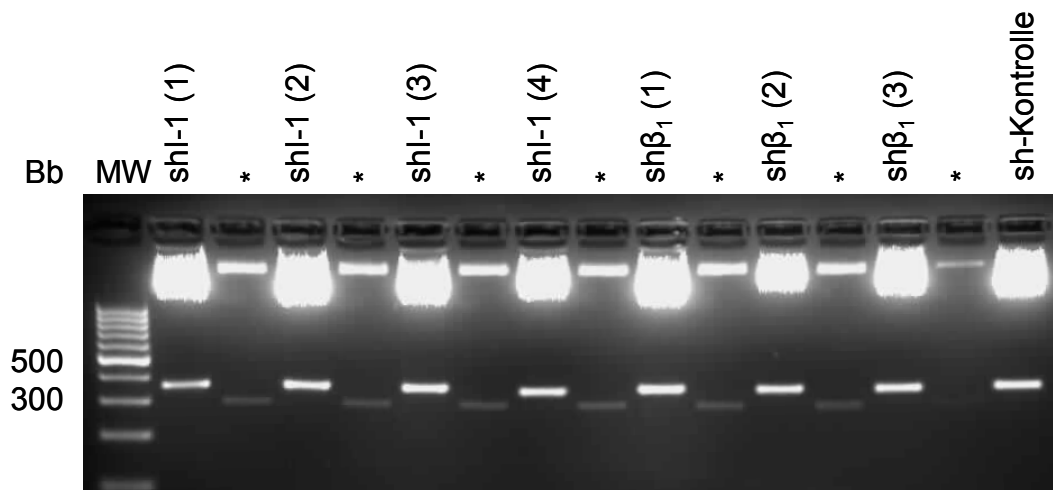


Abbildung 3.11 Restriktionsanalyse aller shRNA-Expressionsvektorklone mit den Enzymen *SacI* und *KpnI*. Alternierend wurde zu jeder Probe der Originalvektor pALsh (*) geladen. Die positiven Klone zeigten ein Bandenmuster von 2856 Bp und 355 Bp. Negative Klone zeigten ein Bandenmuster von 2856 Bp, 300 Bp und 35 Bp (nicht detektierbar).

3.3.1 Quantifizierung des Inhibitor-1 und β_1 -AR *Knockdowns* auf mRNA-Ebene nach Transfektion mit shRNA-Expressionsvektoren

Die Übertragung der shRNA-Expressionsvektoren in die Inhibitor-1 bzw. β_1 -AR exprimierenden Zelllinien erfolgte gemäß der siRNA-Transfektion mittels Lipofektion im 12-Well Maßstab mit 0,8 μ g Plasmid-DNA und 0,2% Lipofektamin. Nach 72 h erfolgten RNA-Extraktion, reverse Transkription und qRT-PCR.

Alle pALsh Inhibitor-1 shRNA-Expressionsvektoren führten in unterschiedlichem Ausmaß zur signifikanten Reduktion der Inhibitor-1 mRNA-Menge (Abbildung 3.12 A) gegenüber der Behandlung mit dem shKontroll-Vektor. Am effektivsten wurde die Inhibitor-1 mRNA durch die Vektoren shl-1 (2) und shl-1 (3) reduziert ($19\pm 2\%$ und $20\pm 3\%$). Weniger ausgeprägt war der Effekt, der durch die Vektoren shl-1 (1) und shl-1 (4) ($41\pm 4\%$ und $53\pm 2\%$) erzielt wurde. Entsprechend der Transfektion mit den siRNA-Sequenzen konnte lediglich der Vektor sh β_1 -AR(1) die β_1 -AR mRNA-Menge signifikant reduzieren ($22,9\pm 4,6\%$). Kein Effekt wurde durch die Vektoren sh β_1 -AR (2) und sh β_1 -AR (3) erreicht ($115\pm 18\%$ und $90\pm 11\%$).

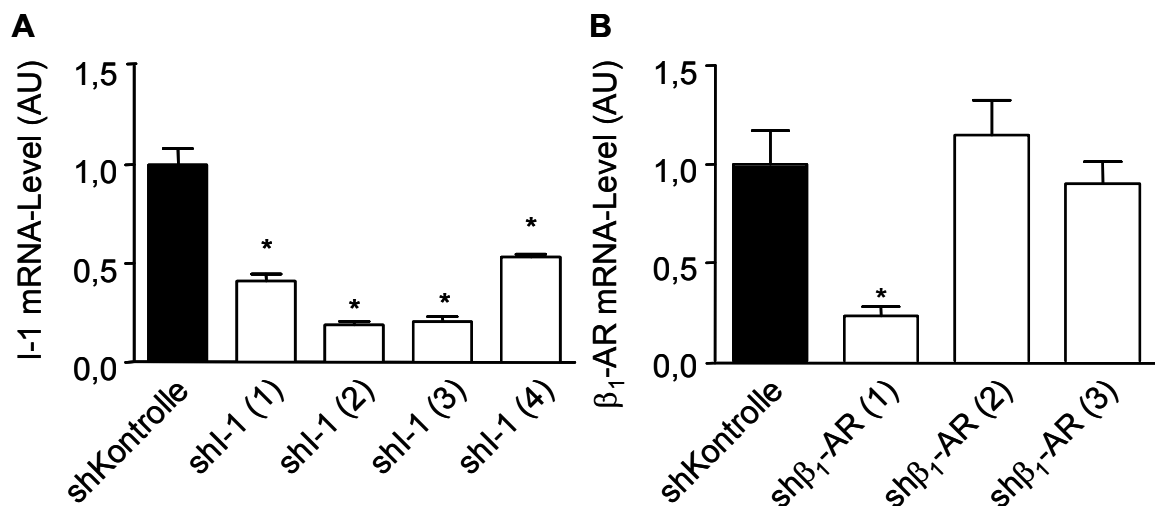


Abbildung 3.12 Analyse der mRNA-Konzentrationen nach Applikation der verschiedenen shRNA-Expressionsvektoren. qRT-PCR Analyse der Inhibitor-1 mRNA-Menge (A) und der β_1 -AR mRNA-Menge (B) 72 h nach shRNA-Transfektion. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH. n=3, *p<0,05 vs. shKontrolle.

3.3.2 Quantifizierung des Inhibitor-1 und β_1 -AR *Knockdowns* auf Proteinebene nach Transfektion mit shRNA-Expressionsvektoren

Die Inhibitor-1 Proteinmenge wurde wiederum mittels Western Blot 72 h nach Transfektion bestimmt und auf das Protein β -Aktin normalisiert. Die Effizienz der Vektoren konnte somit auch auf Proteinebene (Abbildung 3.13) bestätigt werden. Die stärkste Erniedrigung der Inhibitor-1 Proteinmenge auf $27 \pm 1\%$ und $45 \pm 34\%$ war nach Transfektion mit den Vektoren shI-1 (2) und shI-1 (3) zu verzeichnen ($p < 0,05$). Die Vektoren shI-1 (4) und shI-1 (1) erreichten keine deutliche Reduktion der Inhibitor-1 Proteinkonzentration ($62 \pm 11\%$ und $78 \pm 8\%$).

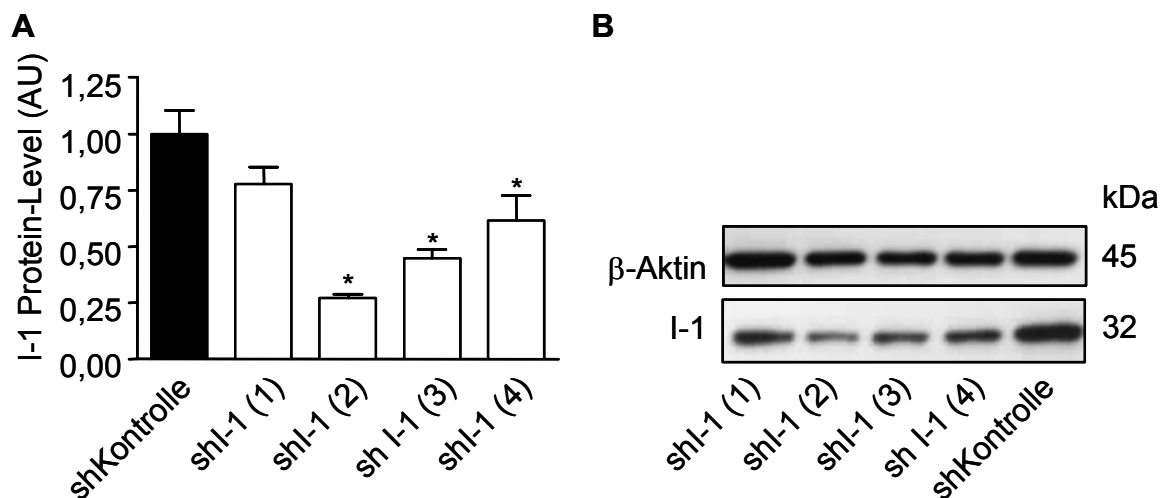


Abbildung 3.13 Analyse der Inhibitor-1 Proteinmenge nach Applikation der verschiedenen shRNA-Expressionsvektoren. (A) Western Blot Analyse der Inhibitor-1 Proteinmenge normalisiert auf die β -Aktin Proteinmenge 72 h nach shRNA-Transfektion. $n=6$, $*p<0,05$ vs. shKontrolle. (B) Western Blot-Auszug.

Um die Wirksamkeit der shRNA gegen den β_1 -AR erstmals auch auf Proteinebene zu überprüfen, wurden 10 cm Zellkulturschalen der stabilen Zelllinie β_1 -AR-pIRES-eGFP mit dem auf mRNA-Ebene effektivsten Vektor sh β_1 -AR (1) und mit dem shKontroll-Vektor transfiziert. Nach 72 h erfolgten die Zellernte, die Präparation der Membranen (Kapitel 2.6.1.3) und die anschließende Bestimmung der Dichte der β -AR mittels [3 H]-CGP 12177 im Bindungsassay (Kapitel 2.6.5). Die β -AR-Dichte konnte auf $29\pm 2\%$ (Abbildung 3.14) reduziert werden und liegt damit etwas unter dem Effekt auf mRNA-Ebene.

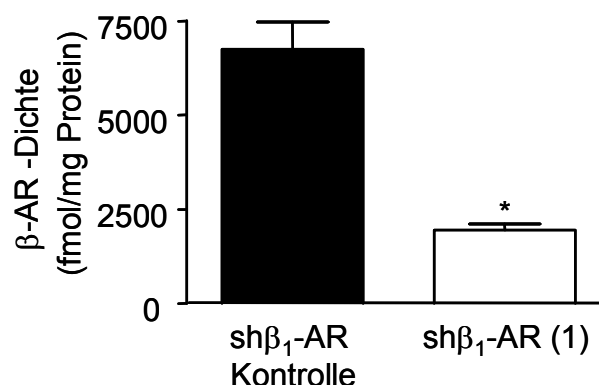


Abbildung 3.14 Analyse der β_1 -Adrenozeptorendichte nach Applikation des shRNA-Expressionsvektors gegen den β_1 -AR. Die Quantifizierung des β_1 -AR *Knockdowns* in den

stabilen HEK293 Zellen (pIRES2-EGFP- β_1 -AR) erfolgte durch [3 H]-CGP 12177 im Bindungsassay. $n=3$, $*p<0,05$ vs. sh β_1 -AR Kontrolle.

Mit Hilfe dieser Evaluierungsexperimente konnten die effektivsten Zielsequenzen zum *Knockdown* des Inhibitor-1/ β_1 -AR identifiziert werden, I-1 (2) und β_1 -AR (1). Diese Sequenzen und die entsprechenden Kontrollen (I-1-Kontrolle und β_1 -AR-Kontrolle) wurden dann für die Konstruktion der rekombinanten shAAVs verwendet.

3.4 Konstruktion und Produktion der AAV-shRNA-Vektorplasmide

Als Ausgangsvektor für die Konstruktion des shRNA exprimierenden Reporterplasmids (Abbildung 3.15) diente das dsAAV-CMV-GFP Vektorplasmid, welches uns freundlicherweise von Dr. Müller (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt wurde. Dieses enthält das eGFP-Reportergen unter der Kontrolle des CMV-Promotors. Die Expressionskassette wird von zwei invertierenden terminalen Sequenzwiederholungen, den ITRs flankiert.



Abbildung 3.15 Schematische Darstellung des AAV-shRNA-Reporterplasmids. Die Expressionskassette enthält den H1-Promotor und die entsprechende shRNA-Sequenz und eGFP unter Kontrolle des CMV-Promotors. ITR=*inverted terminal repeats*.

Für die Klonierung des AAV-shRNA-Vektorplasmids dienten die entsprechenden *pALsh* Vektoren (*pALsh* I-1, *pALsh* I-1-Kontrolle, *pALsh* β_1 -AR und *pALsh* β_1 -AR-Kontrolle) als Vorlage. Mittels PCR wurden die entsprechenden H1-shRNA-Sequenzen amplifiziert und dabei an beiden Enden durch spezielle Primer (Tabelle 12.4) mit *MluI* Schnittstellen versehen. Das PCR-Produkt hatte eine Größe von 320 Bp (Abbildung 3.16 A) und konnte nach der Restriktion durch das Enzym *MluI* in den zuvor ebenfalls mit *MluI* linearisierten dsAAV-CMV-GFP Vektor kloniert werden. Die Klone wurden mittels Restriktionsverdau (Abbildung 3.16 B, C) und Sequenzierung auf ihre Richtigkeit und Orientierung überprüft. Durch den Restriktionsverdau mit *KpnI* konnten positive Klone mit der richtigen Orientierung identifiziert werden, der Restriktionsverdau mit *EcoRI/BsrGI* schneidet den H1-shRNA-CMV-GFP kodierenden Bereich heraus (~1,9 Kb). Das Bandenmuster durch den Verdau mit *SmaI* bestätigte die intakten ITR-Sequenzen.

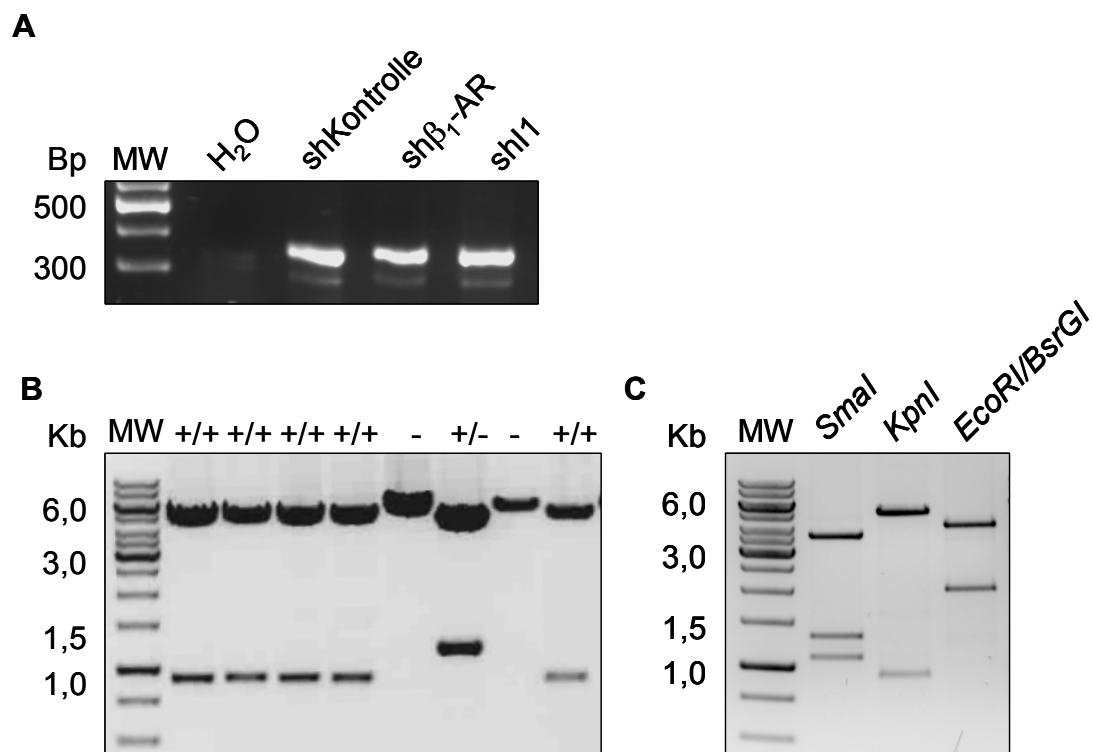


Abbildung 3.16 Klonierung des AAV-shRNA-Vektorplasmids. (A) PCR der H1-Promotor-shRNA-Sequenzen für die Klonierung in das AAV-Vektorplasmid. (B) Restriktionsanalyse der Klone mit *KpnI*, wobei positive Klone (+/+) Banden bei 5,2 Kb und bei 923 Bp zeigen, Klone mit falscher Orientierung (+/-) zeigen Banden bei 4,9 Kb und bei 1,2 Kb und negative Klone (-) zeigen eine Bande des linearisierten Vektors bei 5,8 Kb. (C) Restriktionsanalyse eines positiven Klons mit *KpnI*, *EcoRI/BsrGI* und *SmaI*.

3.4.1 Überprüfung der Funktionalität der AAV-shRNA-Vektorplasmide

Die so generierten AAV-shRNA-Vektorplasmide wurden, wie schon die siRNA-Sequenzen und die shRNA-Expressionsvektoren zuvor, in den Inhibitor-1/ β_1 -AR Zelllinien auf ihre Effizienz zur Genstilllegung getestet. Die Transfektion, mRNA- und Proteinquantifizierung erfolgte analog. Beide AAV-shRNA-Vektorplasmide führten zu signifikanten Effekten auf mRNA-Ebene. Mit dem dsAAV-CMV-GFP-H1-I1 Vektor wurde die mRNA-Menge im Vergleich zur Kontrolle auf $31 \pm 8\%$ (Abbildung 3.17 A) und mit dem dsAAV-CMV-GFP-H1- β_1 -AR Vektor auf $30 \pm 3\%$ (Abbildung 3.17 B) erniedrigt. Die Inhibitor-1 Proteinmenge konnte auf $50 \pm 4\%$ reduziert werden (Abbildung 3.18).

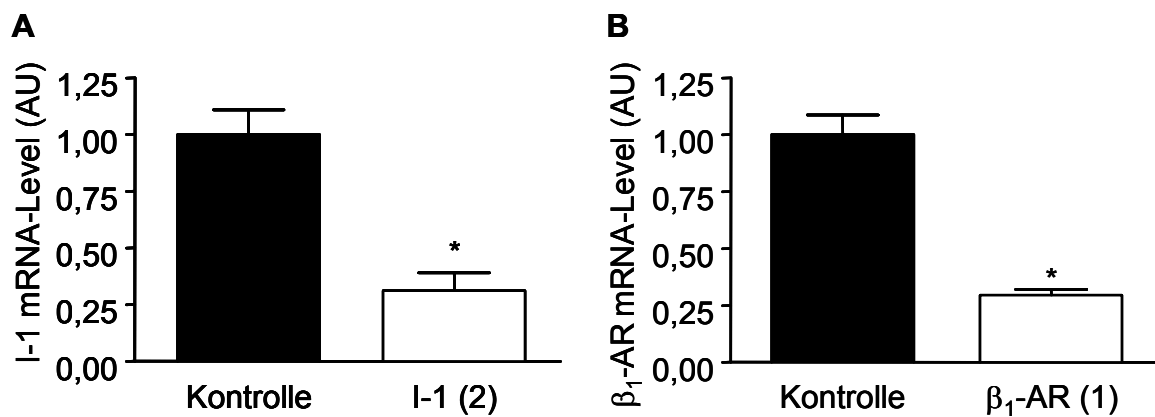


Abbildung 3.17 Analyse der mRNA-Konzentrationen nach Applikation der verschiedenen dsAAV-H1-shRNA-Vektoren. qRT-PCR Analyse der Inhibitor-1 mRNA-Menge (A) und der β_1 -AR mRNA-Menge (B) 72 h nach Plasmidtransfektion. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH. n=6, *p<0,05 vs. Kontrolle.

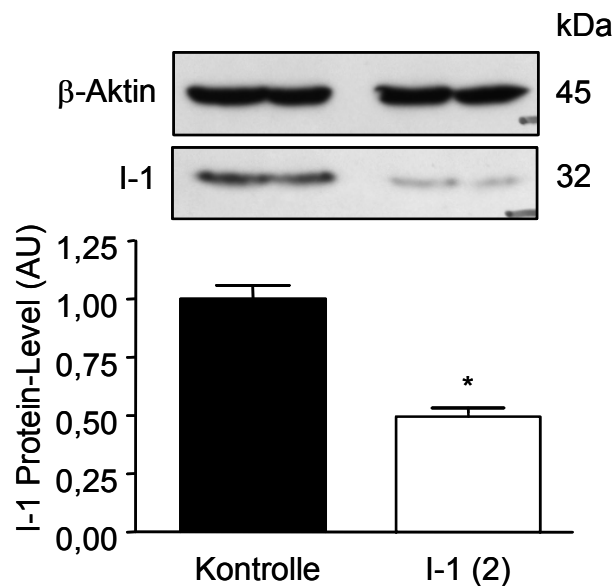


Abbildung 3.18 Analyse der Inhibitor-1 Proteinmenge nach Applikation der dsAAV-H1-shRNA-Vektoren. Western Blot Analyse der Inhibitor-1 Proteinmenge normalisiert auf die β -Aktin Proteinmenge 72 h nach Plasmidtransfektion. n=8, *p<0,05 vs. Kontrolle.

3.5 Produktion und Titrierung der rAAV-shRNA-Vektoren

Die Produktion, Aufreinigung und Titrierung der rekombinanten Viren erfolgte wie in Kapitel 2.5.2 beschrieben durch das DKFZ in Heidelberg.

<u>Virus rAAV6-shRNA</u>	<u>Virustiter [Vg/ml]</u>
AAV6-shI1	$6 \cdot 10^{10} - 1 \cdot 10^{12}$
AAV6-shI1-Kontrolle	$4 \cdot 10^{11} - 1 \cdot 10^{12}$
AAV6-sh β_1 -AR	$4 \cdot 10^{11} - 1,6 \cdot 10^{12}$
AAV6-sh β_1 -AR-Kontrolle	$2 \cdot 10^{11} - 1,6 \cdot 10^{12}$
<u>Virus rAAV9-shRNA</u>	<u>Virustiter [Vg/ml]</u>
AAV9-shI1	$2,6 \cdot 10^{12}$
AAV9-sh β_1 -AR	$7,8 \cdot 10^{12}$
AAV9-shKontrolle	$9,2 \cdot 10^{12} - 1 \cdot 10^{13}$

3.6 Virustransduktion *in vitro* mit rAAV6-shRNA-Vektoren

Für alle *in vitro* Experimente wurde aufgrund der höheren Transduktionseffizienz der Serotyp 6 verwendet (Fechner et al. 2008). In den folgenden Experimenten wurde die Funktionalität der Viren getestet. Da alle Viren zusätzlich für das GFP kodierten, diente die GFP-Epifluoreszenz als Transduktionsmarker. Es wurden die Inhibitor-1 bzw. β_1 -AR exprimierenden HEK293 Zelllinien, sowie Kardiomyozyten der neugeborenen Maus (nMKM) und der Ratte (nRKM) mit ansteigenden Virus Mengen behandelt, wie in Kapitel 2.5.3.1 beschrieben. Dabei wurden 10^3 - 10^5 Vektorgenome (Vg) pro Zelle eingesetzt. Alle rAAV6 waren in der Lage, die genannten Zelltypen zu transduzieren.

3.6.1 Virustransduktion von HEK293 Zellen

HEK293 Zellen im 12-Well Maßstab wurden mit steigenden Viruskonzentrationen behandelt ($3 \cdot 10^3$, 10^4 , $3 \cdot 10^4$ und 10^5 Vg/Zelle) und nach 48 h die GFP-Epifluoreszenz begutachtet (Abbildung 3.19). Um alle Zellen gleichmäßig zu transduzieren, wurden demnach $3 \cdot 10^4$ Vg/Zelle benötigt.

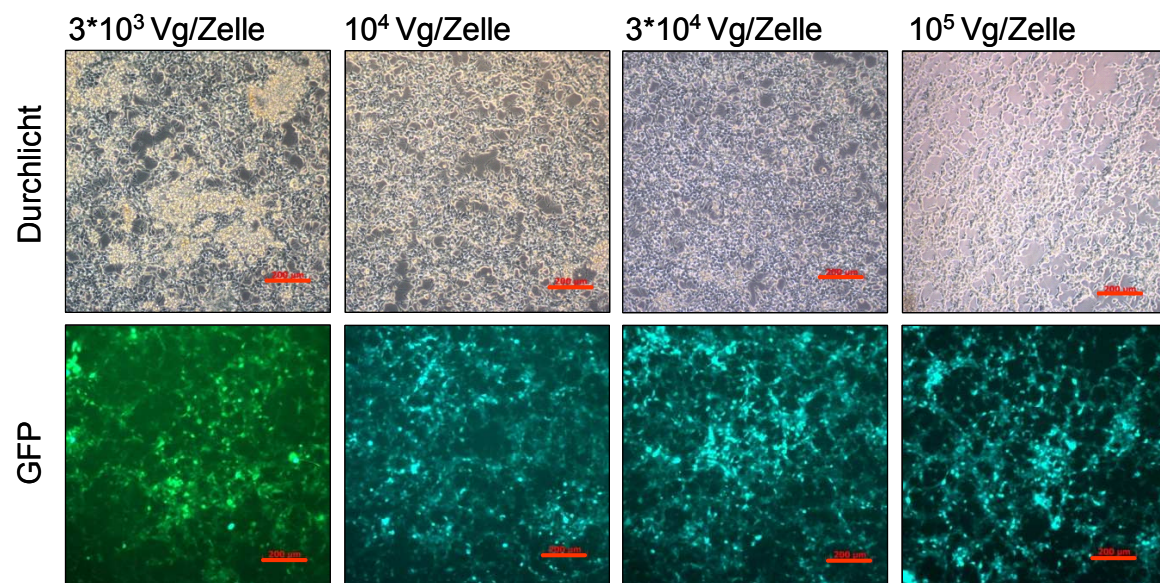


Abbildung 3.19 Virustitration in HEK193 Zellen. Maßstab entspricht 200 µm.

3.6.1.1 Quantifizierung des *Knockdowns* durch rAAV6-shRNA-Vektoren

In den folgenden Experimenten wurde die Fähigkeit der Viren zum *Knockdown* beider Zielgene in den stabilen Zelllinien untersucht. Die Quantifizierung erfolgte auf mRNA-Ebene, Proteinebene bzw. durch β -Adrenozeptoren-Bindungsassay. Die Virustransduktion der Zellen erfolgte im 12-Well Maßstab mit 10^4 Vg/Zelle. Das Ausmaß der Herunterregulation durch AAV6-shI-1 und AAV6-sh β_1 -AR in den etablierten Zelllinien wurde auf mRNA-Ebene 7 d nach Transduktion gemessen. Die Inhibitor-1 mRNA-Menge (Abbildung 3.20 A) wurde auf $51 \pm 2\%$ erniedrigt ($n=4$, $p<0,05$). Dagegen konnte nach Transduktion mit AAV6-sh β_1 -AR nur eine Reduktion der β_1 -AR mRNA auf $66 \pm 2\%$ ($n=4$, $p<0,05$) erzielt werden (Abbildung 3.20 B).

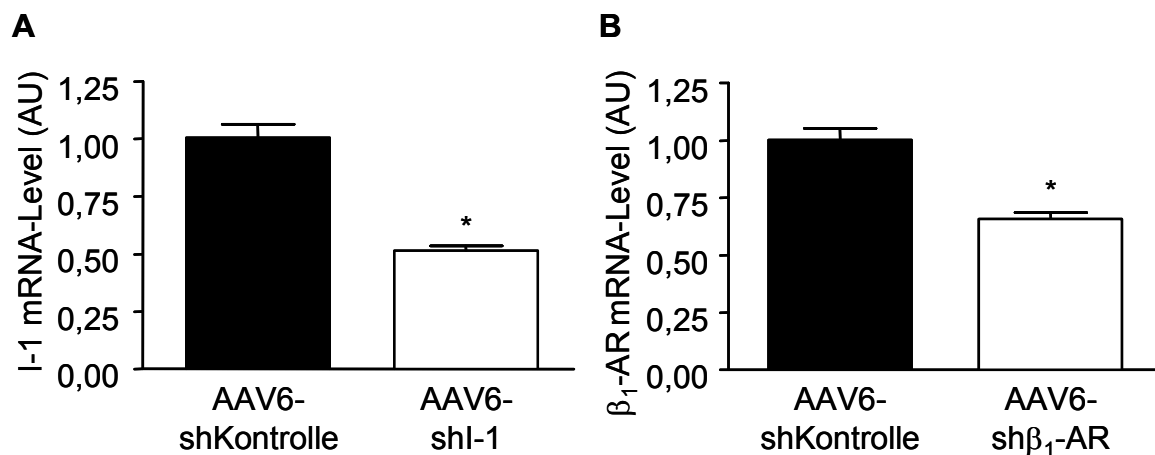


Abbildung 3.20 Analyse der mRNA-Konzentrationen nach Applikation der verschiedenen rAAV6-shRNA-Vektoren in den stabilen Zelllinien. qRT-PCR Analyse der Inhibitor-1 mRNA- (A) und der β₁-AR mRNA-Mengen (B) 7 d nach Virustransduktion. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH. n=4, *p<0,05 vs. AAV6-shKontrolle.

Die mRNA-Daten sollten zusätzlich durch die Messung der Proteinmenge (Immunoblot, β-Adrenozeptorendichte) überprüft werden. Die Quantifizierung des Inhibitor-1 *Knockdowns* auf Proteinebene ergab die Reduktion der Inhibitor-1 Proteinmenge (Abbildung 3.21 A) auf 54±7% (n=8, p<0,05). Im β-AR-Bindungsassay konnte eine Verminderung der β-Adrenozeptorendichte auf etwa 35±3% (n=3, p<0,05) gezeigt werden (Abbildung 3.21 B).

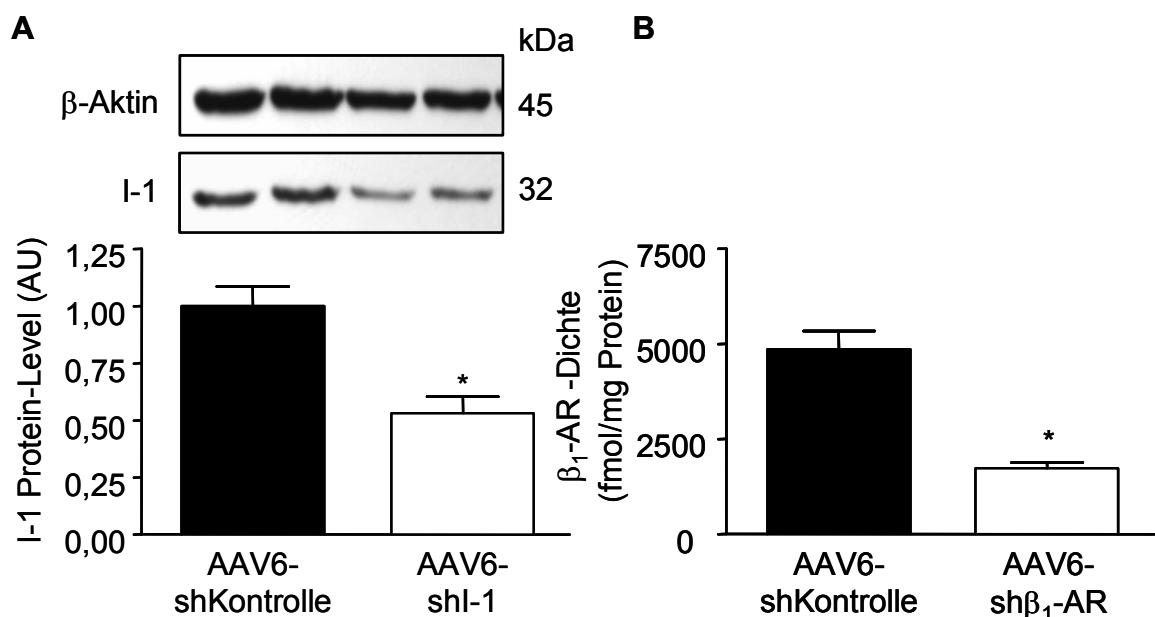


Abbildung 3.21 Analyse der Proteinmengen nach Applikation der rAAV6-shRNA-Vektoren in den stabilen Zelllinien. (A) Western Blot Analyse der Inhibitor-1 Proteinmenge normalisiert

auf die β -Aktin Proteinmenge 7 d nach Virustransduktion. $n=8$, $*p<0,05$ vs. AAV6-sh-Kontrolle. (B) [^3H]-CGP 12177 Bindungsassay ergab eine Reduktion der β -Adrenozeptorendichte um 65%. $n=3$, $*p<0,05$ vs. AAV6-shKontrolle.

3.6.1.2 Qualitative Analyse der shRNA-Expression im Northern Blot

Die Expression der shRNA nach Plasmid- bzw. Virustransduktion in HEK293 Zellen wurde mittels eines Northern Blots, der speziell kleine RNAs bzw. miRNAs nachweisen kann, überprüft. Die Durchführung des Northern Blots erfolgte nach Protokoll (siehe Kapitel 2.7.4) und in Zusammenarbeit mit Dr. Thomas Christalla (Heinrich-Pette-Institut, Hamburg).

Im folgenden Experiment wurden die entsprechenden HEK Zelllinien entweder mit den Reporterplasmiden (shl-1/shKontrolle, sh β_1 -AR/shKontrolle) transfiziert oder mit Virus (AAV6-shl-1/Kontrolle, AAV6-sh β_1 -AR/Kontrolle) transduziert. Nach 72 h wurde die RNA präpariert und davon jeweils 30 μg für den Northern Blot eingesetzt. Die Membranen wurden mit den spezifischen Sonden (Tabelle 2.9) gegen die Inhibitor-1-shRNA (bzw. β_1 -AR-shRNA) inkubiert. Die mit Kontrollplasmid/Virus behandelten Zellen zeigten kein Signal, wodurch die Spezifität der Sonden bestätigt wurde (Abbildung 3.22). Die Inhibitor-1-shRNA-Expression war in den mit Plasmid oder Virus behandelten Zellen etwa gleich stark. Analog dazu konnte die Expression von β_1 -AR-shRNA nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

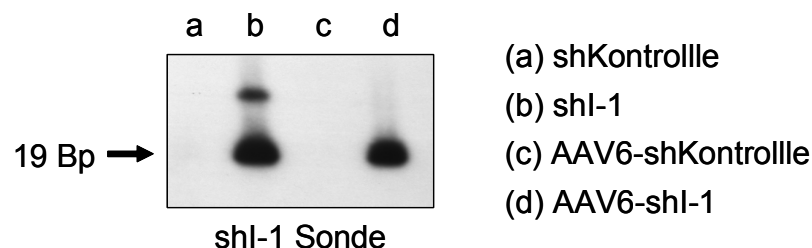


Abbildung 3.22 Northern Blot Analyse zur shRNA-Expression in der stabilen Zelllinien nach Plasmid- bzw. Virustransduktion. Bei der Inkubation der Membran mit einer spezifischen Sonde gegen die Inhibitor-1-shRNA zeigt sich eine Bande von 19 Bp. Exponat nach 3 d.

3.6.2 Virustransduktion von nRKM

Analog zur Virustitration in HEK293 Zellen wurden Kardiomyozyten der neugeborenen Ratte ebenfalls im 12-Well Maßstab mit steigenden

Viruskonzentrationen ($3 \cdot 10^3$, 10^4 , $3 \cdot 10^4$ und 10^5 Vg/Zelle) von AAV6-sh β_1 -AR/shKontrolle behandelt und auf Transduktions- und *Knockdown*-Effizienz untersucht. Die GFP-Epifluoreszenz wurde nach 72 h mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht (Abbildung 3.23).

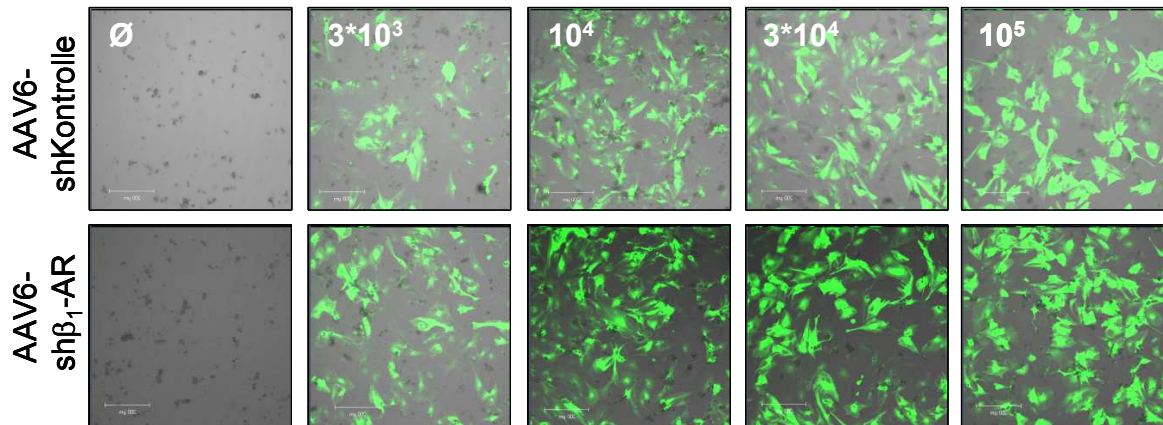


Abbildung 3.23 Virustitration in nRKM. Maßstab entspricht 200 μ m.

Weiterhin wurden die GFP mRNA-Mengen nach Virustransduktion in der qRT-PCR bestimmt. In Abbildung 3.24 A sind die Rohdaten, d. h. die Ct-Werte entsprechend der verwendeten Virusmenge aufgetragen. Mit steigender Viruskonzentration verstärkte sich das GFP-Epifluoreszenz-Signal (niedriger Ct-Wert) und dadurch die Transduktion der Zellen. Die Quantifizierung des *Knockdowns* (Abbildung 3.24 B) ergab eine konzentrationsabhängige Reduktion der β_1 -AR mRNA-Mengen auf $66 \pm 4\%$, $55 \pm 4\%$, $42 \pm 2\%$ und $37 \pm 3\%$ gegenüber der mit äquivalenten Mengen an Kontrollvirus behandelten Kardiomyozyten (Normalisierung jeweils auf AAV6-shKontrolle der entsprechenden Viruskonzentration gleich 1).

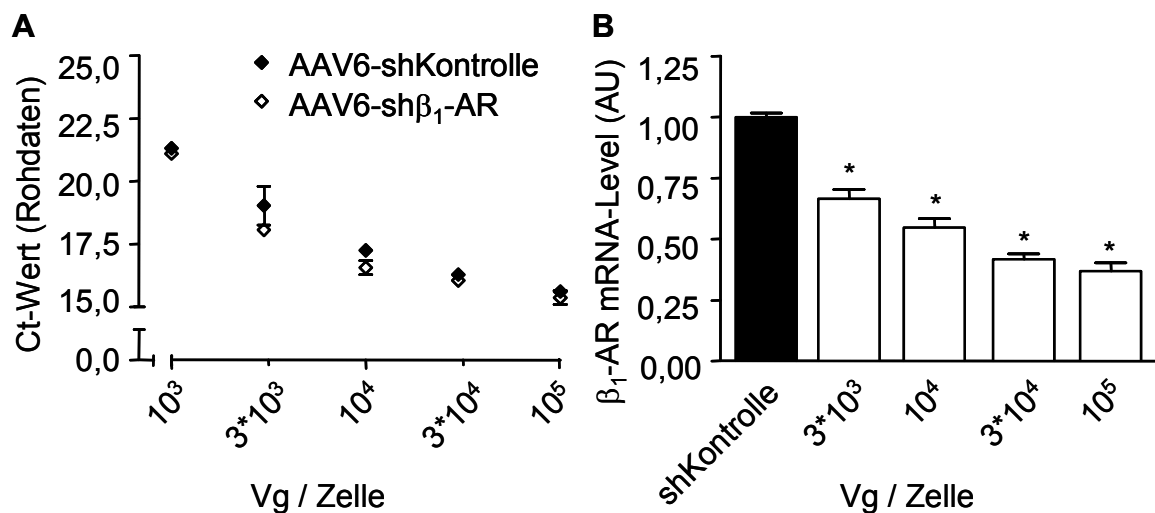


Abbildung 3.24 Analyse der mRNA-Konzentrationen nach Applikation von verschiedenen Virusmengen (AAV6-shβ₁-AR/shKontrolle) in nRKM. qRT-PCR Analyse der GFP mRNA-Menge (A) und der β₁-AR mRNA-Mengen (B) 4 d nach Virustransduktion. Die Normalisierung erfolgte auf CSQ. n=3, *p<0,05 vs. AAV6-shKontrolle.

3.7 Virustransduktion von künstlichem Herzmuskelgewebe

Bei Fibrin-basierten Mini-EHTs (FBMEs) handelt es sich um künstliche, kohärent schlagende, kraftentwickelnde Herzmuskelgewebe der Ratte oder der Maus (Hansen et al. 2010). Sie können unter anderem als *in vitro* Testsystem verwendet werden, wodurch sich funktionelle Effekte und potentielle Toxizität der AAV-vermittelten RNA-Interferenz sowie die Virustoxizität *per se* ermitteln ließen. Die FBME-Herstellung und Virustransduktion wurden in den Kapiteln 2.2.2.5 und 2.5.3.1 beschrieben.

3.7.1 Transduktionseffizienz der rAAV6-shRNA-Vektoren in FBMEs

Die FBMEs wurden an Tag 0 (Präparationstag) oder an Tag 10 nach Herstellung mit rAAV6 (AAV6-shβ₁-AR/shKontrolle) mit 10⁵ Vg/Zelle transduziert. Die FBMEs entwickelten sich in beiden Fällen im Vergleich zu den nicht transduzierten Kontrollen gut und begannen ab Tag 6-8 rhythmisch zu kontrahieren. Die verlaufsweise Betrachtung der GFP-Epifluoreszenz zeigte eine um ein Vielfaches stärkere Transduktion der FBMEs, die an Tag Null (d 0) mit rAAV6 behandelt wurden (Abbildung 3.25 c, d), im Vergleich zu an Tag 10 (d 10) behandelten FBMEs (Abbildung 3.25 e, f).

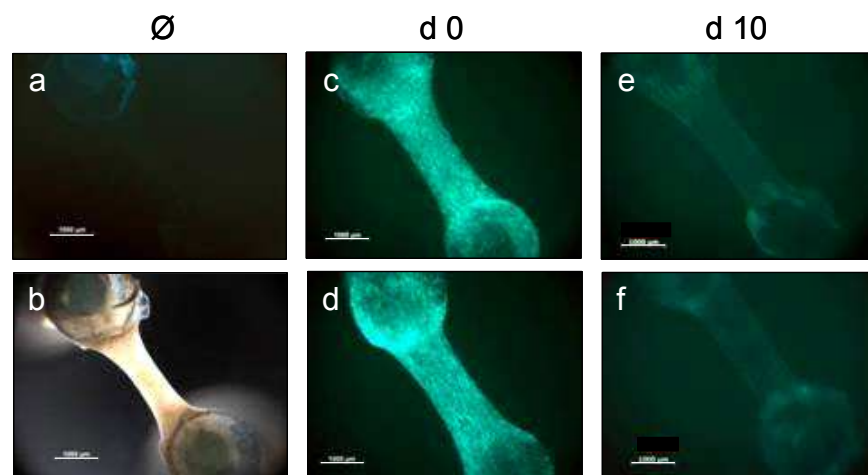


Abbildung 3.25 GFP-Epifluoreszenzaufnahme der FBMEs. Im Vergleich ein unbehandeltes FBME (a), an d 0 mit 10^5 Vg/Zelle behandelte FBMEs (c, d) und an d 10 mit 10^5 Vg/Zelle behandelte FBMEs (e, f). AAV6-shKontrolle: d, f; AAV6-sh β_1 -AR: c, e. Maßstab entspricht 1 cm.

Nach 11 bzw. 14 d Kultivierung wurden die FBMEs fixiert und immunhistologisch analysiert. Mittels α -Aktinin-Färbung wurden die Z-Banden der Myofilamente in den Kardiomyozyten sichtbar gemacht. Anhand dessen zeigte sich sowohl in den Kontrollen als auch in den mit rAAV-behandelten FBMEs eine hohe Zelldichte (Abbildung 3.26). Die GFP-Epifluoreszenzanalyse zeigte, dass ca. 80% der Kardiomyozyten transduziert werden konnten (Abbildung 3.26 B). Die gesunde Struktur deutete gleichzeitig auf eine geringe Virustoxizität hin.

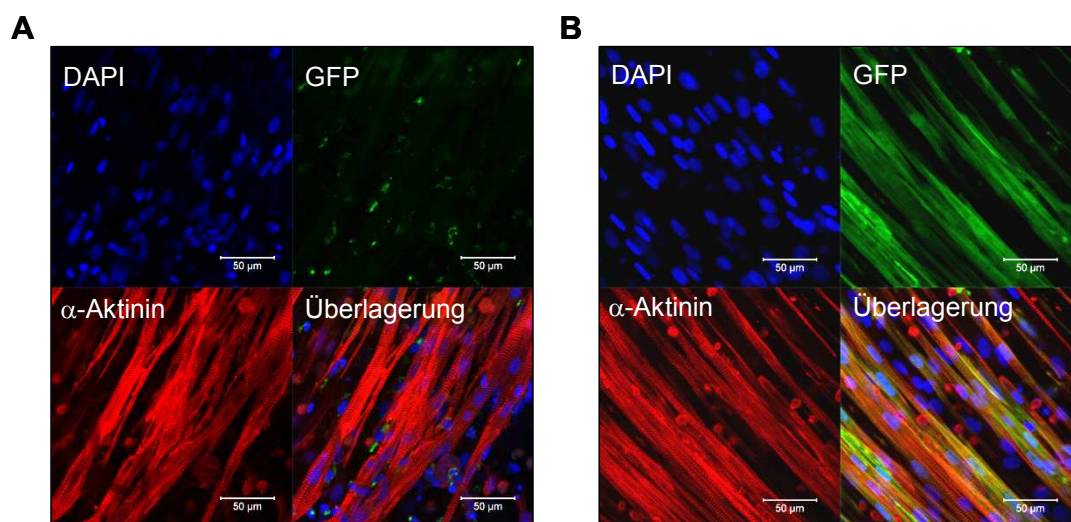


Abbildung 3.26 Fluoreszenzmikroskopische Analyse der FBMEs nach Immunfärbung. (A) DAPI, GFP-Epifluoreszenz und α -Aktinin der nicht-transduzierten Kontrolle. (B) FBME mit Virus an d 0 (10^5 Vg/Zelle) transduziert. Maßstab entspricht 50 μ m.

3.7.2 Quantifizierung des β_1 -AR *Knockdowns* in FBMEs

Das Ausmaß des *Knockdowns* durch AAV6-sh β_1 -AR wurde sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene nach 21 Tagen FBME-Kultivierung in mehreren Serien bestimmt. Die β_1 -AR mRNA-Menge konnte durch RNA-Interferenz reproduzierbar um etwa $64 \pm 3\%$ erniedrigt werden (Abbildung 3.27 A). Im β -AR-Bindungsassay konnte eine entsprechende Verminderung der β -Adrenozeptordichte um etwa 73% gezeigt werden (Abbildung 3.27 B).

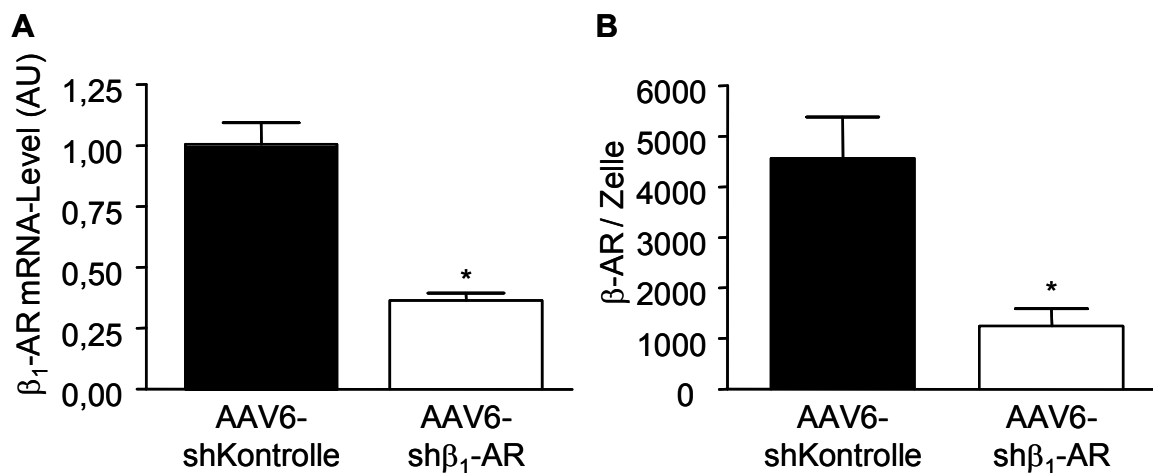


Abbildung 3.27 Analyse des β_1 -AR *Knockdowns* in FBMEs nach AAV6-sh β_1 -AR Applikation. (A) Quantitative RT-PCR Analyse der β_1 -AR mRNA-Konzentration 21 d nach Virustransduktion. Die Normalisierung erfolgte auf CSQ. $n=17$, $*p<0,05$ vs. AAV6-shKontrolle. (B) [3 H]-CGP 12177 Bindungsassay ergab eine Reduktion der β -AR-Dichte um ca. 73% in den behandelten FBMEs. $n=15$, $*p<0,05$ vs. AAV6-shKontrolle.

3.7.3 Funktionelle Analyse der FBMEs nach Virustransduktion

Ziel war es, potentielle Unterschiede in der Kontraktilität der mit AAV6-sh β_1 -AR behandelten FBMEs im Vergleich zu den mit Kontrollvirus behandelten FBMEs bzw. zu den unbehandelten FBMEs zu untersuchen. Besonderes Interesse galt der Stimulation der FBMEs durch den unselektiven β -Adrenozeptoragonisten Isoprenalin. Die Analyse fokussierte sich auf die Messung der Parameter: Frequenz und Kraft. Die Kontraktionsdaten wurden mit zwei verschiedenen video-optischen Meßsystemen erfasst (Kapitel 2.3).

3.7.3.1 Funktionelle Analyse der FBMEs (video-optisches Meßsystem)

3.7.3.1.1 Grundcharakterisierung

Die Entwicklung der FBMEs über die Kulturdauer wurde durch die Messungen durch ein video-optisches System (Kapitel 2.3.1) dokumentiert und ist in Abbildung 3.28 dargestellt. Die FBMEs wurden zwischen Tag 6 und 18 jeden zweiten Tag, 2 h nach Mediumwechsel, gefilmt. Zum Messzeitpunkt befanden sich die FBMEs in 1,8 mM Calcium-enthaltendem Medium. Unter dieser maximalen Calciumkonzentration wurde die spontane Aktivität der Konstrukte erfasst. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse aus 4 unabhängigen FBME-Serien, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten generiert wurden, zusammengefasst. Pro Serie wurden 3 Gruppen untersucht: (1) nicht behandelte Kontroll-FBMEs, (2) mit Kontrollvirus und (3) mit Virus gegen den β_1 -AR behandelte FBMEs, sodass insgesamt 30 Kontrollen, 27 AAV6-shKontrollen und 32 AAV6-sh β_1 ausgewertet wurden. Die Kraft variierte in Abhängigkeit vom Entwicklungsstand, Serie und Gruppe zwischen 0,05 und 0,30 mN. Ab Tag 8 bis Tag 18 entwickelten die AAV6-sh β_1 -AR behandelten FBMEs eine höhere Kraft (bzw. FS) als die entsprechenden Kontrollen (Abbildung 3.28 A, B).

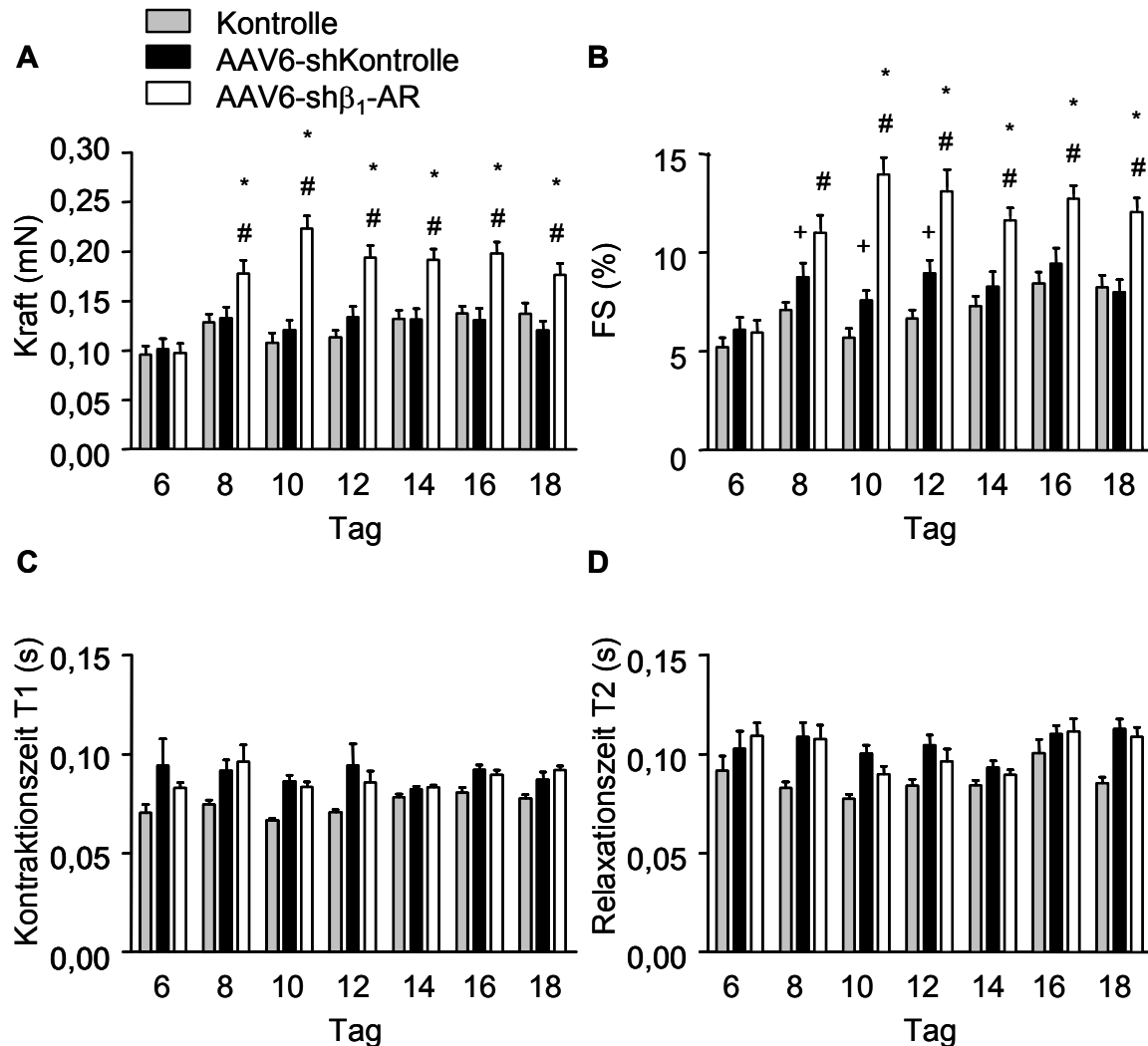


Abbildung 3.28 Entwicklung der FBMEs zwischen Tag 6 und 18. Die spontane Aktivität von 4 FBME-Serien mit den jeweiligen Gruppen (Kontrolle, AAV6-shKontrolle, AAV6-shβ₁-AR) wurde jeden zweiten Tag aufgezeichnet. (A) Kraft, (B) Flächenverkürzung FS, (C) Kontraktionszeit T1 und (D) Relaxationszeit T2 wurden gemittelt und verglichen. Kontrolle (n=13-30); AAV6-shKontrolle (n=12-27); AAV6-shβ₁-AR (n=16-32). *p<0,05 AAV6-shβ₁-AR vs. AAV6-shKontrolle, #p<0,05 AAV6-shβ₁-AR vs. Kontrolle, +p<0,05 AAV6-shKontrolle vs. Kontrolle.

So zeigte die Gruppe AAV6-shβ₁-AR an Tag 14 durchschnittlich eine Kraft von $0,19 \pm 0,01$ mN gegenüber der Kraft von $0,13 \pm 0,01$ mN der beiden Kontrollen (Abbildung 3.29 A). Die Darstellung der Flächenverkürzungsfraction (FS) entspricht der Kontraktionskraft (Abbildung 3.28 B). Bei der Berechnung der FS wurde die Verkürzung während der Kontraktion in Relation zur Konstruktgröße gesetzt, wodurch der Einfluss der Größe minimiert werden konnte. Keine Unterschiede zeigten sich in der Frequenz mit der die Konstrukte der 3 Gruppen

(87, 88, 96 Schläge pro Minute) kontrahierten (Abbildung 3.29 B). Sowohl die Kontraktionszeit T1 (Zeit bis zum Peak), als auch die Relaxationszeit T2 (Zeit vom Peak bis 80% Relaxation) waren zu verschiedenen Zeitpunkten in den mit Virus behandelten FBMEs minimal gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abbildung 3.28 C, D) erhöht. An Tag 14 betrug die Kontraktionszeit der AAV6-sh β_1 -AR-Gruppe im Mittel 83 ± 1 ms im Vergleich zur Kontroll-Gruppe mit 78 ± 2 ms (Abbildung 3.29 C). Die Relaxationszeit war hingegen unverändert, lediglich T2 der mit Kontrollvirus behandelten FBMEs war zu den Kontrollen leicht erhöht 93 ± 3 vs. 84 ± 3 ms (Abbildung 3.29 C). Der Durchmesser der Konstrukte maß an Tag 14 im Durchschnitt 1,3 mm. Die mit Kontrollvirus behandelten FBMEs waren mit $2,5 \pm 0,1$ mm insgesamt kürzer als die Kontrollen ($3,2 \pm 0,1$ mm) und die FBMEs der AAV6-sh β_1 -AR-Gruppe ($2,9 \pm 0,1$ mm). Diese minimalen Abweichungen der Kontraktions- bzw. Relaxationszeiten und der FBME-Dimensionen sind wahrscheinlich auf die Virusbehandlung per se zurückzuführen und könnten einen geringen Grad an Virustoxizität beschreiben bzw. auf die starke Expression von GFP zurückzuführen sein. Viel unerwarteter dagegen ist die Kraftsteigerung in den FBMEs, in denen der β_1 -AR herunterreguliert wurde, im Vergleich zur Kontrollvirus-Gruppe und den nicht mit Virus transduzierten FBMEs jeweils um 45%.

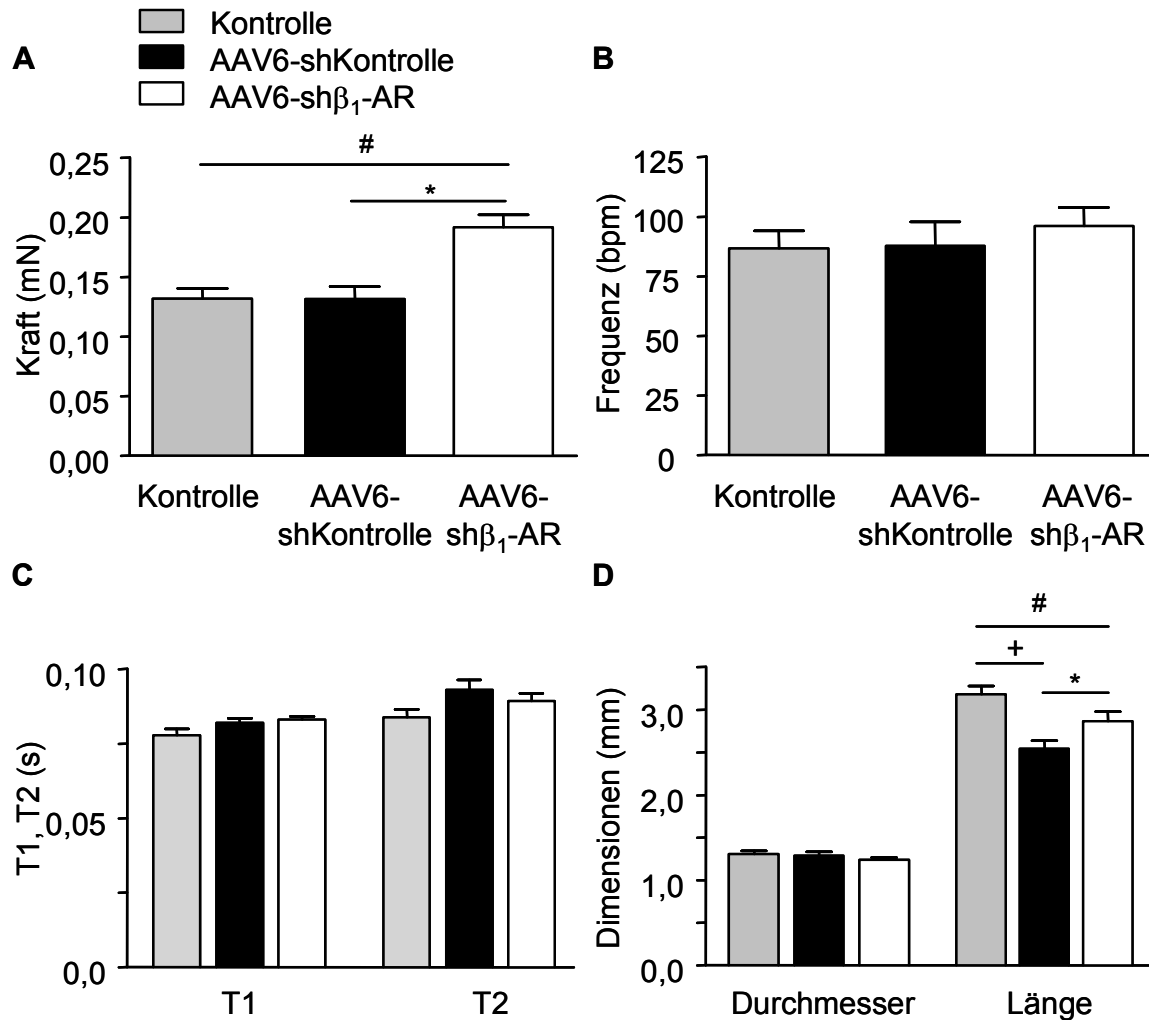


Abbildung 3.29 Vergleich der FBMEs nach Virus-Applikation an Tag 14 anhand der Kraft (A), der Frequenz (B), T1 und T2 (C), FBME-Durchmesser und Länge (D). Kontrolle (n=28-30); AAV6-shKontrolle (n=24-27); AAV6-shβ₁-AR (n=29-32). *p<0,05 AAV6-shβ₁-AR vs. AAV6-shKontrolle, #p<0,05 AAV6-shβ₁-AR vs. Kontrolle, +p<0,05 AAV6-shKontrolle vs. Kontrolle.

3.7.3.1.2 Pharmakologische Ansprechbarkeit

In einem Nebenexperiment wurden die Frequenz- und Kraftentwicklung in zwei voneinander unabhängigen Serien von Kontroll-FBMEs bei minimaler (0,2 mM) und maximaler (1,8 mM) Calciumkonzentration (Abbildung 3.30) sowie die Stimulation mit steigender Isoprenalinkonzentration bei 0,2 mM Calcium untersucht (Abbildung 3.31). Um das im Kulturmedium enthaltene Calcium auszuwaschen, wurden die FBMEs für mindestens 1 h in Medium (0,2 mM Calcium) äquilibriert. In Abbildung 3.30 ist die Zunahme der Frequenz (von 18±2

auf 30 ± 4 Schläge pro Minute) und der Kraft (von $0,05 \pm 0,01$ auf $0,08 \pm 0,01$ mN) unter steigender Calciumkonzentration dargestellt.

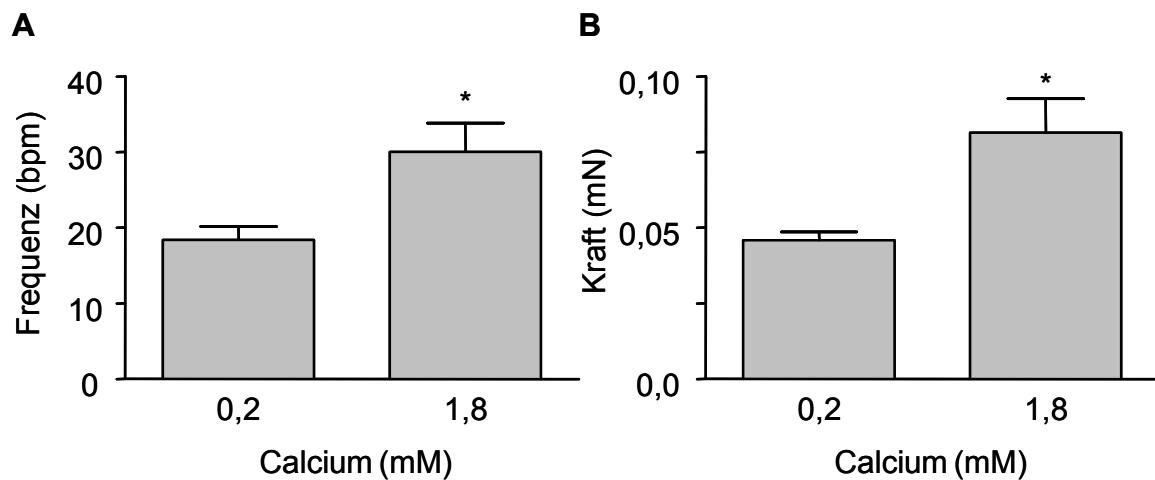


Abbildung 3.30 Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die Frequenz (A) und die Kraft (B) der Kontroll-FBMEs. $n=7$, $*p<0,05$ von 0,2 mM vs. 1,8 mM Calcium.

Mit steigender Isoprenalinkonzentration kam es zu einer deutlichen und konzentrationsabhängigen Frequenzzunahme, wobei unter $3 \mu\text{M}$ Isoprenalin die maximale Frequenz erreicht wurde (Abbildung 3.31 A). Dagegen konnte keine Zunahme der Kraft beobachtet werden (Abbildung 3.31 B). Die Frequenzzunahme durch die Stimulation mit Isoprenalin konnte in gleichem Maße in den mit Virus behandelten FBMEs gezeigt werden (Abbildung 3.31 C). Anhand dessen wurde deutlich, dass die Frequenz nicht der geeignete Parameter war, um Unterschiede zwischen den FBME-Gruppen darzustellen. Weiterhin war es nicht möglich, mittels der Kraftmessung, unter den Messbedingungen des video-optischen Systems, einen funktionellen Unterschied durch die Stimulation mit Isoprenalin darzustellen, da die Messungen weder unter Frequenzstimulation noch unter Perfusion erfolgen konnten.

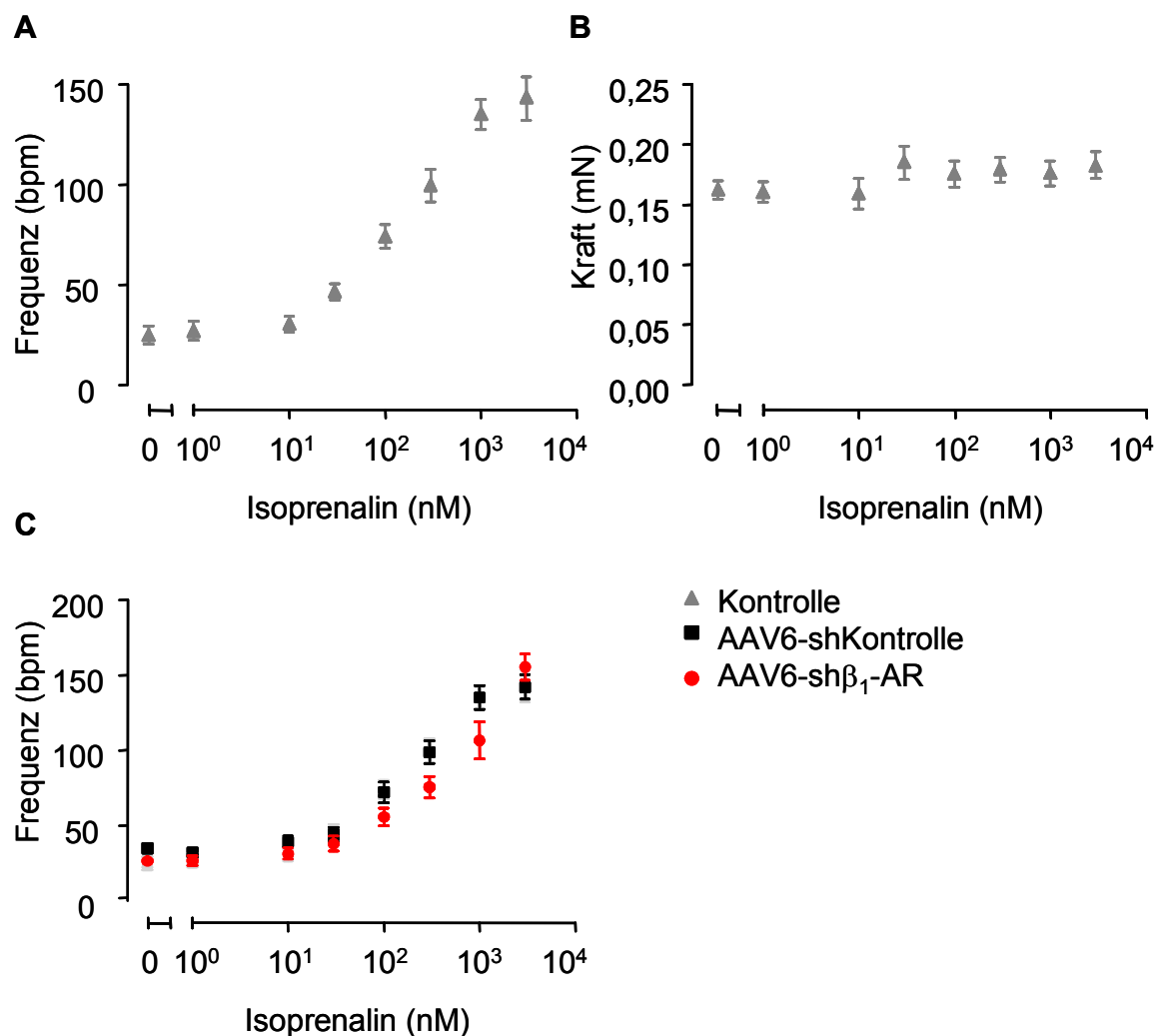


Abbildung 3.31 Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungskurve. Funktionelle Analyse der Frequenz (A, C) und der Kraft (B) der Kontroll-FBMEs (n=14), AAV6-shKontrolle (n=11), AAV6-shβ₁-AR (n=9).

3.7.3.2 Funktionelle Analyse der FBMEs mittels *IonOptix*-System

3.7.3.2.1 Grundcharakterisierung

Die Limitationen der video-optischen Messmethode sollten durch die Analyse der Kontraktilität der FBMEs mit der modifizierten *IonOptix*-Messtechnik (Kapitel 2.3.2) umgangen werden. Zunächst wurde das Verhalten der FBMEs auf steigende extrazelluläre Calciumkonzentrationen in einem Vorversuch analysiert. Dafür wurde jedes einzelne FBME (Kontrolle) mit Tyrodelösung perfundiert und mit einer Frequenz von 2 Hz (30 V) stimuliert. Die Auswaschphase des Calciums mit calciumfreier Tyrode betrug pro FBME zwischen 15-30 min. Die Äquilibration erfolgte bei 0,02 mM Calcium, danach wurde schrittweise die

Calciumkonzentration alle 10 min erhöht (0,05, 0,07, 0,1, 0,2, 0,5, 0,7, 1,0, 1,6 mM; Abbildung 3.32).

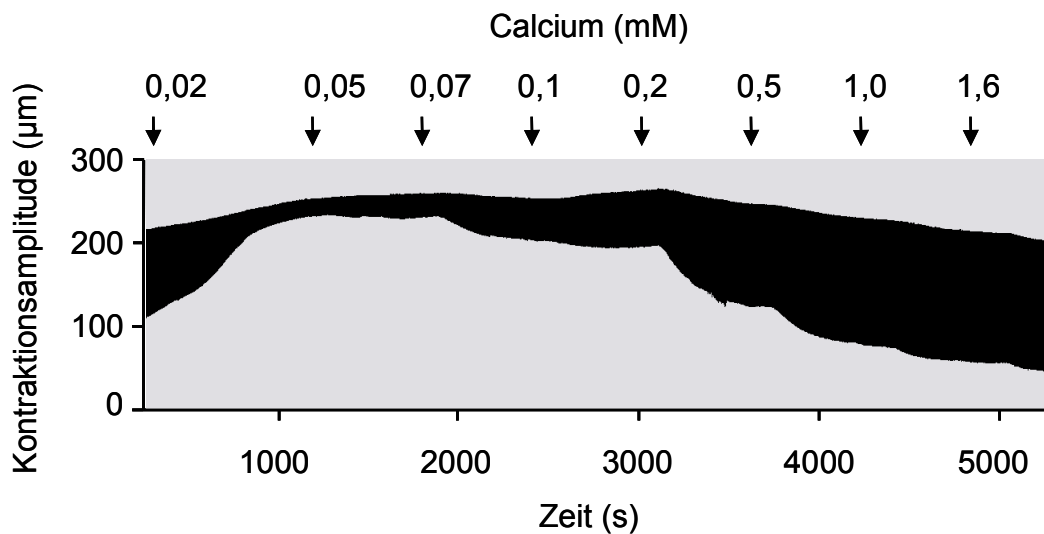


Abbildung 3.32 Originalaufnahme einer Calcium-Konzentrations-Wirkungskurve eines Kontroll-FBMEs.

Die FS (%) erhöhte sich dadurch von 0,6% (0,02 mM Calcium) auf 5,4% (1,6 mM Calcium), woraus sich rechnerisch eine EC_{50} für Calcium von 0,09 mM ergab (Abbildung 3.33).

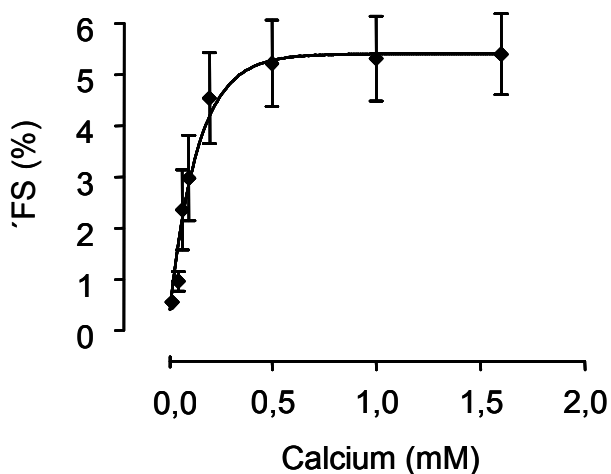


Abbildung 3.33 Einfluss der extrazellulären Calciumkonzentration auf die FS von nicht behandelten FBMEs (n=4).

Im nächsten Versuch wurde die Stimulation mit einer maximal effektiven Isoprenalinkonzentration (100 nM) bei 0,1 mM Calcium durchgeführt, wodurch die FS relativ um 80% von $3,2 \pm 0,3\%$ auf $5,3 \pm 0,4\%$ anstieg (Abbildung 3.34 A). Zur Vervollständigung der Beschreibung der kontraktile Eigenschaften sollte hier der

Effekt der β -adrenergen Stimulation durch ansteigende Konzentrationen von Isoprenalin (1-300 nM) an zwei Kontroll-FBMEs exemplarisch überprüft werden. Die Zugabe von Isoprenalin erfolgte bei 0,1 mM Calcium schrittweise in einem zeitlichen Abstand von 10 min. Die FS konnte maximal durch 300 nM Isoprenalin um 86% von $2,4 \pm 0,4$ auf $4,5 \pm 0,7\%$ vergrößert werden (Abbildung 3.34 B), woraus sich eine EC_{50} von etwa 2,7 nM ergab.

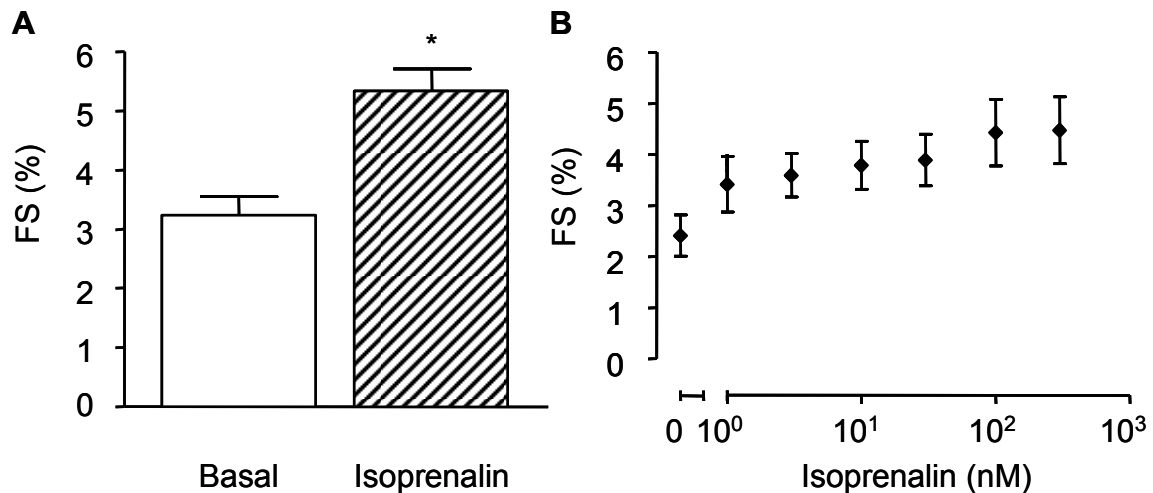


Abbildung 3.34 Stimulation von Kontroll-FBMEs mit Isoprenalin. (A) Effekt von 100 nM Isoprenalin im Vergleich zur Basalbedingung von 0,1 mM Calcium (2 Hz) auf die FS. $n=23$, $*p<0,05$ Isoprenalin vs. Basal. (B) Isoprenalin-Konzentrations-Wirkungskurve unter 0,1 mM Calcium und elektrischer Stimulation mit 2 Hz.

3.7.3.2.2 Charakterisierung des β_1 -AR *Knockdowns* in FBMEs

Das allgemeine Messprotokoll wurde in Kapitel 2.3.2.1 beschrieben. In Abbildung 3.35 sind die kontraktile Eigenschaften der 3 FBME-Gruppen hinsichtlich ihrer Ansprechbarkeit gegenüber Calcium (0,05, 0,1 und 1,6 mM) dargestellt. Alle Gruppen reagierten konzentrationsabhängig mit einer Zunahme der FS, wobei sich nur unter der maximalen Calciumkonzentration signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zeigten. Die FS der Kontrollen stieg von $1,4 \pm 0,2$ (0,05 mM Calcium) über $3,2 \pm 0,3$ (0,1 mM Calcium) bis auf $6,9 \pm 0,4\%$ (1,6 mM Calcium), die der AAV6-shKontrollen von $2,1 \pm 0,2$ auf $4,2 \pm 0,3$ bis $7,6 \pm 0,4\%$ und die der AAV6-sh β_1 -AR-Gruppe von $1,5 \pm 0,2$ auf $3,6 \pm 0,2$ bis $9,3 \pm 0,4\%$. Die FBMEs der AAV6-sh β_1 -AR-Gruppe zeigten unter maximaler Calciumkonzentration gegenüber der Kontrolle eine um $33 \pm 5\%$ und gegenüber der Viruskontrolle eine um $22 \pm 5\%$

erhöhte FS. Diese Darstellung der FS entspricht der video-optischen Kraftmessung an Tag 18 (Abbildung 3.28 A).

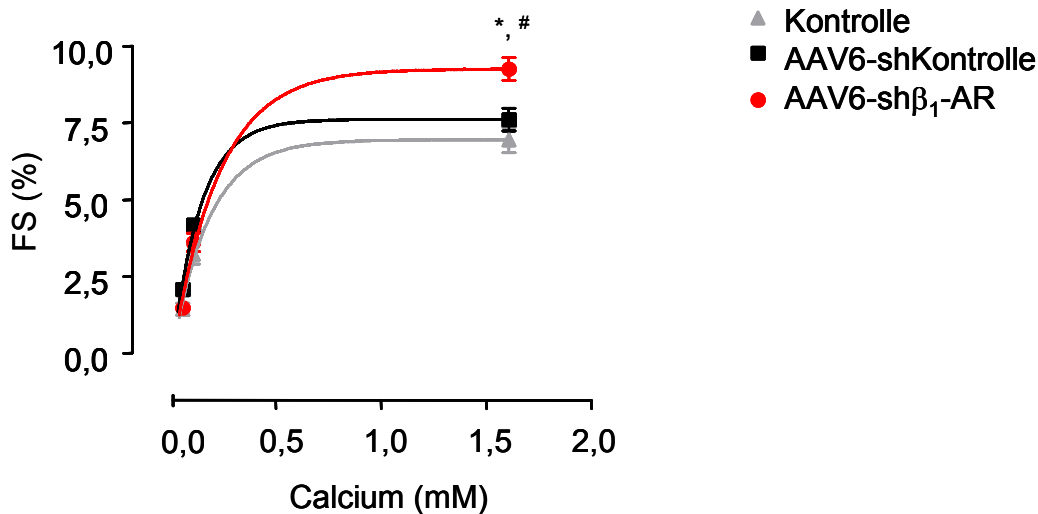


Abbildung 3.35 Funktionelle Analyse der FBMEs (Kontrolle, AAV6-shKontrolle, AAV6-sh β_1 -AR) unter verschiedenen Calciumkonzentrationen (2 Hz). Vergleich der FS der Kontrollen (n=20), der AAV6-shKontrollen (n=26) und AAV6-sh β_1 -AR (n=32). *p<0,05 AAV6-sh β_1 -AR vs. AAV6-shKontrolle, #p<0,05 AAV6-sh β_1 -AR vs. Kontrolle.

Die Stimulation mit der maximal effektiven Isoprenalinkonzentration (100 nM) bei 0,1 mM Calcium führte in allen 3 Gruppen zu einer Verstärkung der Kontraktilität, welche sich in der Zunahme der FS (Abbildung 3.36) widerspiegelte. Die relative Differenz der FS zum jeweiligen Basalwert betrug $80 \pm 10\%$ (Kontrolle), $36 \pm 4\%$ (AAV6-shKontrolle) und $120 \pm 20\%$ (AAV6-sh β_1 -AR). Die Zunahme der Kontraktilität der Viruskontrolle unter Isoprenalin war also ebenfalls signifikant geringer als in den beiden anderen Gruppen.

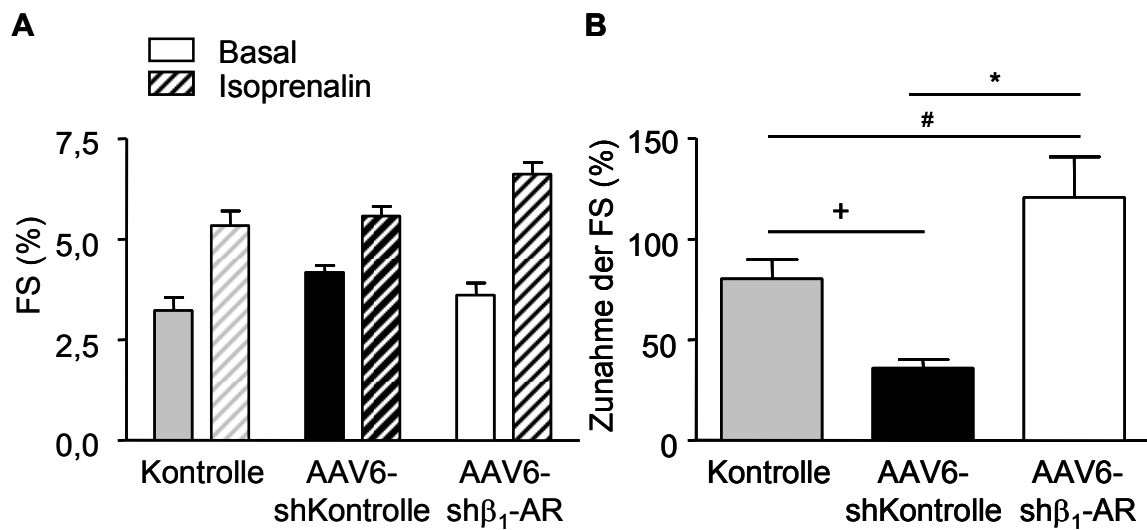


Abbildung 3.36 Analyse des Isoprenalineffektes (100 nM) auf die FS der Kontroll-FBMEs im Vergleich zu den mit Virus behandelten FBMEs (AAV6-shKontrolle, AAV6-shβ₁-AR). Kontrolle (n=20); AAV6-shKontrolle (n=26); AAV6-shβ₁-AR (n=32). *p<0,05 AAV6-shβ₁-AR vs. AAV6-shKontrolle, +p<0,05 AAV6-shKontrolle vs. Kontrolle, #p<0,05 AAV6-shβ₁-AR vs. Kontrolle.

Zusammenfassend konnten die Ergebnisse der video-optischen Messungen durch die *IonOptix*-Analyse bestätigt werden. Entgegen den Erwartungen war die Kontraktilität in den Konstrukten mit β₁-AR-Downregulation im Vergleich zu den Konstrukten, die mit dem Kontrollvirus behandelt wurden bzw. zu den unbehandelten Kontrollen sowohl unter basalen Bedingungen (unstimuliert) als auch unter β-adrenerger Stimulation mit Isoprenalin erhöht. So war die basale Kraft in diesen FBMEs an Tag 14 gegenüber der Viruskontrolle und Kontrolle um 45% erhöht. Die FS unter 1,6 mM Calcium in denselben FBMEs war um 22% bzw. 33% gegenüber den Kontrollen gesteigert. Durch Stimulation mit Isoprenalin kam es zu einer relativen Zunahme der FS in Bezug zum Basalwert um 120% (AAV6-shβ₁-AR), um 36% (AAV6-shKontrolle) und um 80% (Kontrolle). Des Weiteren wurde ein gewisser Virus-vermittelter Effekt erkennbar. So unterschieden sich die mit Kontrollvirus behandelten FBMEs sichtbar in ihrer Größe von den unbehandelten Kontrollen und den mit AAV6-shβ₁-AR behandelten FBMEs.

3.7.4 Genexpressionsanalyse der FBMEs mittels DNA-Mikroarray

Um einen Hinweis auf die Ursache der verbesserten Kontraktilität der AAV6-shβ₁-AR FBMEs zu erhalten, wurde eine Genexpressionsanalyse durchgeführt (Kapitel

2.7.5). Die Hauptergebnisse des Arrays sind in Abbildung 3.37 in Form von Scatter Plots dargestellt, wobei jeweils die durchschnittlichen Signalintensitäten aller untersuchten Transkripte zwischen den verschiedenen FBME-Gruppen (A: AAV6-shKontrolle vs. Kontrolle, B: AAV6-sh β_1 -AR vs. Kontrolle, C: AAV6-sh β_1 -AR vs. AAV6-shKontrolle) gegeneinander aufgetragen wurden (jeweils n=6). Hierdurch wurde eine relativ gleichmäßige Verteilung der Signalintensitäten und somit ein ähnliches Genexpressionsprofil in allen Gruppen erkennbar.

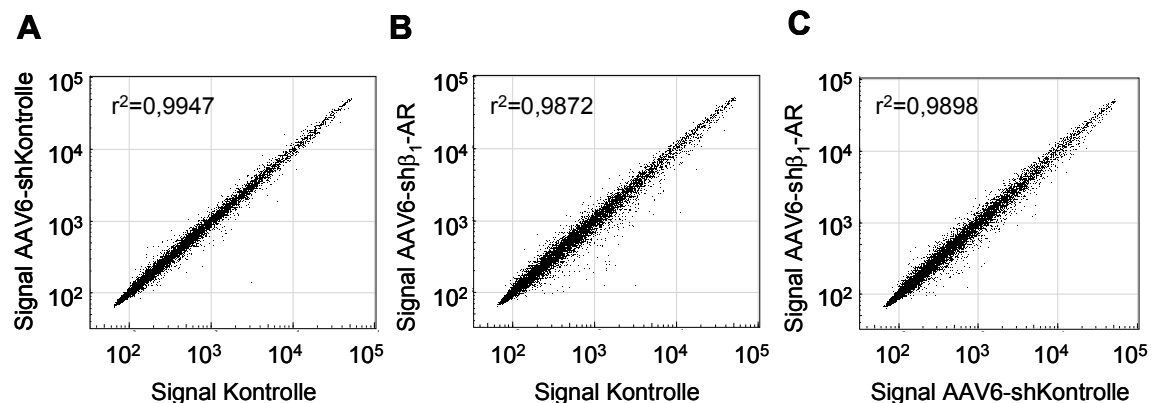


Abbildung 3.37 Scatter Plots der Mikroarray-Analyse: durchschnittliche Signalintensitäten der detektierten Transkripte in der AAV6-shKontrolle (A) oder in der AAV6-sh β_1 -AR (B) geplottet gegen die der unbehandelten Kontrolle bzw. der AAV6-shKontrolle (C), je n=6.

Differentiell regulierte Gene wurden über die X-fache Expressionsänderung (FC) im Vergleich der 3 Gruppen (A, B und C) identifiziert, wobei der Grenzwert bei $0,66 \geq FC \geq 1,5$ lag (Kapitel 2.10.1). Demnach unterschieden sich die beiden Kontrollgruppen kaum voneinander (Tabelle 3.1, Spalte A), wohingegen der Vergleich AAV6-sh β_1 -AR gegenüber der Kontrolle (B) 331 differentiell regulierte, davon 234 herunter- bzw. 97 hochregulierte Gene aufzeigte sowie der Vergleich gegenüber der AAV6-shKontrolle (C) insgesamt 286 differentiell regulierte, davon 172 herunter- bzw. 114 hochregulierte Gene erkennen ließ. Da es sich bei der Viruskontrolle um die adäquate Kontrolle zu den mit AAV6-sh β_1 -AR behandelten FBMEs handelte, war vor allem dieser Vergleich von Bedeutung. In den Tabellen 11.14 und 11.15 im Anhang sind jeweils die am stärksten herunter- bzw. hochregulierten Gene aufgelistet. So wurden zum einen z. B. der *Tissue factor pathway inhibitor 2* (FC=0,24), *Regulator of G-protein signaling 2* (FC=0,41), *Alpha1 skeletal muscle actin* (FC=0,47) und *Natriuretic peptide precursor A*

(FC=0,49) vermindert und zum anderen z. B. *Angiopoetin 2* (FC=2,76), *Iroquois homeobox 5* (FC=2,36), *Sodium channel beta 4 subunit* (FC=2,05), *Glycerol-3-phosphate-dehydrogenase 1* (FC=1,96) und *Alpha-1B adrenergic receptor* (FC=1,92) verstärkt exprimiert vorgefunden. Diese Ergebnisse erlauben naturgemäß keine eindeutigen Rückschlüsse zur Erklärung der Kontraktilitätssteigerung. Eine genauere Interpretation dieser Daten erfolgt in der Diskussion im Kapitel 4.3.3.2.

Tabelle 3.1 Übersicht über die Anzahl der differentiell hoch- bzw. herunterregulierten Gene im Vergleich: (A) AAV6-shKontrolle vs. Kontrolle, (B) AAV6-sh β_1 -AR vs. Kontrolle und (C) AAV6-sh β_1 -AR vs. AAV6-shKontrolle.

	A	B	C
Anzahl aller differentiell regulierten Gene	19	331	286
Anzahl herunterregulierter Gene (FC $\leq$ 0,66)	10	234	172
Anzahl hochregulierter Gene (FC $\geq$ 1,5)	9	97	114

3.8 *In vivo* Gentransfer von rAAV9

3.8.1 Effizienz und Herzselektivität von AAV9-CMV-MLC₂₆₀-eGFP

Der für das eGFP kodierende rAAV9-Vektor (AAV9-CMV-MLC₂₆₀-eGFP) wurde bereits in Heidelberg generiert und erfolgreich auf Effizienz und kardiale Selektivität getestet (Müller et al. 2006). Der Vektor (Abbildung 3.38 A) weist durch die Verwendung eines gewebespezifischen Promotors, welcher sich aus einem stark verkürzten 260 Basen langen *myosin light chain* Promotor (MLC₂₆₀) fusioniert mit einem CMV-Verstärker zusammensetzt, eine erhöhte kardiale Transduktionseffizienz auf. In einem Vorversuch sollte dies an unserem Mäusestamm mit einem C57BL/6 Hintergrund bestätigt werden. Die i. v. Injektion der rAAV9-Suspension erfolgte in die laterale Schwanzvene der Mäuse (Kapitel 2.5.3.2). Es wurden (1) NaCl, (2) rAAV9-Suspension mit $1 \cdot 10^{11}$ Viruspartikeln und (3) mit $2 \cdot 10^{11}$ Viruspartikeln injiziert. Nach 3 Wochen wurden die Tiere durch Dekapitation in CO₂-Narkose getötet und Herz, Lunge, Skelettmuskel, Leber und Niere heraus präpariert, in 4% PFA fixiert und Gefrierschnitte angefertigt. Die Transduktionseffizienz wurde anhand der GFP-Epifluoreszenz in allen Organen mittels konfokaler Lasermikroskopie untersucht. Die Anregung des Fluorophors

erfolgte bei einer Wellenlänge von 488 nm. Um die relativ starke Eigenfluoreszenz des Gewebes zu minimieren wurde ein Hintergrundfilter (LP: ab 630 nm) gleichzeitig mit dem GFP-Filter (BP: 505-530 nm) verwendet (Abbildung 3.38 B). Durch die Überlagerung beider Bilder erschienen GFP-positive Zellen grün. Mit der Injektion von $2 \cdot 10^{11}$ Viruspartikeln rAAV9-GFP wurde das Herz vielversprechend transmural transduziert (Abbildung 3.38). In den anderen Organen konnte keine GFP-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.39).

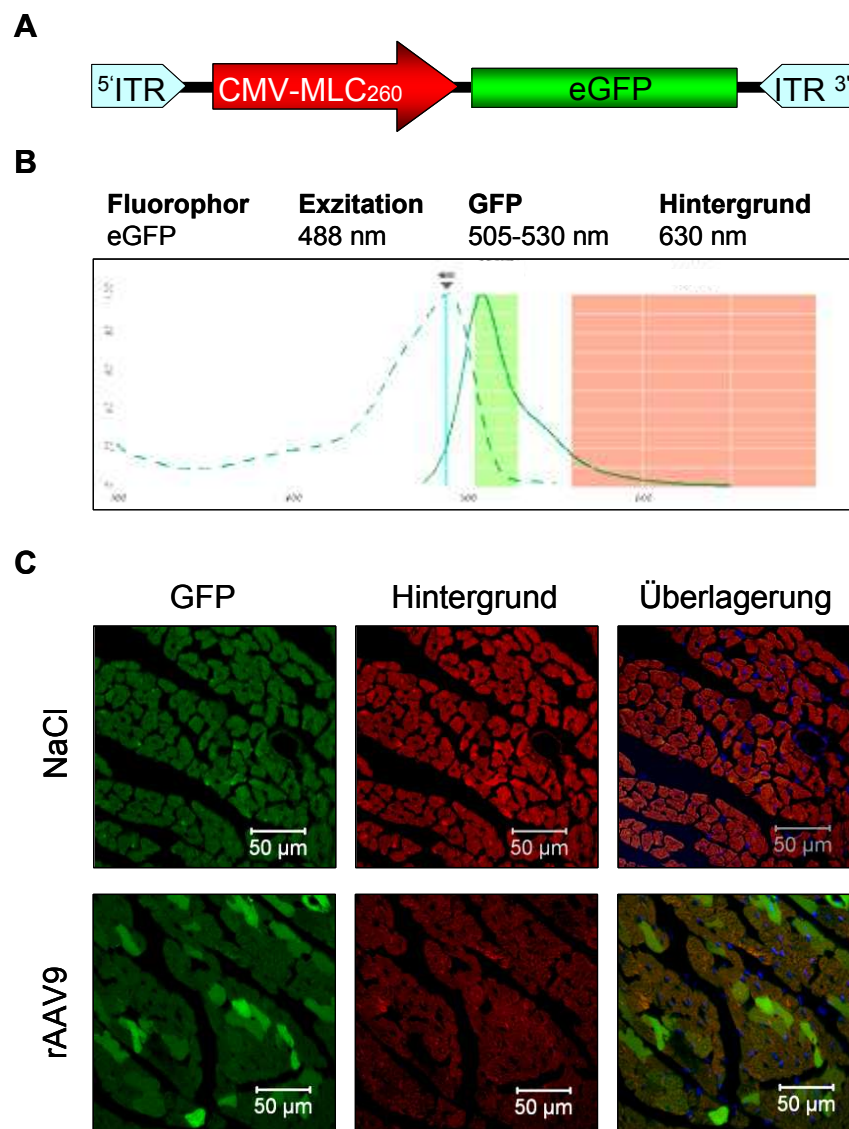


Abbildung 3.38 rAAV-Transduktionseffizienz *in vivo*. (A) Rekombinanter AAV9-Vektor zur Expression von eGFP unter Kontrolle eines CMV-verstärkten MLC-Promotors (rAAV9-CMV-MLC₂₆₀-eGFP). (B) Anregung und Emission des Fluorophors eGFP: GFP-Filter (505-530 nm), Hintergrundfilter (ab 630 nm). (C) rAAV9-CMV-MLC₂₆₀-eGFP ($2 \cdot 10^{11}$ Vg) oder NaCl wurden C57/BL6 Mäusen appliziert. 3 Wochen nach Injektion erfolgte die Bestimmung der kardialen

Transduktionseffizienz des viralen Vektors mittels Fluoreszenzmikroskopie (konfokales Lasermikroskop, 40-fache Vergrößerung) an Gefrierschnitten. Maßstab entspricht 50 µm.

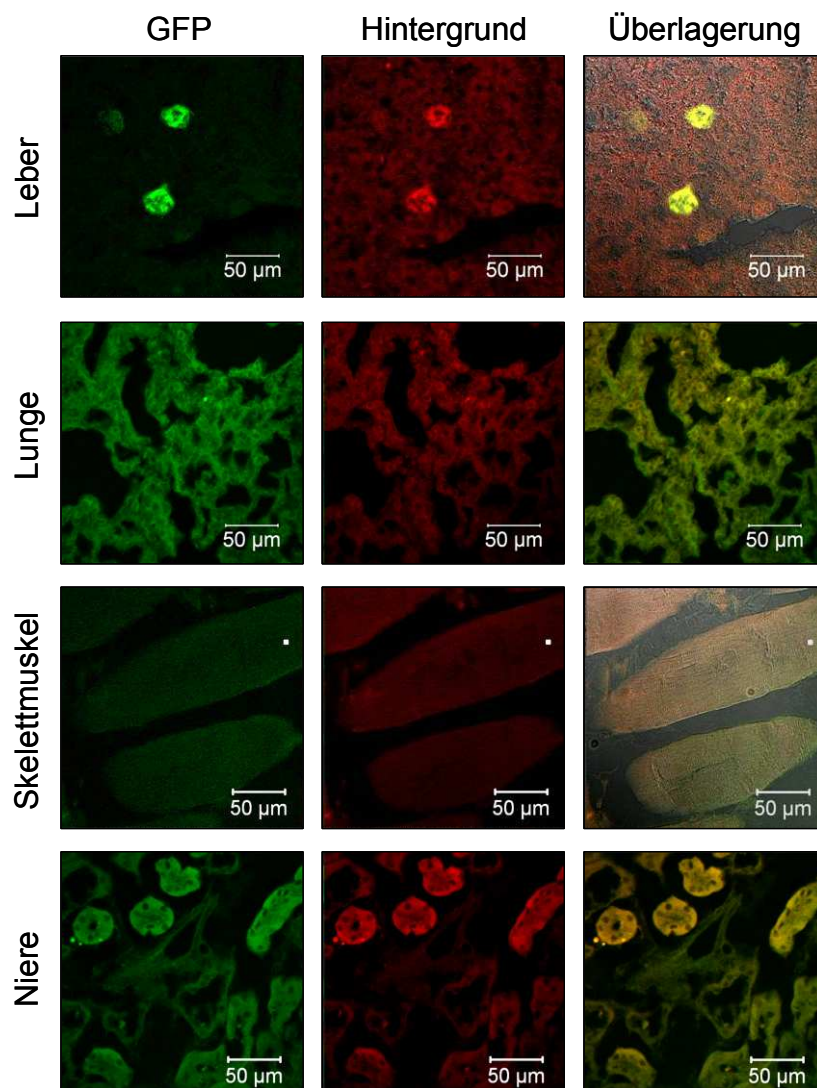


Abbildung 3.39 Histologische Analyse der Organe nach Virusapplikation (rAAV9-CMV-MLC₂₆₀-eGFP). 3 Wochen nach Injektion erfolgte die Bestimmung der Transduktion von verschiedenen Organen (Leber, Lunge, Skelettmuskel, Niere) mittels Fluoreszenzmikroskopie (konfokales Lasermikroskop, 40-fache Vergrößerung) an Gefrierschnitten. Maßstab entspricht 50 µm.

3.8.2 *In vivo* Gentransfer von rAAV9-H1-shRNA-CMV-eGFP

Für den Gentransfer wurden C57/BL6 Mäuse mit den folgenden rAAV9-shRNA-Vektoren *via* Schwanzveneninjektion behandelt:

<u>NaCl-Kontrolle</u>	<u>AAV9-shKontrolle</u>	<u>AAV9-shI-1</u>	<u>AAV9-shβ_1-AR</u>
1	1 (10^{11} Vg)	1 ($5 \cdot 10^{11}$ Vg)	1 (10^{12} Vg)
2	2 (10^{11} Vg)	2 ($5 \cdot 10^{11}$ Vg)	2 (10^{12} Vg)
3	3 (10^{11} Vg)	3 ($2,3 \cdot 10^{11}$ Vg)	3 (10^{12} Vg)
4	5 (10^{12} Vg)	4 ($3,6 \cdot 10^{11}$ Vg)	4 (10^{12} Vg)
5	6 (10^{12} Vg)		5 (10^{12} Vg)
6	7 (10^{12} Vg)		6 (10^{12} Vg)
7	8 (10^{12} Vg)		
8	9 (10^{12} Vg)		
9	10 (10^{12} Vg)		

6 Wochen nach Virusapplikation wurden die Tiere echokardiographisch untersucht und anschließend Herzgewicht/Körpergewicht ermittelt und die Herzen histologisch und molekularbiologisch analysiert.

3.8.2.1 Transduktionseffizienz der rAAV9-shRNA-Vektoren *in vivo*

6 Wochen nach Injektion von 10^{12} Vg (AAV9-sh β_1 -AR) wurden die GFP-Proteinmengen im Western Blot und die GFP mRNA-Mengen mittels qRT-PCR in den verschiedenen Organen untersucht. Der Gentransfer sowie die Probenaufbereitung erfolgten, wie zuvor in den entsprechenden Kapiteln beschrieben. Für die Western Blot Analyse wurden jeweils 30 μ g Protein verwendet. Die GFP-Proteinexpression konnte qualitativ im Herzen, in der Leber und im Skelettmuskel bestimmt (Abbildung 3.40), als Ladekontrolle wurde GAPDH mitgeführt.

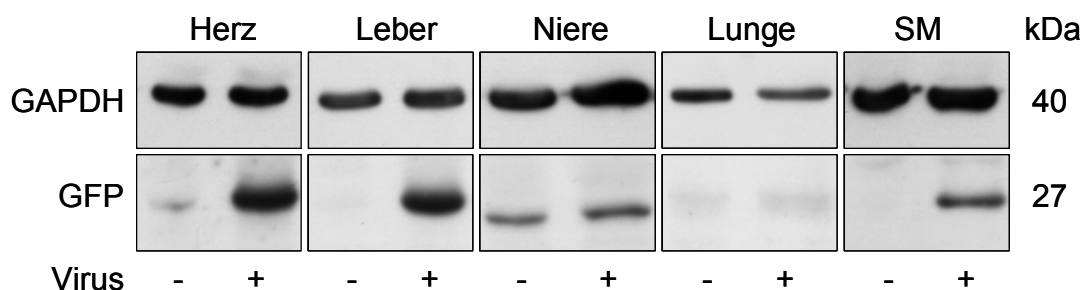


Abbildung 3.40 Analyse der GFP-Proteinmengen in verschiedenen Organen im behandelten (AAV9-sh β_1 -AR/ + Virus) und im unbehandelten (NaCl/ - Virus) Tier bezogen auf GAPDH. SM, Skelettmuskel.

3.8.2.2 Kardiale Transduktion durch rAAV9-shRNA-Vektoren

Anhand der relativen Quantifizierung der GFP mRNA- (Abbildung 3.41 B und C) und Proteinmengen (Abbildung 3.41 A) in den Herzen nach Virusapplikation konnte in Abhängigkeit der injizierten Vektorgenome von AAV9-shKontrolle (10^{11} Vg), AAV9-shI-1 ($5 \cdot 10^{11}$ Vg) und AAV9-sh β_1 -AR (10^{12} Vg) eine unterschiedlich starke kardiale Virustransduktion nachgewiesen werden.

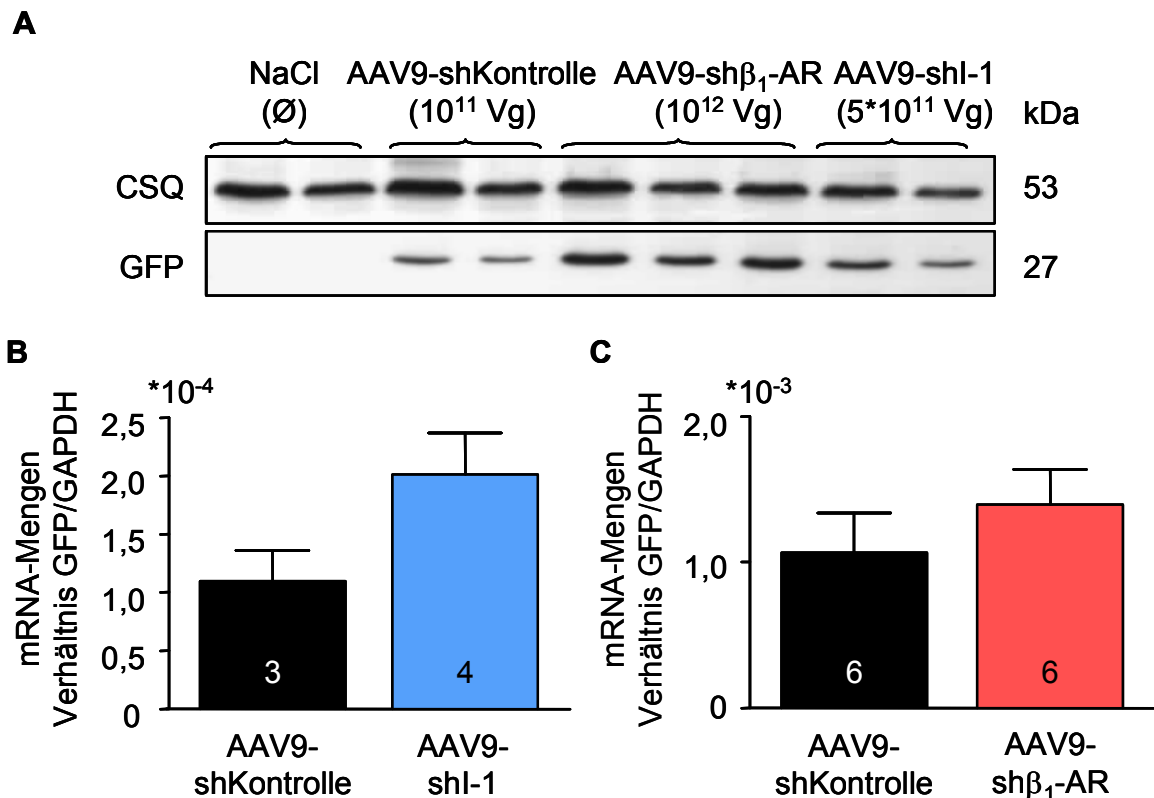


Abbildung 3.41 Analyse der kardialen Transduktion mit rAAV9-shRNA-Vektoren anhand der GFP-Expression. (A) Western Blot-Auszug: Analyse der GFP-Proteinmenge, als Ladekontrolle diente CSQ. (B) Verhältnisse der GFP/GAPDH mRNA-Konzentrationen nach Virusapplikation ermittelt durch qRT-PCR Analyse.

Weiterhin erfolgte eine histologische Beurteilung der Transduktionseffizienz, indem Gefrierschnitte der Herzen fluoreszenzmikroskopisch untersucht wurden. Abbildung 3.42 zeigt im Vergleich die GFP-Epifluoreszenzanalyse der nicht behandelten Kontrolle (NaCl) und der mit Virus behandelten Tiere. Dabei zeigte sich eine heterogene aber transmurale eGFP-Epifluoreszenz in den AAV9-shKontroll- und AAV9-shI-1 Herzen. Hierbei schienen bei genauerer Betrachtung bevorzugt die Kardiomyozyten transduziert worden zu sein.

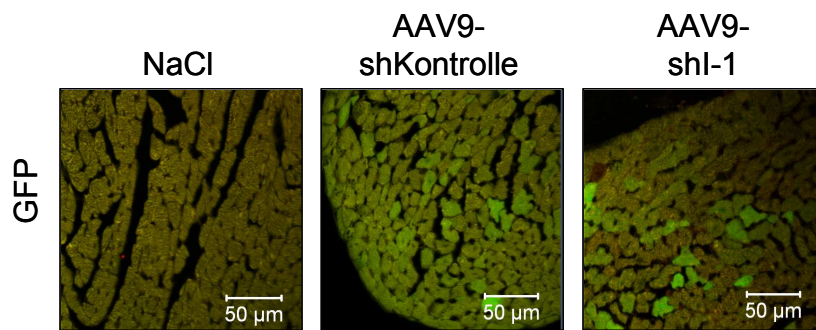


Abbildung 3.42 Kardiale Transduktion nach Applikation der rAAV9-shRNA-Vektoren. Im Vergleich GFP-Epifluoreszenz in der nicht behandelten Kontrolle (NaCl) sowie in mit Virus behandelten Tieren AAV9-shKontrolle (10^{11} Vg) und AAV9-shI-1 ($5 \cdot 10^{11}$ Vg) 6 Wochen nach Injektion. Gefrierschnitte nach Fixierung mit 4% PFA. Maßstab entspricht 50 µm.

3.8.2.3 Quantitative Analyse der Vektorgenome

Um eine quantitative Einschätzung der kardialen Transduktion vornehmen zu können, wurde die Anzahl der Vektorgenome in Herz und Leber bestimmt. Die Gewinnung der zellulären Gesamt-DNA aus Herz- und Lebergewebe erfolgte wie in Kapitel 2.1.15 beschrieben. Die Analyse der viralen Vektorgenome wurde mittels qRT-PCR durchgeführt. Die Anzahl der Vektorgenome wurde auf die Menge der eingesetzten Gesamt-DNA normalisiert und ergab eine 30-fach stärkere Transduktion der Leber als die des Herzens (1783 ± 196 vs. $59,1 \pm 9$; $n=3$, 7; Abbildung 3.43).

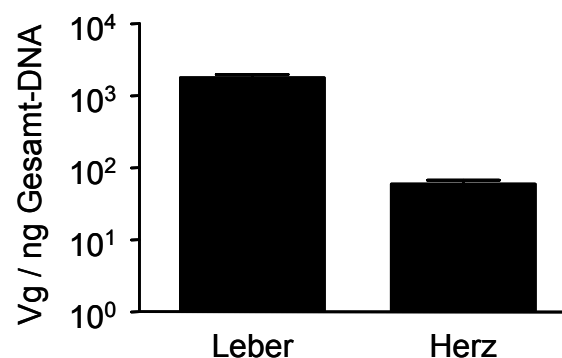


Abbildung 3.43 Bestimmung der Vektor-DNA in Herz und Leber der rAAV9 (10^{12} Vg) behandelten Mäuse. qRT-PCR Analyse der Vektorgenome (Vg) pro ng isolierter Gesamt-DNA, $n=3$.

3.8.2.4 Quantifizierung des Inhibitor-1 und β_1 -AR *Knockdowns* auf mRNA-Ebene

Die qRT-PCR Analyse beider Zielgene zur Quantifizierung des *Knockdowns* in Gesamtherz-Homogenaten ergab, dass die Inhibitor-1 mRNA-Menge durchschnittlich um $34 \pm 4\%$ in den mit AAV9-shI-1 Vektoren behandelten Tieren ($n=4$) im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen AAV9-shKontrolle ($n=3$, $p=0,07$) und NaCl-Kontrolle ($n=4$, $p=0,05$) erniedrigt wurde (Abbildung 3.44 A). Aufgrund der geringen Anzahl von behandelten Tieren war dieser Effekt jedoch nicht statistisch signifikant, sondern muss als Tendenz gewertet werden. Im Gegensatz dazu war in den mit AAV9-sh β_1 -AR-Vektoren behandelten Tieren ($n=6$) trotz höherer applizierter Virusmengen (10^{12} Vg pro Tier) kein *Knockdown* der β_1 -AR mRNA nachweisbar (Abbildung 3.44 B).

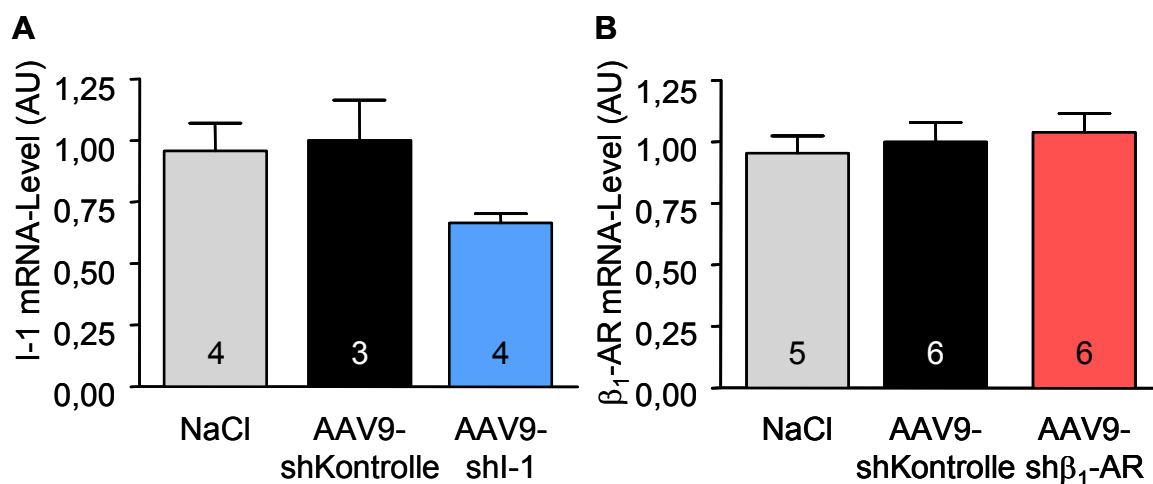


Abbildung 3.44 qRT-PCR Analyse der Inhibitor-1 mRNA (A) und der β_1 -AR mRNA (B) normalisiert auf GAPDH.

3.8.2.4.1 Fehlende Downregulation des β_1 -AR

Aufgrund des fehlenden β_1 -AR *Knockdowns in vivo* wurden nachträglich und analog zu den nRKM (Kapitel 3.6.2) neonatale Mäusekardiomyozyten (nMKM) mit steigenden Virusmengen von AAV6-sh β_1 -AR behandelt. Dabei zeigte sich, dass trotz der extrem guten Transduktionseffizienz (Abbildung 3.45: GFP-Epifluoreszenz, Abbildung 3.46: GFP-mRNA) durch die Verwendung von bis zu $1 \cdot 10^5$ Vg/Zelle keine Genrepression des β_1 -AR erzielt werden konnte (Abbildung 3.46 B).

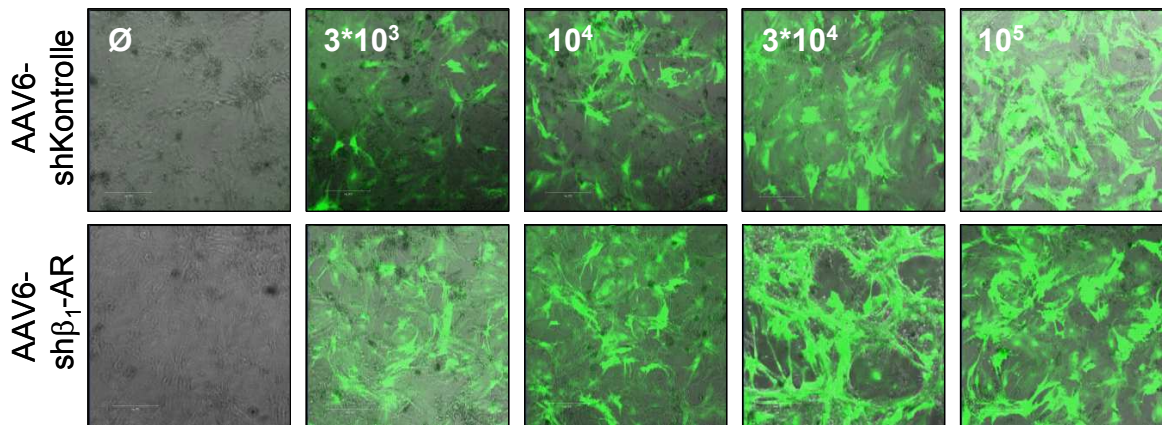


Abbildung 3.45 Virustitration in neonatalen Mauskardiomyozyten. Maßstab entspricht 200 μm .

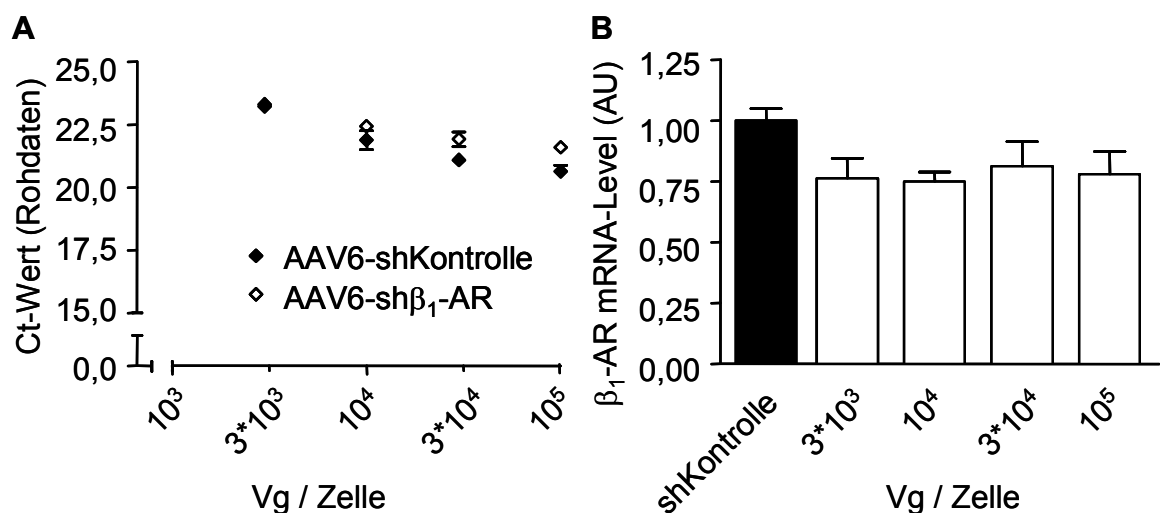


Abbildung 3.46 Analyse der mRNA-Konzentrationen nach Applikation von verschiedenen Virusmengen (AAV6-sh β_1 -AR/shKontrolle) in nMKM. qRT-PCR Analyse der GFP mRNA-Menge (A) und der β_1 -AR mRNA-Mengen (B) 7 d nach Virustransduktion. Die Normalisierung erfolgte auf GAPDH. n=3, keine signifikante Reduktion zur AAV6-shKontrolle.

Die *in vitro* Daten erklären somit den fehlenden β_1 -AR Knockdown *in vivo* und damit die Ineffizienz dieser siRNA-Sequenz gegenüber des β_1 -ARs der Maus. Da sowohl in der stabilen Zelllinie (human) als auch in nRKM (Ratte) eine effiziente Downregulation des β_1 -AR auf mRNA- und Proteinebene nachgewiesen werden konnte, jedoch nicht in nMKM (Maus), liegt das Problem der Ineffizienz sehr wahrscheinlich in der Zielspezies Maus. Mit diesem Wissen war die Durchführung von weiteren *in vivo* Versuchen mit AAV9-sh β_1 -AR-Vektoren nicht sinnvoll. Für weitergehende Untersuchungen an der Maus müsste also zunächst eine neue effiziente und Maus-spezifische Sequenz evaluiert werden.

In den folgenden Abschnitten werden die funktionellen und molekularbiologischen Auswirkungen der *in vivo* Behandlung mit rAAV-shRNA-Vektoren gegen den Inhibitor-1 beschrieben.

3.8.2.5 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen erfolgten vor Injektion sowie 4 und 6 Wochen nach Injektion. Die nachfolgenden Ergebnisse wurden nach 6 Wochen erhalten. Es zeigten sich keine Unterschiede im Herzgewicht/Körpergewicht (Abbildung 3.47 A), in der Herzfrequenz (Abbildung 3.47 B) und des Kontraktilitätsparameters FAS (*fractional area shortening*) unter basalen Bedingungen (Abbildung 3.47 C). Nach akuter β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin (10 mg/kg KG) kam es wie erwartet zum Anstieg der FAS in allen Gruppen, jedoch war die relative Zunahme der Flächenverkürzung unter Stimulation, dargestellt als Δ FAS in %, in AAV9-shI-1 Tieren vermindert (Abbildung 3.47 D). Demnach führte die Dobutamingabe in diesen Tieren zu einem verminderten Anstieg der positiv inotropen Antwort (Δ FAS: $27 \pm 12\%$ vs. $58 \pm 13\%$ in AAV9-shKontrollen und $55 \pm 21\%$ in NaCl-Kontrollen). Trotz großer Streuung impliziert dieses Ergebnis eine Desensibilisierung gegenüber akuter β -adrenerger Stimulation, welche als funktionelle Konsequenz eines Inhibitor-1 *Knockdowns* gedeutet werden kann.

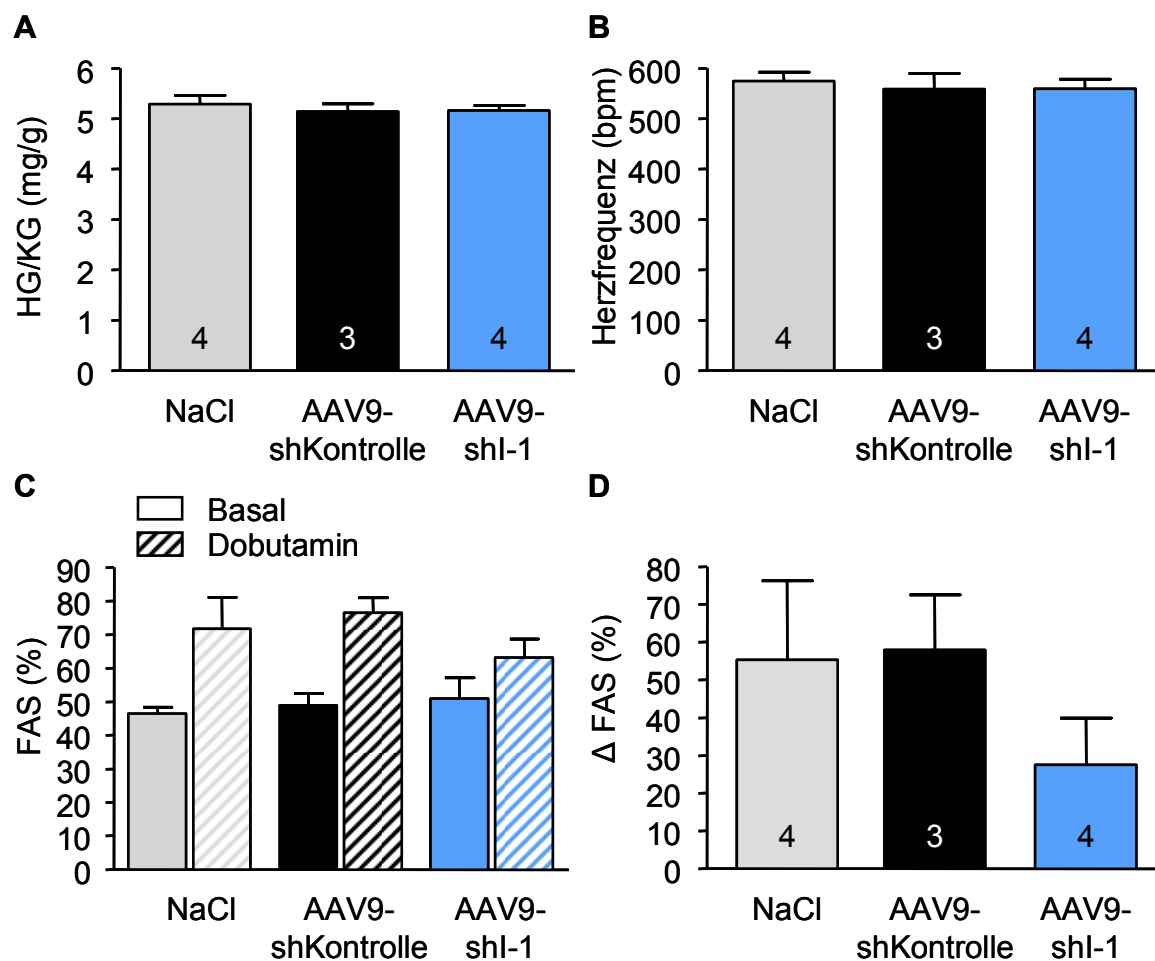


Abbildung 3.47 Echokardiographie-Auswertung der behandelten Mäuse 6 Wochen nach Injektion. (A) Darstellung des Herzgewichts/Körpergewichts, (B) der Herzfrequenz, (C) der FAS und Δ FAS (D) nach Dobutamingabe.

3.8.2.6 Western Blot Analyse von Effektorproteinen

In der nachfolgenden proteinbiochemischen Untersuchung wurden die Phosphorylierungsstelle Serin16 von Phospholamban ($\text{PLB}^{\text{Serin16}}$) sowie die Gesamtproteinmenge von PLB bestimmt. PLB ist ein Substrat der Proteinkinase A (PKA). Durch die β -adrenerge Stimulation kommt es über eine gesteigerte PKA-Aktivität zur erhöhten Phosphorylierung von u. a. PLB und damit zur Steigerung der Herzkraft (Kapitel 1.2.1). Im Umkehrschluss dazu würde eine β -adrenerge Desensibilisierung zu einer verminderten Phosphorylierung führen. Die Western Blot Analyse ergab trotz relativ großer Schwankungen einen Hinweis auf eine reduzierte Phosphorylierung von $\text{PLB}^{\text{Serin16}}$ in den AAV9-shl-1 Tieren (Abbildung 3.48 A, B, D) gegenüber beiden Kontrollgruppen (shKontrolle, NaCl), während die

PLB-Gesamtproteinmenge in allen Gruppen unverändert war (Abbildung 3.48 A, C).

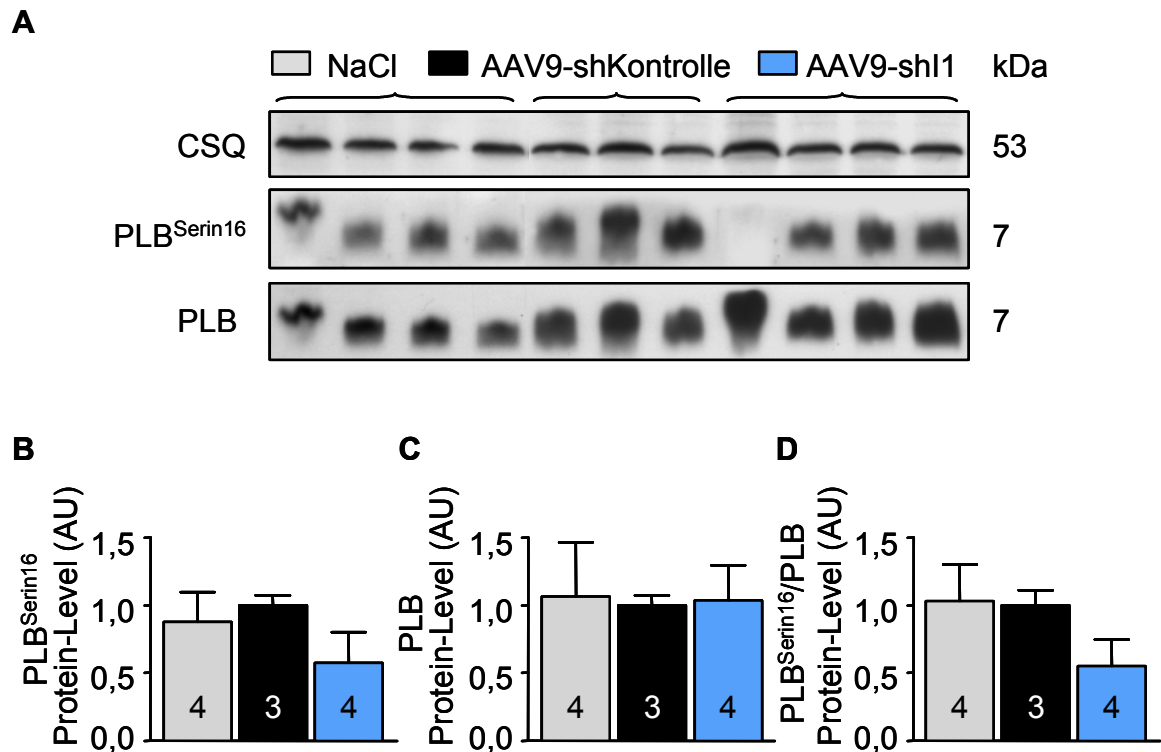


Abbildung 3.48 Westen Blot Analyse des Effektorproteins PLB^{Serin16} nach Applikation von AAV9-shI-1/shKontroll-Vektoren. (A) Western Blot Auszug der behandelten Mäuse. (B-D) Statistische Auswertung von (B) PLB^{Serin16}, (C) PLB Gesamtproteinmenge und (D) die entsprechende Ratio von PLB^{Serin16}/PLB Gesamtproteinmenge jeweils normalisiert auf die CSQ Proteinmenge.

4 Diskussion

Die pharmakologische Therapie der humanen Herzinsuffizienz ist trotz großer Fortschritte noch immer unbefriedigend. Eine der wichtigsten Interventionen stellt die chronische Blockade von myokardialen β -AR durch sogenannte „ β -Blocker“ dar. Diese ist allerdings auch mit z.T. erheblichen Unverträglichkeiten und Nebenwirkungen verbunden, da sie alle Prozesse beeinflusst, die der Stimulation von β -AR nachgeschaltet sind (siehe Kapitel 1.2.5). In den letzten Jahren konnte das Phosphatase-Inhibitor-1 Protein (Inhibitor-1) als distales positives Rückkopplungselement der β -adrenergen Signalkaskade identifiziert werden. So konnte eine ausgeprägte Dysregulation von Inhibitor-1 in kranken menschlichen Herzen aufgezeigt werden. Dagegen zeigten Vorarbeiten in Mäusen mit genetischer Defizienz von Inhibitor-1 einen eindrucklichen Schutz vor experimentell induzierten tödlichen Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienzprogression. Daher wurde die Hypothese formuliert, dass eine Hemmung von Inhibitor-1 als eine Art partielle „subzelluläre β -Blockade“ spezifischer den pathologischen Aspekten einer Überstimulation des β -adrenergen Signalweges entgegenwirken könnte. Da bis dato eine spezifische pharmakologische Beeinflussung von Inhibitor-1 nicht möglich ist, sollten in dieser Arbeit die Grundlagen für eine gentherapeutische Inhibitor-1 Abschaltung mittels Adeno-assoziiierter Virus-Vektoren auf Basis der RNA-Interferenz geschaffen werden und diese mit einer Genabschaltung des β_1 -ARs verglichen werden.

Folgende Hauptergebnisse wurden erzielt und werden in den nächsten Abschnitten ausführlich diskutiert: (1) *In silico* wurden effiziente Zielsequenzen gegen den Inhibitor-1 bzw. den β_1 -AR identifiziert und in den stabilen Zelllinien etabliert. (2) Es wurden die entsprechenden rAAV6-shRNA-Vektoren generiert und erfolgreich *in vitro* etabliert. (3) Die Transduktion von künstlichem Herzmuskelgewebe mit AAV6-sh β_1 -AR führte zu einer effizienten Downregulation des β_1 -AR, der aber von einer unerwarteten gesteigerten Kontraktilität begleitet war. (4) Rekombinante AAV9-shRNA-Vektoren zeigten *in vivo* eine hohe kardiale Transduktionseffizienz. (5) Die erstmalige Anwendung geringer Dosen von rAAV9-shRNA-Vektoren gegen den Inhibitor-1 *in vivo* führte zu einer mäßigen (34%) aber

erfolgsversprechenden Downregulation, welche mit einer tendenziell verminderten Ansprechbarkeit gegenüber Katecholaminen sowie einer verminderten Phospholamban-Phosphorylierung einhergingen.

4.1 Vorarbeiten und methodische Aspekte

4.1.1 Stabile Übertragung des Inhibitor-1- bzw. des β_1 -AR in HEK293 Zellen und Halbwertszeit von Inhibitor-1 in Kardiomyozyten

Eine besondere Herausforderung bestand in der immunologischen Detektierbarkeit der endogenen Proteine in Kardiomyozyten sowie in Herzgewebe. So lässt sich der Inhibitor-1 aus Herzgewebe aufgrund der geringen Expression erst nach Aufkonzentrierung mit Trichloressigsäure (El-Armouche et al. 2004) immunologisch nachweisen bzw. steht für den Nachweis des β_1 -ARs auf Proteinebene kein spezifischer Antikörper zur Verfügung. Daher wurden zu Beginn dieser Arbeit Zelllinien (HEK293) etabliert, die den Inhibitor-1 (bzw. β_1 -AR) stabil exprimierten. Diese bildeten damit die Grundlage für die erfolgreiche Evaluierung der verschiedenen Inhibitor-1 bzw. β_1 -AR sequenzhomologen siRNA-Moleküle.

Beide stabilen Zelllinien zeigten eine starke Expression der Zielproteine. Bemerkenswert war in diesem Zusammenhang, dass selbst durch die massive Expression des β_1 -AR keine spezifische β_1 -AR Bande in der Western Blot Analyse detektiert werden konnte, obwohl die reversible Proteinfärbung mit Ponceau eine eindeutige Bande bei etwa 65 kDa identifizierte (siehe Abbildung 3.5). Dadurch konnte die fehlende Spezifität des zur Verfügung stehenden Antikörpers eindrücklich bestätigt werden, stattdessen wurde die β -Adrenozeptorendichte durch Bindung eines Radioliganden gemessen.

Inwiefern die starke Expression die Effizienz der RNA-Interferenz beeinflusste, wurde nicht näher untersucht. Aber generell gelten Zelllinien mit höheren Expressionsmengen des zu untersuchenden Zielgens als besser geeignet für die Untersuchung von *Knockdown*-Effekten (Xu et al. 2009). Andererseits stellten die stabilen Zelllinien durch die massive Expression ein höchst artifizielles System dar, wodurch der *Knockdown*-Effekt möglicherweise überschätzt wurde und die Interpretation bzw. Übertragung der Ergebnisse auf die endogene Expression bzw. die *in vivo* Situation selbstverständlich bestätigt werden mussten.

Zu Beginn dieser Arbeit war die Protein-Halbwertszeit des Inhibitor-1 nicht bekannt. Dessen Kenntnis war jedoch für die *Knockdown*-Untersuchungen, besonders im Hinblick auf die benötigte Transfektionsdauer mit der entsprechenden siRNA, notwendig. Eine rein theoretische Berechnung der Inhibitor-1 Halbwertszeit mit der *ProtParam tool* Software (ExPASy Proteomics Server; <http://www.expasy.ch/tools/protparam-doc.html>) auf Grundlage der N-Terminus-Regel (Ciechanover und Schwartz 1989; Varshavsky 1997) ergab eine geschätzte Protein-Halbwertszeit von deutlich weniger als 12 h.

Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelte Inhibitor-1 Halbwertszeit durch die Behandlung von Kardiomyozyten mit Cycloheximid betrug weniger als 24 h (siehe Kapitel 3.2.2). Eine genauere Bestimmung der Halbwertszeit war aufgrund der Fragestellung und der experimentellen Bedingungen (Transfektionsdauer) nicht nötig, da die Untersuchung des Inhibitor-1 *Knockdowns* nicht durch eine zu lange Protein-Halbwertszeit beeinträchtigt wurde. Somit konnte in der Tat durch die nachfolgende *in vitro* Evaluation (Transfektion von siRNA bzw. der shRNA-Expressionsvektoren) bestätigt werden, dass eine Behandlung von 72 h absolut ausreichend war, um die Zielproteinmenge effizient (bis zu 70%) zu vermindern.

4.2 Evaluierung der Zielsequenzen *in vitro*

4.2.1 Charakterisierung der siRNAs

Eine eindeutige Vorhersage über die Effizienz einer siRNA ist bisher nicht möglich. Den grundlegendsten Schritt für die erfolgreiche Anwendung der RNA-Interferenz stellt somit das Design effizienter siRNAs dar. So wurden in dieser Arbeit nach anerkannten Regeln (Tuschl et al. 1999) 4 potentielle siRNA-Sequenzen gegen den Inhibitor-1 bzw. 3 siRNA-Sequenzen gegen den β_1 -AR generiert (siehe Kapitel 2.4).

Alle diese Sequenzen entsprachen den klassischen siRNA-Molekülen, bestehend aus 19 Nukleotiden mit zwei Nukleotide langen Überhängen an beiden 3'-Enden. Sie folgten dem NA(N21)-Motiv und wiesen G/C-Gehalte zwischen 47-68% auf (siehe Anhang, Tabelle 12.13). Es ist bekannt, dass ein zu geringer G/C-Gehalt den siRNA-Duplex destabilisieren kann, wohingegen ein zu hoher G/C-Gehalt den Einbau in den RISC bzw. die Freilassung des Spaltproduktes erschweren würde.

Weiterhin besaßen alle Sequenzen einen negativen thermodynamischen Wert (ΔG), welcher sich aus der Energiedifferenz zwischen der Energie des 5'-Endes des Sense-Stranges und der Energie des 5'-Endes des Antisense-Stranges ergab. Es wurden nur siRNA-Sequenzen gewählt, die eine negative Energiedifferenz aufzeigten (siehe Anhang, Tabelle 12.13), d. h. mit einer geringeren thermodynamischen Stabilität des 5'-Endes des Antisense-Stranges (sowie einen höheren A/T-Gehalt), sodass dieser bevorzugt in den RISC-Komplex eingebaut werden konnte (Schwarz et al. 2003). Außerdem kamen nur siRNA-Sequenzen infrage, deren Zielsequenz weder in der 5'-UTR noch in der 3'-UTR, sondern im kodierenden Sequenzbereich der Ziel-mRNA lag. Dadurch sollten eine effiziente Anlagerung des siRNA/Nukleasekomplexes ermöglicht und potentielle *off-target* Effekte vermieden werden.

Durch siRNA-Transfektion wurden die mRNA- und Proteinexpression beider Zielgene in unterschiedlich starkem Ausmaß beeinflusst (siehe Kapitel 3.2.3, 3.2.4). So konnte durch die Sequenz β_1 -AR (1) die β_1 -AR mRNA-Menge um mehr als 90% herunterreguliert werden, während die beiden anderen Sequenzen nahezu wirkungslos waren. Die Verminderung der Inhibitor-1 mRNA-Menge (bzw. Proteinmenge) schwankte ebenfalls zwischen maximal 80% (60%) und minimal 40% (25%). Anhand dessen konnte bestätigt werden, dass eine Vorhersehbarkeit über die Effizienz einer siRNA trotz gleicher Auswahlkriterien/Richtlinien nicht gegeben war. Demnach bestimmen anscheinend noch weitere unbekannte Kriterien und Einflüsse die Effizienz einer siRNA. So konnte z. B. auch für längere siRNAs (27, 29 Nukleotide) eine hohe Effizienz gezeigt werden (Kim et al. 2005; Siolas et al. 2005).

4.2.2 Charakterisierung der shRNA-Expressionsvektoren

Der große Nachteil synthetischer siRNAs, auch im Hinblick auf den therapeutischen Einsatz, ist die relativ kurzweilige Genabschaltung von wenigen Tagen (Watanabe et al. 2004). Außerdem ist der *in vivo* Einsatz von synthetischen siRNAs bedingt durch eine geringe Transduktionseffizienz von z. B. Herzmuskelzellen erschwert (Lewis et al. 2002). Durch die Entwicklung von shRNA-Expressionssystemen (Shi 2003) kann siRNA durch RNA-Polymerase-Promotoren kontinuierlich in der Zelle generiert werden (siehe Kapitel 1.3.3) und

darüber ein langfristiger effizienter *Knockdown* erzielt werden. Sie gelten daher grundsätzlich als effizienter im Vergleich zu synthetischen siRNAs (Brummelkamp et al. 2002), was in dieser Arbeit ebenfalls bestätigt wurde.

So konnte für die Sequenzen shI-1 (2) und (3) im shRNA-Expressionssystem eine stärkere Verminderung des Inhibitor-1 auf mRNA- und Proteinniveau bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2 und 3.3), wohingegen die Sequenzen shI-1 (1) und (4) einen Wirkungsverlust aufzeigten. Insbesondere für die siRNA-Sequenz I-1 (4) hätte man aufgrund der stark erniedrigten mRNA-Menge (-80%) eine Zunahme der Aktivität durch die Expression von shRNA erwartet. Wir vermuten, dass eventuell die Oligonukleotidsynthese fehlerhaft gewesen sein könnte, da die Synthese längerer Oligos bekanntermaßen fehleranfällig ist. In der Tat ergab die wiederholte Sequenzierungsanalyse der shRNA-Expressionsplasmide (H1-Promotor und shRNA-Sequenz) das Fehlen von 10 Nukleotiden am 3'-Ende des Antisense-Stranges der Sequenz shI-1 (4), welches mit großer Wahrscheinlichkeit für den Aktivitätsverlust verantwortlich war. Eventuell könnte aber auch die Sequenzierungsanalyse selbst die inkorrekte Sequenz erklären, da die eindeutige Sequenzierung palindromischer Sequenzen durch die Ausbildung von Sekundärstrukturen oftmals erschwert wird. Dagegen spricht jedoch, dass die Sequenzierung nach dem fehlenden Stück einwandfrei weiterlief. Warum aber dennoch mit dieser falschen shRNA-Sequenz eine Verminderung der Inhibitor-1 mRNA- (-30%) bzw. der Proteinmenge (-40%) erzielt werden konnte, ist unklar und kann hier nicht abschließend geklärt werden. Jedoch wurde bereits mehrfach beschrieben, dass schon 11 zur Ziel-mRNA identische Nukleotide ausreichend sind, um RNAi zu induzieren (siehe Kapitel 4.2.4). Durch die imperfekte Homologie zur mRNA kommt es analog zu endogenen miRNAs zur Hemmung der Translation (siehe Kapitel 1.3.3), die Degradation der Ziel-mRNA bleibt dagegen aus. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die lediglich geringfügig verringerte mRNA-Konzentration bei gleichzeitiger Proteinrepression darstellen.

Ähnlich wie für die Sequenz shI-1 (4) konnte auch für die Sequenz sh β_1 -AR (3) ein Aktivitätsverlust im Vergleich zur siRNA verzeichnet werden. Auch in diesem Fall konnte durch die Sequenzierung ein fehlendes Nukleotid an Position 8 des Antisense-Stranges nachgewiesen werden. Da eine Fehlpaarung an dieser

Position weder zum Abbau der mRNA noch zur Translationshemmung führte, kam es zum vollständigen Wirkungsverlust und bestätigte dadurch die Sequenzspezifität der RNAi.

Die generelle Funktionalität des von uns verwendeten H1-Promotors zur shRNA-Expression bzw. die Prozessierung zur siRNA *in vitro* konnte qualitativ nach shRNA-Vektortransfektion bzw. nach rAAV6-shRNA-Transduktion im Northern Blot nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.6.1.2). Studien belegen, dass die Wahl des Promotors für die RNAi-Effizienz von Bedeutung ist (Boden et al. 2003; Tiscornia et al. 2003). Der H1-Promotor zählt neben dem U6-Promotor zu den am häufigsten verwendeten Promotoren (siehe Kapitel 1.3.1). Durch ihre relativ einfache Struktur und ihrer gut definierten Transkriptionsstartregion gewährleisten sie eine direkte shRNA-Expression (Paule und White 2000; Myslinski et al. 2001).

Neben der Wahl des Promotors kann die Effizienz der shRNAs maßgeblich durch deren Struktur beeinflusst werden. Dabei sind jedoch die Algorithmen, die für die Entwicklung einer siRNA gelten, nicht direkt auf das shRNA-System übertragbar (Taxman et al. 2006; Schopman et al. 2010). Großes Interesse gilt z. B. der Suche nach der optimalen Stamm- und Schleifenstruktur (Li et al. 2007). Die durch uns generierten shRNAs basierten auf den Überlegungen von Dr. A. Laatsch, wonach der gesamte Antisense-Strang sowie der Loop komplementär zur Ziel-mRNA waren (Laatsch et al. 2004). Bei dieser Art von shRNAs (siehe Kapitel 2.4.2) ließ sich nicht mehr in Stamm- bzw. Schleifenstruktur im eigentlichen Sinne unterscheiden, vielmehr handelte es sich um eine vollständig palindromische Struktur, wodurch die Gefahr von Fehlpaarungen bei der Erkennung der mRNA durch die prozessierte siRNA verringert werden sollte. In Folge dessen würde man bei der Faltung des Transkripts theoretisch eine vollständige Hybridisierung erwarten, was aber aus sterischen Gründen nicht möglich ist, sodass ungepaarte Nukleotide in diesem Bereich wahrscheinlich eine schleifenähnliche Struktur ausbilden.

Außerdem geht man davon aus, dass die Loop-Struktur unmittelbar einen Einfluss auf den Prozessierungsschritt hat und die Erkennung und Spaltung durch den Dicer spezifiziert (Vermeulen et al. 2005) und damit essentiell für eine erfolgreiche Downregulation ist. Trotz vieler Untersuchungen zur Funktionsweise des Dicers

(Zhang et al. 2004) und über Strukturen zur Erkennung und Bindung des Substrates ist bisher wenig über die exakte Position der Spaltung sowie die strukturellen Anforderungen des Loops bekannt. Da also nicht bekannt ist, wo genau der Dicer-Enzymkomplex schneidet, wurde in dieser Arbeit versucht, Fehlpaarungen durch nicht komplementäre Loop-Nukleotide zu vermeiden. Die nach diesem Prinzip prozessierte siRNA ist, unabhängig von der Dicer-Schnittstelle, immer vollständig komplementär zur Ziel-mRNA. Die von uns gewählte palindromische shRNA-Struktur, insbesondere die kurze Loop-Struktur, wurde aber nicht näher untersucht bzw. mit anderen möglichen shRNA-Stammstrukturen oder Loop-Größen verglichen, da bereits mehrfach potente shRNAs nach diesem Schema generiert werden konnten (Laatsch et al. 2004; El-Armouche et al. 2007b). Jedoch gibt es Studien, die zeigen, dass shRNAs mit einem Stamm aus 29 Nukleotiden viel potenter sind als solche mit einem Stamm aus 19 Nukleotiden (Siolas et al. 2005). Außerdem wurde in zahlreichen anderen Analysen der Einfluss des Loops (Struktur und Größe) näher untersucht (Brummelkamp et al. 2002; Miyagishi et al. 2004; Vlassov et al. 2007; Schopman et al. 2010). Die Größe der Loops in den verschiedenen Publikationen variierte dabei ebenfalls zwischen 4 und 13 Nukleotiden.

Trotz dieser Vielzahl an Untersuchungen lässt sich demzufolge noch keine generelle Aussage hinsichtlich einer optimalen Struktur ableiten, da sich die Ergebnisse und Schlussfolgerungen der verschiedenen Arbeiten teilweise widersprechen. Offensichtlich ist es nicht ausreichend einem bestimmten Algorithmus zu folgen, vielmehr ist erst das Zusammenspiel verschiedenster Faktoren für die Effizienz einer shRNA verantwortlich. Die grundsätzliche Überlegenheit der endogenen shRNA-Expression gegenüber der exogenen siRNA-Applikation und insbesondere die Wirksamkeit der gewählten shRNA-Struktur konnten jedoch erfolgreich dargestellt werden.

4.2.3 Charakterisierung von rAAV6-shRNA-Vektoren in den stabilen Zelllinien und neonatalen Kardiomyozyten

Um einen effizienten Gentransfer *in vitro* und *in vivo* zu ermöglichen, wurde im nächsten Schritt ein AAV-basiertes, virales Vektorsystem zur shRNA-Expression generiert. Für die Untersuchung der Fragestellung dieser Arbeit stellte das Adeno-

assoziierte Virus die Basis für einen effizienten Gentransfer (siehe Kapitel 1.4.5) dar. Die Untersuchungen des *Knockdowns in vitro* dienen dem funktionellen Nachweis der Viren zur shRNA-Expression.

Für alle *in vitro* Experimente wurde der Serotyp 6 verwendet. Die Literaturangaben über die verwendeten Virusmengen für eine effiziente Transduktion von Primärzellen variieren und liegen zwischen $1 \cdot 10^2$ - $6 \cdot 10^3$ Vektorgenomen (Vg) pro Zelle. Im Vergleich zu Adenoviren ist die Transduktionsrate demzufolge um ein Vielfaches niedriger, was auch in den von uns durchgeführten *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte. Die Koexpression von GFP ermöglichte uns außerdem ein einfaches Abschätzen der Transduktionseffizienz. So konnte bereits nach 24 h die GFP-Epifluoreszenz analysiert werden. In allen Zellsystemen zeigte die GFP-Expression (Epifluoreszenz und mRNA-Expression) eine Abhängigkeit von der eingesetzten Virusmenge (siehe Abbildung 3.19, Abbildung 3.23), die sich durch den Einsatz von bis zu $1 \cdot 10^5$ Vg/Zelle steigern ließ.

In den stabilen Zelllinien konnte nach 7-tägiger Behandlung mit den entsprechenden rAAV6-shRNA-Vektoren (10^4 Vg/Zelle) ein *Knockdown* der mRNA-Mengen auf etwa 50% (Inhibitor-1) bzw. auf 66% (β_1 -AR) quantifiziert werden. Die Inhibitor-1 Proteinmenge war im gleichen Maße auf etwa 54% und die β -Adrenozeptorendichte auf 35% reduziert. Im Vergleich zu den shRNA-Expressionsvektoren schien die Downregulation schwächer zu sein, was wahrscheinlich auf die verwendeten Zelllinien zurückzuführen ist. In diesem Versuch zeigte sich deutlich, dass sich teilende Zellen, wie die von uns etablierten Zelllinien, nicht optimal geeignet sind, um einen längerfristigen *Knockdown* (7 d) zu untersuchen. Letztendlich kann keine Aussage über die Transduktionsrate nach 7 d gemacht werden bzw. inwieweit eine Weitergabe des Transgens an die Tochterzellen stattfand. Möglicherweise kam es im Zeitverlauf durch die schnelle Proliferation der Zellen zur Ausdünnung des *Knockdowns*, sodass die Downregulation im Vergleich zu den Transfektionsexperimenten mit siRNA oder shRNA-Expressionsvektoren geringer war. Ergänzend würde sich eine zeitliche Analyse des *Knockdowns* anbieten, in welcher man den Beginn der Downregulation sowie den Zeitpunkt der maximalen *Knockdown*-Effizienz beschreiben könnte.

Weiterhin hätte eine Steigerung der Viruskonzentration mit großer Wahrscheinlichkeit zu einer noch stärkeren Unterdrückung der Genexpression geführt, da sich die Transduktionseffizienz durch den Einsatz von bis zu $1 \cdot 10^5$ Vg/Zelle noch steigern ließ (siehe GFP-Epifluoreszenzanalyse). Letztlich konnten die mRNA- und Proteinmengen beider Zielgene herunterreguliert werden, wodurch das grundlegende Prinzip *in vitro* bestätigt werden konnte.

Um die Effizienz der Vektoren, besonders im Hinblick auf die *in vivo* Anwendung, zelltypspezifisch zu untersuchen, wurden im nächsten Schritt nRKM mit AAV6-sh β_1 -AR/shKontrolle transduziert. Es erfolgte analog zu den stabilen Zelllinien eine Behandlung mit steigenden Virusmengen bis zu $1 \cdot 10^5$ Vg/Zelle, wodurch die β_1 -AR mRNA konzentrationsabhängig auf maximal 37% im Vergleich zu den mit Kontrollvirus behandelten Kardiomyozyten reduziert werden konnte bzw. die GFP-Signalintensität entsprechend zunahm (siehe Kapitel 3.6.2). Dieses Ergebnis korrelierte sehr gut mit den bis dahin erzielten Ergebnissen der stabilen β_1 -AR-Zelllinie.

4.2.4 Off-target Effekte und Spezifität der si/shRNAs allgemein

Um die Wahrscheinlichkeit möglicher *off-target* Effekte zu vermindern, wurde im Vorfeld ein Vergleich der siRNA-Sequenzen mit dem entsprechenden Genom durchgeführt (BLAST), wodurch aber mögliche Wechselwirkungen mit Teilen der 3'-UTR anderer mRNAs nicht vollständig ausgeschlossen werden konnten.

Off-target Effekte können entweder durch die si/shRNA-Sequenz selbst bzw. durch den Expressionsvektor oder durch Fehlpaarungen der siRNAs vermittelt werden. So wurde beobachtet, dass allein eine einzige Fehlpaarung, wie im Falle der Sequenz sh β_1 -AR (3), zum vollständigem Aktivitätsverlust der siRNA führte (Brummelkamp et al. 2002; Schubert et al. 2005a). Andererseits kann dadurch die Spezifität der siRNA zur Ziel-mRNA stark eingeschränkt werden (Agrawal et al. 2003) und darüber hinaus zu *off-target* Effekten führen (Saxena et al. 2003). Bereits die Übereinstimmung von 11 Nukleotiden zur siRNA (Antisense-Strang) kann ausreichend sein, um eine mRNA, die nicht das Ziel ist, herunter zu regulieren (Jackson et al. 2003). Anscheinend ist die Identität der mRNA zur siRNA nicht allein für diesen Effekt verantwortlich, sondern vielmehr die

Übereinstimmung zwischen Teilen der 3'-UTR und der Seed-Region des Antisense-Stranges der siRNA (Birmingham et al. 2006). Durch Mikroarray-Analysen konnte gezeigt werden, dass siRNAs mit häufig vorkommenden Seed-Regionen stärkere *off-target* Effekte auslösen, als solche, zu deren Seed-Region es nur wenige komplementäre Sequenzen gibt (Anderson et al. 2008). Durch geschicktes siRNA-Design, z. B. durch spezielle computergestützte Analysen zu *off-target* Effekten von siRNAs (Qiu et al. 2005) sowie durch die chemische Modifikation der siRNA, sollen solche Effekte minimiert werden (Jackson et al. 2006).

Um in dieser Arbeit einerseits Vektor- oder shRNA-vermittelte oder sogar toxische Effekte zu ermitteln, wurde in jedem Experiment ein entsprechender Kontrollvektor zur Expression einer „*scrambled*“ Kontrollsequenz mitgeführt. Der unmittelbare Vergleich der Ergebnisse dieser Kontrollsequenz mit denen der unbehandelten Kontrolle bzw. der *Knockdown*-Intervention ergab keine Veränderungen der Expressionsstärken bzw. Proteinmengen von β -Aktin und Calsequestrin-2. So konnten diese *Housekeeping*-Gene bei der Quantifizierung des *Knockdowns* für die Normalisierung verwendet werden.

Die funktionelle Charakterisierung der β_1 -AR Downregulation in künstlichem Herzmuskelgewebe führte zu einem unerwarteten Ergebnis, wonach der *Knockdown* der β_1 -AR mit einer erhöhten Kraftentwicklung in den entsprechenden FBMEs assoziiert war. Jedoch war unklar, ob dieses Ergebnis eine direkte oder indirekte Folge der β_1 -AR Downregulation darstellte. Zur näheren Untersuchung dieses Effektes wurde eine Genexpressionsanalyse mittels Illumina[®] BeadArray Technologie durchgeführt, um differentiell regulierte Gene, die für diesen Effekt verantwortlich sein könnten, zu identifizieren. Mit Hilfe dieser Technik konnten auf einem BeadChip bis zu 22519 Referenzsequenzen analysiert werden (siehe Kapitel 4.3.3.2).

4.2.5 Einfluss von GFP auf die shRNA-Expression

Die von uns *in vitro* und *in vivo* eingesetzten viralen Vektoren enthielten neben der entsprechenden shRNA-Sequenz das Markerprotein GFP unter Kontrolle eines CMV-Promotors. GFP dient vor allem der Untersuchung von Proteinlokalisationen

in Zellen, Geweben und lebenden Organismen (Godwin et al. 1998) und wurde erfolgreich in verschiedenen Transfektionsmodellen und ebenso in diversen *in vivo* Modellen ohne Nebenwirkungen eingesetzt (Okabe et al. 1997; Daniels et al. 2003).

In aktuellen Untersuchungen wird derzeit ein Zusammenhang zwischen der GFP-Koexpression und shRNA-Expression diskutiert. Dabei wurde insbesondere eine inhibitorische Wirkung von GFP auf die shRNA-Expression und damit auf die RNAi im Allgemeinen postuliert (Suckau et al. 2009). In dieser Studie erfolgte die Expression von GFP und der shRNA bidirektional (und einander entgegengerichtet) von einem CMV-Promotor (CMV-eGFP) bzw. einem U6-Promotor, wodurch anscheinend die shRNA-Produktion beeinträchtigt oder sogar verhindert wurde. Möglicherweise kann es durch die massive Proteinexpression zu einer Art Überladung der Zelle mit GFP kommen, die Störungen des normalen Zellhaushaltes (Proteinbiosynthese, etc.) bzw. die Unterdrückung der shRNA-Expression zur Folge hatte. Dies würde den allgemeinen Funktionsverlust der shRNA erklären, wenn sie gemeinsam mit GFP exprimiert wird.

In Gemeinsamkeit zu dieser Arbeit exprimierten die von uns etablierten viralen Vektoren neben der gewünschten shRNA ebenfalls GFP unter einem CMV-Promotor, jedoch enthielt die virale Expressionskassette beide Promotoren in gleicher Orientierung. Die shRNA-Expression wurde außerdem durch den H1-Promotor getrieben, weshalb die beiden Systeme nicht direkt miteinander vergleichbar sind. In Anbetracht der erzielten *Knockdown*-Ergebnisse kann eine inhibitorische Wirkung durch die Koexpression von GFP nahezu ausgeschlossen werden, insbesondere da der Vergleich der Vektoren mit (dsAAV-CMV-GFP-H1-shRNA) und ohne GFP (shRNA-Expressionsvektoren) bzw. zu den siRNA-Oligonukleotiden keinen Hinweis darauf ergab. Um den Einfluss von GFP auf die shRNA-Expression genauer zu untersuchen bzw. um inhibitorische Effekte auszuschließen, müsste man einen direkten Vergleich der viralen Vektoren AAV6-CMV-GFP-H1-shRNA und AAV6-H1-shRNA durchführen, bei dem sowohl die Expressionsmengen der shRNA als auch der Ziel-mRNA näher untersucht werden müssten.

In unseren Händen blieben die Expression und Effizienz der shRNAs unbeeinflusst von der GFP-Koexpression, sodass GFP seiner Rolle als Transduktionsmarker gerecht wurde und mit Hilfe dessen ein einfaches Monitoring erfolgen konnte.

4.2.6 Einfluss der Spezies auf den *Knockdown*

Der Einfluss der Spezies ist insofern von großer Bedeutung, als dass die Evaluierung der Zielsequenzen in unterschiedlichen Zellsystemen verschiedener Spezies erfolgte, mit dem Ziel schließlich einen Gentransfer in der Maus durchzuführen.

Die Suche nach der passenden Sequenz gegen den β_1 -AR gestaltete sich schwierig, da die siRNA-Sequenz gleichzeitig gegen die humane und die murinen Formen gerichtet sein sollte. Die stabile Zelllinie β_1 -AR-pIRES-eGFP, die uns zur Evaluation der siRNA-Sequenzen diente, exprimierte den humanen β_1 -AR (siehe Kapitel 3.1), was bei der Wahl berücksichtigt werden musste. Es konnten 3 potentielle Sequenzen gegen den β_1 -AR (Mensch, Maus) ermittelt werden, von denen zwei (Sequenz β_1 -AR (1) und (3)) auch zur Ratte homolog waren (siehe Tabelle 2.4). Die Sequenz β_1 -AR (1) zeigte als siRNA-, shRNA-Sequenz die beste Fähigkeit zur Genstilllegung in der stabilen Zelllinie und wurde deshalb für die Generierung der rAAV-shRNA-Vektoren ausgewählt. Jedoch war zu diesem Zeitpunkt die Effizienz einzig und allein gegen den humanen β_1 -AR gesichert, nicht jedoch gegen die murinen Formen. Im nächsten Schritt wurden die shRNA exprimierenden Adeno-assoziierten Viren (AAV6-sh β_1 -AR) in Primärzellen, d. h. in Kardiomyozyten der Ratte getestet. Die Behandlung der nRKM führte ebenfalls zur gewünschten Genrepression des β_1 -ARs (siehe Kapitel 3.6.2). Die Downregulation konnte zusätzlich auch in Virus behandelten FBMEs auf mRNA- und Proteinniveau bestätigt werden (siehe Kapitel 3.7.2). In den nachfolgenden *in vivo* Untersuchungen mit AAV9-sh β_1 -AR konnte hingegen kein *Knockdown* des β_1 -AR in Mäuseherzen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.8.2.4). Aus diesem Grunde wurden nachträglich nMKM mit AAV6-sh β_1 -AR behandelt, in denen der *Knockdown* ebenfalls ausblieb (siehe Kapitel 3.8.2.4.1). Eine unzureichende Transduktion der Zellen mit Virus konnte ausgeschlossen werden, da anhand der

GFP-Epifluoreszenz sowie durch die quantitative Analyse der GFP mRNA-Mengen eine effiziente Virustransduktion beschrieben werden konnte.

Um Unterschiede in der Sequenz des β_1 -AR (*Accession code*: NM_007419) in dem von uns verwendeten Mäusestamm C57BL/6J auszuschließen, wurde zunächst durch eine Sequenzierungsanalyse die korrekte Sequenz des β_1 -AR sichergestellt. Der β_1 -AR der Spezies Maus (*Accession code*: NM_007419) und der Ratte (*Accession code*: NM_012701) sind ortholog zur humanen Form (*Accession code*: NM_000684). Die Nukleotid- bzw. die Aminosäure-Sequenzen weisen eine große Homologie auf, weshalb wir von vergleichbaren Eigenschaften der Ziel-mRNA, insbesondere hinsichtlich ihrer Zugänglichkeit für siRNA-Sequenzen, ausgegangen sind. Es wird u. a. auch eine kommerzielle shRNA-Sequenz mit der gleichen Zielsequenz angeboten (TRCN0000008080, *Open Biosystems*). Die Expression der shRNA-Sequenz (sh β_1 -AR) erfolgte in allen Fällen durch ein und denselben Expressionsvektor und auch der Gentransfer immer durch AAV6-sh β_1 -AR (*in vitro*) oder AAV9-sh β_1 -AR (*in vivo*). Demnach bestand der einzige Unterschied in der Spezies. Anscheinend beeinflusst dieser Unterschied die *Knockdown*-Effizienz jedoch maßgeblich.

In verschiedenen Untersuchungen konnte bereits gezeigt werden, dass nicht nur die intrinsischen Eigenschaften der siRNA selbst, sondern auch die Eigenschaften der Zielsequenz und die Zugänglichkeit der Ziel-mRNA für die siRNA, das Ausmaß des *Knockdowns* bestimmen, wodurch dieses Ergebnis möglicherweise erklärt werden könnte. So wurde in einem Zweistufenmodell (Schubert et al. 2005b) versucht, die Effizienz der Hemmung durch siRNA zu beschreiben: (1) in Abhängigkeit der Stabilität der Strangenden wird ein Strang bevorzugt in RISC eingebaut und (2) je nach Zugänglichkeit der Ziel-mRNA für die siRNA erfolgt die Genrepression (Shao et al. 2007). Dabei scheint insbesondere die Zugänglichkeit des 3'-Endes der siRNA-Bindungsregion wichtig zu sein, da in diesem Bereich die Wechselwirkungen zwischen der siRNA und der Ziel-mRNA stattfinden (Westerhout und Berkhout 2007).

In diesem Zusammenhang ist weiterhin zu beachten, dass es anscheinend Zielgene gibt, die sich leicht inhibieren lassen, während die Downregulation anderer Gene problematisch ist, wodurch der Einfluss der Ziel-mRNA auf das

Ausmaß der Genstilllegung ebenfalls verdeutlicht wird (Krueger et al. 2007). Inwiefern die Betrachtungen über die Zugänglichkeit der Ziel-mRNA für die siRNA von Bedeutung sind, konnte in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden. So konnte trotz intensiver Literaturrecherche die Ursache für den fehlenden *Knockdown* des β_1 -AR (Maus) *in vitro* und *in vivo* nicht abschließend aufgeklärt werden.

Die Etablierung der siRNA-Sequenzen gegen den Inhibitor-1 war dagegen weniger problematisch. So wurden alle siRNA-, shRNA-Sequenzen bis hin zu den rAAV-shRNA-Vektoren in der stabilen I-1-pIRES-eGFP Zelllinie etabliert (siehe Kapitel 3.1). Alle 4 siRNA-Sequenzen waren vollständig komplementär zur Maus, jedoch nicht zur Ratte (Ausnahme Sequenz I-1 (4)). Die Untersuchung eines funktionellen Nachweises der Inhibitor-1 Downregulation in FBMEs wurde daher nicht durchgeführt, da die FBMEs zu diesem Zeitpunkt nur aus Herzzellen der neonatalen Ratte hergestellt werden konnten. Zurzeit wird aber auch die Herstellung von FBMEs aus Herzzellen der Maus etabliert, die eine zukünftige Anwendung von AAV6-shI-1 im FBME-Modell möglich macht.

Aus diesen Erfahrungen heraus ermisst sich die Bedeutung der Reproduzierbarkeit der Genausschaltung in allen Systemen (siRNA, shRNA-Expressionsvektor, AAV-shRNA-Vektorplasmid und rAAV-shRNA-Vektoren). Außerdem muss eine sichere Übertragung der Ergebnisse von *in vitro* Untersuchungen auf den *in vivo* Gentransfer gewährleistet sein, z. B. durch die kontinuierliche Etablierung der Sequenzen im passenden System zur Zielspezies (Maus).

4.3 Charakterisierung von AAV6-sh β_1 -AR-Vektoren im FBME-Modell

Durch die Entwicklung des FBME-Modells wurde ein robustes, reproduzierbares, einfach zu handhabendes Multi-Well-Testformat mit automatisierter Auswertung entwickelt (Hansen et al. 2010), welches sich prinzipiell auch für die *in vitro* Untersuchung unserer Fragestellung anbot. Aufgrund der Wirtsspezies der künstlichen Herzmuskelkonstrukte (Eschenhagen und Zimmermann 2005) konnten bisher lediglich die funktionellen Auswirkungen der β_1 -AR-Downregulation durch die Behandlung mit AAV6-sh β_1 -AR-Vektoren untersucht werden. Dabei

stellten die mit Kontrollvirus behandelten FBMEs die adäquate Kontrolle zu den mit AAV6-sh β_1 -AR transduzierten FBMEs dar, da sie im gleichen Maße dem Einfluss der rAAV6-Behandlung (shRNA- und GFP-Expression) unterstanden. Die Analyse der unbehandelten Kontrollen diente dazu, rein Virus-vermittelte Effekte besser von Konsequenzen des β_1 -AR *Knockdowns* unterscheiden zu können.

4.3.1 Virustransduktion und *Knockdown*-Effizienz von AAV6-sh β_1 -AR

Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, dass künstliche Herzmuskelgewebekonstrukte effizient mit Adenoviren transduziert werden können (Zimmermann et al. 2000; El-Armouche et al. 2003; El-Armouche et al. 2007b). Die Behandlung mit den weniger toxischen Adeno-assoziierten Viren war bereits während der FBME-Präparation möglich und führte eindeutig zu einer verbesserten Virustransduktion (siehe Abbildung 3.25) als die Anwendung an Tag 10. Durch die direkte Zugabe der Viruslösung zum FBME-Mastermix wurden die Viren unmittelbar in die Matrix eingebunden und standen so direkt mit den Zellen in Kontakt, wodurch die Infektion der Zellen erleichtert und eine homogene Transduktion erzielt werden konnte.

Die FBMEs konnten analog zu den Monolayerkulturen erfolgreich mit $1 \cdot 10^4$ - 10^5 rAAV6 (sh β_1 -AR/shKontrolle) behandelt werden. Der Erfolg der Transduktion ließ sich anhand des β_1 -AR *Knockdowns* einfach quantifizieren (siehe Kapitel 3.7.2). Insgesamt war die Transduktionseffizienz der rAAV6 in FBMEs als sehr gut zu beurteilen. Die Fibrinmatrix stellte demnach keine Penetrationsbarriere dar, die die Infektion der Zellen im Inneren des Gewebeverbandes erschwert hätte. Mit diesem Ergebnis konnten zum einen die Resultate der Vorarbeiten reproduziert werden und zum anderen stellte es die Basis für die weitere funktionelle Untersuchung der β_1 -AR Downregulation in FBMEs dar.

4.3.2 Reifung und Entwicklung der FBMEs

Im Reifungsprozess konnten zunächst keine Unterschiede zwischen den 3 Gruppen beobachtet werden. So kam es während der Kultivierung zur Ausbreitung und Durchdringung der Matrix mit Zellen. Diese bildeten untereinander ein Netzwerk aus, was zur Verdichtung der Gewebekonstrukte und zu einer stärkeren mechanischen Belastung der Zellen führte, sodass die Posts aufeinander zu

gebeugt wurden. Wie bereits früher beschrieben, spielte bei der Ausbildung kontraktile Herzmuskelgewebe die Anwesenheit von Nicht-Kardiomyozyten eine große Rolle (Naito et al. 2006). Nach 4-5 Tagen konnten Kontraktionen einzelner Zellen beobachtet werden. Durch Degradation und Umgestaltung der extrazellulären Matrix formten sich im Durchmesser etwa 1 mm breite Gewebestreifen, die ab Tag 6-8 begannen kohärent zu schlagen. Durchschnittlich ab Tag 8 kam es zur Ablenkung der Posts, sodass Kontraktionsmessungen optimalerweise zwischen Tag 14 und 21 durchgeführt wurden. In der histologischen Analyse der Konstrukte zeigte sich eine homogene Verteilung der Zellen über den gesamten FBME-Durchmesser sowie eine hohe Zelldichte von α -Aktinin-positiven, parallel längsausgerichteter Kardiomyozyten mit gut ausgebildeter Sarkomerstruktur (siehe Abbildung 3.26 A). Ebenso konnte eine homogene und effiziente virale Transduktion (GFP-Epifluoreszenz) beschrieben werden (siehe Abbildung 3.26 B). Sowohl die normale Entwicklung als auch die Histologie gaben keinen Anhaltspunkt für Virustoxizität.

Die Entwicklung der FBMEs im Kulturverlauf wurde zwischen Tag 6 und 18 durch die video-optischen Messungen (siehe Kapitel 3.7.3.1) dokumentiert. Darüber konnte ein kleiner Größenunterschied der Kontrollvirus-Gruppe zu den anderen beiden Gruppen (siehe Abbildung 3.29 D) festgestellt werden. Der Längenunterschied zur Kontrolle ist wahrscheinlich auf die Virusbehandlung zurückzuführen, der Unterschied zur AAV6-sh β_1 -AR-Gruppe möglicherweise auf die verbesserte Kontraktilität dieser Konstrukte. Über die Kulturdauer manifestierte sich eine erhöhte Kraft und FS der AAV6-sh β_1 -AR-Gruppe gegenüber den Kontrollgruppen. Im direkten Vergleich beider Kontrollgruppen hinsichtlich der kontraktilen Parameter wie Kraft, FS, Frequenz konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden. Anhand dieser Entwicklung kann ebenfalls von einer geringgradigen AAV-vermittelten Virustoxizität ausgegangen werden.

4.3.3 Effekte der β_1 -AR Downregulation im FBME-Modell

4.3.3.1 Basale Charakterisierung und β -adrenerge Stimulation

In den funktionellen Analysen durch das video-optische und *IonOptix*-System zeigten die AAV6-sh β_1 -AR-Konstrukte schon in der Grundcharakterisierung unter

basalen Bedingungen (1,8 mM Calcium) eine unerwartete erhöhte Kraft (+45%) über fast den gesamten Kulturverlauf (Tag 8-18) gegenüber den mit Kontrollvirus behandelten und den unbehandelten FBMEs. Analog dazu war die in der *IonOptix*-Analyse bestimmte FS erhöht. Gleichzeitig hatte der β -AR-Agonist Isoprenalin (100 nM) einen größeren inotropen Effekt in AAV6-sh β_1 -AR FBMEs als in den Kontrollgruppen (Δ FS: 121% in sh β_1 -AR, 36% in shKontrollen, 80% in Kontrollen).

Normalerweise hätte man aufgrund der Downregulation der β_1 -AR zum einen eine Verminderung der Schlagfrequenz unter β -adrenerger Stimulation und zum anderen eine reduzierte Kraft (bzw. FS) der Konstrukte erwartet, weshalb diese beiden Ergebnisse im Folgendem diskutiert werden sollen.

Eine mögliche Ursache für die in der video-optischen Analyse beobachtete und unerwartete konzentrationsabhängige Frequenzzunahme unter steigenden Isoprenalinkonzentrationen in den β_1 -AR *Knockdown*-FBMEs (siehe Abbildung 3.31 C) könnte sein, dass der Isoprenalineffekt vor allem durch die Stimulation der β_2 -AR verursacht wurde und diese somit die Downregulation der β_1 -AR überlagerten. Jedoch war eine kompensatorische Hochregulation von β_2 -AR aufgrund folgender Beobachtungen unwahrscheinlich. Zum einen konnte durch die Genexpressionsanalyse eine Gegenregulation der β_2 -AR ausgeschlossen werden. Zum anderen ergab die Bestimmung der β -Adrenozeptorendichte mit dem nicht selektiven Radioliganden [3 H]-CGP 12177 keinen Hinweis auf einen Anstieg der β_2 -AR.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Downregulation der β_1 -AR von mehr als 70% möglicherweise unzureichend war bzw. dass die Anzahl der verbliebenen Rezeptoren ausreichend war, um die chronotrope Antwort in den Gewebekonstrukten zu vermitteln. Diese Beobachtung steht in direkter Übereinstimmung mit der für Ratten beschriebenen Rezeptorreserve der β_1 -AR, wodurch bereits durch eine 15%ige Besetzung der Rezeptoren etwa 90% der maximalen Kontraktionskraft ausgelöst werden kann (Brown et al. 1992).

4.3.3.2 Genexpressionsanalyse

Wodurch konnte die gesteigerte Kontraktilität in den β_1 -AR *Knockdown*-FBMEs erklärt werden? Im Rahmen dieser Arbeit wurde dieses unerwartete Ergebnis durch eine Genexpressionsanalyse mittels DNA-Mikroarray-Technologie näher untersucht, um darüber Hinweise bzw. potentielle Ansatzpunkte für weiterführende Untersuchungen zu erhalten. Dabei zeigte sich zunächst, dass die Genexpressionsprofile der untersuchten FBME-Gruppen sehr ähnlich waren, insbesondere unterschieden sich die mit Kontrollvirus behandelten kaum von den unbehandelten FBMEs. Darüber konnte schließlich bestätigt werden, dass die Virus-vermittelte Toxizität ausgehend von rAAV6 bzw. der Einfluss der shRNA-Expression sehr gering war.

Dagegen wurden im Vergleich sh β_1 -AR vs. shKontrolle 286 Gene als differentiell reguliert identifiziert, wobei der Anteil an herunterregulierten Genen größer war, als der der hochregulierten Gene, was das Auftreten möglicher *off-target* Effekte nicht ausschließen lässt. Allgemein ist die Interpretation der Expressionsdaten sehr vorsichtig zu handhaben, da es häufig zur Identifizierung von falsch-positiven aber auch von falsch-negativen Ergebnissen kommen kann, die es durch die Anwendung verschiedenster statistischer Tests zu verhindern gilt (Breitling 2006). Außerdem wurde die Anzahl der differentiell regulierten Gene maßgeblich über den Schwellenwert des FC bestimmt. Demnach würden durch Ansetzen eines strengeren Schwellenwertkriteriums von z. B. $0,5 > FC > 2$ nur noch insgesamt 44 differentiell regulierte Gene erkannt werden (9 hochregulierte bzw. 35 herunterregulierte Gene). Dadurch würden sich die Unterschiede zwischen AAV6-sh β_1 -AR vs. AAV6-shKontrolle minimieren und die Spezifität der sh β_1 -AR zusätzlich unterstrichen werden. Ebenso konnten durch eine weitere Blast-Analyse und Sequenzvergleiche direkte Wechselwirkungen der sh β_1 -AR mit den am stärksten herunterregulierten Genen ausgeschlossen werden.

Grundsätzlich muss an dieser Stelle erwähnt werden, dass die Signalintensitäten des β_1 -AR durch die geringe Expression im Bereich des Hintergrundsignales lagen und somit nicht statistisch auswertbar waren, wodurch eine interne Kontrolle des Arrays bzw. des Experiments nicht möglich war. Jedoch wurde in allen verwendeten Proben der β_1 -AR *Knockdown* zuvor bereits mittels qRT-PCR

nachgewiesen. Außerdem waren unmittelbar mit dem β -adrenergen Signalweg assoziierte Gene wie z. B. der β_2 -Adrenozeptor (Adrb2), die β -adrenerge Rezeptorkinase1 (β ARK1), die SR-Calcium-ATPase (Serca2), Phospholamban (PLB), stimulierende und hemmende Guaninnukleotid-bindende Proteine (Gnas und $G\alpha_{i2}$) nicht differentiell reguliert, die eventuell eine verbesserte Kontraktilität auf den ersten Blick erklärt hätten.

Durch die Auswertung des Arrays und insbesondere der differentiell regulierten Gene ließen sich bis zum jetzigen Zeitpunkt leider noch keine eindeutigen Rückschlüsse auf die Kontraktilitätssteigerung ziehen. Jedoch fiel auf, dass u. a. zwei hypertrophe Gene stark vermindert waren. Zum einen *alpha 1 skeletal muscle Actin* (Acta1, FC=0,47) und *Natriuretic peptide precursor A* (Nppa, FC=0,49), wohingegen andere hypertrophe Gene wie *Natriuretic peptide precursor B* (Nppb) oder *beta-cardiac muscle Myosin heavy chain 7* (Myh7) nicht reguliert waren. Möglicherweise zeigten die AAV6-sh β_1 -AR behandelten FBMEs in einem gewissen Grade antihypertrophe Eigenschaften, die eventuell indirekt zur verbesserten Kontraktilität beitrugen.

Daneben war u. a. der *Regulator of G-Protein signaling 2* (Rgs2, FC=0,41) vermindert exprimiert. Rgs2 ist ein potenter und selektiver Negativregulator des $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_i$ Signalweges, der aber selber keine GTPase-Proteinaktivität gegenüber Gs-Protein gekoppelten Rezeptoren (β_1 -AR) besitzt (Hao et al. 2006), wodurch ein direkter Zusammenhang zur β_1 -AR Downregulation ausgeschlossen werden konnte. Jedoch wird derzeit eine mögliche Interaktion zwischen $G\alpha_s$ und $G\alpha_{q/11}$ oder $G\alpha_i$ -vermittelten Signalwegen in Kardiomyozyten diskutiert (Tsang et al. 2010). Man könnte außerdem vermuten, dass durch die geringere Rgs2-Expression die Signaltransduktion möglicherweise verstärkt über $G\alpha_{q/11}$ erfolgte und darüber vermehrt über den α_1 -Adrenozeptor (α_1 -AR). Entsprechend dazu war der α_{1B} -AR fast zweifach überexprimiert (Adra1b, FC=1,94) und könnte eventuell für die besonderen kontraktilen Eigenschaften mitverantwortlich sein. Durch die Ergebnisse aus zahlreichen Zell-, Tier- und humanen Studien wird vermutet, dass α_1 -AR adaptive und protektive Effekte im Herzen vermitteln (Jensen et al. 2010) wie z. B. positive Inotropie, Gentranskription, Proteinbiosynthese,

Glucosestoffwechsel sowie Hemmung von Zellsterben. Zwar beziehen sich die meisten dieser Untersuchungen vor allem auf den α_{1A} -AR, was jedoch eine Bedeutung von α_{1B} -AR nicht gänzlich ausschließt, zumal der α_{1B} - (60-80%) gegenüber dem α_{1A} -Subtyp (20-40%) in Kardiomyozyten überwiegt (Knowlton et al. 1993). Andererseits ist allgemein bekannt, dass die chronische Stimulation von α_1 -AR mit Katecholaminen (Phenylephrin) oder die Überexpression von $G_{\alpha_{q/11}}$ zur Hypertrophie-Entwicklung (Xiao et al. 2001) und damit zur kardialen Dysfunktion beitragen (Frey und Olson 2003). In diesem Falle kommt es u. a. zu einem initialen Anstieg von Rgs2 (Hao et al. 2006) sowie zur Hochregulation der typischen Hypertrophie-Marker Acta1, Nppa, Myh6/7 und zur Aktivierung des ERK-Signalweges (Zou et al. 2006). Gleichzeitig können diese hypertrophen Effekte wiederum durch die Überexpression von Rgs2 abgemildert bzw. aufgehoben werden (Zhang et al. 2006; Zou et al. 2006). Wie bereits zuvor beschrieben war Rgs2 jedoch herunterreguliert, weshalb man nicht direkt auf protektive bzw. kontraktilitätssteigernde Eigenschaften durch Rgs2 schließen konnte. Demgegenüber gewinnen α_1 -AR-Agonisten aufgrund ihrer beobachteten Eigenschaften zur Aktivierung von adaptiven und protektiven Mechanismen derzeit immer mehr an Bedeutung als potentielle Kandidaten in der Therapie verschiedener Herzerkrankungen. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* führte eine moderate Aktivierung von α_1 -AR zu einer adaptiven Hypertrophie, Kardioprotektion, Kraftsteigerung. Möglicherweise kommt es durch die β_1 -AR Downregulation zu einer Verschiebung der Signaltransduktion hin zu α_1 -AR, wodurch die kontraktilen Eigenschaften der FBMEs verbessert wurden.

Ebenfalls unterstützend für die verbesserte Kontraktilität könnte die vermehrte Expression der Untereinheiten von Ionenkanälen, wie des Natriumkanals (Scn4b, FC=2,05), des Calciumkanals (Cacna1g, FC=1,96) und des Transkriptionsfaktors Irf5 (FC=2,34) für den Kaliumkanal Kv4.2 wirken. Ebenso deutete die erhöhte Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase Expression (Gpd1, FC=1,96), bedingt durch die verbesserte Kontraktilität, anscheinend auf einen verstärkten Glucosestoffwechsel und einen erhöhten Energieverbrauch hin.

Letztlich bleibt die Interpretation der Daten offen und die Betrachtung möglicher Zusammenhänge zwischen den als differentiell-reguliert identifizierten Genen mit

der erhöhten Kraft rein hypothetisch, sodass eine abschließende Schlussfolgerung nicht möglich ist.

4.4 Anwendung von rAAV9-Vektoren *in vivo*

Das übergeordnete Ziel dieser Arbeit war es, die Grundlagen für einen RNAi-induzierten, langfristigen und effizienten *Knockdown* von Inhibitor-1 bzw. des β_1 -AR im Mäuseherzen durch einen Gentransfer mit Adeno-assoziierten Viren zu etablieren. Die Basis dafür stellten die *in vitro* Untersuchungen dar, die verdeutlicht haben, dass der durch die verschiedenen shRNA-Expressions- und rAAV-shRNA-Vektoren hervorgerufene *Knockdown* durch RNA-Interferenz sowohl transkriptionell als auch translationell effizient und darüber hinaus spezifisch war.

Alleinige Untersuchungen an primären neonatalen Herzzellkulturen oder künstlichen Herzmuskelkonstrukten (FBME) sind zur Beantwortung der Fragestellung nicht ausreichend, da diese artifizielle, isolierte *ex vivo* Systeme darstellen und komplexe regulatorische Vorgänge eines gesamten Organismus nicht widerspiegeln. Um eine potentielle gentherapeutische Anwendung im funktionellen Gesamtbild zu untersuchen, kommt nur der Einsatz im Tiermodell (z. B. im Mausmodell) infrage.

Die shRNA-Sequenzen shI-1 (2) und sh β_1 -AR (1) erwiesen sich *in vitro* am effizientesten, weshalb diese für den Gentransfer mit rAAV9-shRNA-Vektoren verwendet wurden. Die Applikation der Vektoren erfolgte über die laterale Schwanzvene der Mäuse.

4.4.1 Transduktionseffizienz von rAAV9

Um eine robuste und homogene Transduktion des Herzens mittels Adeno-assoziierten Viren zu erzielen, waren die Wahl des Serotyps, die verabreichte Virusmenge sowie der Applikationsweg von großer Bedeutung. Aufgrund des kardialen Tropismus des Serotyps 9 (Inagaki et al. 2006; Pacak et al. 2006; Vandendriessche et al. 2007) wurde dieser für die *in vivo* Versuche verwendet. Durch die Verwendung von herzspezifischen Promotoren wie des CMV-verstärkten MLC-Promotors (siehe Kapitel 3.8.1) kann die Spezifität des kardialen AAV-vermittelten Gentransfers zusätzlich erhöht werden (Müller et al. 2006).

In einem ersten Vorversuch konnte die Effizienz und Herzselektivität des AAV-vermittelten Gentransfers durch den Vektor AAV9-CMV-MLC₂₆₀-eGFP ($2 \cdot 10^{11}$ Vg) an C57BL/6 Mäusen prinzipiell bestätigt werden (siehe Kapitel 3.8.1). Die GFP-Epifluoreszenz war bedingt durch den verwendeten Promotor erfreulicherweise nur im Herzen detektierbar. Jedoch war der Einsatz dieser Art von gewebespezifischen Promotoren für diese Arbeit weniger entscheidend, da diese nicht zur shRNA-Bildung in der Lage sind. Viel wichtiger dagegen war eine effiziente Transkriptionskontrolle der shRNA-Expression, welche nur durch RNA-Polymerase-Promotoren gesteuert werden kann (siehe Kapitel 1.3.3). In neuesten Studien werden inzwischen weiterentwickelte RNA-Promotoren für eine effizientere und organspezifische RNAi-Therapie eingesetzt (siehe dazu Kapitel 4.5).

In den Hauptversuchen zur Downregulation der Zielproteine wurden die entsprechenden AAV9-shRNA-Vektoren den Mäusen systemisch via Schwanzvene appliziert. Dabei kamen verschiedene Virusmengen zur Anwendung (siehe Kapitel 3.8.2): AAV9-shKontrolle (10^{11} - 10^{12} Vg), AAV9-shI-1 ($2,3 \cdot 10^{11}$ - $5 \cdot 10^{11}$ Vg) und AAV9-sh β_1 -AR (10^{12} Vg). Die echokardiographischen Untersuchungen und Herzgewicht/Körpergewicht zeigten keine Anzeichen von AAV-vermittelter Toxizität in den behandelten Tieren.

In der histologischen Analyse der Herzen konnte eine kardiale transmurale Transduktion nachgewiesen werden. Der Größe der GFP-positiven Zellen nach zu urteilen, handelte es sich bei diesen präferentiell um Kardiomyozyten. Diese Beobachtung steht in Übereinstimmung mit dem in der Literatur beschriebenen kardialen Tropismus des AAV9 Subtypen. Da der Inhibitor-1 ubiquitär, also auch in Nicht-Kardiomyozyten, die etwa 30% der Herzmuskelmasse ausmachen, exprimiert wird, kann sogar davon ausgegangen werden, dass der tatsächliche Inhibitor-1 *Knockdown* in den Kardiomyozyten bereits ~50% betragen könnte.

Weiterhin konnte ein heterogenes GFP-Epifluoreszenzsignal beobachtet werden, welches sehr wahrscheinlich auf die unterschiedliche Anzahl von inkorporierten Vektorgenomen zurückzuführen ist (siehe Kapitel 3.8.2.2). Dies deutet auf ein allgemein bekanntes Problem bei allen AAV-basierten gentherapeutischen Ansätzen hin, d. h. dass die Integration des Transgens zufällig erfolgt. Diese

Eigenschaft der verwendeten rAAV-Vektoren ist von Nachteil, da der Integrationslokus die *Knockdown*-Effizienz maßgeblich beeinflussen kann bzw. dadurch auch wichtige zelluläre Gene zerstört werden können (Kurreck 2009). Um zukünftig eine besser vorhersagbare shRNA-Expression zu gewährleisten und unerwünschte Einflüsse regulatorischer Elemente des Insertionsortes zu minimieren, müsste man das Transgen in einen definierten Genlokus, wie z. B. den Rosa26-Lokus, einbringen. In diesen kann das Transgen durch Rekombinase-vermittelten Kassettenaustausch gezielt eingebracht werden. Dadurch kann mit einer einzigen Kopie der shRNA-Expressionskassette eine Genrepression um durchschnittlich 80-95% erzielt werden (Seibler et al. 2005).

Die Effizienz der kardialen Transduktion wurde u. a. durch die Bestimmung der Vektorgenome (siehe Kapitel 3.8.2.3) und anhand des GFP-Signals in den verschiedenen Organen bestimmt (siehe Kapitel 3.8.2.1). Demnach konnte die GFP-Expression im Immunoblot qualitativ in der Leber, im Herzen und im Skelettmuskel nachgewiesen werden. Eine quantitative Auswertung der GFP-Proteinmengen in den verschiedenen Organen konnte jedoch nicht vorgenommen werden. Diese Ergebnisse der Transduktionseffizienz von rAAV9 decken sich grundsätzlich mit den Angaben anderer Arbeitsgruppen (Müller et al. 2006; Müller et al. 2008; Suckau et al. 2009) und weisen einen kardialen Gentransfer nach.

In diesem Zusammenhang soll ebenfalls auf das am stärksten transduzierte Organ, die Leber, eingegangen werden. Die quantitative Analyse der Virusgenome ergab eine 30-fach stärkere Transduktion der Leber im Vergleich zum Herzen (siehe Kapitel 3.8.2.3). In der Literatur ist das Auftreten hepatotoxischer Effekte durch RNAi beschrieben worden (Grimm et al. 2006). Makroskopisch gab es keine Auffälligkeiten bzw. Anzeichen, die auf Hepatotoxizität hindeuteten. Da jedoch keine weiteren Untersuchungen zur Organtoxizität durchgeführt wurden, können derartige Effekte nicht gänzlich ausgeschlossen werden. Um diese sicher auszuschließen, müsste regelmäßig Serum zur Leberparameter-Analyse entnommen werden.

4.4.2 AAV9-Knockdown-Effizienz und Effekte der Inhibitor-1 Downregulation *in vivo*

Die quantitative Analyse der Inhibitor-1 und β_1 -AR mRNA-Mengen in Gesamtherz-Homogenaten ergab eine mäßige (I-1: ~34%) und keine Downregulation (β_1 -AR) *in vivo*. Als Ursache für das Versagen der etablierten siRNA-Sequenz gegen den β_1 -AR *in vivo* konnte eine Speziesabhängigkeit bezüglich der Maus aufgezeigt werden, die im Kapitel 4.2.6 bereits ausführlich diskutiert wurde.

Die mäßige Downregulation des Inhibitor-1 in unseren Pilotexperimenten wäre zur Überprüfung der Wirksamkeit eines therapeutischen *Knockdowns* wahrscheinlich nicht ausreichend. Folgende Faktoren kommen als Ursachen in Betracht und sollten in zukünftigen Experimenten optimiert werden: (1) die geringe Vektordosis, (2) die Applikationsart und dadurch bedingt (3) eine mäßige kardiale Transduktion sowie (4) die Effizienz der si/shRNA-Sequenz als solche.

Diese Faktoren werden in den folgenden Abschnitten diskutiert:

Die Transduktionseffizienz wird maßgeblich durch die Virusdosis bestimmt. In dieser Arbeit führte die Injektion von $\sim 3 \cdot 10^{11}$ Vg/Maus zu einer transmuralen Transduktion der Herzen (bevorzugt Kardiomyozyten) und darüber zu einer Reduktion der kardialen Inhibitor-1 Expression um ein Drittel. Zukünftig könnte durch eine Erhöhung der Virusmenge von AAV9-shI-1 auf 10^{12} bis 10^{13} Vg pro Tier, bei ausreichend hohen Virustitern, höchstwahrscheinlich eine verbesserte Transduktion und damit eine stärkere Inhibitor-1 Downregulation erzielt werden. So konnte für die Applikation von 10^{12} Vg des AAV9-sh β_1 -AR-Vektors anhand des GFP-Markers bereits eindeutig eine gesteigerte Transduktionsrate gezeigt werden (siehe Kapitel 3.8.2.2). Andererseits wurde in anderen Studien gezeigt, dass Virusmengen von 10^{10} - 10^{12} Vg pro Tier bereits ausreichend für eine erfolgreiche Genübertragung sind (Wang et al. 2005; Bish et al. 2008). Jedoch scheinen insbesondere für inhibitorische oder Exon-skipping-Ansätze relativ hohe Dosen benötigt zu werden (Gregorevic et al. 2004).

Die intravenöse, speziell die Schwanzveneninjektion, ist die am häufigsten gewählte Applikationsart und wird in der Literatur allgemein mit guten Ergebnissen beschrieben (Suckau et al. 2009). Der Vorteil liegt neben der hohen Transduktionseffizienz auch in der einfachen Handhabung der nicht invasiven

Methode. Alternativ kann der Gentransfer auch durch Injektion in die Jugularvene (Pacak et al. 2006), durch direkte intramyokardiale Injektion (Svensson et al. 1999; Chu et al. 2003; Rengo et al. 2009) und durch intrakoronare Injektion (Champion et al. 2003; Iwatate et al. 2003; Iwanaga et al. 2004) erfolgen. Zusätzlich können diese Methoden durch das Abklemmen der Aorta, der Pulmonalarterie oder durch Herzstillstand begleitet werden (Müller et al. 2007). Dadurch wird die Verweildauer der viralen Vektoren am gewünschten Wirkungsort, dem Myokard, verlängert und darüber organspezifisch eine gesteigerte Genexpression erzielt. Jedoch scheint der Nutzen dieser invasiven Methoden fraglich, da die Prozeduren als solche mit einem hohen Risiko behaftet sind und die Transduktionseffizienz dadurch nicht zwingend verbessert wird.

Neben der Applikationsart gibt es andere Ansätze wie z. B. die Verwendung von sogenannten *Microbubbles*. Dabei handelt es sich um Bläschen, die mit Viruspartikeln beladen werden können, wodurch lokal höhere Viruskonzentrationen erzielt werden sollen. Ultraschall führt zur Zerstörung der *Microbubbles* und damit zur lokalen Freisetzung der Viruspartikel und gleichzeitig zur Steigerung der Kapillarpermeabilität (Müller et al. 2008). Inwiefern die Transduktionsrate durch eine andere Applikationsroute bzw. Technik noch verbessert werden kann, bleibt ungeklärt. Außerdem wäre die intravenöse Verabreichung besonders im Hinblick auf eine potentielle klinische Anwendung anzustreben.

Schließlich muss auch die Wirksamkeit der von uns etablierten siRNA-Sequenzen gegen den Inhibitor-1 als Ursache für die mäßige Downregulation in Betracht gezogen werden. Möglicherweise war deren Effizienz zu gering und die Evaluation der Zielsequenzen hätte unter strengeren, definierteren Bedingungen erfolgen sollen, d. h. die entsprechende Sequenz hätte *in vitro* eine Reduktion der Proteinmenge von >90% erzielen müssen.

Die Ergebnisse der Effekte der Inhibitor-1 Downregulation, insbesondere die funktionellen Auswirkungen, sind dennoch vielversprechend. Selbst die mäßige Verminderung des Inhibitor-1 ging mit leichten Veränderungen der Herzfunktion einher. So war die positiv inotrope Antwort in den AAV9-shI-1 Tieren nach akuter β -adrenerger Stimulation mit Dobutamin tendenziell vermindert, während die

basale Herzfrequenz und Kontraktilität (FAS) unverändert waren (siehe Kapitel 3.8.2.5). Diese Daten sind mit Befunden in den Inhibitor-1 Knockout-Mäusen gut vereinbar (siehe Kapitel 1.2.4). In diesen Tieren war die Inhibitor-1 Genabschaltung ebenfalls mit einer unveränderten basalen Herzfunktion *in vivo* sowie mit einer Desensitivierung gegenüber β -adrenerger Stimulation mit Isoprenalin *in vitro* assoziiert (El-Armouche et al. 2008). In Übereinstimmung zu der verminderten Ansprechbarkeit durch Katecholamine konnte in den Mäusen außerdem ein Hinweis auf eine geringere Phosphorylierung von PLB (Ser16) detektiert werden (siehe Kapitel 3.8.2.6). PLB ist neben RyR2 ein wichtiges Phospho-Effektorprotein, welches insbesondere für die Untersuchung funktioneller Veränderungen durch Inhibitor-1 geeignet ist. Analog dazu zeigten auch Inhibitor-1 Knockout-Mäuse auf molekularer Ebene eine verminderte Phosphorylierung dieser beiden Regulatorproteine (El-Armouche et al. 2008). Aufgrund der niedrigen Anzahl behandelter Tiere handelte es sich bei den beschriebenen Veränderungen um Tendenzen, die dringend in weiterführenden Untersuchungen bestätigt werden müssen. Jedoch konnte erstmalig eine funktionelle Downregulation des Inhibitor-1 auf Grundlage eines RNAi-basierten, AAV-vermittelten Gentransfers gezeigt werden.

Insgesamt bilden diese Vorarbeiten, trotz der relativ niedrigen Dosis, eine gute Basis für weiterführende Untersuchungen des Inhibitor-1 *Knockdowns* im Mäuseherzen. Des Weiteren deutet die präferentielle Transduktion von Kardiomyozyten durch AAV9 darauf hin, dass der tatsächliche Inhibitor-1 *Knockdown* in den Kardiomyozyten höher ist und durch eine Dosiserhöhung steigerbar ist. Unterstützt wird dieses Ergebnis weiterhin durch die funktionellen Untersuchungen, in denen ein verminderter Kraftanstieg nach Dobutamingabe in den mit AAV9-sh-I1 behandelten Tieren aufgezeigt wurde.

4.5 Ausblick

Der Erfolg einer gentherapeutischen RNAi *in vivo* wird durch das Zusammenspiel vieler Faktoren, wie der Auswahl der optimalen Zielsequenz, einem starken Promotor zur shRNA-Expression und der Effizienz des Gentransfers, bestimmt. Dass die Kombination der AAV-vermittelten RNAi grundsätzlich möglich und

erfolgreich ist, konnte schon in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden (Fechner et al. 2008; Chen et al. 2009; Suckau et al. 2009).

Im Hinblick auf die bisher erzielte Downregulation des Inhibitor-1 *in vivo* wird deutlich, dass für eine zukünftige gentherapeutische Behandlung eine Steigerung der *Knockdown*-Effizienz und die Verbesserung des kardialen Gentransfers erforderlich sind. So muss in einer Dosisfindungsstudie (z. B. mit $3 \cdot 10^{11}$, 10^{12} , $3 \cdot 10^{12}$ Vg/Maus) die optimale Vektordosis für eine effiziente Herunterregulation ermittelt werden. Die Quantifizierung des *Knockdowns* sollte optimalerweise über einen bestimmten Zeitverlauf (z. B. 7, 14 und 28 Tage) in den verschiedenen Organen auf mRNA- und Proteinebene erfolgen.

Sollte trotz einer erfolgreichen und hohen Transduktionseffizienz mit rAAV9-Vektoren, die Inhibitor-1 Inaktivierung nicht ausreichend sein, könnten in einem alternativen Ansatz neue Zielsequenzen vom sogenannten miRNA-Typ etabliert werden. Solche shRNAs vom miRNA-Typ stellen eine Weiterentwicklung im Hinblick auf Effizienzsteigerung und Spezifität dar (Zeng et al. 2002; Silva et al. 2005). Dabei wird die natürlich vorkommende miRNA-Sequenz durch eine künstliche shRNA ersetzt (Zeng et al. 2002), woraufhin die RNA-Polymerase II zunächst ein langes Primärtranskript generiert, welches durch Drosha und Dicer analog zur miRNA zu einer funktionellen siRNA prozessiert wird. Für derartige Konstrukte konnte eine Effizienzsteigerung bis zu 80% beobachtet werden (Boden et al. 2004). Weiterhin besteht die Möglichkeit, gleichzeitig andere proteinkodierende Sequenzen stromaufwärts der miRNA-Umgebung, wie ein Reportergen (GFP), zu exprimieren. Außerdem können ausgehend von nur einem einzigen Transkript durch polycistronische Expression mehrere shRNAs vom miRNA-Typ gebildet werden (Chung et al. 2006). Dadurch können entweder mehrere Gene gleichzeitig bzw. ein Zielgen kann durch mehrere shRNAs herunterreguliert werden. Ein weiterer Nutzen ergibt sich aus der Möglichkeit zelltypspezifische Promotoren zu verwenden. Im Gegensatz zu den Polymerase III Promotoren, die eine starke ubiquitäre Expression vermitteln, kann durch die Verwendung verschiedener Polymerase II Promotoren die Expression unter spezifischen Bedingungen oder in speziellen Zelltypen erreicht werden (Rao et al. 2006).

Bei erfolgreicher Etablierung des Modells könnte im nächsten Schritt die Wirksamkeit der gentherapeutischen Abschaltung von Inhibitor-1 im Kontext einer induzierten Herzinsuffizienz in der Maus untersucht und diese sowohl mit einer Genabschaltung des β_1 -AR als auch mit einer konventionellen β -Blocker Therapie verglichen werden. In diesem vergleichenden Ansatz könnte erstmals überprüft werden, ob eine Hemmung von Inhibitor-1 als eine Art partielle „subzelluläre β -Blockade“ spezifischer den pathologischen Aspekten einer Herzinsuffizienz entgegenwirkt.

Neben diesem gentherapeutischen Ansatz wäre, insbesondere im Hinblick auf eine zukünftige klinische Bedeutung der Inhibitor-1 Inaktivierung, ein pharmakologischer Ansatz denkbar und wünschenswert. So könnte z. B. durch eine direkte und spezifische Hemmung mit niedermolekularen Substanzen die Virusapplikation vermeidbar gemacht und damit die klinische Sicherheit erhöht werden. Aus verschiedenen Gründen stehen jedoch bis dato keine solchen Substanzen zur Verfügung, wobei derzeit intensiv an deren Identifizierung geforscht wird und bereits >4000 Substanzen getestet wurden (laufende Dissertation von Frau Hanni Sotoud).

5 Zusammenfassung

Einen zentralen Bestandteil in der Pharmakotherapie der chronischen Herzinsuffizienz stellt die Blockade von myokardialen β -Adrenozeptoren (AR) durch sogenannte β -Blocker dar. Da unter β -Blocker-Gabe alle Prozesse, die der Stimulation von β_1 -AR nachgeschaltet sind, blockiert werden, ist dieser Therapieansatz unter Umständen mit unerwünschten Nebenwirkungen und Unverträglichkeiten verbunden. Kürzlich konnte der Phosphatase-Inhibitor-1 (Inhibitor-1) als ein distaler und positiv-wirkender Modulator der β -AR Signalkaskade identifiziert werden. Die genetische Defizienz von Inhibitor-1 in Mäusen vermittelte einen eindrücklichen Schutz vor Katecholamin-induzierter Herzinsuffizienz und Arrhythmien, ohne jedoch die basale Kontraktionskraft oder die Herzfrequenz zu beeinflussen. Somit scheint eine spezifische Hemmung von Inhibitor-1, im Sinne einer „distalen β -Blockade“, möglicherweise selektiver den pathologischen Aspekten einer Herzinsuffizienz entgegenwirken zu können. Da derzeit keine niedermolekularen Substanzen für eine spezifische pharmakologische Inaktivierung von Inhibitor-1 zur Verfügung stehen, war es das Ziel dieser Arbeit, die Grundlagen für einen herzspezifischen Inhibitor-1 *Knockdown* im Tiermodell, insbesondere im Hinblick für eine potentielle gentherapeutische Anwendung, zu schaffen. Des Weiteren sollte der Ansatz einen direkten Vergleich zur spezifischen Genabschaltung des β_1 -AR ermöglichen.

Es wurden zunächst siRNA-Sequenzen gegen den Inhibitor-1 und den β_1 -AR *in silico* konstruiert und synthetisiert. Deren biologische Effizienz wurde anschließend in Form von exogen applizierter siRNA und endogen produzierter shRNA in verschiedenen Zellsystemen getestet. Um optimale Testbedingungen zu gewährleisten, wurden Zelllinien generiert, die jeweils eines der beiden Proteine stabil exprimierten. Die *Knockdown*-Effekte wurden sowohl auf mRNA- (mittels qRT-PCR) als auch auf Proteinebene (mittels Western Blot bzw. Bindungsassay) quantifiziert und mit den entsprechenden wirkungslosen Kontroll-siRNAs verglichen. Dabei konnte eine Überlegenheit des shRNA-vermittelten *Knockdowns* gegenüber der exogen applizierten siRNA anhand einer Reduktion der mRNA- und Proteinkonzentration von Inhibitor-1 und β_1 -AR um bis zu 80% aufgezeigt

werden. Die jeweils effizientesten Sequenzen wurden zur Generierung der rAAV-shRNA-Vektoren für den Gentransfer verwendet. Auf Grund der besseren *in vitro* Transduktionseffizienz wurden für die Evaluation in Zellsystemen zunächst Vektoren vom Serotyp 6 verwendet, wodurch die Inhibitor-1 Proteinmenge um ca. 50% und die β_1 -AR Proteinmenge um ca. 65% vermindert werden konnten. Zusätzlich wurde der rAAV-vermittelte β_1 -AR *Knockdown* in einem hochsensitiven *in vitro* Testsystem künstlicher Herzmuskelgewebe, den Fibrin-basierten Mini-EHTs (FBMEs) untersucht. Die Transduktionseffizienz in FBMEs betrug nahezu 100% und führte zu einer β_1 -AR Downregulation von >70%. Unerwarteterweise entwickelten diese Konstrukte eine verbesserte Kontraktilität.

In vivo konnte der Gentransfer von shRNA-exprimierenden rAAV9-Vektoren erfolgreich an C57/BL6-Mäusen durchgeführt werden, ohne dass sich konkrete Hinweise auf eine AAV- und/oder eine shRNA-vermittelte kardiale Toxizität erkennen ließen. So konnte, trotz relativ geringer Virusmengen ($\sim 3 \cdot 10^{11}$ Vg/Maus), die kardiale Inhibitor-1 Expression im Gesamtherzen um etwa ein Drittel reduziert werden. Die funktionelle Analyse dieser Tiere mittels Echokardiographie *in vivo* zeigte eine Tendenz zur Desensibilisierung gegenüber akuter β -adrenerger Stimulation, welche sich durch einen verminderten Anstieg der Herzkraft nach Dobutamingabe darstellte. Passend dazu erschien die Phosphorylierung von PLB (Ser16) vermindert. Diese Beobachtungen decken sich sehr gut mit Befunden in Inhibitor-1 Knockout-Mäusen und sprechen grundsätzlich für eine erfolgreiche Etablierung dieses Ansatzes. Allerdings waren die Versuche auf Grund der geringen Anzahl an untersuchten Tieren nicht statistisch signifikant und müssen in Zukunft optimiert werden.

Insgesamt konnte durch diese Arbeit eine sehr gute Basis für eine zukünftige Überprüfung der Wirksamkeit einer therapeutischen, AAV-vermittelten Inhibitor-1 Genausschaltung im Kontext einer experimentell induzierten Herzinsuffizienz geschaffen werden. Eine protektive Wirkung der Inhibitor-1 Herunterregulation auf den Verlauf der experimentellen Herzinsuffizienz könnte den Weg für die Entwicklung klinisch anwendbarer Ansätze zur therapeutischen Modulation dieser vielversprechenden Zielstruktur ebnen.

6 Summary

A key component in the pharmacotherapy of chronic heart failure is the permanent blockade of myocardial β -adrenoceptors (AR) by so called β -blockers. After β -blocker administration all processes downstream of the β_1 -AR are blocked, which may be associated in part with undesirable side effects and incompatibilities. Recently the protein phosphatase-1 inhibitor-1 (inhibitor-1) was identified as a distal and positive-acting modulator of β -AR signaling. Notably, genetic ablation of inhibitor-1 in mice resulted in an impressive protection from catecholamine-induced heart failure and arrhythmias, without affecting basal contractile force or heart rate. Thus a specific inhibition of inhibitor-1, resembling kind of “distal β -blockade”, may counteract more specifically the pathological aspects of heart failure. However, small molecules for a pharmacological inactivation of inhibitor-1 are not available yet. Therefore this study aimed to establish the experimental conditions for a successful inhibitor-1 knockdown in the mouse heart, particularly in respect of a future gene therapy application. Furthermore, this approach should allow a head-to-head comparison with specific gene silencing of the β_1 -AR.

First, siRNA sequences targeting specifically the inhibitor-1 and the β_1 -AR were designed *in silico* and synthesized commercially. The knockdown efficiency was then tested by exogenously applied siRNA and compared with endogenously produced shRNA in different cell systems. To ensure optimal experimental conditions, stable cell lines either expressing inhibitor-1 or the β_1 -AR were generated. Knockdown efficiency was quantified both on mRNA (by qRT-PCR) and on protein level (by western blot and binding assay, respectively) and compared to the corresponding non-silencing control siRNAs. The shRNA-mediated knockdown approach was superior to the exogenously administered siRNA, showing a reduction of inhibitor-1 and β_1 -AR up to 80%. The most efficient sequences were used to generate rAAV-shRNA vectors for gene transfer. Due to stronger *in vitro* transduction efficiency vectors of the serotype 6 were used for the *in vitro* evaluation, whereby the inhibitor-1 and the β_1 -AR protein levels were reduced by about 50% and 65%, respectively. Moreover, rAAV-mediated β_1 -AR knockdown was investigated in a highly sensitive *in vitro* test system of artificial

heart muscle tissue constructs in fibrin-based mini-EHTs (FBMEs). Transduction efficiency in FBMEs was almost 100% resulting in a β_1 -AR downregulation >70%, whereby these constructs unexpectedly exhibited higher force generation and higher response to β -AR stimulation.

In vivo, gene transfer by shRNA-expressing rAAV9 vectors was successfully applied in C57/BL6 mice, without any evidence of AAV- and/or shRNA-mediated cardiac toxicity. By this means, cardiac inhibitor-1 expression in the total heart was reduced about one third, despite using relatively low amounts of virus ($\sim 3 \times 10^{11}$ vg/mouse). Functional analysis of these mice by echocardiography revealed indeed a tendency to desensitization against β -adrenergic stimulation, as indicated by a reduced inotropic response to acute dobutamine stimulation. Similarly phosphorylation of the inhibitor-1 downstream target and SERCA-pump regulator phospholamban (at Ser16) tended to be reduced. These observations are well compatible with the cardiac phenotype in inhibitor-1 knockout mice and suggest obviously a successful establishment of this approach. However, these results did not reach statistical significance due to the small number of animals and have to be further improved in the future.

Overall, this study established the experimental conditions to test the potential benefits of an AAV-mediated inhibitor-1 knockdown *in vivo* in the context of pre-existing heart failure. A protective effect of inhibitor-1 knockdown on the course of heart failure could pave the way for the development of clinically applicable approaches to therapeutic modulation of this promising target structure.

7 Literaturverzeichnis

- (1991). "Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators." *N Engl J Med* 325: 293-302.
- (1999a). "The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial." *Lancet* 353: 9-13.
- (1999b). "Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF)." *Lancet* 353: 2001-2007.
- Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohmmmed A, Malhotra P, Bhatnagar RK und Mukherjee SK (2003). "RNA interference: biology, mechanism, and applications." *Microbiol Mol Biol Rev* 67: 657-685.
- Aitken A und Cohen P (1982). "Isolation and characterisation of active fragments of protein phosphatase inhibitor-1 from rabbit skeletal muscle." *FEBS Lett* 147: 54-58.
- Aktories K, Hofmann F und Starke K (2008). Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; begündet von W. Forth, D. Henschler, W. Rummel, URBAN & Fischer.
- Anderson EM, Birmingham A, Baskerville S, Reynolds A, Maksimova E, Leake D, Fedorov Y, Karpilow J und Khvorova A (2008). "Experimental validation of the importance of seed complement frequency to siRNA specificity." *Rna* 14: 853-861.
- Atchison RW, Casto BC und Hammon WM (1965). "Adenovirus-Associated Defective Virus Particles." *Science* 149: 754-756.
- Bartlett JS, Wilcher R und Samulski RJ (2000). "Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors." *J Virol* 74: 2777-2785.
- Beaton A, Palumbo P und Berns KI (1989). "Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein." *J Virol* 63: 4450-4454.
- Bers DM (2002). "Cardiac excitation-contraction coupling." *Nature* 415: 198-205.
- Biel M, Schneider A und Wahl C (2002). "Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation." *Trends Cardiovasc Med* 12: 206-212.
- Birmingham A, Anderson EM, Reynolds A, Ilsley-Tyree D, Leake D, Fedorov Y, Baskerville S, Maksimova E, Robinson K, Karpilow J, Marshall WS und Khvorova A (2006). "3' UTR seed matches, but not overall identity, are associated with RNAi off-targets." *Nat Methods* 3: 199-204.
- Bish LT, Morine K, Sleeper MM, Sanmiguel J, Wu D, Gao G, Wilson JM und Sweeney HL (2008). "Adeno-associated virus (AAV) serotype 9 provides global cardiac gene transfer superior to AAV1, AAV6, AAV7, and AAV8 in the mouse and rat." *Hum Gene Ther* 19: 1359-1368.
- Boden D, Pusch O, Lee F, Tucker L, Shank PR und Ramratnam B (2003). "Promoter choice affects the potency of HIV-1 specific RNA interference." *Nucleic Acids Res* 31: 5033-5038.
- Boden D, Pusch O, Silbermann R, Lee F, Tucker L und Ramratnam B (2004). "Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins." *Nucleic Acids Res* 32: 1154-1158.
- Bohm M, Gierschik P, Jakobs KH, Pieske B, Schnabel P, Ungerer M und Erdmann E (1990). "Increase of Gi alpha in human hearts with dilated but not ischemic cardiomyopathy." *Circulation* 82: 1249-1265.
- Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M und Speed TP (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." *Bioinformatics* 19: 185-193.
- Bouvy ML, Heerdink ER, Leufkens HG und Hoes AW (2003). "Predicting mortality in patients with heart failure: a pragmatic approach." *Heart* 89: 605-609.
- Bowditch HP (1871). "Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen." *Ber Sächs Ges (Akad) Wis* 23: 652-689.

- Breitling R (2006). "Biological microarray interpretation: the rules of engagement." *Biochim Biophys Acta* 1759: 319-327.
- Brennecke J, Stark A, Russell RB und Cohen SM (2005). "Principles of microRNA-target recognition." *PLoS Biol* 3: e85.
- Bristow MR (2000). "beta-adrenergic receptor blockade in chronic heart failure." *Circulation* 101: 558-569.
- Brodde OE, Bruck H und Leineweber K (2006). "Cardiac adrenoceptors: physiological and pathophysiological relevance." *J Pharmacol Sci* 100: 323-337.
- Brodde OE und Michel MC (1999). "Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart." *Pharmacol Rev* 51: 651-690.
- Brown L, Deighton NM, Bals S, Sohlmann W, Zerkowski HR, Michel MC und Brodde OE (1992). "Spare receptors for beta-adrenoceptor-mediated positive inotropic effects of catecholamines in the human heart." *J Cardiovasc Pharmacol* 19: 222-232.
- Brummelkamp TR, Bernards R und Agami R (2002). "A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells." *Science* 296: 550-553.
- Buller RM, Janik JE, Sebring ED und Rose JA (1981). "Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication." *J Virol* 40: 241-247.
- Buller RM und Rose JA (1978). "Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells." *J Virol* 25: 331-338.
- Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M und Croce CM (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2999-3004.
- Carmell MA und Hannon GJ (2004). "RNase III enzymes and the initiation of gene silencing." *Nat Struct Mol Biol* 11: 214-218.
- Carrier L (2007). "Cardiac myosin-binding protein C in the heart." *Arch Mal Coeur Vaiss* 100: 238-243.
- Casto BC, Atchison RW und Hammon WM (1967). "Studies on the relationship between adeno-associated virus type I (AAV-1) and adenoviruses. I. Replication of AAV-1 in certain cell cultures and its effect on helper adenovirus." *Virology* 32: 52-59.
- Champion HC, Georgakopoulos D, Haldar S, Wang L, Wang Y und Kass DA (2003). "Robust adenoviral and adeno-associated viral gene transfer to the in vivo murine heart: application to study of phospholamban physiology." *Circulation* 108: 2790-2797.
- Chen CC, Sun CP, Ma HI, Fang CC, Wu PY, Xiao X und Tao MH (2009). "Comparative study of anti-hepatitis B virus RNA interference by double-stranded adeno-associated virus serotypes 7, 8, and 9." *Mol Ther* 17: 352-359.
- Chen CZ, Li L, Lodish HF und Bartel DP (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." *Science* 303: 83-86.
- Chirmule N, Probert K, Magosin S, Qian Y, Qian R und Wilson J (1999). "Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans." *Gene Ther* 6: 1574-1583.
- Chiu YL und Rana TM (2002). "RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA." *Mol Cell* 10: 549-561.
- Chiu YL und Rana TM (2003). "siRNA function in RNAi: a chemical modification analysis." *Rna* 9: 1034-1048.
- Choung S, Kim YJ, Kim S, Park HO und Choi YC (2006). "Chemical modification of siRNAs to improve serum stability without loss of efficacy." *Biochem Biophys Res Commun* 342: 919-927.
- Chu D, Sullivan CC, Weitzman MD, Du L, Wolf PL, Jamieson SW und Thistlethwaite PA (2003). "Direct comparison of efficiency and stability of gene transfer into the mammalian heart

- using adeno-associated virus versus adenovirus vectors." *J Thorac Cardiovasc Surg* 126: 671-679.
- Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB und Turner DL (2006). "Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155." *Nucleic Acids Res* 34: e53.
- Ciechanover A und Schwartz AL (1989). "How are substrates recognized by the ubiquitin-mediated proteolytic system?" *Trends Biochem Sci* 14: 483-488.
- Cohen P (1989). "The structure and regulation of protein phosphatases." *Annu Rev Biochem* 58: 453-508.
- Cohen P und Cohen PT (1989). "Protein phosphatases come of age." *J Biol Chem* 264: 21435-21438.
- Cohen P, Foulkes JG, Holmes CF, Nimmo GA und Tonks NK (1988). "Protein phosphatase inhibitor-1 and inhibitor-2 from rabbit skeletal muscle." *Methods Enzymol* 159: 427-437.
- Cohen PT (1997). "Novel protein serine/threonine phosphatases: variety is the spice of life." *Trends Biochem Sci* 22: 245-251.
- Cohen PT (2002). "Protein phosphatase 1--targeted in many directions." *J Cell Sci* 115: 241-256.
- Connor JH, Quan H, Oliver C und Shenolikar S (1998). "Inhibitor-1, a regulator of protein phosphatase 1 function." *Methods Mol Biol* 93: 41-58.
- Dalby B, Cates S, Harris A, Ohki EC, Tilkins ML, Price PJ und Ciccarone VC (2004). "Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications." *Methods* 33: 95-103.
- Daniels DM, Shen WY, Constable IJ und Rakoczy PE (2003). "Quantitative model demonstrating that recombinant adeno-associated virus and green fluorescent protein are non-toxic to the rat retina." *Clin Experiment Ophthalmol* 31: 439-444.
- Depaoli-Roach AA, Park IK, Cerovsky V, Csontos C, Durbin SD, Kuntz MJ, Sitikov A, Tang PM, Verin A und Zolnierowicz S (1994). "Serine/threonine protein phosphatases in the control of cell function." *Adv Enzyme Regul* 34: 199-224.
- Despa S, Bossuyt J, Han F, Ginsburg KS, Jia LG, Kutchai H, Tucker AL und Bers DM (2005). "Phospholemman-phosphorylation mediates the beta-adrenergic effects on Na/K pump function in cardiac myocytes." *Circ Res* 97: 252-259.
- Dincer UD, Bidasee KR, Guner S, Tay A, Ozcelikay AT und Altan VM (2001). "The effect of diabetes on expression of beta1-, beta2-, and beta3-adrenoreceptors in rat hearts." *Diabetes* 50: 455-461.
- Egloff MP, Johnson DF, Moorhead G, Cohen PT, Cohen P und Barford D (1997). "Structural basis for the recognition of regulatory subunits by the catalytic subunit of protein phosphatase 1." *Embo J* 16: 1876-1887.
- Eisner DA und Trafford AW (2002). "Heart failure and the ryanodine receptor: does Occam's razor rule?" *Circ Res* 91: 979-981.
- El-Armouche A (2008). Funktion und Regulation des Protein-Phosphatase-Inhibitor-1 im gesunden und kranken Herzen. Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie. Hamburg, Freie Universität. Universität Hamburg.
- El-Armouche A, Bednorz A, Pamminger T, Ditz D, Didie M, Dobrev D und Eschenhagen T (2006). "Role of calcineurin and protein phosphatase-2A in the regulation of phosphatase inhibitor-1 in cardiac myocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 346: 700-706.
- El-Armouche A und Eschenhagen T (2008). "beta-Adrenergic stimulation and myocardial function in the failing heart." *Heart Fail Rev*.
- El-Armouche A, Gocht F, Jaeckel E, Wittkopper K, Peeck M und Eschenhagen T (2007a). "Long-term beta-adrenergic stimulation leads to downregulation of protein phosphatase inhibitor-1 in the heart." *Eur J Heart Fail* 9: 1077-1080.

- El-Armouche A, Pamminger T, Ditz D, Zolk O und Eschenhagen T (2004). "Decreased protein and phosphorylation level of the protein phosphatase inhibitor-1 in failing human hearts." *Cardiovasc Res* 61: 87-93.
- El-Armouche A, Rau T, Zolk O, Ditz D, Pamminger T, Zimmermann WH, Jackel E, Harding SE, Boknik P, Neumann J und Eschenhagen T (2003). "Evidence for protein phosphatase inhibitor-1 playing an amplifier role in beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes." *Faseb J* 17: 437-439.
- El-Armouche A, Singh J, Naito H, Wittkopper K, Didie M, Laatsch A, Zimmermann WH und Eschenhagen T (2007b). "Adenovirus-delivered short hairpin RNA targeting PKCalpha improves contractile function in reconstituted heart tissue." *J Mol Cell Cardiol* 43: 371-376.
- El-Armouche A, Wittkopper K, Degenhardt F, Weinberger F, Didie M, Melnychenko I, Grimm M, Peeck M, Zimmermann WH, Unsold B, Hasenfuss G, Dobrev D und Eschenhagen T (2008). "Phosphatase inhibitor-1-deficient mice are protected from catecholamine-induced arrhythmias and myocardial hypertrophy." *Cardiovasc Res* 80: 396-406.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K und Tuschl T (2001a). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." *Nature* 411: 494-498.
- Elbashir SM, Harborth J, Weber K und Tuschl T (2002). "Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs." *Methods* 26: 199-213.
- Elbashir SM, Lendeckel W und Tuschl T (2001b). "RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs." *Genes Dev* 15: 188-200.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W und Tuschl T (2001c). "Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in Drosophila melanogaster embryo lysate." *Embo J* 20: 6877-6888.
- Elbrecht A, DiRenzo J, Smith RG und Shenolikar S (1990). "Molecular cloning of protein phosphatase inhibitor-1 and its expression in rat and rabbit tissues." *J Biol Chem* 265: 13415-13418.
- Elmen J, Thonberg H, Ljungberg K, Frieden M, Westergaard M, Xu Y, Wahren B, Liang Z, Orum H, Koch T und Wahlestedt C (2005). "Locked nucleic acid (LNA) mediated improvements in siRNA stability and functionality." *Nucleic Acids Res* 33: 439-447.
- Engelhardt S, Hein L, Wiesmann F und Lohse MJ (1999). "Progressive hypertrophy and heart failure in beta1-adrenergic receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 7059-7064.
- Eschenhagen T (2008). "Beta-adrenergic signaling in heart failure-adapt or die." *Nat Med* 14: 485-487.
- Eschenhagen T (2010). "Is ryanodine receptor phosphorylation key to the fight or flight response and heart failure?" *J Clin Invest* 120: 4197-4203.
- Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Doring V, Kalmar P, Hoppner W und et al. (1992). "Increased messenger RNA level of the inhibitory G protein alpha subunit Gi alpha-2 in human end-stage heart failure." *Circ Res* 70: 688-696.
- Eschenhagen T und Zimmermann WH (2005). "Engineering myocardial tissue." *Circ Res* 97: 1220-1231.
- Fechner H, Sipo I, Westermann D, Pinkert S, Wang X, Suckau L, Kurreck J, Zeichhardt H, Müller O, Vetter R, Erdmann V, Tschope C und Poller W (2008). "Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy." *J Mol Med* 86: 987-997.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE und Mello CC (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans." *Nature* 391: 806-811.
- Fisher KJ, Jooss K, Alston J, Yang Y, Haecker SE, High K, Pathak R, Raper SE und Wilson JM (1997). "Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy." *Nat Med* 3: 306-312.

- Frey N und Olson EN (2003). "Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly." *Annu Rev Physiol* 65: 45-79.
- Godwin AR, Stadler HS, Nakamura K und Capecchi MR (1998). "Detection of targeted GFP-Hox gene fusions during mouse embryogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13042-13047.
- Goehring C, Rutschow D, Bauer R, Schinkel S, Weichenhan D, Bekeredjian R, Straub V, Kleinschmidt JA, Katus HA und Müller OJ (2009). "Prevention of cardiomyopathy in delta-sarcoglycan knockout mice after systemic transfer of targeted adeno-associated viral vectors." *Cardiovasc Res* 82: 404-410.
- Gregorevic P, Blankinship MJ, Allen JM, Crawford RW, Meuse L, Miller DG, Russell DW und Chamberlain JS (2004). "Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors." *Nat Med* 10: 828-834.
- Grimm D, Streetz KL, Jopling CL, Storm TA, Pandey K, Davis CR, Marion P, Salazar F und Kay MA (2006). "Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways." *Nature* 441: 537-541.
- Gupta RC, Neumann J, Watanabe AM, Lesch M und Sabbah HN (1996). "Evidence for presence and hormonal regulation of protein phosphatase inhibitor-1 in ventricular cardiomyocyte." *Am J Physiol* 270: H1159-1164.
- Hannon GJ und Rossi JJ (2004). "Unlocking the potential of the human genome with RNA interference." *Nature* 431: 371-378.
- Hansen A, Eder A, Bonstrup M, Flato M, Mewe M, Schaaf S, Aksehirlioglu B, Schworer A, Uebeler J und Eschenhagen T (2010). "Development of a Drug Screening Platform Based on Engineered Heart Tissue." *Circ Res*.
- Hao J, Michalek C, Zhang W, Zhu M, Xu X und Mende U (2006). "Regulation of cardiomyocyte signaling by RGS proteins: differential selectivity towards G proteins and susceptibility to regulation." *J Mol Cell Cardiol* 41: 51-61.
- Hauswirth WW und Berns KI (1977). "Origin and termination of adeno-associated virus DNA replication." *Virology* 78: 488-499.
- Hauswirth WW und Berns KI (1979). "Adeno-associated virus DNA replication: nonunit-length molecules." *Virology* 93: 57-68.
- Hauswirth WW, Lewin AS, Zolotukhin S und Muzyczka N (2000). "Production and purification of recombinant adeno-associated virus." *Methods Enzymol* 316: 743-761.
- He L und Hannon GJ (2004). "MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation." *Nat Rev Genet* 5: 522-531.
- Herzig S und Neumann J (2000). "Effects of serine/threonine protein phosphatases on ion channels in excitable membranes." *Physiol Rev* 80: 173-210.
- Heubach JF, Rau T, Eschenhagen T, Ravens U und Kaumann AJ (2002). "Physiological antagonism between ventricular beta 1-adrenoceptors and alpha 1-adrenoceptors but no evidence for beta 2- and beta 3-adrenoceptor function in murine heart." *Br J Pharmacol* 136: 217-229.
- Higuchi E, Nishi A, Higashi H, Ito Y und Kato H (2000). "Phosphorylation of protein phosphatase-1 inhibitors, inhibitor-1 and DARPP-32, in renal medulla." *Eur J Pharmacol* 408: 107-116.
- Huang FL und Glinsmann WH (1976). "Separation and characterization of two phosphorylase phosphatase inhibitors from rabbit skeletal muscle." *Eur J Biochem* 70: 419-426.
- Inagaki K, Fuess S, Storm TA, Gibson GA, McTiernan CF, Kay MA und Nakai H (2006). "Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8." *Mol Ther* 14: 45-53.
- Inoue H, Nojima H und Okayama H (1990). "High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids." *Gene* 96: 23-28.
- Iwanaga Y, Hoshijima M, Gu Y, Iwatate M, Dieterle T, Ikeda Y, Date MO, Chrast J, Matsuzaki M, Peterson KL, Chien KR und Ross J, Jr. (2004). "Chronic phospholamban inhibition

- prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats." *J Clin Invest* 113: 727-736.
- Iwatate M, Gu Y, Dieterle T, Iwanaga Y, Peterson KL, Hoshijima M, Chien KR und Ross J (2003). "In vivo high-efficiency transcortical gene delivery and Cre-LoxP gene switching in the adult mouse heart." *Gene Ther* 10: 1814-1820.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G und Linsley PS (2003). "Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi." *Nat Biotechnol* 21: 635-637.
- Jackson AL, Burchard J, Leake D, Reynolds A, Schelter J, Guo J, Johnson JM, Lim L, Karpilow J, Nichols K, Marshall W, Khvorova A und Linsley PS (2006). "Position-specific chemical modification of siRNAs reduces "off-target" transcript silencing." *Rna* 12: 1197-1205.
- Jaski BE, Jessup ML, Mancini DM, Cappola TP, Pauly DF, Greenberg B, Borow K, Dittrich H, Zsebo KM und Hajjar RJ (2009). "Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial." *J Card Fail* 15: 171-181.
- Jensen BC, O'Connell TD und Simpson PC (2010). "Alpha-1-adrenergic receptors: Targets for agonist drugs to treat heart failure." *J Mol Cell Cardiol*.
- Jooss K, Yang Y, Fisher KJ und Wilson JM (1998). "Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers." *J Virol* 72: 4212-4223.
- Joseph SS, Lynham JA, Colledge WH und Kaumann AJ (2004). "Binding of (-)-[3H]-CGP12177 at two sites in recombinant human beta 1-adrenoceptors and interaction with beta-blockers." *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 369: 525-532.
- Kannel WB und Belanger AJ (1991). "Epidemiology of heart failure." *Am Heart J* 121: 951-957.
- Kashiwakura Y, Tamayose K, Iwabuchi K, Hirai Y, Shimada T, Matsumoto K, Nakamura T, Watanabe M, Oshimi K und Daida H (2005). "Hepatocyte growth factor receptor is a coreceptor for adeno-associated virus type 2 infection." *J Virol* 79: 609-614.
- Kim DH, Behlke MA, Rose SD, Chang MS, Choi S und Rossi JJ (2005). "Synthetic dsRNA Dicer substrates enhance RNAi potency and efficacy." *Nat Biotechnol* 23: 222-226.
- Kim VN und Nam JW (2006). "Genomics of microRNA." *Trends Genet* 22: 165-173.
- Knowlton KU, Michel MC, Itani M, Shubeita HE, Ishihara K, Brown JH und Chien KR (1993). "The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy." *J Biol Chem* 268: 15374-15380.
- Kobayashi T und Solaro RJ (2005). "Calcium, thin filaments, and the integrative biology of cardiac contractility." *Annu Rev Physiol* 67: 39-67.
- Kotin RM, Linden RM und Berns KI (1992). "Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination." *Embo J* 11: 5071-5078.
- Krek A, Grun D, Poy MN, Wolf R, Rosenberg L, Epstein EJ, MacMenamin P, da Piedade I, Gunsalus KC, Stoffel M und Rajewsky N (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." *Nat Genet* 37: 495-500.
- Krueger U, Bergauer T, Kaufmann B, Wolter I, Pilik S, Heider-Fabian M, Kirch S, Artz-Oppitz C, Isselhorst M und Konrad J (2007). "Insights into effective RNAi gained from large-scale siRNA validation screening." *Oligonucleotides* 17: 237-250.
- Kurreck J (2009). "RNA interference: from basic research to therapeutic applications." *Angew Chem Int Ed Engl* 48: 1378-1398.
- Kyostio SR, Wonderling RS und Owens RA (1995). "Negative regulation of the adeno-associated virus (AAV) P5 promoter involves both the P5 rep binding site and the consensus ATP-binding motif of the AAV Rep68 protein." *J Virol* 69: 6787-6796.

- Laatsch A, Ragozin S, Grewal T, Beisiegel U und Joerg H (2004). "Differential RNA interference: replacement of endogenous with recombinant low density lipoprotein receptor-related protein (LRP)." *Eur J Cell Biol* 83: 113-120.
- Labow MA, Hermonat PL und Berns KI (1986). "Positive and negative autoregulation of the adeno-associated virus type 2 genome." *J Virol* 60: 251-258.
- Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, Lin LZ, Cai CL, Lu MM, Reth M, Platoshyn O, Yuan JX, Evans S und Chien KR (2005). "Postnatal isl1+ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages." *Nature* 433: 647-653.
- Lee RC, Feinbaum RL und Ambros V (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75: 843-854.
- Lewis DL, Hagstrom JE, Loomis AG, Wolff JA und Herweijer H (2002). "Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice." *Nat Genet* 32: 107-108.
- Li L, Lin X, Khvorova A, Fesik SW und Shen Y (2007). "Defining the optimal parameters for hairpin-based knockdown constructs." *Rna* 13: 1765-1774.
- Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song JJ, Hammond SM, Joshua-Tor L und Hannon GJ (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." *Science* 305: 1437-1441.
- Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ und Parker R (2005). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." *Nat Cell Biol* 7: 719-723.
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T und Kranias EG (1994). "Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation." *Circ Res* 75: 401-409.
- Lusby E, Fife KH und Berns KI (1980). "Nucleotide sequence of the inverted terminal repetition in adeno-associated virus DNA." *J Virol* 34: 402-409.
- Lusby EW und Berns KI (1982). "Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome." *J Virol* 41: 518-526.
- Ma JB, Ye K und Patel DJ (2004). "Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain." *Nature* 429: 318-322.
- MacDougall LK, Campbell DG, Hubbard MJ und Cohen P (1989). "Partial structure and hormonal regulation of rabbit liver inhibitor-1; distribution of inhibitor-1 and inhibitor-2 in rabbit and rat tissues." *Biochim Biophys Acta* 1010: 218-226.
- MacDougall LK, Jones LR und Cohen P (1991). "Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban." *Eur J Biochem* 196: 725-734.
- MacIntyre K, Capewell S, Stewart S, Chalmers JW, Boyd J, Finlayson A, Redpath A, Pell JP und McMurray JJ (2000). "Evidence of improving prognosis in heart failure: trends in case fatality in 66 547 patients hospitalized between 1986 and 1995." *Circulation* 102: 1126-1131.
- MacLennan DH und Kranias EG (2003). "Phospholamban: a crucial regulator of cardiac contractility." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 566-577.
- Maier LS und Bers DM (2002). "Calcium, calmodulin, and calcium-calmodulin kinase II: heartbeat to heartbeat and beyond." *J Mol Cell Cardiol* 34: 919-939.
- Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA und Maniatis T (2007). "The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing." *Mol Cell* 27: 435-448.
- Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N und Marks AR (2000). "PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts." *Cell* 101: 365-376.
- McCarty DM, Christensen M und Muzyczka N (1991). "Sequences required for coordinate induction of adeno-associated virus p19 and p40 promoters by Rep protein." *J Virol* 65: 2936-2945.

- McCarty DM, Monahan PE und Samulski RJ (2001). "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis." *Gene Ther* 8: 1248-1254.
- McLaughlin SK, Collis P, Hermonat PL und Muzyczka N (1988). "Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures." *J Virol* 62: 1963-1973.
- McPherson RA, Rosenthal LJ und Rose JA (1985). "Human cytomegalovirus completely helps adeno-associated virus replication." *Virology* 147: 217-222.
- Meister G, Landthaler M, Patkaniowska A, Dorsett Y, Teng G und Tuschl T (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." *Mol Cell* 15: 185-197.
- Mello CC und Conte D, Jr. (2004). "Revealing the world of RNA interference." *Nature* 431: 338-342.
- Mendelson E, Trempe JP und Carter BJ (1986). "Identification of the trans-acting Rep proteins of adeno-associated virus by antibodies to a synthetic oligopeptide." *J Virol* 60: 823-832.
- Miyagishi M, Sumimoto H, Miyoshi H, Kawakami Y und Taira K (2004). "Optimization of an siRNA-expression system with an improved hairpin and its significant suppressive effects in mammalian cells." *J Gene Med* 6: 715-723.
- Monahan PE, Jooss K und Sands MS (2002). "Safety of adeno-associated virus gene therapy vectors: a current evaluation." *Expert Opin Drug Saf* 1: 79-91.
- Mulkey RM, Endo S, Shenolikar S und Malenka RC (1994). "Involvement of a calcineurin/inhibitor-1 phosphatase cascade in hippocampal long-term depression." *Nature* 369: 486-488.
- Müller OJ, Katus HA und Bekerredjian R (2007). "Targeting the heart with gene therapy-optimized gene delivery methods." *Cardiovasc Res* 73: 453-462.
- Müller OJ, Kaul F, Weitzman MD, Pasqualini R, Arap W, Kleinschmidt JA und Trepel M (2003). "Random peptide libraries displayed on adeno-associated virus to select for targeted gene therapy vectors." *Nat Biotechnol* 21: 1040-1046.
- Müller OJ, Leuchs B, Pleger ST, Grimm D, Franz WM, Katus HA und Kleinschmidt JA (2006). "Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors." *Cardiovasc Res* 70: 70-78.
- Müller OJ, Schinkel S, Kleinschmidt JA, Katus HA und Bekerredjian R (2008). "Augmentation of AAV-mediated cardiac gene transfer after systemic administration in adult rats." *Gene Ther* 15: 1558-1565.
- Muzyczka N, Berns, K. I. (2001). *Parvoviridae: The viruses and their replication*. Fields Virology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Myslinski E, Ame JC, Krol A und Carbon P (2001). "An unusually compact external promoter for RNA polymerase III transcription of the human H1RNA gene." *Nucleic Acids Res* 29: 2502-2509.
- Naito H, Melnychenko I, Didie M, Schneiderbanger K, Schubert P, Rosenkranz S, Eschenhagen T und Zimmermann WH (2006). "Optimizing engineered heart tissue for therapeutic applications as surrogate heart muscle." *Circulation* 114: 172-78.
- Nakai H, Storm TA und Kay MA (2000). "Increasing the size of rAAV-mediated expression cassettes in vivo by intermolecular joining of two complementary vectors." *Nat Biotechnol* 18: 527-532.
- Neumann J, Eschenhagen T, Jones LR, Linck B, Schmitz W, Scholz H und Zimmermann N (1997). "Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure." *J Mol Cell Cardiol* 29: 265-272.
- Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC und Watanabe AM (1991). "Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart." *Circ Res* 69: 1450-1457.
- Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Döring V und Kalmar P (1988). "Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure." *Lancet* 2: 936-937.

- Nykanen A, Haley B und Zamore PD (2001). "ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway." *Cell* 107: 309-321.
- Okabe M, Ikawa M, Kominami K, Nakanishi T und Nishimune Y (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." *FEBS Lett* 407: 313-319.
- Pacak CA, Mah CS, Thattaliyath BD, Conlon TJ, Lewis MA, Cloutier DE, Zolotukhin I, Tarantal AF und Byrne BJ (2006). "Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo." *Circ Res* 99: e3-9.
- Packer M, Carver JR, Rodeheffer RJ, Ivanhoe RJ, DiBianco R, Zeldis SM, Hendrix GH, Bommer WJ, Elkayam U, Kukin ML und et al. (1991). "Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group." *N Engl J Med* 325: 1468-1475.
- Parker JS, Roe SM und Barford D (2005). "Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex." *Nature* 434: 663-666.
- Parker JS, Roe SM und Barford D (2006). "Molecular mechanism of target RNA transcript recognition by Argonaute-guide complexes." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71: 45-50.
- Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz JE, Lorenz JN, Bodi I, Weiser D, Hahn H, Carr AN, Syed F, Mavila N, Jha L, Qian J, Marreez Y, Chen G, McGraw DW, Heist EK, Guerrero JL, DePaoli-Roach AA, Hajjar RJ und Kranias EG (2005). "Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1." *Circ Res* 96: 756-766.
- Paule MR und White RJ (2000). "Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III." *Nucleic Acids Res* 28: 1283-1298.
- Perabo L, Buning H, Kofler DM, Ried MU, Girod A, Wendtner CM, Enssle J und Hallek M (2003). "In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display." *Mol Ther* 8: 151-157.
- Pereira DJ, McCarty DM und Muzyczka N (1997). "The adeno-associated virus (AAV) Rep protein acts as both a repressor and an activator to regulate AAV transcription during a productive infection." *J Virol* 71: 1079-1088.
- Qing K, Mah C, Hansen J, Zhou S, Dwarki V und Srivastava A (1999). "Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2." *Nat Med* 5: 71-77.
- Qiu S, Adema CM und Lane T (2005). "A computational study of off-target effects of RNA interference." *Nucleic Acids Res* 33: 1834-1847.
- Rabinowitz JE, Xiao W und Samulski RJ (1999). "Insertional mutagenesis of AAV2 capsid and the production of recombinant virus." *Virology* 265: 274-285.
- Rao MK, Pham J, Imam JS, MacLean JA, Murali D, Furuta Y, Sinha-Hikim AP und Wilkinson MF (2006). "Tissue-specific RNAi reveals that WT1 expression in nurse cells controls germ cell survival and spermatogenesis." *Genes Dev* 20: 147-152.
- Rapundalo ST (1998). "Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates." *Cardiovasc Res* 38: 559-588.
- Rayburn ER und Zhang R (2008). "Antisense, RNAi, and gene silencing strategies for therapy: mission possible or impossible?" *Drug Discov Today* 13: 513-521.
- Rengo G, Lymperopoulos A und Koch WJ (2009). "Future g protein-coupled receptor targets for treatment of heart failure." *Curr Treat Options Cardiovasc Med* 11: 328-338.
- Robb GB und Rana TM (2007). "RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading." *Mol Cell* 26: 523-537.
- Rockman HA, Koch WJ und Lefkowitz RJ (2002). "Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function." *Nature* 415: 206-212.
- Rodriguez P, Mitton B, Waggoner JR und Kranias EG (2006). "Identification of a novel phosphorylation site in protein phosphatase inhibitor-1 as a negative regulator of cardiac function." *J Biol Chem* 281: 38599-38608.

- Rose JA, Maizel JV, Jr., Inman JK und Shatkin AJ (1971). "Structural proteins of adenovirus-associated viruses." *J Virol* 8: 766-770.
- Russell DW (2003). "AAV loves an active genome." *Nat Genet* 34: 241-242.
- Samulski R, Sally M und Muzyczka N (1999). Adeno-Associated Viral Vectors. The Development of Human Gene Therapy. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Samulski RJ, Srivastava A, Berns KI und Muzyczka N (1983). "Rescue of adeno-associated virus from recombinant plasmids: gene correction within the terminal repeats of AAV." *Cell* 33: 135-143.
- Sasaki K, Shima H, Kitagawa Y, Irino S, Sugimura T und Nagao M (1990). "Identification of members of the protein phosphatase 1 gene family in the rat and enhanced expression of protein phosphatase 1 alpha gene in rat hepatocellular carcinomas." *Jpn J Cancer Res* 81: 1272-1280.
- Saxena S, Jonsson ZO und Dutta A (2003). "Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells." *J Biol Chem* 278: 44312-44319.
- Schopman NC, Liu YP, Konstantinova P, Ter Brake O und Berkhout B (2010). "Optimization of shRNA inhibitors by variation of the terminal loop sequence." *Antiviral Res.*
- Schroder F, Handrock R, Beuckelmann DJ, Hirt S, Hullin R, Priebe L, Schwinger RH, Weil J und Herzig S (1998). "Increased availability and open probability of single L-type calcium channels from failing compared with nonfailing human ventricle." *Circulation* 98: 969-976.
- Schubert S, Grunert HP, Zeichhardt H, Werk D, Erdmann VA und Kurreck J (2005a). "Maintaining inhibition: siRNA double expression vectors against coxsackieviral RNAs." *J Mol Biol* 346: 457-465.
- Schubert S, Grunweller A, Erdmann VA und Kurreck J (2005b). "Local RNA target structure influences siRNA efficacy: systematic analysis of intentionally designed binding regions." *J Mol Biol* 348: 883-893.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N und Zamore PD (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell* 115: 199-208.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Haley B und Zamore PD (2002). "Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways." *Mol Cell* 10: 537-548.
- Seibler J, Kuter-Luks B, Kern H, Streu S, Plum L, Mauer J, Kuhn R, Bruning JC und Schwenk F (2005). "Single copy shRNA configuration for ubiquitous gene knockdown in mice." *Nucleic Acids Res* 33: e67.
- Senapathy P, Tratschin JD und Carter BJ (1984). "Replication of adeno-associated virus DNA. Complementation of naturally occurring rep- mutants by a wild-type genome or an ori-mutant and correction of terminal palindrome deletions." *J Mol Biol* 179: 1-20.
- Shao Y, Chan CY, Maliyekkel A, Lawrence CE, Roninson IB und Ding Y (2007). "Effect of target secondary structure on RNAi efficiency." *Rna* 13: 1631-1640.
- Shenolikar S und Nairn AC (1991). "Protein phosphatases: recent progress." *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 23: 1-121.
- Shi Y (2003). "Mammalian RNAi for the masses." *Trends Genet* 19: 9-12.
- Siegl G, Bates RC, Berns KI, Carter BJ, Kelly DC, Kurstak E und Tattersall P (1985). "Characteristics and taxonomy of Parvoviridae." *Intervirology* 23: 61-73.
- Sijen T und Plasterk RH (2003). "Transposon silencing in the Caenorhabditis elegans germ line by natural RNAi." *Nature* 426: 310-314.
- Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary MA, Elledge SJ und Hannon GJ (2005). "Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes." *Nat Genet* 37: 1281-1288.

- Simmerman HK und Jones LR (1998). "Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function." *Physiol Rev* 78: 921-947.
- Siolas D, Lerner C, Burchard J, Ge W, Linsley PS, Paddison PJ, Hannon GJ und Cleary MA (2005). "Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers." *Nat Biotechnol* 23: 227-231.
- Sipo I, Fechner H, Pinkert S, Suckau L, Wang X, Weger S und Poller W (2007). "Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction." *Gene Ther* 14: 1319-1329.
- Snyder RO, Im DS, Ni T, Xiao X, Samulski RJ und Muzyczka N (1993). "Features of the adeno-associated virus origin involved in substrate recognition by the viral Rep protein." *J Virol* 67: 6096-6104.
- Srivastava A, Lusby EW und Berns KI (1983). "Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome." *J Virol* 45: 555-564.
- Straus SE, Ginsberg HS und Rose JA (1975). "DNA-minus temperature-sensitive mutants of adenovirus type 5 help adenovirus-associated virus replication." *J Virol* 17: 140-148.
- Suckau L, Fechner H, Chemaly E, Krohn S, Hadri L, Kocksamper J, Westermann D, Bisping E, Ly H, Wang X, Kawase Y, Chen J, Liang L, Sipo I, Vetter R, Weger S, Kurreck J, Erdmann V, Tschope C, Pieske B, Lebeche D, Schultheiss HP, Hajjar RJ und Poller WC (2009). "Long-term cardiac-targeted RNA interference for the treatment of heart failure restores cardiac function and reduces pathological hypertrophy." *Circulation* 119: 1241-1252.
- Sullivan CS, Grundhoff AT, Tevethia S, Pipas JM und Ganem D (2005). "SV40-encoded microRNAs regulate viral gene expression and reduce susceptibility to cytotoxic T cells." *Nature* 435: 682-686.
- Summerford C, Bartlett JS und Samulski RJ (1999). "AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection." *Nat Med* 5: 78-82.
- Summerford C und Samulski RJ (1998). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions." *J Virol* 72: 1438-1445.
- Sun L, Li J und Xiao X (2000). "Overcoming adeno-associated virus vector size limitation through viral DNA heterodimerization." *Nat Med* 6: 599-602.
- Svensson EC, Marshall DJ, Woodard K, Lin H, Jiang F, Chu L und Leiden JM (1999). "Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors." *Circulation* 99: 201-205.
- Swedberg K, Hjalmarson A, Waagstein F und Wallentin I (1979). "Prolongation of survival in congestive cardiomyopathy by beta-receptor blockade." *Lancet* 1: 1374-1376.
- Tang G (2005). "siRNA and miRNA: an insight into RISCs." *Trends Biochem Sci* 30: 106-114.
- Tattersall P und Ward DC (1976). "Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA." *Nature* 263: 106-109.
- Taxman DJ, Livingstone LR, Zhang J, Conti BJ, Iocca HA, Williams KL, Lich JD, Ting JP und Reed W (2006). "Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors." *BMC Biotechnol* 6: 7.
- Thomson BJ, Weindler FW, Gray D, Schwaab V und Heilbronn R (1994). "Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression." *Virology* 204: 304-311.
- Tiscornia G, Singer O, Ikawa M und Verma IM (2003). "A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1844-1848.
- Tsang S, Woo AY, Zhu W und Xiao RP (2010). "Deregulation of RGS2 in cardiovascular diseases." *Front Biosci (Schol Ed)* 2: 547-557.
- Tuschl T, Zamore PD, Lehmann R, Bartel DP und Sharp PA (1999). "Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro." *Genes Dev* 13: 3191-3197.

- Vandenburgh H, Shansky J, Benesch-Lee F, Barbata V, Reid J, Thorrez L, Valentini R und Crawford G (2008). "Drug-screening platform based on the contractility of tissue-engineered muscle." *Muscle Nerve* 37: 438-447.
- Vandendriessche T, Thorrez L, Acosta-Sanchez A, Petrus I, Wang L, Ma L, L DEW, Iwasaki Y, Gilljns V, Wilson JM, Collen D und Chuah MK (2007). "Efficacy and safety of adeno-associated viral vectors based on serotype 8 and 9 vs. lentiviral vectors for hemophilia B gene therapy." *J Thromb Haemost* 5: 16-24.
- Varshavsky A (1997). "The N-end rule pathway of protein degradation." *Genes Cells* 2: 13-28.
- Vermeulen A, Behlen L, Reynolds A, Wolfson A, Marshall WS, Karpilow J und Khvorova A (2005). "The contributions of dsRNA structure to Dicer specificity and efficiency." *Rna* 11: 674-682.
- Vlassov AV, Korba B, Farrar K, Mukerjee S, Seyhan AA, Ilves H, Kaspar RL, Leake D, Kazakov SA und Johnston BH (2007). "shRNAs targeting hepatitis C: effects of sequence and structural features, and comparison with siRNA." *Oligonucleotides* 17: 223-236.
- Walz C, Deprez A, Dupressoir T, Durst M, Rabreau M und Schlehofer JR (1997). "Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium." *J Gen Virol* 78 (Pt 6): 1441-1452.
- Wang Z, Ma HI, Li J, Sun L, Zhang J und Xiao X (2003). "Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo." *Gene Ther* 10: 2105-2111.
- Wang Z, Zhu T, Qiao C, Zhou L, Wang B, Zhang J, Chen C, Li J und Xiao X (2005). "Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart." *Nat Biotechnol* 23: 321-328.
- Watanabe A, Arai M, Yamazaki M, Koitabashi N, Wuytack F und Kurabayashi M (2004). "Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca²⁺ uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum." *J Mol Cell Cardiol* 37: 691-698.
- Waterhouse PM, Wang MB und Lough T (2001). "Gene silencing as an adaptive defence against viruses." *Nature* 411: 834-842.
- Webster KA, Discher DJ und Bishopric NH (1993). "Induction and nuclear accumulation of fos and jun proto-oncogenes in hypoxic cardiac myocytes." *J Biol Chem* 268: 16852-16858.
- Weindler FW und Heilbronn R (1991). "A subset of herpes simplex virus replication genes provides helper functions for productive adeno-associated virus replication." *J Virol* 65: 2476-2483.
- Westerhout EM und Berkhout B (2007). "A systematic analysis of the effect of target RNA structure on RNA interference." *Nucleic Acids Res* 35: 4322-4330.
- Wittköpper K, Eschenhagen T und El-Armouche A (2010a). "Phosphatase-1-inhibitor-1: amplifier or attenuator of catecholaminergic stress?" *Basic Res Cardiol* 105: 569-571.
- Wittköpper K, Fabritz L, Neef S, Ort KR, Grefe C, Unsold B, Kirchhof P, Maier LS, Hasenfuss G, Dobrev D, Eschenhagen T und El-Armouche A (2010). "Constitutively active phosphatase inhibitor-1 improves cardiac contractility in young mice but is deleterious after catecholaminergic stress and with aging." *J Clin Invest* 120: 617-626.
- Wonderling RS und Owens RA (1997). "Binding sites for adeno-associated virus Rep proteins within the human genome." *J Virol* 71: 2528-2534.
- Wu P, Xiao W, Conlon T, Hughes J, Agbandje-McKenna M, Ferkol T, Flotte T und Muzyczka N (2000). "Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism." *J Virol* 74: 8635-8647.
- Xiao L, Pimental DR, Amin JK, Singh K, Sawyer DB und Colucci WS (2001). "MEK1/2-ERK1/2 mediates alpha1-adrenergic receptor-stimulated hypertrophy in adult rat ventricular myocytes." *J Mol Cell Cardiol* 33: 779-787.
- Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G und Wilson JM (1999). "Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1." *J Virol* 73: 3994-4003.
- Xiao W, Warrington KH, Jr., Hearing P, Hughes J und Muzyczka N (2002). "Adenovirus-facilitated nuclear translocation of adeno-associated virus type 2." *J Virol* 76: 11505-11517.

- Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A und Chapman MS (2002). "The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 10405-10410.
- Xu XM, Yoo MH, Carlson BA, Gladyshev VN und Hatfield DL (2009). "Simultaneous knockdown of the expression of two genes using multiple shRNAs and subsequent knock-in of their expression." *Nat Protoc* 4: 1338-1348.
- Yan Z, Zhang Y, Duan D und Engelhardt JF (2000). "Trans-splicing vectors expand the utility of adeno-associated virus for gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6716-6721.
- Yang CC, Xiao X, Zhu X, Ansardi DC, Epstein ND, Frey MR, Matera AG und Samulski RJ (1997). "Cellular recombination pathways and viral terminal repeat hairpin structures are sufficient for adeno-associated virus integration in vivo and in vitro." *J Virol* 71: 9231-9247.
- Yang Q, Mamounas M, Yu G, Kennedy S, Leaker B, Merson J, Wong-Staal F, Yu M und Barber JR (1998). "Development of novel cell surface CD34-targeted recombinant adenoassociated virus vectors for gene therapy." *Hum Gene Ther* 9: 1929-1937.
- Young SM, Jr., McCarty DM, Degtyareva N und Samulski RJ (2000). "Roles of adeno-associated virus Rep protein and human chromosome 19 in site-specific recombination." *J Virol* 74: 3953-3966.
- Zeng Y und Cullen BR (2002). "RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm." *Rna* 8: 855-860.
- Zeng Y, Wagner EJ und Cullen BR (2002). "Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells." *Mol Cell* 9: 1327-1333.
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E und 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 und Mende U (2006). "Selective loss of fine tuning of Gq/11 signaling by RGS2 protein exacerbates cardiomyocyte hypertrophy." *J Biol Chem* 281: 5811-5820.
- Zhao Y, Samal E und Srivastava D (2005). "Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis." *Nature* 436: 214-220.
- Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J und Eschenhagen T (2000). "Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes." *Biotechnol Bioeng* 68: 106-114.
- Zincarelli C, Soltys S, Rengo G und Rabinowitz JE (2008). "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection." *Mol Ther* 16: 1073-1080.
- Zou MX, Roy AA, Zhao Q, Kirshenbaum LA, Karmazyn M und Chidiac P (2006). "RGS2 is upregulated by and attenuates the hypertrophic effect of alpha1-adrenergic activation in cultured ventricular myocytes." *Cell Signal* 18: 1655-1663.

8 Lebenslauf

Name	Christiane Neuber
Geburtstag	15. Juli 1981
Geburtsort	Dresden

Ausbildung

1991 - 2000	Joseph-Haydn-Gymnasium, Dresden
2000 - 2006	Studium der Pharmazie an der Universität Leipzig
Juli 2005 - Juni 2006	Praktisches Jahr: - Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf - Lerchenfeld Apotheke, Hamburg
Oktober 2006	Approbation zur Apothekerin
Seit Dezember 2006	Dissertation am Institut für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Berufstätigkeit

Okt. 2006 - Nov. 2006	Lerchenfeld Apotheke, Hamburg
-----------------------	-------------------------------

9 Veröffentlichungen

9.1 Originalarbeiten

Schwoerer AP, **Neuber C**, Schmechel A, Melnychenko I, Mearini G, Boknik P, Kirchhefer U, Schmitz W, Ehmke H, Eschenhagen T, El-Armouche A (2008). "Mechanical unloading of the rat heart involves marked changes in the protein kinase-phosphatase balance." *J Mol Cell Cardiol* 45: 633-641.

El-Armouche A, Schworer AP, **Neuber C**, Emmons J, Biermann D, Christalla T, Grundhoff A, Eschenhagen T, Zimmermann WH, Ehmke H (2010). "Common microRNA signatures in cardiac hypertrophic and atrophic remodeling induced by changes in hemodynamic load." *PLoS One* 5: e14263

9.2 Kongressbeiträge

Neuber C, Hansen FC, Müller OJ, Katus HA, Eschenhagen T, El-Armouche A. "AAV-9-mediated shRNA-delivery to knockdown phosphatase-inhibitor-1 in the murine heart." *49. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2008.

Neuber C, Müller OJ, Eder A, Hansen A, Hansen F, Katus H, Eschenhagen T, El-Armouche A. "AAV-mediated shRNA-delivery to knockdown components of the beta-adrenergic signaling pathway in reconstituted heart tissue in vitro and in the murine heart in vivo." *50. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Mainz, März 2009.

Neuber C, Eder A, Hansen A, Müller OJ, Sietmann A, Rühle F, Stoll M, Eschenhagen T, El-Armouche A. "AAV-mediated knockdown of the β_1 -adrenoceptor in reconstituted heart tissue." *77. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie*, Frankfurt, März 2011.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die an der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

Etablierung eines kardialen Langzeitgentransfers zur Abschaltung des Phosphatase-Inhibitors-1 mittels Adeno-assoziiierter Virus-Vektoren auf Basis von RNA-Interferenz

in der Abteilung Pharmakologie des Instituts für Experimentelle Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Eschenhagen und der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Ali El-Armouche und der Betreuung durch Herrn Prof. Dr. Michael Korth für den Fachbereich Chemie ohne fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen, als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht habe.

Hamburg, April 2011

.....

Christiane Neuber

11 Danksagung

Zunächst bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Eschenhagen für die Anleitung und fachkundige Unterstützung, während der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Michael Korth danke ich ausdrücklich für die Übernahme des zweiten Gutachtens und für die Betreuung meiner Promotionsarbeit für den Fachbereich Chemie.

Ein besonders großer Dank gilt Prof. Dr. Ali El-Armouche für die Vergabe des Promotionsthemas, die stets freundschaftliche Betreuung und die gute Zusammenarbeit während der gesamten Laborzeit sowie für die Geduld bei zahlreichen Telefonaten.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meiner gesamten ehemaligen Arbeitsgruppe, Jutta Starbatty, Dr. Katrin Wittköpper, Hanni Sotoud, Thomas Schulze, Micha Peeck, Fabian Brunner und Maida Mahmud, durch die ein besonders positives und motivierendes Arbeitsklima entstand. Besonders möchte ich mich bei Felix Hansen, der mir als Mitdoktorand und guter Freund zur Seite stand, bedanken und mit dem ich viele gemeinschaftliche Laborstunden und einen großen Teil dieser Arbeit in Zusammenarbeit verbracht habe.

Großer Dank gilt auch Birgit Geertz und Thomas Schulze für die Durchführung und Auswertung zahlreicher Echos sowie June Uebeler und Marianne Flato für die stetige Präparation der neonatalen Kardiomyozyten. Bei Arne Hansen und seiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich mich vor allem für die Einarbeitung und ihre Unterstützung bei der FBME-Generierung bedanken. Insbesondere bei Alexandra Eder, die mir jederzeit für zahlreiche Diskussionen, den ersten Kaffee sowie in Freud und Leid zur Seite stand. Weiterhin bedanke ich mich bei Jasmin Singh, Justus Stenzig und Doreen Stimpel für die schöne Zeit im und außerhalb des Labors.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Oliver Müller (DKFZ, Heidelberg) und Dr. Stefanie Schinkel für die enge Zusammenarbeit bei der Generierung und Produktion der AAVs, Dr. Thomas Christalla (HPI, Hamburg) für die Durchführung der Northern Blots und der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. sc. hum. Monika Stoll,

insbesondere Dr. Anika Sietmann und Dr. Frank Rühle, für die Durchführung und Auswertung der Mikroarray-Analyse.

Schließlich bedanke ich mich von Herzen bei meinen lieben Eltern und meinem Bruder für die Ermöglichung des Studiums und ihre uneingeschränkte Unterstützung.

12 Anhang

12.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere (SI-Basiseinheit der Stromstärke)
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb	Abbildung
AmpR	Ampicillin Resistenz
APS	Ammoniumpersulfat
Ara-C	Cytosin β -D-arabinofuranosid
ATP	Adenosintriphosphat
AU	<i>arbitrary units</i> (willkürliche Einheiten)
AwThd/s	Linksventrikuläre enddiastolische/systolische Vorderwandstärke
β -AR	β -Adrenozeptor
Bp	Basenpaare
bpm	beats per minute (Schläge pro Minute)
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CBFHH	calcium- und bicarbonatfreier Hanks Puffer mit HEPES
cDNA	<i>complementary</i> (komplementäre) DNA
CEE	<i>chicken embryo extract</i> (Hühnerembryonenextrakt)
CMV	Cytomegalovirus
CO	<i>cardiac output</i> (Herzminutenvolumen)
Col E1 ori	<i>E. coli</i> Replikationsursprung
CSQ	Calsequestrin
Ct	cycle threshold (SchWellenwert-Zyklus)
DARPP-32	Dopamin- u. cAMP-reguliertes Phosphoprotein 32
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
dNTPs	Desoxyribonukleotid-Gemisch
dpm	<i>decay per minute</i> (Zerfälle pro Minute)
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
EHT	<i>Engineered Heart Tissue</i> (künstliches Herzgewebe)
EKG	Elektrokardiogramm
EtBr	Ethidiumbromid
f1 ori	Replikationsursprung des Phagen f1
FAS	Linksventrikuläre Flächenverkürzungsfraktion
FCS	<i>fetal calf serum</i> (fetales Kälberserum)
for	<i>forward</i> , 5'-3' Primer
FS	<i>fractional shortening</i> (Verkürzungskraktion)
g	Erdschwerebeschleunigung ($9,8 \text{ m/s}^2$)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>Green fluorescence protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
h	Stunde
HBSS	Hank's balanced salt solution
HF	Herzfrequenz
HEK	HEK
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HW	Herzgewicht
J	Joule (SI-Einheit der Arbeit, Wärme, Energie)
I-1	Protein-Phosphatase-Inhibitor-1
IC ₅₀	Mittlere inhibitorische Konzentration
IgG	Immunglobulin G (Gammaglobulin)
i. p.	Intraperitoneale Applikation
ITR	<i>Inverted terminal Repeats</i> (terminale invertierte Basensequenz)
KanaR	Kanamycin Resistenz
kDa	Kilo-Dalton
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
KG	Körpergewicht
KM	Kardiomyozyten
KO	Knockout
LB	Lysogeny broth (Nährmedium)
LVEDD/S	Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. –systolischer Durchmesser
LVEDV/SV	Linksventrikuläres enddiastolisches bzw. –systolisches Volumen
LVEDP/SP	Linksventrikulärer enddiastolischer bzw. –systolischer Druck
LVM	Masse des linken Ventrikels
M	Mol/l
mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute

Mio	Millionen
ml	Milliliter
MW	<i>Molecular Weight Marker</i> (Protein- bzw. DNA-Größenstandard)
mRNA	<i>messenger RNA</i> (Boten-Ribonukleinsäure)
N	Nukleotid
N	Newton (SI-Einheit der Kraft)
NKM	Nicht-Kardiomyozyten
nMKM	neonatale Mauskardiomyozyten
nRKM	neonatale Rattenkardiomyozyten
NS	Nukleinsäure
n. s.	Nicht signifikant
NeoR	Neomycin Resistenz Gen
OD	optische Dichte
p90 ^{RSK}	90 kDa ribosomale S6 Kinase
pA	Polyadenylierungsstelle
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pAK	polyklonaler Antikörper
pBR322	Replikationsursprung
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Protein Kinase A
PKC α	Protein Kinase C Isoform α
PP1	Serin/Threonin Protein-Phosphatase vom Typ 1
PP1c	Katalytische Untereinheit der PP1
PP2A	Serin/Threonin Protein-Phosphatase vom Typ 2A
pUC ori	Replikationsursprung des Plasmids pUC
PwThd/s	Linksventrikuläre enddiastolische/systolische Hinterwandstärke
qRT-PCR	quantitative (Echtzeit) RT-PCR
rev	<i>reverse</i> , 3'–5' Primer
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehung pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
s	Sekunde
SDS	sodium dodecyle sulfate (Natriumdodecylsulfat)
shRNA	<i>short hairpin RNA</i> (Haarnadelstruktur-RNA)
siRNA	<i>short interfering RNA</i> (kleine hemmende RNA)
s. o.	siehe oben

SV40	Simianes Virus 40
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA Puffer
TBS	<i>Tris buffered saline</i> , (Tris-gepufferte Salzlösung)
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
TL	Tibiallänge
T _m	Schmelztemperatur
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Units</i> (Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt (SI-Einheit der Spannung)
Vg	Vektorgenome
Vol	Volumen
vs.	versus
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent

Si-Einheiten (Präfixe)

k	Kilo 10 ³
m	Milli 10 ⁻³
μ	Micro 10 ⁻⁶
n	Nano 10 ⁻⁹
p	Pico 10 ⁻¹²
f	Femto 10 ⁻¹⁵

12.2 R- und S-Sätze

R-Sätze (Hinweise auf besondere Gefahren)

R 1	In trockenem Zustand explosionsgefährlich
R 2	Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich
R 3	Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich
R 4	Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen
R 5	Beim Erwärmen explosionsfähig
R 6	Mit und ohne Luft explosionsfähig
R 7	Kann Brand verursachen
R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
R 9	Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen

R 10	Entzündlich
R 11	Leichtentzündlich
R 12	Hochentzündlich
R 14	Reagiert heftig mit Wasser
R 15	Reagiert mit Wasser unter Bildung hochentzündlicher Gase
R 16	Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen
R 17	Selbstentzündlich an der Luft
R 18	Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger/leichtentzündlicher Dampf/Luft-Gemische möglich
R 19	Kann explosionsfähige Peroxide bilden
R 20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
R 21	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 23	Giftig beim Einatmen
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 27	Sehr giftig bei Berührung mit der Haut
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken
R 29	Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase
R 30	Kann bei Gebrauch leichtentzündlich werden
R 31	Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 33	Gefahr kumulativer Wirkungen
R 34	Verursacht Verätzungen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 36	Reizt die Augen
R 37	Reizt die Atmungsorgane
R 38	Reizt die Haut
R 39	Ernste Gefahr irreversiblen Schadens
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung
R 41	Gefahr ernster Augenschäden
R 42	Sensibilisierung durch Einatmen möglich
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich
R 44	Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluss
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition
R 49	Kann Krebs erzeugen beim Einatmen
R 50	Sehr giftig für Wasserorganismen

-
- | | |
|------|--|
| R 51 | Giftig für Wasserorganismen |
| R 52 | Schädlich für Wasserorganismen |
| R 53 | Kann in Gewässern längerfristig schädliche Wirkungen haben |
| R 54 | Giftig für Pflanzen |
| R 55 | Giftig für Tiere |
| R 56 | Giftig für Bodenorganismen |
| R 57 | Giftig für Bienen |
| R 58 | Kann längerfristig schädliche Wirkungen auf die Umwelt haben |
| R 59 | Gefährlich für die Ozonschicht |
| R 60 | Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen |
| R 61 | Kann das Kind im Mutterleib schädigen |
| R 62 | Kann möglicherweise die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen |
| R 63 | Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen |
| R 64 | Kann Säuglinge über die Muttermilch schädigen |
| R 65 | Gesundheitsschädlich: Kann beim Verschlucken Lungenschäden verursachen |
| R 66 | Wiederholter Kontakt kann zu spröder oder rissiger Haut führen |
| R 67 | Dämpfe können Schläfrigkeit und Benommenheit verursachen |
| R 68 | Irreversibler Schaden möglich |

S-Sätze (Sicherheitsratschläge)

- | | |
|------|---|
| S 1 | Unter Verschluss aufbewahren |
| S 2 | Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen |
| S 3 | Kühl aufbewahren |
| S 4 | Von Wohnplätzen fernhalten |
| S 5 | Unter ... aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben) |
| S 6 | Unter ... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben) |
| S 7 | Behälter dicht geschlossen halten |
| S 8 | Behälter trocken halten |
| S 9 | Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren |
| S 12 | Behälter nicht gasdicht verschließen |
| S 13 | Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten |
| S 14 | Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen sind vom Hersteller anzugeben) |
| S 15 | Vor Hitze schützen |
| S 16 | Von Zündquellen fernhalten - Nicht rauchen |
| S 17 | Von brennbaren Stoffen fernhalten |
| S 18 | Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben |
| S 20 | Bei der Arbeit nicht essen und trinken |
| S 21 | Bei der Arbeit nicht rauchen |
| S 22 | Staub nicht einatmen |
| S 23 | Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen (geeignete Bezeichnung(en) vom Hersteller) |

- hr/>
- anzugeben)
- S 24 Berührung mit der Haut vermeiden
- S 25 Berührung mit den Augen vermeiden
- S 26 Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
- S 27 Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen
- S 28 Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 29 Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
- S 30 Niemals Wasser hinzugießen
- S 33 Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen
- S 35 Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden
- S 36 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
- S 37 Geeignete Schutzhandschuhe tragen
- S 38 Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen
- S 39 Schutzbrille/Gesichtsschutz tragen
- S 40 Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen (Material vom Hersteller anzugeben)
- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen
- S 42 Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen (geeignete Bezeichnung(en) vom Hersteller anzugeben)
- S 43 Zum Löschen ... (vom Hersteller anzugeben) verwenden (wenn Wasser die Gefahr erhöht, anfügen: "Kein Wasser verwenden")
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder Etikett vorzeigen
- S 47 Nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren (vom Hersteller anzugeben)
- S 48 Feucht halten mit ... (geeignetes Mittel vom Hersteller anzugeben)
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 51 Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden
- S 53 Exposition vermeiden ... vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen
- S 56 Dieses Produkt und seinen Behälter der Problemabfallentsorgung zuführen
- S 57 Zur Vermeidung einer Kontamination der Umwelt geeigneten Behälter verwenden
- S 59 Informationen zur Wiederverwendung/Wiederverwertung beim Hersteller/Lieferanten erfragen
- S 60 Dieses Produkt und sein Behälter sind als gefährlicher Abfall zu entsorgen
- S 61 Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Besondere Anweisungen einholen / Sicherheitsdatenblatt zu Rate ziehen
- S 62 Bei Verschlucken kein Erbrechen herbeiführen. Sofort ärztlichen Rat einholen und

Verpackung oder dieses Etikett vorzeigen

- S 63 Bei Unfall durch Einatmen: Verunfallten an die frische Luft bringen und ruhigstellen
- S 64 Bei Verschlucken Mund mit Wasser ausspülen (nur wenn Verunfallter bei Bewusstsein ist)

12.3 Material

12.3.1 Substanzen

Substanz	R- und S-Sätze	Firma
Aceton	R: 11-36-66-67 S: 9-16-26	J.T.Baker
Acrylamid/Bis-Acrylamid-Lösung (29:1)	R: 45-46-20/21-23/24/25-43-48 S: 36/37/39-45-60	Bio-Rad
Adenosin 5'-Triphosphat (ATP)		Sigma-Aldrich
Agarose		Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	R: 8-22-36/37/38-42/43 S: 22-24-26-37	Bio-Rad
Ampicillin-Trihydrat	R: 36/37/38-42/43 S: 22-26-36/37	Serva
Aprotinin		Sigma-Aldrich
Aqua ad injectabilia		Baxter GmbH
Ascorbinsäure		Merck
Bacto™ Agar		Becton Dickinson
Bacto™ Tryptone		Becton Dickinson
5-Brom-2-desoxyuridin (BrdU)	R: 40-68 S: 22-24/25-36/37/39-45	Sigma-Aldrich
Bromphenolblau	S: 22-24/25	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)		Roth
Calciumchloridhexahydrat (CaCl ₂ x 6H ₂ O)	R: 36 S: 22-24/25	Sigma-Aldrich
<i>Calf Intestine</i> alkalische Phosphatase (CIP)		New England Biolabs
Chloroform (≥99%)	R: 11-22-38-40-48/20/22 S: 36/37	Sigma-Aldrich
Coomassie Brilliant Blau G-250 Lösung	R: 20/21/22-34-68 S: 26-36/37/39-45	Bio-Rad
Cycloheximid	R: 61-28-68-51/53	Sigma-Aldrich

	S: 45-53-61	
Cytarabin (Ara-C)	R: 43-63; S: 36/37	Sigma-Aldrich
DEPC-H ₂ O		Roth
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	S: 22-24/25	Merck
Dimethylformamid (DMF)	R: 61-20/21-36; S: 53-45	Roth
Dimethylsulfoxid (DMSO)	R: 36/37/38; S: 23-26-36	Fluka
DNeasy Blood & Tissue Kits		Qiagen
dNTPs		Fermentas
Dobutamin	R: 20/21/22-63 S: 22-26-36/37/39	Carinopharm
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)		Biochrom AG
1,4-Dithiothreitol (DTT)	R: 22-36/37/38; S: 26-36	Sigma-Aldrich
ECL Western blotting detection system	R: 11-19-36/37-40-66	Pierce
Essigsäure (100%)	R: 10-35; S: 23-26-45	Roth
Ethanol (absolut)	R: 11; S: 7-16	J.T.Baker
Ethidiumbromid	R: 23-68; S: 36/37-45	Fluka
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	R: 36-52/53; S: 26-61	Sigma-Aldrich
Express Hyb™		Clontech
Hybridisierungspuffer		
F-12 Medium		
FCS		Gibco/Invitrogen
Fibrinogen		Sigma-Aldrich
Fluoromount G		Southern Biotech
Geneticin	R:20-22; S:26-28-36	Invitrogen
Glucose		Sigma-Aldrich
Glutathion		Sigma-Aldrich
Glycerol		Merck
Glycin	S: 22-24/25	Roth
Harnstoff		Fluka
HBSS		Gibco/Invitrogen
[³ H]-CGP 12177		Affinity BioReagents
HEPES		Sigma-Aldrich
Histidin		Sigma-Aldrich
Hydrochloridsäure (HCl)	R: 34-37 S: 26-36/37/39-45	Merck

IgG (Rinderserum)		Sigma-Aldrich
Insulin		Sigma-Aldrich
Isoprenalin	R: 36/37/38	Sigma-Aldrich
(DL-Isoproterenol hydrochloride)	S: 26-36	
Isopropanol (≥99,8%)	R: 11-36-67	Merck
	S: 7-16-24/25-26	
Kaliumacetat ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{K}^+$)		Merck
Kaliumchlorid (KCl)	S: 22-24/25	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)		Merck
Kaliumhexacyanoferrat II ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)	R: 52/53	Sigma-Aldrich
	S: 50-61	
Kaliumhexacyanoferrat III ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)		Sigma-Aldrich
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO_3)		Merck
Kaliumhydroxid (KOH)	R: 22-35	Merck
	S: 26-36/37/39-45	
Koffein	R: 20; S: 2	Sigma-Aldrich
Laminin		Roche
L-Glutamin		Invitrogen
Magnesiumchlorid-Hexahydrat ($\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$)		Roth
Magnesiumsulfat-Heptahydrat ($\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)		Merck
Mangan II-chlorid (MnCl_2)	R: 22-51/53; S: 61	Merck
Matrigel		BD Biosciences
Medium M 199		Gibco/Invitrogen
Mercaptoethanol	R: 23/24/25; S: 45	Gibco/Invitrogen
Methanol	R: 11-23/24/25-39/23/24/25	J.T. Baker
	S: 7-16-36/37-45	
Milchpulver		Roth
Minimum Essential Medium Eagle		BioWest
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	R: 36/37/38	Sigma-Aldrich
	S: 26-36	
Natriumacetat ($\text{CH}_3\text{COO}^-\text{Na}^+$)		Merck
Natriumazid (NaN_3)	R: 28-32-50/53	Serva
	S: 1/2-28-45-60-61	
Natriumcitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$)		Merck
Natriumchlorid (NaCl)		J.T. Baker

Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS)	R: 11-21/22-36/37/38 S: 26-36/37	Roth
Natriumfluorid (NaF)	R: 25-32-36/38	Merck
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)		Merck
Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 7H ₂ O)		Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	R: 35; S: 26-37/39-45	Merck
Oligonukleotide		Eurofins MWG Operon
OptiMem		Gibco/Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	R: 20/22-36/37/38-40-43 S: 22-26-36/37	Sigma-Aldrich
PBS		Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	R: 43; S: 36-38	Gibco/Invitrogen
Pferdeserum		Gibco/Invitrogen
Plasmid-Maxi-Kit (NucleoBond [®] PC 500)		Macherey-Nagel
Pikrinsäure	R: 3-4-23/24/25 S: (1/2)-28-35-36/37-45	Merck
Ponceau-S	R: 36/37/38-51/53 S: 2-25-26-29/56-37-46-57- 60-64	Serva
Propranolol (DL-Propranolol hydrochloride)	R: 22	Sigma-Aldrich
Protan [®]		Whatman [®]
Nitrocellulose Transfer Membran		
PVDF-Membran Amersham Hybond [™] -P		GE Healthcare
Roti [®] -Histofix	R: 40-43; S: 36/37	Roth
Roti [®] -Histol	R: 10-38-43-50/53-65 S: 23-24-36/37-60-62	Roth
Roti [®] -Nanoquant (Bradfordreagenz)	R: 11-34 S: 16-26-45	Roth
Rubidiumchlorid (RbCl)		Merck
Sucrose		Merck
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix		Applied Biosystems
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	R: 11-20/22-34 S: 16-26-36/37/39-45-60	Bio-Rad
Thrombin	R: 22-24/25	Sigma-Aldrich

Tissue Tek® O.C.T™ Compound		Sakura
Titriplex (Natrium-EDTA)		Merck
Tranexamsäure	R: 36/37/38 S: 26-36	Pfizer
Triethanolamin		Roth
Trichloressigsäure	R: 35-50/53 S: 26-36/37/39-45	Merck
Trishydroxymethylaminomethan-(Tris) Base	R: 36/37/38 S: 26-36	Sigma-Aldrich
Tris-Hydrochlorid (Tris-HCl)	R: 36/37/38; S: 26-36	Promega
Triton® X-100	R: 22-41; S: 25-26-39	Sigma-Aldrich
TRizol®	R: 32/34/68-23/24/25- 48/20/21/22- 52/53	Invitrogen
Trypsin/EDTA	R: 42-36/37/38	Gibco/Invitrogen
Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat (Tween® 20)		Sigma-Aldrich
Ultima Gold™ (Szintillationsflüssigkeit)	R: 38-41-52/53 S: 26-39-61	PerkinElmer
Ultraschallgel Sonogel		Bad Camberg
Xylencyanol	R: 36; S: 26-36	Fluka
[γ - ³² P]-ATP		NEN-DuPont
Zeta-Probe GT Nylon Membran		Bio-Rad

12.3.2 Antikörper

Tabelle 12.1 Verwendete Primärantikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Western Blot (WB) und in der Immunfluoreszenz (IF). Verwendung von polyklonalen (pAK) und monoklonalen (mAK) Antikörpern.

Primärantikörper	Verdünnung	Firma/Referenz	Klon	Anwendung
Anti- α Aktinin	1:800	Sigma-Aldrich	mAK	IF, WB
Anti- β_1 -Adrenozeptor	1:200	Santa Cruz	pAK	WB
Anti- β -Aktin	1:5000	Sigma-Aldrich	mAK	IF, WB
Anti-CSQ	1:2500	Dianova	pAK	WB
Anti-cTnI	1:30000	Chemicon	pAK	WB
Anti-Phospho-TnI ^{Ser23/24}	1:1000	Cell Signaling	pAK	WB
Anti-GFP	1:2000	Sigma-Aldrich	pAK	WB

Anti-GFP	1:2000	Abcam	pAK	IF
Anti-I-1	1:1000	El-Armouche et al. 2003	pAK	WB
Anti-PLB	1:5000	Badrilla	mAK	IF, WB
Anti-Phospho-PLB ^{Ser16}	1:5000	Badrilla	pAK	IF, WB
Anti-PP1 α	1:500	Upstate	pAK	WB

Tabelle 12.2 Verwendete Sekundärantikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen im Western Blot (WB) und in der Immunfluoreszenz (IF). Anti-mouse: Anti-Maus; Anti-rabbit: Anti-Kaninchen; goat: Ziege; IgG: Immunglobulin G; HRP: konjugiert an Meerrettichperoxidase.

Sekundäre Antikörper	Verdünnung	Firma/Referenz	Anwendung
Anti-mouse-IgG-HRP	1:5000/10000	Sigma-Aldrich	WB
Anti-rabbit-IgG-HRP	1:5000/10000	Sigma-Aldrich	WB
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-rabbit IgG	1:800	Invitrogen	IF
Alexa Fluor [®] 488 goat anti-mouse IgG	1:800	Invitrogen	IF
Alexa Fluor [®] 546 goat anti-mouse IgG	1:800	Invitrogen	IF
Alexa Fluor [®] 546 goat anti-rabbit IgG	1:800	Invitrogen	IF

Tabelle 12.3 Verwendete Fluoreszenzfarbstoffe für Immunfluoreszenzanalysen (IF).

Fluoreszierender Farbstoff	Verdünnung	Anwendung
4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI, Invitrogen)	1:1000	IF, DNA-Färbung (blaue Kernfärbung)

12.3.3 Primer und Sonden

Tabelle 12.4 Primer für die Klonierungen.

Name	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)	Anwendung
hADRB1-for	atgggcgcgggggtgctcgt	68	Amplifikation des
hADRB1-rev	ctacaccttgattccgaggc	64	humanen β_1 -AR (Acc:NM_000684)
Mlul-for	cgacgcgtcg aattcgaacgctgacgtcatcaacc	74	Einfügen der Mlul -
Mlul-rev	cgacgcgtcg ggtaccggggcccccctcga	80	Schnittstelle an H1-shRNA Sequenz

Tabelle 12.5 Primer für die Sequenzierungsanalysen.

Name	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)	Fragmentgröße (Bp)
hADRB1_seq1_for	taacggccgccagtgtg	58	Sequenzierung Teil1
hADRB1_seq1_rev	cagcccatgaccaggtc	61	368 Bp
hADRB1_seq2_for	gacgctcaccaaccttc	59	Sequenzierung Teil2
hADRB1_seq2_rev	gaagacgccatgatgat	57	730 Bp
hADRB1_seq3_for	gag cagaaggcgctcaag	58	Sequenzierung Teil3
hADRB1_seq3_rev	gatctcctcggtccctg	58	535 Bp
pALsh_seq_for (H1)	cgacgttgtaaaacgacggc	58	ohne shRNA: 427 Bp
pALsh_seq_rev	ccaagctcggaattaaccctc	60	mit shRNA: 453 Bp
AAV-for	gcgcgcagagagggagtggaattc	68	450 Bp
AAV-rev	gggtcgtgggcggtcagcc	68	

Tabelle 12.6 Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR Analyse (Eurofins MWG Operon).

Name	Sequenz (5'-3')	T _m (°C)	Anmerkung
β ₁ -AR-for	cgcctcttctgtcttctca	57	Fragmentgröße: 68 Bp
β ₁ -AR-rev	ggcagtagatgatgggggtga	60	Spezies: Maus, Ratte,
β ₁ -AR-Sonde	ctgggctacccaactcggcc	68	Mensch
GAPDH-for	atgttcagtagtactccactcacg	63	Fragmentgröße:
GAPD-rev	gaagacaccagtagactccacgaca	68	171 Bp
GAPDH-Sonde	aagcccatcaccatcttcaggagcgaga	70	Spezies: Maus
GFP-for	gagcaaggcgaggagctgttc	66	Fragmentgröße:
GFP-rev	atgaacttcagggtcagctt	55	138 Bp
GFP-Sonde	acgtaaaccggccacaagttc	57	
I-1-Ex1-for	ccacggaagatccagtttacg	60	Fragmentgröße:
I-1-Ex2-rev	gactgatcactgggcagcacao	60	119 Bp
I-1-Sonde	aggcggcggagcagattcggag	68	Spezies: Maus

Tabelle 12.7 Kommerzielle TaqMan Gene Expression Assays (Applied Biosystems).

Name/Spezies	Accession Nr.	Fragmentgröße (Bp)	Anmerkung
Adrb1/Ratte	NM_012701.1	65 Bp	Lokalisation in Exon1
Adrb1/Maus	NM_007419.2	76 Bp	Lokalisation in Exon1
Casq2/Ratte	NM_017131.2	79 Bp	Lokalisation in Exon2/3
GAPDH/Mensch	NM_002046.3	122 Bp	Lokalisation in Exon3
Ppp1r1a/Maus	NM_021391.3	150 Bp	Lokalisation in Exon1/2

12.3.4 Enzyme

Tabelle 12.8 Verwendete Restriktionsenzyme (New England Biolabs).

Name	Schnittstelle	Firma
BseRI	5'...GAGGAG(N) ₁₀ ↓...3' 3'...CTCCTC(N) ₈ ↑...5'	New England Biolabs
BsrGI	5'...T↓GTACA...3' 3'...ACATG↑T...5'	New England Biolabs
EcoRI	5'...G↓AATTC...3' 3'...CTTAA↑G...5'	New England Biolabs
HindIII	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↑A...5'	New England Biolabs
KpnI	5'...GGTAC↓C...3' 3'...C↑CATGG...5'	New England Biolabs
MluI	5'...A↓CGCGT...3' 3'...TGCGC↑A...5'	New England Biolabs
NotI	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'	New England Biolabs
SmaI	5'...CCC↓GGG...3' 3'...GGG↑CCC...5'	New England Biolabs
XbaI	5'...T↓CTAGA...3' 3'...AGATC↑T...5'	New England Biolabs
XhoI	5'...C↓TCGAG...3' 3'...GAGCT↑C...5'	New England Biolabs

Tabelle 12.9 DNA-modifizierende Enzyme, DNA-Polymerasen für Klonierungen und RT-PCRs.

Name	Firma
Alcaline (<i>calf intestine</i>) Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
AmpliTaq Gold® DNA Polymerase	Applied Biosystems
DreamTaq® DNA Polymerase	Fermentas
Platinum® PFX DNA Polymerase	Invitrogen
Taq DNA Polymerase	Invitrogen
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T4 Polynukleotidkinase	Fermentas

12.3.5 Übersicht über verwendete Bakterien, Zellstämme und Plasmide

Tabelle 12.10 Bakterienstämme mit Charakterisierung.

Name/Firma	Eigenschaften
E. coli DH10B (Invitrogen)	F ⁻ , mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ (ara,leu) 7697, galU, galK, λ , rpsL, nupG
E. coli Top10F (Invitrogen)	F ⁻ , mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15, Δ lacX74, deoR, araD139, Δ (ara,leu) 7697, galU, galK, rpsL (STr ^R), endA1, nupG
E. coli DH5 α (Stratagene)	F ⁻ , Φ 80dlacZ Δ M15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk ⁻ , mk ⁺), phoA, supE44, thi-1, gyrA96, relA1, λ -

Tabelle 12.11 Verwendete eukaryotische Zelllinien.

Name	Beschreibung
HEK293 (human embryonic kidney)	humane, embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert mit den Genen E1A und E1B des Adenovirus Ad5
HEK293 T	humane, embryonale Nierenepithel-Zelllinie, transformiert mit den Genen E1A und E1B des Adenovirus Ad5, SV40 large T-Antigen
CHO (chinese hamster ovary)	Epithel-Zelllinie aus den Ovarien des chinesischen Hamsters

Tabelle 12.12 Verwendete Plasmide und Expressionsvektoren mit den entsprechenden Resistenzen (R) gegen Ampicillin (Amp) oder Kanamycin (Kan).

Name	Beschreibung
PCR2.1	TOPO-cloning Vektor (3919 Bp), Amp-R
pIRES2-eGFP	Koexpression von eGFP (5300 Bp), Kan-R
pALsh	shRNA-Expressionsvektor (3185 Bp), Amp-R
dsAAV-CMV-eGFP	AAV-Vektor (5848 Bp), Koexpression von eGFP, Amp-R
dsAAV-CMV _{enh} -MLC ₂₆₀ -eGFP	AAV-Vektor (6088 Bp), Koexpression von eGFP, Amp-R
pcDNA3	Expressionsvektor (5446 Bp), Amp-R

Tabelle 12.13 Übersicht der verschiedenen siRNA-Sequenzen gegen den Inhibitor-1 und gegen den β_1 -AR. In den beiden rechten Spalten ist der G/C-Gehalt in % sowie der thermodynamische Wert (* Δ) in K/mol in 1 M NaCl, pH 7 und 37 °C angegeben.

Nummer	Strang	Sequenz	G/C (%)	(* Δ)
I-1 (1)	S	5' ggaccacaccacccaugaauu 3'	58	- 5,2
	AS	3' uuccuggugugggugguacu 5'		
I-1 (2)	S	5' ccacaccacccaugaagauu 3'	53	- 3,4
	AS	3' uuggugugggugguacuuucu 5'		
I-1 (3)	S	5' guccaccuugucaaugucuuu 3'	47	- 2,3

	AS	3'	uucagguggaacaguuacaga	5'		
I-1 (4)	S	5'	gggagccacugagagcacauu	3'	63	-1,6
	AS	3'	uucccucggugacucugugu	5'		
β_1 -AR (1)	S	5'	cgcucaccaaccucuucuuuu	3'	53	- 4,2
	AS	3'	uugcgagugguuggagaagua	5'		
β_1 -AR (2)	S	5'	uggccuucguguaccugcguu	3'	63	-2,1
	AS	3'	uuaccggaagcacauggacgc	5'		
β_1 -AR (3)	S	5'	cuggcugggcuacgccaacuu	3'	68	-1,8
	AS	3'	uugaccgacccgaugcgguug	5'		

12.4 Hilfsmittel und Geräte

Substanz

Agarose GEL Electrophoresis System Sub-Cell GT
 Analysenwaage Genius
 Brutschränke (Bakterien)
 Chemie Genius² Bio Imaging System
 Chromatographiepapier Whatman 3 mm
 Combispin FVL-2400N mit Vortex
 Dampfsterilisator Varioklav
 Deckgläser 24 x 60 mm
 Digital pH-Meter
 Digitalwaage Ohaus Precision Advanced
 Einwegspritzen Injekt (2 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml)
 Elektrophorese-Spannungsgerät PowerPac Basic
 Elektrophoresesystem
 (Mini Protean[®] electrophoresis cell)
 Erlenmeyerkolben (verschiedene Größen)
 Fluoreszenzmikroskop, Axioplan mit Kamera
 Fluoreszenzmikroskop, Axioskop mit Kamera
 Fluoreszenzmikroskop, Axiovert mit Kamera
 Fluoreszenzmikroskop, Axiovert 200M mit Kamera
 Fotometer Smart Spec[™] 3000
 Gefrierschrank Liebherr comfort (-20 °C)
 Gefriertruhe Kryotec (-80 °C)
 Gewebekulturschalen (10 cm, 15 cm)
 Gewebekulturplatten (6-, 12-, 24-, 48- Well-Format)
 Horizontalschüttler Polymax 1040

Firma

Bio-Rad
 Sartorius AG
 Hereaus
 Syngene
 Sarstedt
 PeqLab
 Medi-Tech
 Marienfeld
 Mettler Toledo
 Ohaus
 B.Braun
 Bio-Rad
 Bio-Rad

 Schott Glaswerke
 Carl Zeiss
 Carl Zeiss
 Carl Zeiss
 Carl Zeiss
 Bio-Rad
 Liebherr
 HansS. Schröder GmbH
 Sarstedt
 Nunc
 Heidolph

Inkubatoren (Zellkultur)	Hereaus
Insulinspritzen	B.Braun
IonOptix (Mikroskop-, Kamera-, Fluoreszenzsystem)	IonOptix LLC
Kippwippe	Sarstedt
Konfokales Laser Scanning Mikroskop, LSM 510 Meta Axiovert 200	Carl Zeiss
Kryotom Leica CM 3050 S	Leica
Kühlplatte Leica EG 1150 C	Leica
Kühlschrank Liebherr Profiline	Liebherr
Küvetten (10 x 4 x 45)	Sarstedt
Magnetrührer COMBIMAG RET	Janke & Kunkel
Meßzylinder (verschiedene Größen)	Schott Glaswerke
Mikrotom Leica RM 2125 RT	Leica
96-Well Multiscreen [®] filtration plate	Millipore
NanoDrop [®] ND-1000	PeqLab
Neubauer-Zählkammer	Karl Hecht KG "Assistent"
Objekträger HistoBond [®]	Marienfeld
Objekträger Superfrost/Plus	Hecht-Aisstent
Paraffinbad Leica EG 1120	Leica
PCR-Gerät GeneAmp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems
PCR-Platte MicroAmp [®] Optical 384-Well Reaction Plate	Applied Biosystems
PCR-Folie MicroAmp [®] Optical Adhesive Film	Applied Biosystems
PCR-Einzelgefäße Multiply [®] (0,2 ml)	Sarstedt
Pipetten (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Pipetten (serologisch; 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Sarstedt
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Pipettenspitzen mit Filter Biosphere [®] (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Sarstedt
Pipettierhilfe accu-jet [®] pro	BRAND
Präparationsbesteck	Hammacher Instrumente
Reaktionsgefäße Safe Lock (0,2 ml; 0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf
Reaktionsgefäße konisch (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Reaktionsgefäße rund Cellstar [®] (14 ml)	Greiner Bio-One
Rollschüttler Roller Mixer SRT1	Stuart
Schüttelinkubator C25 Incubator Shaker	New Brunswick Scientific
Sicherheitswerkbank HERAsafe [®]	Thermo
Sterilfilter Filtropur S (0,2 µm)	Sarstedt
Stimulator SD9	Grass Technologies

Thermomixer	Eppendorf
TissueLyser	Qiagen
Ultraschallgerät Vevo 770® System	Visual Sonics
Ultrazentrifuge Optima® L-90 K	Beckman Coulter
Wasserbad	Medax Nagel GmbH
Video-optisches System	
Zellschaber (16 cm)	Sarstedt
Zellsieb (100 µm, Nylon)	BD Falcon
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt
Zentrifuge Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Zentrifuge Centrifuge 5810 R	Eppendorf
Zentrifuge Universal 30 RF	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge J-6B Centrifuge	Beckman Coulter
Zentrifuge J2-21 Centrifuge	Beckman Coulter

12.5 Genexpressionsanalyse

Tabelle 12.14 Übersicht der am stärksten herunterregulierten Gene im Vergleich AAV6-shβ₁-AR vs. AAV6-shKontrolle FC≤0,6.

Genname	Symbol	Entrez_Gene_ID	FC
Tissue factor pathway inhibitor 2	Tfpi2	286926	0,24
RT1 class II, locus Da	RT1-Da	294269	0,25
RT1 class II, locus Ba	RT1-Ba	309621	0,32
RT1 class II, locus Db1	RT1-Db1	294270	0,37
Oxidized low density lipoprotein receptor 1	Oldlr1	140914	0,26
Serine peptidase inhibitor1, clade E	Serpine1	24617	0,3
Apolipoprotein C-I	Apoc1	25292	0,37
Cd74 molecule	Cd74	25599	0,37
Interleukin 1 receptor antagonist	Il1rn	60582	0,39
B-cell leukemia 2 related protein A1d	Bcl2a1	170929	0,41
Regulator of G-protein signaling 2	Rgs2	84583	0,41
Actin, alpha 1, skeletal muscle	Acta1	29437	0,47
C-type lectin domain family 4, member e	Clec4e	450223	0,48
Nuclear factor, interleukin 3 regulated	Nfil3	114519	0,48
Natriuretic peptide precursor A	Nppa	24602	0,49
ATP-binding cassette, subfamily A1	Abca1	313210	0,52
Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	29560	0,52
Interleukin 18	Il18	29197	0,52

Ribonucleotide reductase M2	Rrm2	362720	0,57
Tropomyosin 4	Tpm4	24852	0,58
Caspase 1	Casp1	25166	0,6

Tabelle 12.15 Übersicht der am stärksten hochregulierten Gene im Vergleich AAV6-sh β_1 -AR vs. AAV6-shKontrolle FC $\geq$ 1,67.

Genname	Symbol	Entrez_Gene_ID	FC
Angiopoetin 2	Angpt2	89805	2,76
Mitochondrial ribosomal protein L18	Mrpl18	292244	2,36
Iroquois homeobox 5	Irx5	498918	2,34
Sodium channel, type IV, beta	Scn4b	315611	2,05
Glycerol-3-phosphate-dehydrogenase 1	Gpd1	314472	1,96
Calcium channel, T type, alpha 1G subunit	Cacna1g	29717	1,96
LIM domain binding 3	Ldb3	498587	1,94
Adrenergic, alpha-1B-, receptor	Adra1b	24173	1,92
Leucine-rich repeat-containing 10	Lrrc10	314848	1,86
Iroquois homeobox 4	Irx4	306655	1,84
Gap junction protein, alpha 5	Gja5	50563	1,82
Cbp/p300-interacting transactivator	Cited4	114491	1,81
G protein-coupled receptor 56	Gpr56	260326	1,8
Carbonic anhydrase 9	Car9	313495	1,79
Phospholipase A2, group V	Pla2g5	29354	1,77
Proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	Pcsk6	25507	1,77
GATA binding protein 5	Gata5	499951	1,75
Fibroblast growth factor 16	Fgf16	60464	1,73
Collagen, type XVIII, alpha 1	Col18a1	85251	1,71
Iroquois homeobox 3	Irx3	307721	1,7
G protein-coupled receptor 22	Gpr22	298944	1,7
Neuropilin 1	Nrp1	246331	1,69
Fibrinogen gamma chain	Fgg	24367	1,69
Solute carrier organic anion transporter	Slco3a1	140915	1,67