

Aus der Klinik mit Schwerpunkt
Kardiologie, Angiologie und Pulmologie
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Detektion und Charakterisierung
endogener antisense RNA des β 1- adrenergen Rezeptors**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –

Universitätsmedizin Berlin

von

Ulrike Ingrid Schuster

aus Berlin

Gutachter:

1. Priv.-Doz. Dr. med. H. P. Luther

2. Prof. Dr. med. K. J. Osterziel

3. Priv.-Doz. Dr. med. K. C. Wollert

Datum der Promotion:

22. Juni 2007

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG	7
A.	KLINISCHER HINTERGRUND	7
	A. 1.Pathophysiologie der Herzinsuffizienz	7
	A. 2.Herzinsuffizienz und β 1-adrenerger Rezeptor	7
B.	β1-ADRENERGER REZEPTOR	8
	B. 1.Klassifikation	8
	B. 2.Struktur	8
	B. 3.Regulation	9
C.	ANTISENSE RNA	11
	C. 1. Klassifikation	11
	C. 2. Struktur	12
	C. 3. Lokalisation	14
	C. 4. Funktion	14
D.	FRAGESTELLUNG	17
II.	MATERIAL UND METHODEN	18
A.	DETEKTION	18
	A. 1.RNA-Extraktion	18
	A. 2.DNase Digestion	19
	A. 3.Reverse Transkription	20
	A. 4.Konventionelle PCR	23
	A. 5.Agarosegelelektrophorese	24
B.	STRUKTUR	24
	B. 1.Sequenzierung	24
	B. 2.Transkriptgröße	24
	B. 3.Extraktion von Poly(A)-RNA	25
	B. 4.Detektion von RNA-Duplexen	26

C. LOKALISATION	27
C. 1. Extraktion zytoplasmatischer RNA.....	27
C. 2. Extraktion von Kern RNA	27
D. QUANTITÄT	28
D. 1. SYBR Green™ real-time RT-PCR	28
D. 2. Westernblot	30
E. FUNKTION	32
E. 1.Klonierung von DNA für in vitro Transkriptions- Translations-Essay	32
E. 2.In vitro Transkriptions- Translations-Essay	36
E. 3.Nachweis des β 1-adrenergen Rezeptor-Proteins.....	37
III. ERGEBNISSE	40
A. DETEKTION	40
A. 1.Myokardgewebe der Ratte	40
A. 2.Myokardgewebe des Menschen	40
A. 3.Neonatale Kardiomyozyten	41
A. 4.Qualitätssicherung der konventionellen RT-PCR	41
B. STRUKTUR	43
B. 1.Größe	43
B. 2.Sequenz	44
B. 3.Polyadenylierung.....	45
B. 4.Duplexformationen	45
C. LOKALISATION	46
C. 1. Antisense RNA Transkripte.....	46
C. 2. Duplexformationen	46
D. QUANTITÄT	47
E. FUNKTION	49
E. 1.In vitro Transkriptions-Translations-Essay	49
E. 2.Ratio von antisense und sense RNA im herzinsuffizienten Myokardgewebe.....	50
E. 3. β 1-adrenerges Rezeptor-Protein	51

IV. DISKUSSION	52
A. DETEKTION	52
A. 1. Qualitativer Nachweis von antisense RNA mit RT-PCR im Myokard von Ratte und Mensch sowie in neonalen Kardiomyozyten.....	52
A. 2. Qualitätssicherung der konventionellen RT-PCR	52
B. STRUKTUR	54
B. 1. Die Größe Antisense RNA umfasst die gesamte Länge der Sequenz des β 1-adrenergen Rezeptors	54
B. 2. Vollständige Komplementarität der antisense RNA zur sense RNA.....	56
B. 3. Polyadenylierung der antisense RNA	57
B. 4. Bildung von Duplexen zwischen Antisense und Sense Transkripten	58
C. LOKALISATION	60
C. 1. Koexpression von sense und antisense RNA Transkripten im Myokard.....	60
C. 2. Detektion von Antisense RNA in Nukleus und Zytoplasma.....	61
D. QUANTITÄT	61
D. 1. Tendenz zur Verminderung der antisense RNA im insuffizienten Myokardgewebe.....	61
D. 2. Keine Verminderung der sense RNA im insuffizienten Myokardgewebe	62
E. FUNKTION	71
E. 1. In vitro Inhibition der Translation des β 1-adrenergen Rezeptors durch antisense Oligonukleotide.....	71
E. 2. In vitro Inhibition durch antisense Oligonukleotide ist sequenzabhängig	72
E. 3. In vitro Inhibition durch antisense Oligonukleotide erfolgt auf posttranskriptionaler Ebene	73
E. 4. In vitro Inhibition ist abhängig von der Länge der antisense Oligonukleotide.....	73
E. 5. Unveränderte antisense/sense Ratio RNA in vivo	74
V. THESEN	75
A. THESEN ZU MECHANISMUS UND FUNKTION ENDOGENER ANTISENSE RNA	75
A. 1. Verstärkung der Translation durch endogene antisense RNA	75
A. 2. Inhibition der Translation durch endogene antisense RNA / RNA-Interferenz	76
A. 3. Schutzfunktion.....	77
A. 4. Evolutionärer Vorteil.....	77

B. THESEN ZUR KLINISCHEN RELEVANZ DER ERGEBNISSE	78
B. 1. Erste klinische Studien basieren auf antisense Technologie.....	78
B. 2. Neue Strategien zur Entwicklung neuer Therapieansätze bei Herzinsuffizienz	79
VI. ZUSAMMENFASSUNG	81
VII. ANHANG	82
C. LITERATUR	82
D. TABELLEN	96
E. ABBILDUNGEN	96
F. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	98
G. PUBLIKATIONEN	99
H. DANKSAGUNG	100
I. LEBENSLAUF	101
J. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	102

VI. Zusammenfassung

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit dienen der Erweiterung des Verständnisses der molekularen Vorgänge bei chronischer Herzinsuffizienz. Im Fokus steht die Untersuchung eines Teilaspekts der katecholamininduzierten β -adrenergen Signaltransduktion, der Downregulation des β 1-adrenergen Rezeptorproteins am Beispiel von Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie (DCM).

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels RT-PCR endogene antisense RNA für den β 1-adrenergen Rezeptor im Myokardgewebe der Ratte und des Menschen sowie in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte nachgewiesen. Die antisense RNA erstreckt sich fast über die gesamte cDNA des β 1-adrenergen Rezeptors. Ihre Sequenz ist zur sense RNA vollständig komplementär, polyadenyliert und formt RNA-RNA Duplexe mit der zugehörigen sense RNA. Endogene antisense RNA wurde im zytoplasmatischen und im nukleären Zellkompartiment detektiert.

Im insuffizienten Myokard konnte für die antisense RNA keine Veränderung der Menge im Vergleich zu herzgesunden Kontrollen dokumentiert werden. Auch die Ratio aus antisense und sense RNA war bei Patienten unverändert im Vergleich zu herzgesunden Kontrollen. Die Hypothese, nach welcher eine Tendenz von inversen Mengen antisense und sense RNA bei DCM-Patienten und Kontrollen nachweisbar wäre, bestätigte sich damit nicht.

In einem In vitro-Transkriptions-/ Translations-Essay wurde modellhaft eine Inhibition der Translation von Proteinstrukturen des β 1-adrenergen Rezeptors durch antisense Oligonukleotide in Abhängigkeit von deren Konzentration und Sequenz nachgewiesen. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich Hinweise darauf, dass endogene antisense RNA unabhängig von deren Menge einen Einfluss auf die Downregulation des β 1-adrenergen Rezeptors haben könnte.

D. Tabellen

Tabelle 1 Primer für den β_1 -adrenergen Rezeptor, Position in Sequenz bei der Ratte * [Machida, 1990], Position in Sequenz beim Menschen ** [Frielle, 1987].....	22
Tabelle 2 Übersicht der Primer für den β_1 -adrenergen Rezeptor, Position in Sequenz bei der Ratte * [Machida, 1990], Position in Sequenz beim Menschen ** [Frielle, 1987]	25
Tabelle 3 SYBR Green™ real-time RT-PCR Primer zum Nachweis von sense und antisense RNA mittels SYBR Green™ real-time RT-PCR (H. sapiens)	29
Tabelle 4 Rezept für zwei Gele (Westernblot)	31
Tabelle 5 Rezept für Polyacrylamidgel	38

E. Abbildungen

Abbildung 1 Detektion endogener β_1 Adrenorezeptor antisense RNA mittels konventioneller RT-PCR im Myokardgewebe fünf verschiedener Ratten. ML – Mass Ladder, Primer β_1 AR for 707, β_1 AR rev 863	40
Abbildung 2 Detektion endogener β_1 Adrenorezeptor antisense RNA mittels konventioneller RT-PCR im Myokardgewebe drei verschiedener herzgesunder humaner Kontrollen. ML – Mass Ladder, Primer β_1 AR for 707, β_1 AR rev 863	40
Abbildung 3 Detektion endogener antisense RNA des β_1 -adrenergen Rezeptors in neonatalen Kardiomyocyten. LW - Leerwert; ML – Mass Ladder; Primer β_1 AR for 707, β_1 AR rev 863.....	41
Abbildung 4 RT-PCR mit DNA-spezifischen Primern bei einem Intron-haltigen Referenzgen (Troponin I) (-): nicht DNase I behandelte Probe mit DNA-spezifischem Primer. (+): mit DNase I behandelte Probe mit DNA-spezifischem Primer.	41
Abbildung 5 (+):RNA-spezifischer Primer (DNase I behandelte Probe) (-): RNA-spezifischer Primer ohne M- MLV Reverse Transkriptase (<i>no-RT-control</i>).....	42
Abbildung 6 RNA-Abhängigkeit der PCR Signale bei sense und antisense RNA. Einsatz von 0,1 bis 0,5 μ g RNA; Primer β_1 AR for 707 / β_1 AR rev 863.....	42
Abbildung 7 Detektion von antisense RNA durch RT-PCR, Ratte [Machida 1990].....	43
Abbildung 8 Detektion von antisense RNA mit RT-PCR, Mensch.....	44
Abbildung 9 Nachweis der Polyadenylierung von antisense RNA des β_1 -adrenergen Rezeptors (m RNA Präparation, humanes Myokardgewebe, Primer β_1 AR for 707/ β_1 AR rev 863) mittels konventioneller RT-PCR, S- sense RNA, AS – antisense RNA.....	45
Abbildung 10 Nachweis von sense/antisense RNA Duplexen in einer Kardiomyocytenzellkultur (x: Leerwert, Primer β_1 AR for 707, β_1 AR rev 863), Ausschnitt aus Abbildung 11.....	45
Abbildung 11 Nachweis von sense und antisense RNA-Transkripten in verschiedenen Zellkompartimenten Lane A,C,E,G. Jeweils Primer β_1 AR for 707, rev 863).....	46
Abbildung 12 Nachweis von sense/antisense RNA Duplexen in verschiedenen Zellkompartimenten einer	

Kardiomyocytenzellkultur (Primer β_1AR for 707, β_1AR rev 863). Zur besseren Übersicht Wiederholung von Abbildung 11 und Markierung der relevanten Lanes durch Pfeile	47
Abbildung 13 Vergleich der Menge endogener antisense RNA des β_1-adrenergen Rezeptors bei Patienten und Kontrollen. Zum Vergleich rechts: sense RNA bei Patienten und Kontrollen.....	47
Abbildung 14 CT-Werte von antisense und sense RNA des β_1-adrenergen Rezeptors im Verleich bei Patienten und Kontrollen.....	48
Abbildung 15 Schmelzkurve der Proben des β_1-adrenergen Rezeptors.....	48
Abbildung 16 Expression von Proteinteilstrukturen des β_1-adrenergen Rezeptors nach in vitro Transkription/Translation unter Zugabe von antisense Oligonukleotiden verschiedener Konzentrationen (scrambled: Oligonukleotid mit den gleichen Anteilen von A, T, G und C wie antisense).	49
Abbildung 17 In vitro Transkription /Translation	50
Abbildung 18 Vergleich der Ratio endogener antisense RNA des β_1-adrenergen Rezeptors bei Patienten und Kontrollen	50
Abbildung 19 Downregulation des β_1-adrenergen Rezeptor-Proteins bei Patienten mit DCM (links) im Vergleich zu herzgesunden Kontrollen (rechts).....	51

F. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
A	Adenin
β1AR	β1-adrenerger Rezeptor
bp	Basenpaare
C	Cytosin
C _T	Threshold Cycle
dsRNA	doppelsträngige RNA, Duplex-RNA
G	Guanin
GS	Guanylnukleotid-bindende Protein
mRNA	messenger RNA
NAT	natürliche antisense Transkripte
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
RISC	RNA-Induced Silencing Complex
RT	Reverse Transkription
siRNA	short interfering RNA
T	Thymin
T _m	Schmelztemperatur
U	Uracil
UTR	untranslated region

G. Publikationen

U.Schuster, S.Podlowski, H.Bartsch, G.Baumann, H.P.Luther: Nachweis von Beta(1)-Adrenorezeptor sense-antisense RNA Duplexen in Kardiomyozytenzellkulturen. Z Kardiol 93: Suppl 3 (2004): P135. 70 Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Kardiologie

S.Podlowski, R.Pregla, M.Moellgaard, U.Schuster, R.Hetzer, G.Baumann, H.P.Luther: Nachweis von endogener antisense mRNA des beta 1 -Adrenorezeptors (AR) in humanem Myocard. 68. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie

H. Danksagung

Zum Gelingen und zur Durchführung dieser Arbeit haben viele Menschen beigetragen, die mich während der Zeit der experimentellen Arbeiten und der Anfertigung des Manuskripts unterstützt haben. Bei allen möchte ich mich sehr herzlich bedanken. Darüber hinaus möchte ich mich ausdrücklich bedanken bei:

- Herrn PD Dr. med. Hans-Peter Luther für die Bereitstellung dieses interessanten Themas, kritische Gespräche, aufmunternde Worte und die intensive Durchsicht des Roh-Manuskriptes,
- Herrn Prof. Dr. Gerd Baumann für die finanzielle Unterstützung,
- Frau Dr. Svenia Podlowski für die konstruktive Zusammenarbeit, die Hilfe bei methodischen Fragestellungen und der Mitwirkung bei der Fokussierung der Thematik,
- Herrn Dr. Wallukat für die Überlassung einiger Oligonukleotide und die Bereitstellung von humanen Myokardgewebe,
- allen MitarbeiterInnen des kardiologischen Forschungslabors der Charité in der Ziegelstraße, insbesondere Frau Stach und Frau Zepp für das gute Teamwork, das angenehme Arbeitsklima und den fruchtbaren Ideenaustausch während der experimentellen Arbeiten für dieses Projekt,
- Frau Edith Böhmer für ihre gründliche orthografische Korrektur des Manuskripts.

Ich möchte meinen Eltern dafür danken, dass sie mir das Studium der Medizin ermöglicht und mich auf meinem Weg mit all ihrer Kraft unterstützt haben.

I. Lebenslauf

Der Lebenslauf wird aus Datenschutzgründen in der elektronischen Version der Arbeit nicht mit veröffentlicht.

J. Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, daß ich die vorliegende Doktorschrift eigenständig ohne unerlaubte Hilfe Dritter angefertigt habe, dass sie nicht in Teilen eine Kopie anderer Arbeiten darstellt, dass die benutzten Hilfsmittel und das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt sind und dass die Doktorschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Ulrike Ingrid Schuster