

# I. Einleitung

## A. Klinischer Hintergrund

---

### A. 1. Pathophysiologie der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist ein klinisches Syndrom, dessen Ätiologie vielfältig ist. Pathophysiologisch kommt es sowohl zu isolierten als auch kombinierten systolischen bzw. diastolischen Ventrikelfunktionsstörungen. Systolische Ventrikelfunktionsstörungen sind Folge von Kontraktionsstörungen des Myokards und werden pathophysiologisch in jene mit gesteigerter Ventrikelwandspannung (Erhöhung von Preload/Afterload) und jene mit kontraktile Dysfunktion differenziert. Ursachen der kontraktile Dysfunktion können der Myokardinfarkt, die Myokarditis sowie verschiedene Kardiomyopathien sein.

Kardiomyopathien sind primär muskuläre Erkrankungen des Herzens. Man unterscheidet die dilatative (DCM), hypertrophische (HCM) und restriktive (RCM) sowie die arrhythmogene rechtsventrikuläre (ARVCM) und nicht klassifizierbare (NKCM) Kardiomyopathien. Die DCM ist neben der HCM eine der häufigsten Kardiomyopathien.

Pathophysiologisches Charakteristikum der Herzinsuffizienz ist die Aktivierung verschiedener neuroendokriner Systeme. Es kommt zu einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, einer Steigerung der Vasopressin (ADH) Ausschüttung, einer Freisetzung der kardialen Gewebshormone ANP und BNP sowie zu einer Sympathikusaktivierung mit erhöhten Katecholaminspiegeln. Katecholamine haben am Herzen eine positive inotrope Wirkung. Ein chronisch erhöhter Katecholaminspiegel im Blut führt langfristig zu einer verminderten Wirksamkeit von Katecholaminen an  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren [Baumann *et al.* 1981, Harden *et al.* 1983].

### A. 2. Herzinsuffizienz und $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor

Die verminderte Ansprechbarkeit  $\beta_1$ -adrenerger Rezeptoren auf Katecholamine wird bei Patienten mit Herzinsuffizienz häufig beobachtet und wird als eines der molekularen Korrelate bei Herzinsuffizienz angesehen.

Aus diesem Grund stellt der Schutz des Herzens vor kardiodepressiven sympathischen Wirkungen mit Hilfe von  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorantagonisten ( $\beta$ -Blockern) einen wichtigen Teilaspekt in der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz dar.  $\beta$ -Blocker führen über Rückkopplungsmechanismen am intakten Protein zur Rezeptor-Up-Regulation und verbessern die Prognose von Patienten mit Herzinsuffizienz signifikant.

Die Therapie mit  $\beta$ -Blockern ist zwar mit vergleichsweise wenig Nebenwirkungen verbunden. Es können jedoch Funktionsstörungen des zentralen Nervensystems wie Schlafstörungen, Depressionen und Schwindel bei der Therapie auftreten. Außerdem treten partielle  $\beta_2$ -adrenerge antagonistische Wirkungen auf, wie beispielsweise ein Anstieg des peripheren vaskulären Widerstandes und insbesondere Bronchokonstriktion, was zur Einschränkung der Indikation z. B. bei Asthma bronchiale führt. Die Erforschung neuer pharmakologischer Herangehensweisen ist für weitere Fortschritte in der Therapie der Herzinsuffizienz unerlässlich und birgt zugleich großes Potential, zur Verbesserung von Lebensqualität und –erwartung bei Patienten mit Herzinsuffizienz beizutragen.

Eine Grundlage dazu ist das Verständnis der vielfachen molekularen Veränderungen, die der Downregulation des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorproteins zugrunde liegen. Welchen Mechanismen die verminderte Ansprechbarkeit der  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren genau unterliegt und auf welche Weise sie beeinflusst werden könnte, ist Gegenstand vieler Forschungsarbeiten (vgl. Kapitel I-II.A.1-4). In deren Ergebnis wurde bereits als ein wesentlicher Angriffspunkt die Rezeptorproteinsynthese identifiziert. Auf diesem Gebiet werden weitere Interventionsstrategien vermutet. Der exakte Mechanismus der Regulation des Rezeptorproteins ist jedoch nicht vollends verstanden.

## **B. $\beta_1$ -adrenerger Rezeptor**

---

### **B. 1. Klassifikation**

Adrenerge Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-Rezeptoren. Pharmakologische Forschungen, beginnend mit den Arbeiten von Ahlquist, ließen die Existenz von alpha- und beta-Subklassen von adrenergen Rezeptoren vermuten [Ahlquist et al. 1948]. Bestätigung fand die Theorie mit der Synthese der ersten selektiven  $\beta$ -Rezeptorantagonisten im Jahr 1955. Darüber hinaus wurde die Existenz weiterer Subklassen von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Rezeptoren vermutet. Heute geht man davon aus, dass mindestens zwischen zwei  $\alpha$ -Adrenorezeptorsubtypen ( $\alpha_1$  und  $\alpha_2$ ) und drei  $\beta$ -Adrenorezeptorsubtypen ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  und  $\beta_3$ ) unterschieden werden kann [Emorine et al. 1991, Bylund et al. 1994].

### **B. 2. Struktur**

Die c-DNA des humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors kodiert für ein Protein aus 477 Aminosäuren. [Friele et al. 1987]. Dieses ist zu 69% homolog zum 466 Aminosäuren umfassenden Protein des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors der Ratte [Machida et al. 1990]. Die Gene für den humanen  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor und für den der Ratte haben eine Größe von 1,7 bzw. 1,6 Kilobasenpaaren

und sind zu 90% homolog. Sie liegen bei beiden Spezies jeweils auf Chromosom 10. Als Besonderheit sei hervorgehoben, dass das Gen des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors, wie auch das des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors, keine Introns enthält. Die Sequenz des  $\beta_3$ -adrenergen Rezeptors enthält dagegen ein Intron [Pietri-Rouxel *et al.* 1995, Strosberg *et al.* 1996].

Die Promotorregion des  $\beta_1$ -Rezeptors enthält Erkennungsregionen für das Schilddrüsenhormon und für Glukokortikoide [Emorine *et al.* 1991, Collins *et al.* 1993], die für die Regulation der Genexpression des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors auf transkriptioneller Ebene verantwortlich sein könnten. Überdies wurden mittels Sequenzanalyse ebenfalls im Promotorbereich Bindungsstellen für das "cAMP responsive element" und die Transkriptionsfaktoren NF<sub>1</sub> ("nuclear factor") und SP<sub>1</sub> gefunden [Emorine *et al.* 1991].

Das *Protein* des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors weist die grundlegenden strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren auf. Es ist ein integrales Membranprotein, welches mit sieben Domänen (I-VII) als  $\alpha$ -Helices die Plasmamembran durchdringen [Dohlman *et al.* 1987]. Diese sind durch drei extrazelluläre (1e-3e) und drei intrazelluläre Schleifen (1i-3i) verbunden. Das N-terminale Ende der Rezeptoren befindet sich auf der extrazellulären Seite; das C-terminale Ende auf der intrazellulären [Lefkowitz *et al.* 1990].

### **B. 3. Regulation**

Die Verminderung der Wirkung von Katecholaminen am Myokard kann auf zwei molekulare Veränderungen des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorproteins zurückgeführt werden, der Desensibilisierung und der Downregulation.

Bei der *Desensibilisierung* bleibt die Zahl der Rezeptoren in den Myozyten unverändert. Lediglich die Ansprechbarkeit auf die Katecholamine ist reduziert. Untersuchungen zur Desensibilisierung ergaben, dass als Mechanismus zum einen die vermehrte Expression und Aktivität des inhibitorischen G-Proteins (Gi) eine Rolle spielt. Zum anderen konnte eine vermehrte Expression und Aktivität der G-Proteinrezeptorkinase (GRK,  $\beta$ -ARK) und die damit verbundene Internalisierung des Rezeptors als ursächlich identifiziert werden (vgl. Kapitel III.A.5.a).

Bei der *Downregulation* ist die Gesamtzahl der  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptoren drastisch reduziert. Zum Mechanismus der Downregulation wurde eine Reihe von Hypothesen formuliert. Sie reichen von der Vermutung einer gesteigerten Proteolyse bis zur Postulierung einer verminderten Transkription und Translation. Die Proteinsynthese kann theoretisch in jedem Schritt auf dem Weg vom Gen zum nativen Protein reguliert werden.

Diese wurde bereits vor mehr als 30 Jahren auf Proteinebene mittels verschiedener Bindungsstudien nachgewiesen und quantifiziert [Shear 1976, Su *et al.* 1979, Su *et al.* 1980, Homburger *et*

*al.* 1980, Baumann *et al.* 1981, Bristow *et al.* 1982]. Die Down-Regulation ist als ein Prozess definiert, welcher die Liganden-Rezeptor Interaktion nach Stimulation mit Agonisten über eine Reduktion der Zahl der Rezeptoren in allen Zellfraktionen einschränkt [Mills *et al.* 2002]. Sie erfolgt langsamer als der Prozess der Internalisierung und dauert Stunden bis Tage. Über den Verbleib der Rezeptorproteine gibt es lediglich Vermutungen. Letztendlich im Detail verstanden sind diese Mechanismen noch nicht.

Die Regulation der Menge eines Proteins kann nur über die Beeinflussung des Verhältnisses von dessen Abbau und Synthese erfolgen. Eine Reduktion der Proteinmenge bedeutet, dass entweder dessen Degradation induziert oder dessen Synthese inhibiert ist.

Es gilt als gesichert, dass einerseits eine induzierte Degradation durch lysosomale Proteolyse nach Internalisierung die Ursache der Verminderung der Rezeptorzahl ist und in diesem Fall die Regeneration nur über Neusynthese des Rezeptorproteins stattfindet [Frederich *et al.* 1983].

Andererseits konnte die These bestätigt werden, dass es gleichzeitig auch zu einer Inhibition der Synthese des Rezeptorproteins kommt. Den Nachweis hierzu erbrachte die Beobachtung, dass nicht nur das Rezeptorprotein, sondern überdies auch die mRNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors im insuffizienten Myokard in verminderter Menge vorliegt [Ungerer *et al.*, 1993, Bristow *et al.*, 1993].

Die Frage nach dem Mechanismus, welcher zur Reduktion der mRNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors führt, stand bereits im Fokus einiger Arbeiten. Es konnte jedoch lediglich für den  $\beta_2$ -Adrenorezeptor ein RNA-bindendes Protein nachgewiesen werden, welches die Stabilität der mRNA herabsetzt. Dessen Menge wies nach der Behandlung von Zellen mit  $\beta_1$ -Rezeptor-Agonisten einen starken Anstieg auf [Port *et al.* 1992].

Die Downregulation des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptorproteins als auch die Reduktion der mRNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors kann neben der Stimulation durch Agonisten über einen weiteren Mechanismus ausgelöst werden. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Kultivierung von Kardiomyozyten mit agonistischen  $\beta_1$ -Autoantikörpern die Expression des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene reduziert. Diese Downregulation war subtypspezifisch für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor [Podlowski *et al.* 1998].

## C. Antisense RNA

---

### C. 1. Klassifikation

Im Zuge der Erkenntnisse der letzten Jahre kann man heute nach funktionellen Gesichtspunkten bei den Ribonukleinsäuren zwei Klassen unterscheiden: Zum einen kodierende oder informativische RNAs, zum anderen nicht-kodierende oder funktionelle RNAs. [Altuvia *et al.* 2000, Erdmann *et al.* 2001, Michaelis *et al.* 1991, Ambros *et al.* 2001].

Informativische RNAs kodieren in ihrer Sequenz die Informationen zur Translation in Proteine, wie z.B. die messenger RNA (mRNA) und virale RNAs (vRNAs), die virale Genome verschlüsseln. Nicht-kodierende RNAs (untranslated RNAs) sind RNA-Abschnitte, die von Introns transkribiert werden sowie funktionelle RNAs, wie die ribosomale RNA (rRNA) und die transfer RNA (tRNA) [Mattick *et al.* 2001].

Neben diesen seit Jahrzehnten bekannten funktionellen RNAs wurden in den letzten Jahren eine Reihe weiterer untranslatierter RNAs mit regulatorischen Eigenschaften entdeckt. Etwa 98% des gesamten transkriptionalen Outputs beim Menschen besteht, neuesten Schätzungen zufolge, aus nicht-kodierenden, funktionellen RNAs [Mattick *et al.* 2001].

Der Begriff ‚antisense‘ (Gegensinn) wurde in Abgrenzung zum Begriff ‚sense‘ (Sinn) geprägt. Dabei meint man mit sense RNA die kodierende RNA, in deren Sequenz die Information zur Synthese von Proteinen gespeichert ist, also die *messenger RNA*. Der zur kodierenden sense RNA komplementäre Nukleinsäurestrang, der Gegenstrang, entspricht der antisense RNA.

Aufgrund der Komplementarität vermag antisense RNA hochspezifisch an ihre sense RNA zu binden und birgt damit großes Potential zur spezifischen Inhibition der Proteinsynthese. Diese Eigenschaft wurde bereits vor 25 Jahren entdeckt, als man beobachtete, dass Oligodeoxynukleotide über komplementäre Basenpaarung an mRNA binden und damit deren Translation blockieren kann [Zamecnik *et al.* 1978].

Seither werden synthetische antisense RNAs eingesetzt, um experimentell die Expression von Genen für investigative und therapeutische Zwecke zu untersuchen. Anfang der 80er Jahre konnten auch erstmals endogene antisense RNAs nachgewiesen werden. Sie sind wahrscheinlich nicht translatierte RNA-Moleküle, treten in verschiedenen Formen auf und besitzen regulatorische Eigenschaften. Einige asRNAs wirken über einen Mechanismus, bei dem sie mit komplementären Sequenzen von DNA oder RNA hybridisieren, als natürliche Regulatoren der Genexpression (vgl. I.C. 4).

## C. 2. Struktur

### C. 2.1. Größe

Die Größe eines mRNA-Moleküls (sense RNA) kann wenige hundert bis zu einigen tausend Basenpaaren betragen. Unter den endogenen antisense RNAs wurden verschiedene Gruppen nachgewiesen, die sich unter anderem durch ihre Größen unterscheiden. Es handelt sich im Vergleich zur mRNA einerseits um sehr kurze RNA Fragmente von wenigen Nukleotiden (<100 bp) Länge und andererseits um längere Fragmente mit einigen hundert Basenpaaren, die sogar der Länge der mRNA entsprechen können.

Vertreter der kurzen RNA-Fragmente sind beispielsweise die *Small interfering RNAs* (siRNA), endogene RNA-Duplexe von 21-25 Nukleotiden Länge, welche zur Degradation der Ziel-RNA führen [Elbashir *et al.* 2001, Nykanen *et al.* 2001] und *MicroRNAs* (miRNA), endogene einsträngige RNAs von 21-25 Nukleotiden Länge, deren regulatorische Funktion nicht über eine Degradation der Ziel-RNA erfolgt [Paddison *et al.* 2002, Ambros *et al.* 2001].

In den letzten Jahren wurde neben diesen kurzen antisense RNAs auch eine Reihe von längeren, mehrere hundert Basenpaare umfassenden endogenen antisense Transkripten detektiert. Diese sind offenbar komplementäre Kopien der korrespondierenden mRNA [Luther *et al.* 1998, Bartsch *et al.* 2004].

### C. 2.2. Sequenz

Bei mRNA Molekülen (sense RNA) kodiert die Sequenz die Information zur Proteinsynthese. Für die Charakterisierung der nachgewiesenen antisense RNA birgt die Sequenzanalyse und damit verbunden die Analyse der Komplementarität wertvolle Aufschlüsse über ihre Herkunft und die Art ihrer Funktionsweise. In der Literatur werden antisense RNA-Moleküle mit verschiedenen Eigenschaften beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Sequenz in zwei Gruppen unterteilen lassen.

Einerseits finden sich antisense Transkripte, welche den sense Transkripten vollständig komplementär sind. Diese direkt vom komplementären Strang des betreffenden Gens abgeschriebenen natürlichen antisense Transkripte (NAT) werden auch als cis-acting oder cis-NATS bezeichnet [Lavorgna *et al.* 2004]. Innerhalb der antisense RNA existieren Sequenzen die für die Initiation und Stabilisierung der Interaktion mit der target RNA von unterschiedlicher Bedeutsamkeit sind. Diese langen antisense Transkripte konnten sowohl in vivo nachgewiesen als auch erfolgreich in vitro in Form von doppelsträngiger RNA zur Genregulation eingesetzt werden [Kimelman *et al.* 1989, Kumar *et al.* 1998, Luther *et al.* 1998, Shi *et al.* 2000, Luther *et al.* 2001, Podlowski *et al.*

2002, Bartsch et al. 2004].

Andererseits existieren antisense Transkripte, die z.T. nur eine unvollständige Komplementarität zur sense RNA aufweisen und in den meisten Fällen sehr kurze Sequenzen, um 20 Nukleotide, umfassen. Beispiele sind miRNAs, siRNAs, shRNAs und snRNAs (vgl. Abschnitt I C. 3 Seite 14). Diese kurzen antisense RNA Transkripte stammen häufig von entfernt liegenden Gen-Orten oder sind von bestimmten Vorläufermolekülen abgeleitet und werden daher als trans-acting antisense RNA bezeichnet.

### **C. 2.3. Polyadenylierung**

Eine universelle Eigenschaft eukaryontischer messenger RNAs ist die Existenz eines endständigen Abschnitts aus Polyadenylsäure an ihrem 3'-Ende, der auch als Poly(A)-Sequenz oder Poly(A)-Schwanz bezeichnet wird [Dreyfus *et al.* 2002]. Diese Polyadenylierung wurde vor über 30 Jahren erstmalig beschrieben und findet sich sowohl bei höheren Organismen als auch bei Bakterien [Adesnik *et al.* 1972, Edmonds *et al.* 2002].

Die Poly(A)-Sequenz ist nicht von der DNA kodiert, sondern wird nach der Transkription während des Prozessing des 3'-Ende im Nukleus an die RNA angehängt. Die genaue Funktion ist in vielen Details noch nicht geklärt. Eine stabilisierende Wirkung auf mRNA konnte bei Eukaryonten nachgewiesen werden [Dreyfus *et al.* 2002]. So beginnt in Hefen und bei höheren Eukaryonten die Degradation von zytoplasmatischer mRNA normalerweise mit der Kürzung der Poly(A)-Sequenz [Wilusz *et al.* 2001]. Dieser initiale Schritt limitiert normalerweise die Geschwindigkeit der Degradation, d.h. die Lebensdauer der meisten mRNAs ist durch die zur Deadenylierung benötigte Zeit determiniert [Dreyfus *et al.* 2002, Tucker *et al.* 2001]. Im Gegensatz zu dieser stabilisierenden Wirkung bei Eukaryonten vermittelt die Poly(A)-Sequenz bei *E. coli* eine Beschleunigung der Degradation von mRNA [Dreyfus *et al.* 2002]. Darüber hinaus scheint die Poly(A)-Sequenz einen Einfluss auf die Effektivität des Exports der mRNA ins Zytoplasma zu besitzen [Hilleren *et al.* 2001]. Ein Einfluss auf die Termination der Transkription in Eukaryonten, auf das Prozessing von pre-mRNA [Proudfoot *et al.* 2002] sowie ein Zusammenhang zur Translation, insbesondere der Initiation werden postuliert [Lewin *et al.* 1998].

### **C. 2.4. Duplexformationen**

Es konnte gezeigt werden, dass sense und antisense Transkripte basierend auf ihrer komplementären Struktur RNA-RNA-Duplexe bilden können. Es wird vermutet, dass sie auf diese Art die Genexpression auf transkriptionaler, post-transkriptionaler oder translationaler Ebene modulieren können [Knee *et al.* 1997].

RNA-Duplexe können im Nukleus durch Deaminasen weiter prozessiert werden. In einem Fall konnte nachgewiesen werden, dass hierbei viele der Adeninbasen in Inosinbasen konvertiert werden [Bass und Weintraub 1987]. Abhängig vom Grad der Modifikation, werden die RNAs entweder degradiert, im Nukleus behalten oder ins Zytoplasma transportiert [Kumar *et al.* 1998]. Als weitere Enzyme, welche doppelsträngige RNA als Substrat prozessieren, seien beispielhaft die Proteinkinase R (PKR) und die 2-5A Synthetase erwähnt [Kerr *et al.* 1978, Proud *et al.* 1995].

Der Nachweis von RNA-RNA-Duplexen gelingt in vielen Fällen nicht, denn die Modifikation bzw. das Processing von RNA-Duplexen kann mit deren Detektion interferieren [Kumar *et al.* 1998]. Es konnte gezeigt werden, dass die Duplexbildung ein komplizierter und fragiler Prozess ist. Daher wird der Nachweis von RNA-Duplexen eher als ein außergewöhnlicher Umstand, als die Regel angesehen. [Wagner EG *et al.* 1994]. In unserer Arbeitsgruppe konnten bereits RNA-Duplexe für ein anderes kardiales Protein, das Troponin I [Podlowski *et al.* 2002] nachgewiesen werden.

### **C. 3. Lokalisation**

In mehreren Fällen konnten antisense RNAs in verschiedenen Zellkompartimenten nachgewiesen werden. Entsprechend ihres Vorkommens werden diese vorwiegend kurzen RNAs beispielsweise als *small nuclear RNA* (snRNA), *small nucleolar RNA* (snoRNA) oder *small cytosolic RNAs* (scRNA), bezeichnet. Dicer Enzyme, welche zur Modifikation der antisense RNA bei der RNA Interferenz offensichtlich essentiell sind, sind augenscheinlich im Zytoplasma lokalisiert. Dies belegen Untersuchungen von Zellextrakten und indirekten Immunfluoreszenzexperimente [Billy *et al.* 2001].

### **C. 4. Funktion**

Die RNA vermittelte Genregulation ist offenbar unter höheren Eukaryonten weit verbreitet. Es wird geschätzt, dass etwa 10-20 % des humanen Genoms einer antisense Transkription unterliegt [Herbert 2004]. Die Modulation der Geneexpression durch antisense RNA wird nunmehr auch beim Menschen als weit verbreiteter regulatorischer Mechanismus angesehen [Yelin *et al.* 2003]. Komplexe genetische Phänomene wie RNA Interference (RNAi), Co-Suppression, transgenes Silencing, Imprinting, Methylierung, und wahrscheinlich sogar die phänotypische und genotypische Variation zwischen Individuen einer Population werden über verschiedene Teilmechanismen des RNA-Signaling vermittelt.

Der Begriff *RNA Interference* (RNAi), oder Posttranskriptionales-Gene-Silencing wurde nach der Beobachtung geprägt, dass die Injektion von doppelsträngiger RNA (dsRNA) in den Nematoden *Caenorhabditis elegans* zu einer spezifischen Inhibition von Genen führte, welche in ihrer Sequenz zu dieser RNA hohe Komplementarität aufwiesen [Fire *et al.* 1998]. Die dsRNA vermittelte offenbar spezifisch die Degradation homologer mRNA.

Weitere Untersuchungen erbrachten, dass sowohl exogene als auch endogene dsRNA Moleküle als Trigger des Gen-Silencings fungieren können. Die dsRNAs können dabei entweder die Sekundärstruktur sehr langer Haarnadelstruktur-RNAs oder bimolekularer Duplex-RNAs aufweisen [Ambros *et al.* 2001].

Der Mechanismus der RNA Interferenz beginnt offenbar gemäß von Zellstudien und in vitro Experimenten mit der Spaltung der dsRNA durch das so genannte 'Dicer-Enzym'. Dieses in seiner Wirkung den RNaseIII-ähnlich charakterisierte Enzym [Bernstein *et al.* 2001a] spaltet ATP-abhängig [Zamore *et al.* 2000, Bernstein *et al.* 2001-a] die dsRNA in Fragmente einer Länge zwischen 21 bis 26 Nukleotiden, so genannte short interfering RNAs (siRNA) [Bernstein *et al.* 2001a, Grishok *et al.* 2001, Hannon *et al.* 2002, Hutvagner *et al.* 2002]. Charakteristisch dabei ist, dass die siRNA am terminalen 3'-Ende einen Überhang von zwei-Nukleotiden besitzen und am terminalen 5'-Ende phosphoryliert sind [Zamore *et al.* 2000, Elbashir *et al.* 2001a]. Diese Konfiguration ist funktionell bei der Inkorporation in den RISC-Komplex (s.u.) von Bedeutung [Elbashir *et al.* 2001a, Nykanen *et al.* 2001]. Basierend auf den bekannten Mechanismen der RNaseIII-Enzymfamilie, ist das Dicer-Enzym wahrscheinlich ein dimeres Enzym. Die Spaltung in Fragmente mit präziser Größe wird dadurch vermittelt, dass eine der aktiven Seiten in jedem Dicer-Molekül inaktiv ist. Hierdurch kommt es zu einer Verschiebung der Periodizität von 9-11 Nukleotiden, wie bei bakteriellen RNaseIII-Enzymen, auf ca. 22 Nukleotiden bei eukaryotischen Dicer-Enzymen [Blaszczyk *et al.* 2001]. Dicer vermitteln das Prozessing von dsRNA in siRNA auf für die Spezies jeweils charakteristische Größe [Bernstein *et al.* 2001; Ketting *et al.* 2001].

Durch den initialen Schritt der dsRNA Degradation kommt es zur Akkumulation zahlreicher siRNA-Moleküle beider Stränge der dsRNA [Ambros *et al.* 2001]. Um die Degradation der Ziel-mRNA mit maximaler Effizienz zu triggern, müssen die siRNAs, mit Ausnahme der terminalen Nukleotid-Überhänge perfekte Komplementarität zur mRNA aufweisen [Hannon *et al.* 2002].

Dem Model von Elbashir zufolge existieren verschiedene, die dsRNA-beeinflussende Proteine, welche asymmetrisch an die dsRNA binden. Dies bedeutet, dass eines der Proteine stets mit dem siRNA-Strang in 3'-5'-Richtung bindet, während das andere stets an den komplementären siRNA-Strang bindet. Demnach blieben diese Proteine mit dem siRNA-Duplex assoziiert und bewahren dessen Orientierung, wie sie durch die Richtung der dsRNA-Prozessing-Reaktion be-

stimmt wurde [Elbashir *et al.* 2000].

Weitere Proteine vermitteln nachfolgend den Transport der siRNA Duplexe zum passenden Effektor-Komplex, einem Ribonucleoproteinkomplex, dem RNA induced silencing complex (RISC) [Hannon *et al.* 2002]. Die siRNA Duplexe werden wahrscheinlich in RISC inkorporiert und entwunden, wodurch es zu einer Aktivierung von RISC kommt [Nykanen *et al.* 2001].

Die Assoziation von siRNA mit RISC ermöglicht es diesem Komplex über Watson–Crick Basenpaarungen, mRNA als homologe Sequenzen der siRNA zu identifizieren, als Substrat zu selektieren und deren Degradation bzw. Inhibition zu vermitteln [Hammond *et al.* 2000, Bernstein *et al.* 2001, Hutvagner *et al.* 2002, Hannon *et al.* 2002]. Offenbar erfolgt die Spaltung endonukleotisch und findet ausschließlich in Regionen statt, welche zur siRNA homolog sind [Zamore *et al.* 2000, Nykanen *et al.* 2001].

Einer erweiterten Hypothese zufolge, könnte RISC eine Art Plattform darstellen, welche als Basis verschiedener regulatorischer Module fungiert. Der Kernkomplex würde dabei die small RNA vom Dicer-Enzym entgegennehmen und diese zur Identifikation homologer Substratsequenzen benutzen. Abhängig von der Struktur oder der Lokalisation des Signals könnten verschiedene Effektoren zusätzlich an den RIS-Komplex binden. Im Falle des RIS-Komplexes wären dies beispielsweise Nukleasen, im Falle der stRNA abhängigen Regulation translationale Repressoren und beim transkriptionalen Silencing eine Verbindung des Komplexes mit Chromatinverändernden Faktoren [Hannon *et al.* 2002]. Es wird darüber hinaus vermutet, dass RISC bei *Drosophila melanogaster* direkt mit dem Ribosom assoziiert sein könnte [Hammond *et al.* 2000].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Genregulation über RNAi eine hoch komplexe Reaktion darstellt, welche eine Reihe von Proteinen mit bisher unbekannter Funktion involviert [Hammond *et al.* 2001, Matzke *et al.* 2001 Sharp *et al.* 2001.] und auf verschiedenen Ebenen zwischen Transkription und Translation operiert [Hannon *et al.* 2002]. Zu diesem Thema wurden bereits eine Reihe von Übersichtsarbeiten publiziert [Sharp *et al.* 1999, Fire *et al.* 1999, Bosher *et al.* 2000, Bass *et al.* 2000; Sijen *et al.* 2000; Ketting *et al.* 2000)].

## D. Fragestellung

---

In der vorliegenden Arbeit wurde die Hypothese geprüft, nach welcher für den  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor endogene antisense RNA nachgewiesen werden kann und Hinweise existieren, welche die Vermutung erhärten, dass die antisense RNA an der Downregulation des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors beteiligt sein könnte. Die Beantwortung folgender zentraler Fragen stand dabei im Mittelpunkt der Untersuchungen:

- A. Lässt sich für den  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor endogene antisense RNA detektieren?
- B. Welche Aussagen können über die Struktur der antisense RNA getroffen werden?
- C. Wo ist die endogene antisense RNA lokalisiert?
- D. Welche quantitativen Aussagen lassen sich bei Patienten mit Herzinsuffizienz im Vergleich zu Kontrollen treffen?
- E. Gibt es Hinweise auf die Beteiligung von endogener antisense RNA am Mechanismus der Downregulation des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptorproteins?