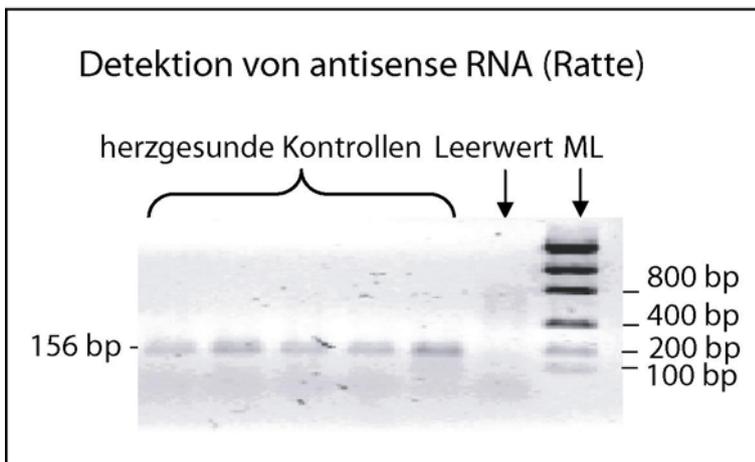


### III. Ergebnisse

#### A. Detektion

##### A. 1. Myokardgewebe der Ratte

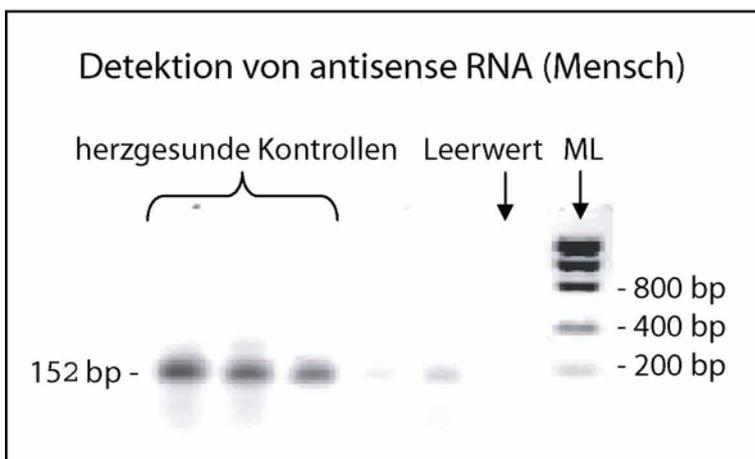
Aus Myokardgewebe von vier herzgesunden Ratten wurde mittels der Trizol-Methode RNA isoliert. Nachfolgend wurde die Präparation einer konventionellen RT-PCR unterzogen. Abbildung 1 zeigt, dass im Myokard der Ratte endogene antisense RNA nachgewiesen werden kann.



**Abbildung 1** Detektion endogener  $\beta_1$  Adrenorezeptor antisense RNA mittels konventioneller RT-PCR im Myokardgewebe fünf verschiedener Ratten. ML – Mass Ladder, Primer  $\beta_1$ AR for 707,  $\beta_1$ AR rev 863

##### A. 2. Myokardgewebe des Menschen

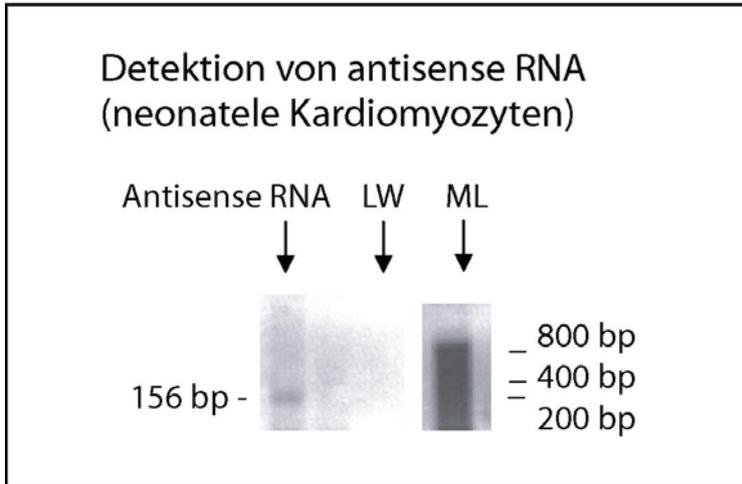
Abbildung 2 zeigt die detektierten Banden für endogene antisense RNA beim  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor im herzgesunden humanen Myokardgewebe.



**Abbildung 2** Detektion endogener  $\beta_1$  Adrenorezeptor antisense RNA mittels konventioneller RT-PCR im Myokardgewebe drei verschiedener herzgesunder humaner Kontrollen. ML – Mass Ladder, Primer  $\beta_1$ AR for 707,  $\beta_1$ AR rev 863 (Primerposition vgl. Tabelle 2 Seite 25).

### A. 3. Neonatale Kardiomyozyten

Abbildung 3 zeigt die detektierten Banden für endogene antisense RNA beim  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor einer neonatalen Kardiomyozytenzellkultur (Ratte).

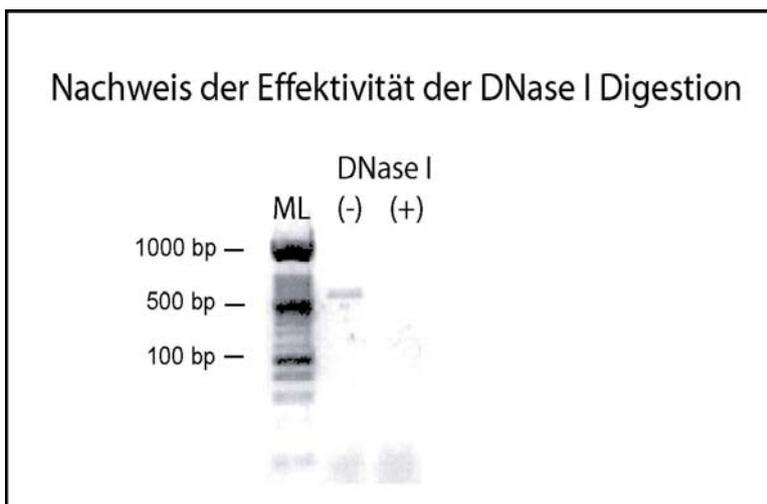


**Abbildung 3** Detektion endogener antisense RNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors in neonatalen Kardiomyozyten. LW - Leerwert; ML – Mass Ladder; Primer  $\beta_1$ AR for 707,  $\beta_1$ AR rev 863

### A. 4. Qualitätssicherung der konventionellen RT-PCR

#### A. 4.1. DNase I Digestion

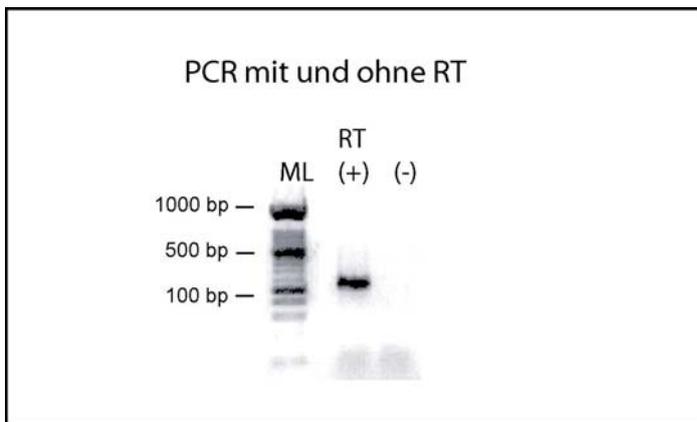
Standardmäßig wurden alle Proben einem DNase I Verdau unterzogen. Abbildung 4, Lane (-) zeigt, dass nach einer 15 minütigen DNase I Behandlung in der PCR keine genomische DNA mehr nachgewiesen werden kann. Da das Gen des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors keine Introns enthält, wurde die grundsätzliche Effizienz des DNase I exemplarisch anhand des Intron-haltigen Referenzgens Troponin I untersucht.



**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.

### PCR ohne Reverse Transkriptase

Ziel der Untersuchung war es, weitere Hinweise darauf zu erhalten, dass die PCR-Signale nicht auf Artefakte durch genomische DNA zurückzuführen sind. Hierzu wird dem Versuchsansatz der RT-PCR kein Enzym Reverse Transkriptase zugesetzt. So kann in der Reversen Transkription keine Umschrift in cDNA erfolgen. Der DNA-Polymerase fehlt somit im folgenden Schritt das Substrat. Eine Produktamplifikation kann nur stattfinden, sofern Reste genomischer DNA in der Präparation verblieben sind. Abbildung 5 veranschaulicht das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese. In der Probe ohne Reverse Transkriptase konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden.



**Abbildung 5** (+):RNA-spezifischer Primer (DNase I behandelte Probe) (-): RNA-spezifischer Primer ohne M-MLV Reverse Transkriptase (*no-RT-control*)

### A. 4.2. RNA-Abhängigkeit der PCR Signale

Abbildung 6 zeigt die Abhängigkeit der Intensität der Banden von der eingesetzten RNA-Menge. Mit der Verringerung der eingesetzten RNA Menge verringert sich auch die Signalintensität der Produkte in der Agarosegelelektrophorese. Gleichzeitig ergibt sich hieraus die minimal notwendige Menge an Gesamt-RNA, die zum sicheren Nachweis von antisense RNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors notwendig ist. Die untere Nachweisgrenze lag bei 0,5 Mikrogramm Gesamt-RNA bei 36 PCR-Zyklen.



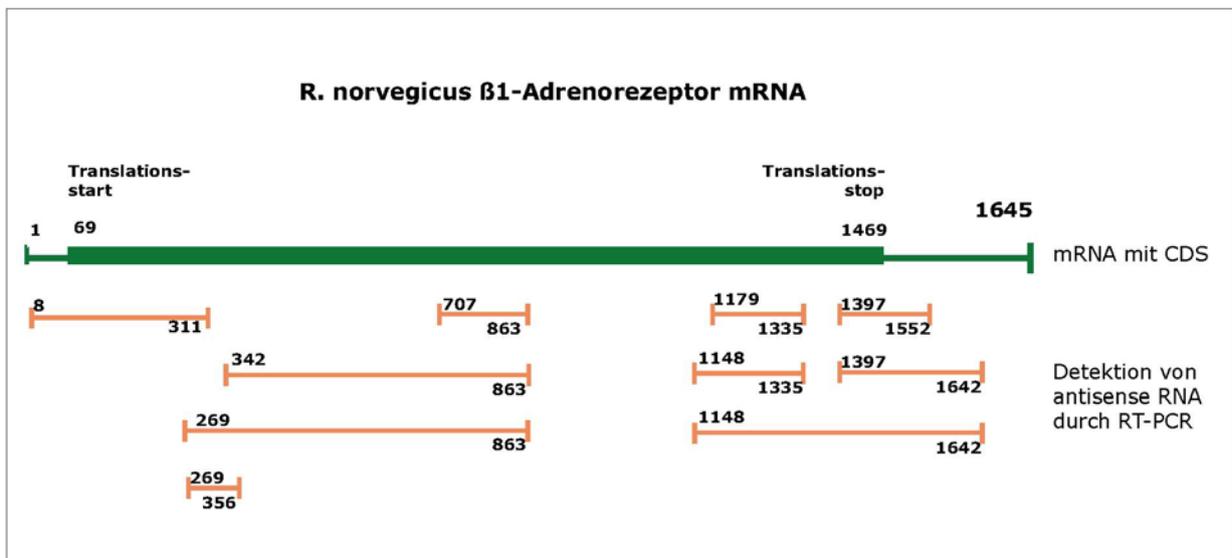
**Abbildung 6** RNA-Abhängigkeit der PCR Signale bei sense und antisense RNA. Einsatz von 0,1 bis 0,5  $\mu\text{g}$  RNA; Primer  $\beta_1\text{AR}$  for 707 /  $\beta_1\text{AR}$  rev 863

## B. Struktur

### B. 1. Größe

#### B. 1.1. Größe der antisense RNA bei der Ratte

Zur Bestimmung der Größe der antisense RNA wurden entlang der gesamten Sequenz des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors mehrere forward- und reverse Primer in verschiedenen Kombinationen getestet. Abbildung 7 zeigt Größe und Position der Amplifikate, die mit den verschiedenen Primern für den  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor bei der Ratte nachgewiesen werden konnten. Die Primer sind nach ihrer Position innerhalb der Sequenz benannt. Die Spezifität der Produkte wurde jeweils durch Sequenzierung bestätigt (vgl. I.B. 2).

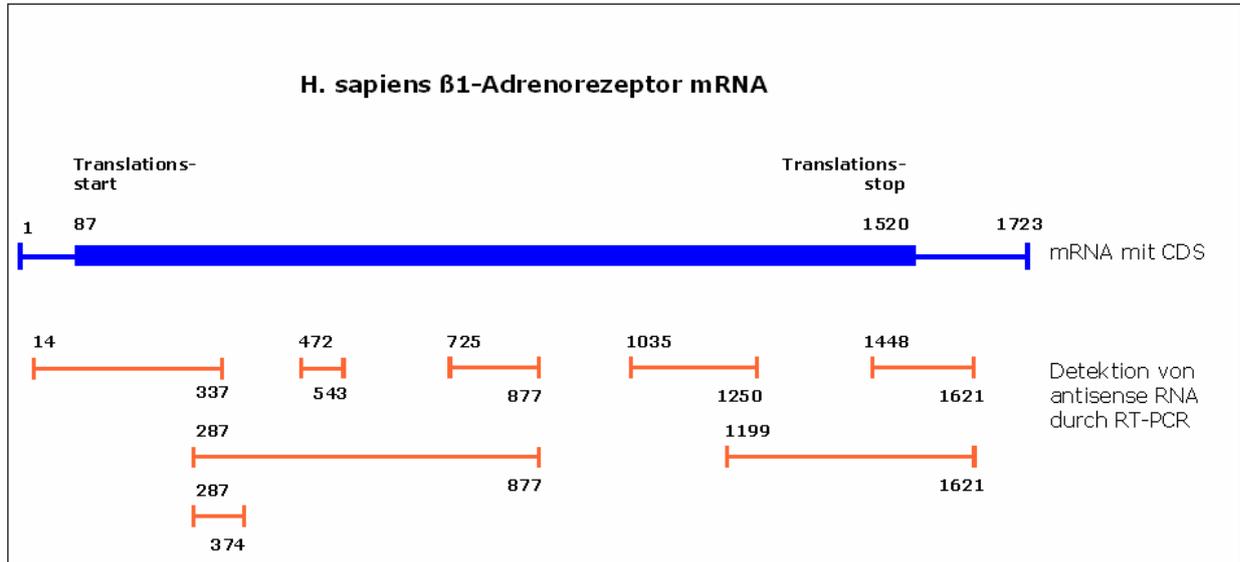


**Abbildung 7** Detektion von antisense RNA durch RT-PCR, Ratte [Machida 1990]

Aus Abbildung 7 ist ersichtlich, über welche Strecken der Gensequenz des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors bei der Ratte antisense RNA nachgewiesen werden konnte. In der Summe konnte auf diese Weise komplementär zu 82% der Gensequenz des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors antisense RNA nachgewiesen werden. Zwischen den Positionen 863 und 1148 liegt eine 285 bp lange Gensequenz für die keine antisense RNA nachgewiesen werden konnte. Für diesen Abschnitt der Sequenz konnte, trotz Verwendung positiv getesteter Primer auch keine sense RNA detektiert werden.

### B. 1.2. Größe der antisense RNA beim Menschen

Abbildung 8 zeigt die Position der verwendeten Primer und die Amplifikate, die für den  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor beim Menschen nachgewiesen werden konnten.



**Abbildung 8** Detektion von antisense RNA mit RT-PCR, Mensch

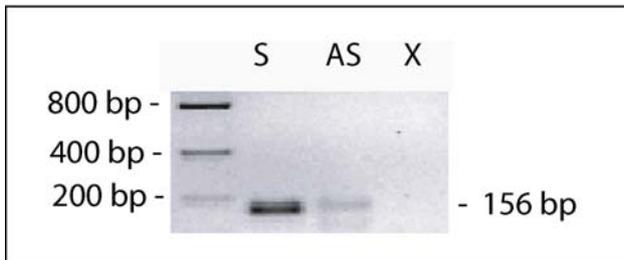
Aus Abbildung 8 ist ersichtlich, über welche Strecken und an welcher Position der Gensequenz des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors beim Menschen endogene antisense RNA nachgewiesen werden konnte. In der Summe konnte auf diese Weise komplementär zu 84% der Gensequenz des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors beim Menschen antisense RNA nachgewiesen werden. Zwischen den Positionen 877 und 1035 liegt auch hier eine Gensequenz (158 bp), für die keine antisense RNA nachgewiesen werden konnte (vgl. Abbildung 7). Auch bei den humanen Proben konnte für diesen Abschnitt der Sequenz, auch hier trotz Verwendung erprobter Primer, keine sense RNA nachgewiesen werden. Der Vergleich der Lage der Sequenzen, für die keine antisense RNA nachgewiesen werden konnte, bei Mensch und Ratte zeigt, dass diese Abschnitte in korrespondierenden Bereichen innerhalb der Sequenz des Gens des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors liegen (Abbildung 7 und Abbildung 8).

### B. 2. Sequenz

Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab, dass es sich hierbei um die erwarteten cDNA-Fragmente des humanen  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor-Gens handelt. Zwischen der nachgewiesenen antisense RNA und der sense RNA des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors herrscht vollständige Komplementarität.

### B. 3. Polyadenylierung

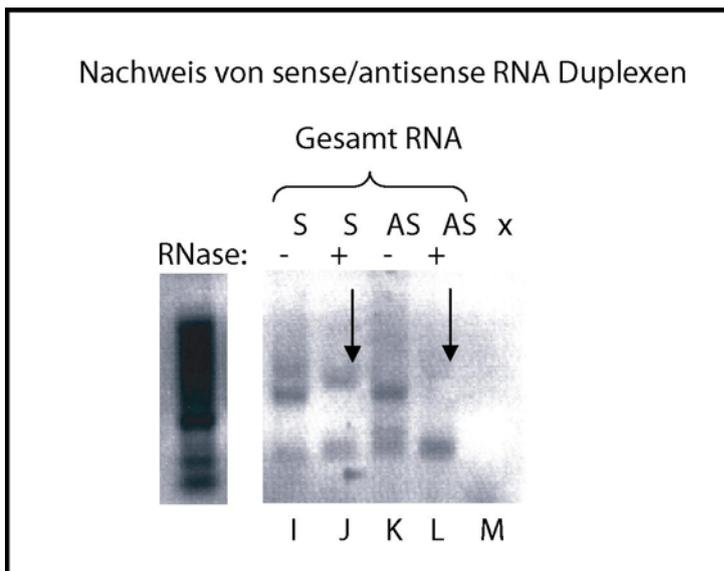
Abbildung 9 zeigt, dass die endogene antisense RNA polyadenyliert ist. Für beide Orientierungen der RNA, sense und antisense, ließen sich in Proben aus polyadenylierter RNA mittels konventioneller RT-PCR Signale detektieren. Das Signal der sense RNA Probe war dabei stärker als das der antisense Probe.



**Abbildung 9** Nachweis der Polyadenylierung von antisense RNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors (m RNA Präparation, humanes Myokardgewebe, Primer  $\beta_1$ AR for 707/  $\beta_1$ AR rev 863) mittels konventioneller RT-PCR, S- sense RNA, AS – antisense RNA.

### B. 4. Duplexformationen

Abbildung 10 zeigt den Nachweis von RNA-Duplexen für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor. In der Gesamt-RNA Präparation konnte nach RNase A und DNase Behandlung sowohl mit dem reverse Primer (Lane J) als auch mit dem forward Primer (Lane L) ein PCR-Produkt nachgewiesen werden (vgl. I.C. 2 )

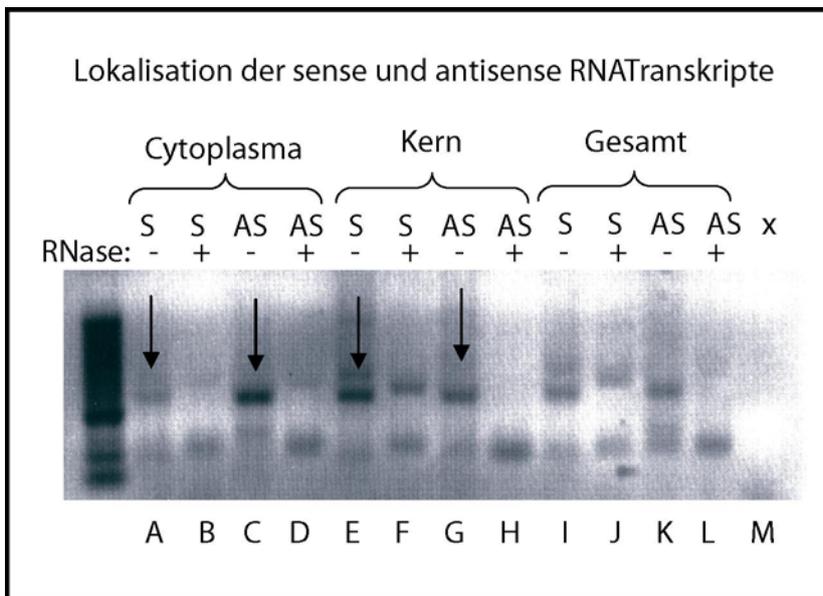


**Abbildung 10** Nachweis von sense/antisense RNA Duplexen in einer Kardiomyocytenzellkultur (x: Leerwert, Primer  $\beta_1$ AR for 707,  $\beta_1$ AR rev 863), Ausschnitt aus Abbildung 11

## C. Lokalisation

### C. 1. Antisense RNA Transkripte

Ziel dieser Untersuchung war die Darstellung der zellkompartimentspezifischen Verteilung endogener antisense RNA-Transkripte. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung. Es konnte gezeigt werden, dass endogene antisense RNA Transkripte für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor sowohl in der zytoplasmatischen, als auch in einer nukleären Fraktion nachzuweisen sind. In beiden Zellfraktionen konnten etwa gleiche Mengen nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 10, Lane C, G).

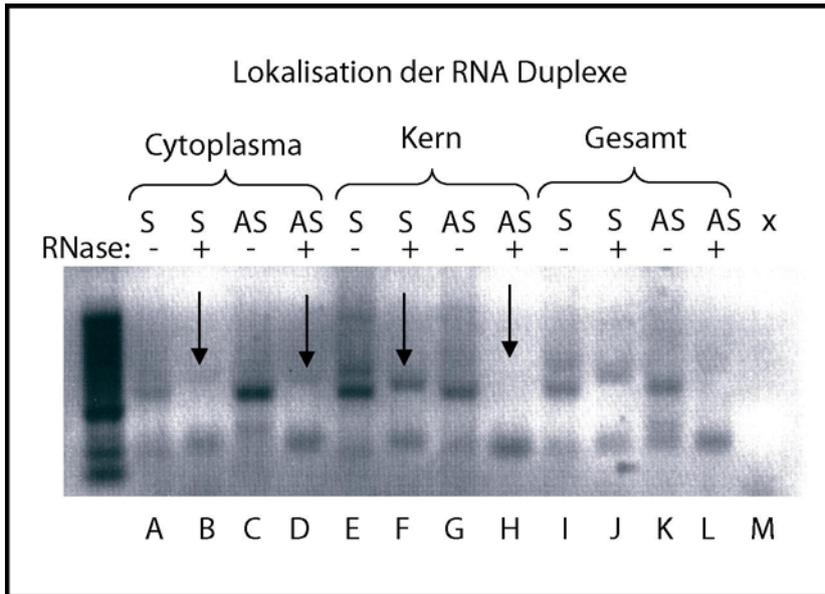


**Abbildung 11** Nachweis von sense und antisense RNA-Transkripten in verschiedenen Zellkompartimenten Lane A,C,E,G. Jeweils Primer  $\beta_1$ AR for 707, rev 863)

Verglichen mit der Expression der sense RNA ist die Expression der antisense RNA in der Kernfraktion etwa gleich stark. (Abbildung 10, Lane E, G). Dem entgegen ist in der zytoplasmatischen Fraktion deutlich mehr antisense im Vergleich zur sense RNA nachzuweisen (Abbildung 10, Lane A, C). Die sense RNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors ist im Nukleus deutlich höher exprimiert als im Zytoplasma (Abbildung 10, Lane A, E).

### C. 2. Duplexformationen

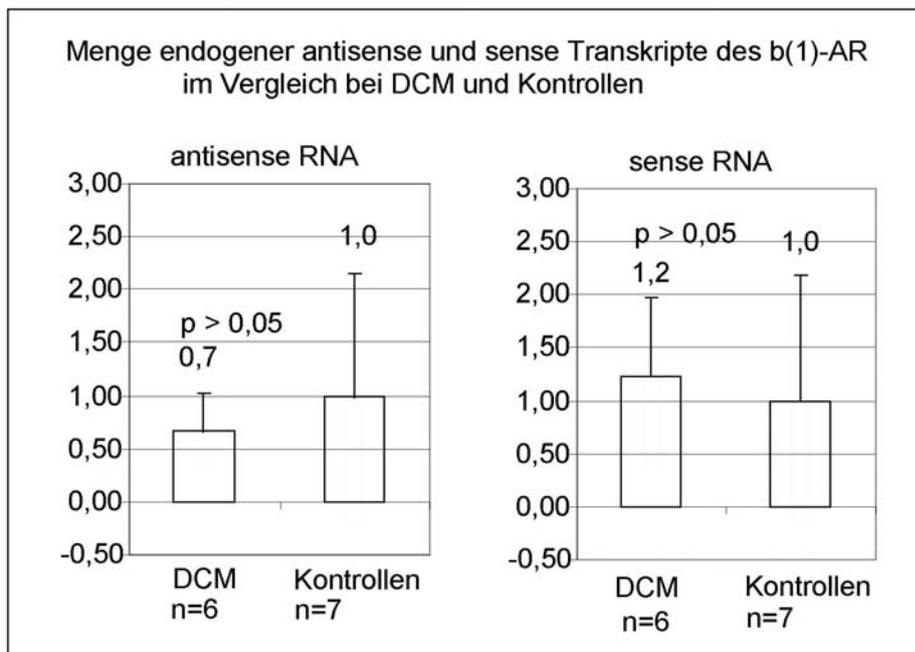
Abbildung 12 zeigt den Nachweis von RNA-Duplexen für den  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptor im Zytoplasma (Lane B und D) und im Kern (Lane F und H). RNA-Duplexe konnten sowohl bei Einsatz des reverse Primers (Lane B) als auch bei Einsatz des forward Primers (Lane D) in der Reversen Transkription nachgewiesen werden.



**Abbildung 12** Nachweis von sense/antisense RNA Duplexen in verschiedenen Zellkompartimenten einer Kardiomyocytenzellkultur (Primer  $\beta_1$ AR for 707,  $\beta_1$ AR rev 863). Zur besseren Übersicht Wiederholung von Abbildung 11 und Markierung der relevanten Lanes durch Pfeile

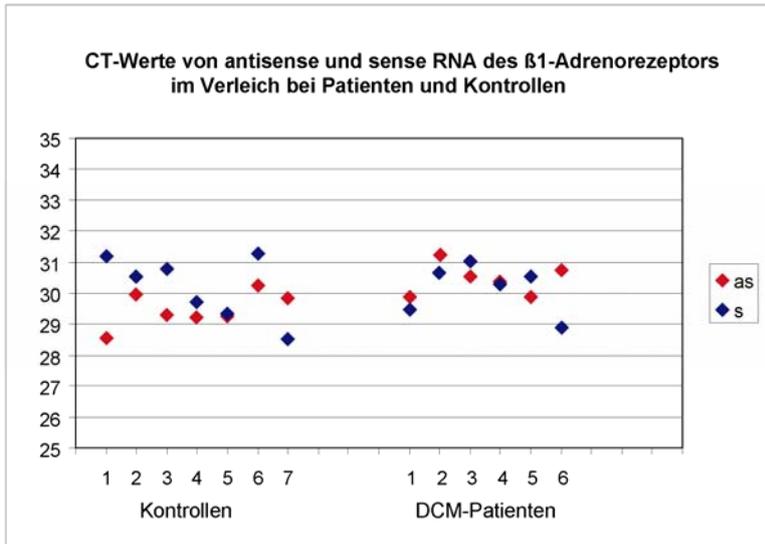
## D. Quantität

Ziel des Versuchs war es, quantitative Aussagen über das Vorkommen der endogenen antisense RNA zu treffen. Hierzu erfolgte mittels SYBR Green™ real-time RT-PCR ein Vergleich von antisense RNA bei Patienten mit Dilatativer Kardiomyopathie (DCM-Patienten) und herzgesunden Kontrollen. Gegenüber gestellt wurde analog die Menge von sense RNA bei Patienten und Kontrollen. Um den Vergleich zu erleichtern wurde die Menge der RNA bei den Kontrollen 100% (1,0) gesetzt.

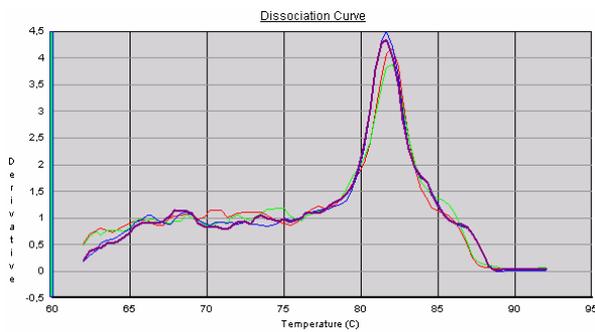


**Abbildung 13** Vergleich der Menge endogener antisense RNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors bei Patienten und Kontrollen. Zum Vergleich rechts: sense RNA bei Patienten und Kontrollen

Es zeigte sich, dass die antisense Transkripte im insuffizienten Myokard von DCM Patienten etwa gleich stark exprimiert waren, wie bei den Kontrollen. Unterschiede, die detektiert wurden, waren nicht signifikant. Gleiches galt für die sense RNA.



**Abbildung 14** CT-Werte von antisense und sense RNA des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors im Vergleich bei Patienten und Kontrollen.



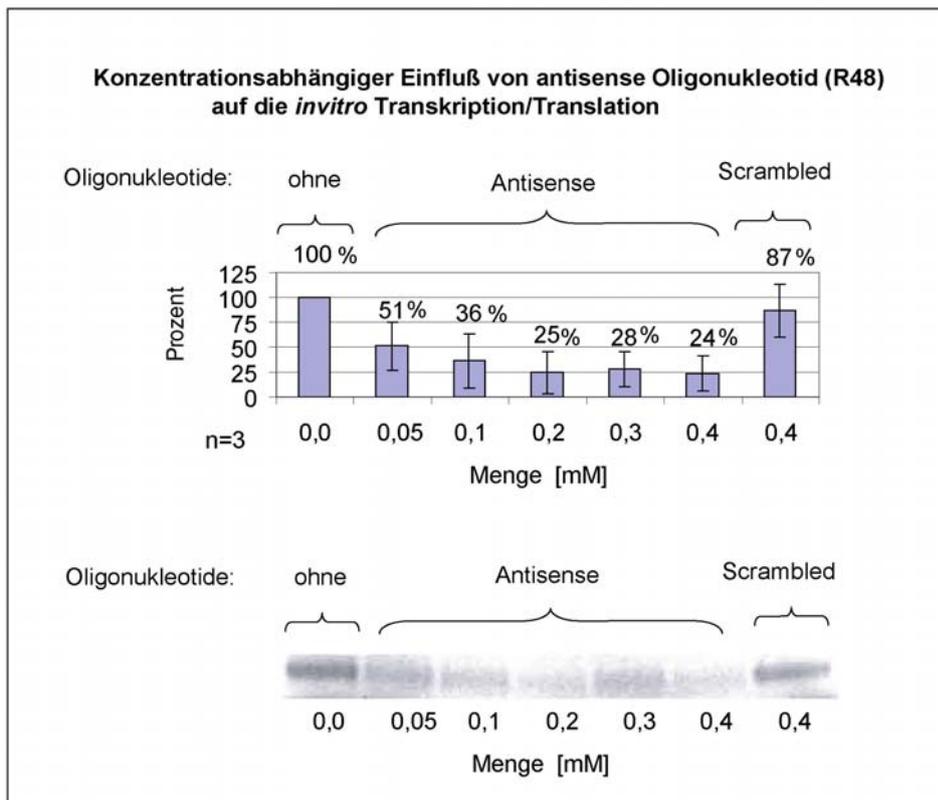
**Abbildung 15** Schmelzkurve der Proben des  $\beta_1$ -adrenergen Rezeptors

## E. Funktion

### E. 1. In vitro Transkriptions-Translations-Essay

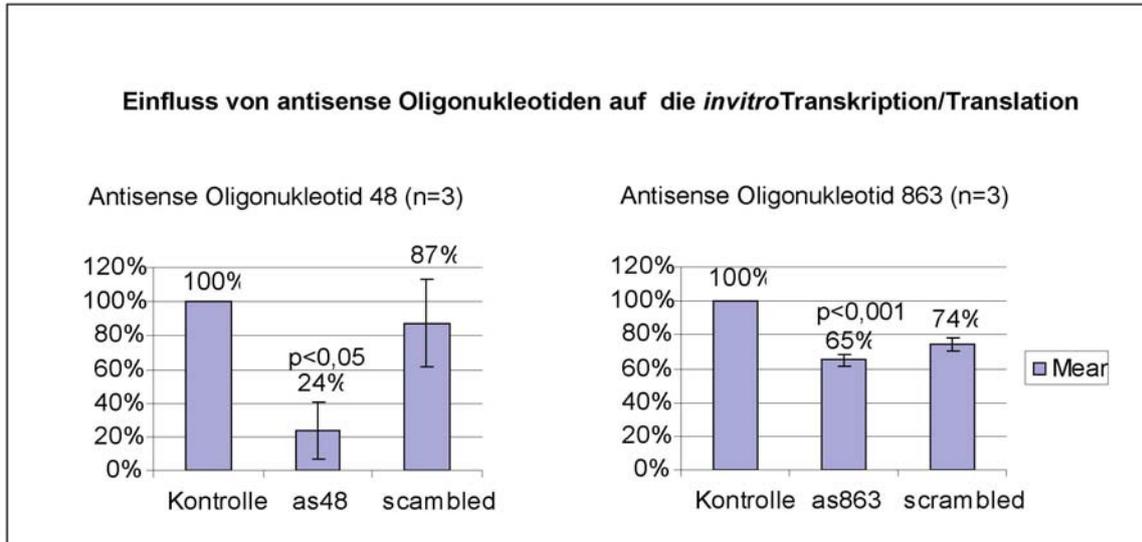
Zur Untersuchung der Funktion von antisense RNA wurde ein in vitro Modell konstruiert.

Abbildung 16 zeigt das Verhalten der Expression von Proteinstrukturen unter Zusatz verschiedener Mengen von antisense Oligonukleotiden. Mit höherer Konzentration der applizierten antisense Oligonukleotide zum beschriebenen in vitro Translations-/Transkriptionsansatz kommt es zu einer verminderten Expression von Proteinstrukturen. Dieses Ergebnis ist abhängig von der Sequenz der zugesetzten Oligonukleotide. Zur Gensequenz komplementäre Oligonukleotide führen zu einer stärkeren Inhibition der Translation als unspezifische Oligonukleotide mit identischen Anteilen an Basen (scrambled).



**Abbildung 16** Expression von Proteinteilstrukturen des  $\beta$ 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).

Abbildung 17 zeigt die Ergebnisse des Einflusses zweier verschiedener antisense Oligonukleotide auf das in vitro Transkriptions-/Translationsessay. Das antisense Oligonukleotid 48, welches näher am 3' –Ende lokalisiert ist, führte zu einer stärkeren Inhibition als Oligonukleotid 863. Das Signifikanzniveau ist jedoch bei Oligonukleotid 863 deutlich höher.



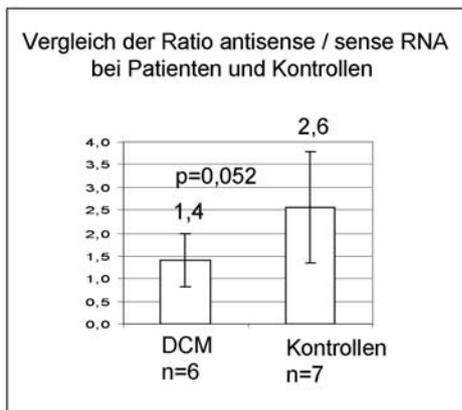
**Abbildung 17** In vitro Transkription /Translation

Die Analyse der Korrelation zwischen zugegebenen antisense Oligonukleotiden und dem Ausmaß der Suppression der Translation ergab für das Nukleotid R 48 einen Korrelationskoeffizienten von durchschnittlich  $-0,76$ , für das Nukleotid R 862 von durchschnittlich  $-0,86$ .

## E. 2. Ratio von antisense und sense RNA im herzinsuffizienten Myokardgewebe

Mit der Bestimmung der Ratio erhält man einen Wert, der angibt wie viel RNA Moleküle antisense RNA pro RNA Molekül sense RNA vorhanden ist.

In Abbildung 18 ist die Ratio aus antisense und sense RNA-Mengen bei Patienten und Kontrollen dargestellt. Es zeigte sich, dass bei den Kontrollen die Menge an antisense zu sense RNA das 2,6 fache ( $\pm 1,22$ ) beträgt. Bei den Patienten beträgt dieses Verhältnis das 1,4 fache ( $\pm 0,59$ ). Die Ratio aus antisense und sense RNA ist bei den Patienten also niedriger als bei der Kontrollgruppe, verfehlt jedoch mit  $p=0,052$  das Signifikanzniveau. Bezogen auf das housekeeping Gen 18 S gibt es keinen signifikanten Unterschied zwischen K und DCM bei sense ( $K=1 / DCM=1,92$ ) oder antisense RNA ( $Kon=1 / DCM=0,55$ ).

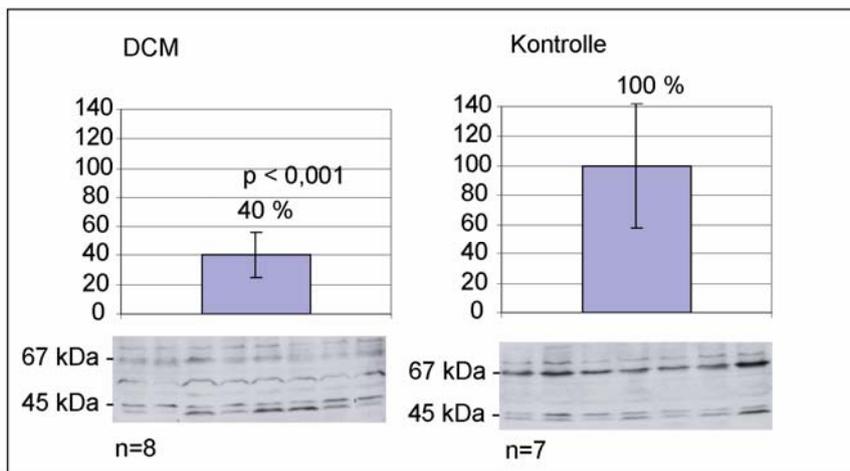


**Abbildung 18** Vergleich der Ratio endogener antisense RNA des  $\beta 1$ -adrenergen Rezeptors bei Patienten und Kontrollen

### E. 3. $\beta$ 1-adrenerges Rezeptor-Protein

Ziel dieses Abschnitts war es, zur Validierung der Aussagen, die in der Literatur beschriebene Downregulation des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors auf Proteinebene zu reproduzieren. Dazu wurde die Proteinexpression des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptors im insuffizienten Myokard von DCM-Patienten und bei Kontrollen mittels Westernblot untersucht.

Die verwendeten polyklonalen Anti- $\beta$ 1-Adrenorezeptor-Peptidantikörper detektieren im Westernblot von herzgesundem Myokard zwei Proteinsignale, eins bei etwa 67 kDa und ein zweites bei etwa 45 kDa. Im insuffizienten Myokard von DCM-Patienten ist die Expression der 67 kDa Bande stark reduziert. Die Expression des 45 kDa großen Proteins ist im Vergleich von insuffizientem zu herzgesundem Myokard weitgehend unverändert. Der Quotient der optischen Dichte beider Banden (67 kDa/ 45 kDa) ist ein Maß für die Insuffizienz des verwendeten Myokardgewebes. Je kleiner er ist, desto höher ist das Ausmaß der Insuffizienz [Podlowski, 1997].



**Abbildung 19** Downregulation des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor-Proteins bei Patienten mit DCM (links) im Vergleich zu herzgesunden Kontrollen (rechts).

Im Ergebnis ergab sich eine signifikante Minderexpression des  $\beta$ 1-adrenergen Rezeptor-Proteins ( $P < 0,001$ ) bei DCM-Patienten im Vergleich zu den herzgesunden Kontrollen.