

IV. Diskussion

A. Detektion

A. 1. Qualitativer Nachweis von antisense RNA mit RT-PCR im Myokard von Ratte und Mensch sowie in neonalen Kardiomyozyten

Einen wichtigen Hinweis auf die Relevanz einer wissenschaftlichen Beobachtung liefert deren Nachweis bei verschiedenen Spezies. In der vorliegenden Untersuchung konnte endogene antisense RNA des β 1-adrenergen Rezeptors im Myokard des Menschen als auch bei der Ratte nachgewiesen werden (siehe Abschnitt I.A. 1 und I.A. 3). Weitere umfangreiche Untersuchungen müssten durchgeführt werden, um Aussagen zur evolutionären Konservierung dieses Prinzips ableiten zu können. Durch den Nachweis in neonatalen Kardiomyozyten und in adultem Myokard der Ratte ergeben sich weitere Fragen zur Rolle und zum Verhalten von antisense RNA in unterschiedlichen Entwicklungsstufen. Diese Ergebnisse sind daher als Indizien zu werten, aus denen neue Hypothesen abgeleitet werden könnten.

A. 2. Qualitätssicherung der konventionellen RT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob analog der DNA auch bei der RNA ein komplementärer Nukleinsäurestrang, die antisense RNA, nachweisbar ist. Daher war es wesentlich, diesen RNA-Strang von einem sequenzgleichen DNA-Abschnitt sicher zu unterscheiden. Zentrale Fragestellung bei allen durchgeführten Untersuchungen ist daher, ob es sich in jedem Fall ausschließlich um RNA handelte und nicht um Artefakte durch Kontamination mit genomischer DNA oder durch unspezifische Amplifikate. Mit geeigneten Methoden musste gezeigt werden, dass keine genomische DNA amplifiziert wurde.

A. 2.1. DNase I Digestion

Bei der RNA-Extraktion kann nicht verhindert werden, dass geringe Mengen genomischer DNA in der Präparation verbleiben (vgl. nicht DNase behandelte Probe (-) in Abbildung 4 Seite 41). Aus diesem Grund wurde in das Protokoll der RT-PCR standardmäßig ein Schritt zur Degradation von genomischer DNA integriert. Ziel weiterer Untersuchungen zur Etablierung der PCR war daher der Nachweis der Effizienz dieses DNase I Verdaus. Es sollte nachgewiesen werden, dass nach der DNase I Behandlung keine genomische DNA mehr nachzuweisen ist.

Grundsätzlich kann über die Auswahl der Primerpaare die Spezifität des PCR-Produkts für DNA

oder RNA bestimmt werden. Allerdings ist dies nur bei Intron-haltigen Genen möglich. Ein RNA spezifisches Primerpaar liegt selbst im Bereich von Exons, überspannt jedoch die Sequenz eines oder mehrerer Introns oder liegt innerhalb dessen. In der Agarosegelelektrophorese lässt sich nachfolgend anhand der Größe erkennen, ob es sich um gespaltene Nukleinsäuren (RNA) oder ungespaltene (DNA) handelt. Da das Gen des β 1-adrenergen Rezeptors keine Introns enthält, lässt sich dieser Nachweis an diesem Gen nicht erbringen. Um dennoch die grundsätzliche Effizienz des DNase I Verdau zu demonstrieren, wurde daher exemplarisch als Intron-haltiges Referenzgen Troponin I untersucht.

Die Analysen mit DNA spezifischen Primern des Referenzgens Troponin I erbrachten in der RT-PCR den Nachweis genomischer DNA in der RNA-Präparation. Nach einer 15 minütigen DNase Behandlung konnte in der PCR mit DNA spezifischen Primern jedoch kein Produkt mehr nachgewiesen werden (vgl. DNase behandelte Probe (+) in Abbildung 4 Seite 41.).

Die Übertragung der Ergebnisse von einem Gen auf ein anderes ist möglich, da DNase I unspezifisch für spezielle Gene jegliche genomische DNA degradiert. Kann also bei einem Gen A keine genomische DNA mehr nachgewiesen werden, kann man davon ausgehen, dass auch die genomische DNA vom intronlosen Gen B degradiert wurde.

A. 2.2. PCR ohne Reverse Transkriptase

Auf Grund der hohen Sensitivität besteht bei der praktischen Durchführung der PCR die große Gefahr falsch-positiver Ergebnisse durch Kontaminationen. Bei der gleichzeitigen Aufarbeitung mehrerer Proben kann es vorkommen, dass spezifische Nukleinsäuren zwischen den Proben verschleppt werden (Kreuzkontamination). DNA aus vorangegangenen PCR-Reaktionen kann in den PCR-Ansatz gelangen (Produktkontamination, "Carry over"). Die verschleppte DNA wird durch die PCR vermehrt und führt so zu einem positiven Ergebnis, obwohl im ursprünglichen Ansatz keine DNA mit der gesuchten Sequenz enthalten war.

In diesem Teil der Untersuchung wurde der RT-PCR kein Enzym Reverse Transkriptase zugesetzt. Auf diese Weise kann in der Reversen Transkription keine Umschrift von RNA 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 oder eine Kontamination aus anderen Quellen stattgefunden hat. Abbildung 5 Seite 42 veranschaulicht das Ergebnis der Agarosegelelektrophorese. In der Probe ohne Reverse Transkriptase konnte kein PCR-Produkt nachgewiesen werden. Damit erbrachte die Methode zur Verifizierung der Spezifität bei der Detektion von antisense RNA den Nachweis, dass es sich tatsächlich um RNA und nicht um genomische DNA handelt.

B. Struktur

B. 1. Die Größe Antisense RNA umfasst die gesamte Länge der Sequenz des β_1 -adrenergen Rezeptors

Experimente mit synthetischen antisense Oligonukleotiden lassen vermuten, dass die Länge der antisense Transkripte die inhibitorischen Potenz entscheidend beeinflusst [Bechler *et al.* 1997]. Der Grad der Inhibition korreliert mit der Länge der doppelsträngigen RNA (dsRNA), wobei längere Transkripte effektiver sind als kürze [Elbashir *et al.* 2000].

Um erste Hinweise auf die Größe der antisense RNA zu erlangen, wurden entlang der gesamten Sequenz des β_1 -adrenergen Rezeptors sowohl bei der Ratte als auch beim Mensch mehrere forward- und reverse Primer an verschiedenen Genabschnitten getestet.

B. 1.1. Diskussion des Ergebnisses

Sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen konnten auf diese Weise eine Reihe von antisense Transkripten verteilt über nahezu die gesamte Gensequenz nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 7 Seite 43, Abbildung 8 Seite 44). Die Größe der nachgewiesenen Transkripte betrug dabei zwischen ca. 150 bp und 600 bp. Diese Transkriptgrößen können als Hinweis auf die Mindestgröße der antisense RNA gewertet werden, da in der vorliegenden Untersuchung die nachgewiesene Größe durch die Entfernung der Primer innerhalb der Sequenz bestimmt wurde. Die Arbeitsgruppe von Rosok hingegen untersuchte die Größe von sense-antisense Transkripten systematisch. Hier fand man eine Häufung von PCR-Produkten der Größe im Bereich zwischen 200 und 800 bp [Rosok *et al.* 2004].

Trotz intensiver Versuche gelang es nicht, Bedingungen für eine RT-PCR zu etablieren, die unter Verwendung der am weitesten am 5'- bzw. 3'-Ende gelegenen Primer (human: β_1 AR for14 und β_1 AR rev1621; Ratte β_1 AR for 8 und β_1 AR rev 1642) die Amplifizierung des gesamten kodierenden Bereiches der cDNA des β_1 -adrenergen Rezeptors (sense RNA) ausgehend vom 5' Ende ermöglicht hätten. Die Größe der nachgewiesenen Transkripte beruht somit auf der Auswahl der Primerpaare.

Allerdings wurde durch verschiedene Kombinationen der Primer auch für jeweils überlappende Sequenzabschnitte antisense RNA nachgewiesen. Dies lässt sich auf zweierlei Weisen interpretieren.

Es könnte sich einerseits um ein einziges, kontinuierliches antisense Transkript handeln, welches die gesamte Sequenz des β_1 -adrenergen Rezeptors überspannt, aber aus technischen Gründen

beim β 1-adrenergen Rezeptor nicht als ganzes Transkript nachzuweisen ist. Ursache hierfür könnte der GC-Reichtum und der hieraus resultierenden Sekundärstruktur der RNA sein. Für diese Variante spricht, dass der Nachweis für die sense RNA, also die translatierbare mRNA, ebenfalls nicht gelang.

Andererseits könnte es sich auch um wechselnd große antisense Transkripte handeln, deren Anfang und Ende nicht notwendigerweise immer an der gleichen Stelle in der Sequenz liegen.

In der Sequenz der Ratte liegt zwischen den Positionen 863 und 1148 eine 285 bp lange Gensequenz, für die keine antisense RNA nachgewiesen werden konnte. Beim Menschen existiert zwischen den Positionen 877 und 1035 ebenfalls eine Gensequenz (158 bp), für die keine antisense RNA nachgewiesen werden konnte. Sowohl bei den humanen Proben als auch bei der Ratte liegen diese Genabschnitte in korrespondierender Region der Sequenz. Trotz Verwendung erprobter Primer, konnte für diese Abschnitte auch keine sense RNA nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass ein korrespondierender Bereich der Gensequenz sowohl beim Menschen als auch bei der Ratte mit den angewendeten Methoden nicht ohne weiteres zu amplifizieren ist. Vermutlich liegt hier eine komplizierte Sekundärstruktur vor.

Bei der Ratte entsprach die Summe der Abschnitte der Sequenz, für die antisense RNA Fragmente nachgewiesen werden konnten 82% der gesamten Gensequenz. Beim Menschen entsprach die Summe der Längen der einzelnen nachgewiesenen antisense RNA Fragmente 84% der gesamten Gensequenz.

Darüber hinaus konnte auch für jene Gensequenz, für die bei Ratte und Mensch keine Übereinstimmung herrscht, für beide Spezies antisense RNA nachgewiesen werden. Dies stützt die Hypothese, dass die antisense RNA vom selben Genort transkribiert wird, wie die sense RNA (cis-transkribiert).

B. 1.2. Diskussion der Methodik zur Größendetektion

Mit den in Tabelle 2 (Seite 25) gelisteten Primern konnten jeweils Produkte für den β 1-adrenergen Rezeptor nachgewiesen werden. Diese Primer führten jedoch nicht in jeder beliebigen Kombination zur Produktamplifikation. Dies galt sowohl für die antisense als auch für die sense Orientierung.

Dass funktionierende Primer nicht in jeder Kombination zur Produktamplifikation führte, mag zum einen am ungewöhnlich hohen GC-Anteil der Sequenz des β 1-adrenergen Rezeptors liegen, was die Amplifikation generell erschwert. Kürzere Amplifikate von 150 bis 350 bp Länge ließen sich besser nachweisen. Nur ausnahmsweise gelang der Nachweis längerer Produkte.

Eine andere Erklärung liegt höchst wahrscheinlich in der unterschiedlichen Annealingtemperatur

bedingt durch die freie Kombination der Primer. Diese erklärt am ehesten die fehlende Produktamplifikation.

Auch die Primerkonzentration kann erheblichen Einfluss auf die Ausbeute der PCR-Reaktion haben. Primer werden relativ zur Menge der Ziel-DNA im Überschuss zum Reaktionsansatz gegeben. Allerdings sinkt die Ausbeute jenseits eines Optimums wieder sehr schnell. Es kann dann auch bei geringer Komplementarität der Nukleotidsequenz der Primer vermehrt zu deren Hybridisierung und Bildung von Primerdimern kommen. Primerdimere können unter Umständen die Detektion kleiner PCR-Produkte erheblich erschweren [Brownie *et al.* 1997].

Insgesamt kann jedoch für das schwierig zu amplifizierende Gen des β 1-adrenergen Rezeptors von einem außerordentlich guten Resultat bei der Anzahl der funktionsfähigen Primerpaare ausgegangen werden (vgl. Abb 10 und 11). Das für die Orientierung spezifische RT-PCR Assay ist eine etablierte und zum Nachweis von antisense RNA erprobte Methode [Rosok *et al.* 2004]. Letztlich ist jedoch die Analyse mittels Northern Blot eine spezifischere Methode, um Aussagen über die Größe der mRNA-Transkripte zu treffen.

B. 2. Vollständige Komplementarität der antisense RNA zur sense RNA

Primer sind jeweils immer nur für die sehr kurze, meist etwa 20 Nukleotide lange Sequenz, am Anfang und am Ende eines Amplifikats spezifisch. Über die Sequenz zwischen den Primern, welche in der Regel einige hundert Basenpaare umfasst, lassen sich nur indirekt Aussagen treffen. Die genaue Sequenzierung dient zum einen dem Nachweis, dass die verwendeten Primer spezifisch Sequenzabschnitte des β 1-adrenergen Rezeptors amplifizierten. Zum anderen ist die Analyse der Komplementarität der antisense RNA zur sense RNA zu deren Charakterisierung erforderlich. Es ist beispielsweise möglich, dass die antisense Transkripte vom selben Genort wie die sense RNA transkribiert werden. Diesen Fall bezeichnet man als *cis*-kodiert. Es herrscht vollständige Komplementarität zwischen dem sense und antisense Strang. Andererseits ist es möglich, dass die antisense Transkripte von einem anderen Genort, beispielsweise einem Pseudogen transkribiert wird. Diesen Fall bezeichnet man als *trans*-kodiert und die Wahrscheinlichkeit wäre hoch, dass keine vollständige Komplementarität herrscht.

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

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit den Befunden bei früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, welche ebenfalls vollständige Komplementarität zwischen den Transkripten

anderer kardialer Gene nachwies [Luther *et al.* 1998, Luther *et al.* 2001, Podlowski *et al.* 2002, Bartsch *et al.* 2004]. Es ist davon auszugehen, dass antisense RNA mit vollständiger Komplementarität zur sense RNA über die gesamte Sequenz des β 1-adrenergen Rezeptors hinweg vorhanden ist (vgl. VII.B.2.). Es ist daher zu vermuten, dass die antisense direkt vom komplementären Strang der DNA abgeschrieben wird und offenbar als *cis*-kodierte antisense RNA vorkommt. Ob diese Primärstruktur tatsächlich daher rührt, dass die antisense RNA vom selben Genort (*cis*-kodiert) oder von einem bisher unbekanntem anderen Genort mit exakt komplementärer Sequenz transkribiert wird, bleibt dabei jedoch unbekannt.

B. 3. Polyadenylierung der antisense RNA

Die Existenz einer Poly(A)-Sequenz am 3'-Ende ist allgemein offenbar eine universelle Eigenschaft eukaryontischer mRNAs. Postuliert werden eine stabilisierende Wirkung, ein Einfluss auf die Effektivität des Exports der mRNA ins Zytoplasma, Funktionen bei der Termination der Transkription, dem Prozessing von pre-mRNA sowie der Initiation der Translation. Mit dem Wissen über das Vorhandensein einer endständigen Poly(A)-Sequenz ergeben sich damit wichtige Hinweise auf mögliche Funktionen der antisense RNA.

B. 3.1. Diskussion des Ergebnis

Das Prinzip des Nachweises beruht auf der Bindung des poly(A)⁺Endes der RNA an Oligo(dt)-Zellulose während der RNA Isolation. Die so gewonnene RNA wurde nach spezifischer Reverser Transkription qualitativ mittels Standardprotokoll der konventionellen RT-PCR untersucht. Für beide Orientierungen, sense und antisense ließen sich in der konventionellen PCR Signale detektieren.

Die Polyadenylierung von antisense RNA konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits bei endogener antisense RNA für das alpha Myosin nachgewiesen werden [Luther *et al.* 2001]. Mit dem Nachweis von antisense RNA aus einer Oligo(dt)-RNA-Präparation ergibt sich damit zunächst ein weiterer Beleg, dass es sich hier nicht um eine artifizielle Amplifikation genomischer DNA handelt. Die Poly(A)-Sequenz ist nicht von der DNA kodiert, sondern wird nach der Transkription während des Prozessings 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]. Welche Funktion sie bei endogener antisense RNA bekleidet, ist unbekannt. Beispiele von DNA-Sequenzen, die trotz Produktion polyadenylierter RNA nicht in ein Protein translatiert werden, wurden bereits in der Literatur beschrieben [Askew *et al.* 1999].

Gleichzeitig ergibt sich ein Hinweis auf die Zellkompartimentierung. Die Poly(A)-Sequenz hat offenbar Einfluss auf die Effektivität des Exports der mRNA ins Zytoplasma [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 darüber hinaus postuliert [Lewin *et al.* 1998].

B. 3.2. Diskussion der Methodik zur Untersuchung der Polyadenylierung

Das Prinzip des Nachweises von antisense RNA beruht hier auf der Bindung des poly(A)⁺Endes der RNA an Oligo(dt)-Zellulosesäulen. Nach mehreren Waschschritten, in denen nicht-polyadenylierte RNA entfernt wird, wird die polyadenylierte RNA durch spezifische Elution extrahiert. Theoretisch ist es möglich, dass trotz der wiederholten Waschschrritte, geringe Mengen genomischer DNA in der Präparation verblieben sind. Da theoretisch mittels PCR selbst ein einziges Nukleinsäuremolekül nachgewiesen werden kann, ist es nicht auszuschließen, dass die detektierten Produkte doch genomischer DNA entstammten. Praktisch wird diese hohe Sensitivität der PCR jedoch nur selten erreicht. Wenigstens 10000 Zielmoleküle sind für eine zuverlässige PCR notwendig [Mülhardt *et al.* 1999]. Zudem wurde auch diesem Versuch ein DNase-Verdau vorangestellt. Somit können die PCR-Signale nur auf dem Nachweis von polyadenylierter RNA beruhen.

Die Beantwortung weiterer Fragen, wie nach dem Anteil, in welchem Zellkompartiment sie generiert wird und welche Funktion sie vermittelt, muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. Quantitative Aussagen lassen sich aus den vorliegenden Experimenten nicht ableiten.

B. 4. Bildung von Duplexen zwischen Antisense und Sense Transkripten

Ziel der Untersuchung war der Nachweis von antisense-sense RNA-Duplexen, welcher als Hinweis auf einen möglichen Mechanismus der Modulation der Genexpression *in vivo* gewertet werden könnte. Das Auftreten von RNA Duplexen wurde mit einem modifizierten RNase Protection Assay an neonatalen Kardiomyocyten untersucht.

Für die Modulation der Genexpression durch endogene antisense RNA wird unter anderem ein posttranskriptionaler Mechanismus analog dem von synthetischen Oligonukleotiden vermutet. Bei diesem kommt es zu einer komplementären Anlagerung der Oligonukleotide an die Ziel-RNA, welche offenbar aufgrund der (partiellen) Doppelsträngigkeit für Ribosomen nicht mehr translatierbar ist. Die auf diese Weise gebildeten komplementären RNA-Transkripte werden aufgrund ihrer Doppelsträngigkeit als RNA-Duplexe bezeichnet. Ein Nachweis von antisense-sense RNA-Duplexen kann daher als Hinweis auf den möglichen Mechanismus einer Modulation der

Genexpression durch antisense RNA in vivo gewertet werden.

B. 4.1. Diskussion der Ergebnisse

In der Gesamt-RNA Präparation konnte durch RT-PCR auch nach RNase A und DNase I Behandlung mit dem reverse Primer ein PCR-Produkt nachgewiesen werden. RNase A degradiert selektiv einzelsträngige RNA. Doppelsträngige RNA ist gegen RNase A resistent. Analog dem Ergebnis bei einem konventionellen RNase-Protection Essay, kann dieses Ergebnis also nur durch die Existenz eines gewissen Anteils doppelsträngiger RNA (Duplexe) hervorgerufen werden.

Der Theorie folgend, dass es beim gleichzeitigen Vorhandensein komplementärer Nukleinsäurestränge zu deren Assoziation und Doppelstrangbildung kommt, wird die Existenz von antisense/sense Duplexen schon seit geraumer Zeit vermutet [Knee *et al.* 1997]. Erstmals nachgewiesen wurden RNA-Duplexe in vivo mit Hilfe der Elektronenmikroskopie an heterogener nukleärer RNA von HeLa Zellen [Fedoroff *et al.* 1977]. Der Nachweis durch ein modifiziertes RNase Protection Assay gelang erstmalig für das Gen c-myc in Neuroblastomzellen [Krystal *et al.* 1990] und später für nNOS in neuronalen Zellen der Schnecke [Korneev *et al.* 1999]. In der vorliegenden Untersuchung wurde ein ähnlicher Versuchsansatz gewählt, wie von Korneev 1999 beschrieben. Mit diesem konnte in unserer Arbeitsgruppe bereits antisense-sense Duplexe für Troponin I im Myokard nachgewiesen werden [Podlowski *et al.* 2002]. Im folgenden Schritt wurde das Vorkommen von RNA-Duplexen in den beiden Zellkompartimenten Nukleus und Zytoplasma untersucht. Es ließ sich sowohl in der nukleären als auch in der zytoplasmatischen RNA-Präparation PCR-Produkte für den β 1-adrenergen Rezeptor detektieren.

Erwähnenswert ist der geringe, aber deutliche Unterschied in der Wanderungsgeschwindigkeit in der Elektrophorese zwischen dem Produkt der zytoplasmatischen mRNA und dem RNA-Duplex. Das Produkt, welches beiden enzymatischen Behandlungen ausgesetzt war, zeigte eine etwas geringere Wanderungsgeschwindigkeit. Dies kann durch eine längere Sequenz hervorgerufen werden oder durch eine komplizierte Sekundärstruktur, welche die Wanderungsgeschwindigkeit bremst. Ob die Duplexe über zusätzliche Anhänge verfügen und welcher Natur diese gegebenenfalls sind muss weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben.

B. 4.2. Diskussion der Methodik zur Duplexdetektion

Die angewendete Methode zum Nachweis von RNA-Duplexen ist die Ableitung des etablierten, in der Literatur gut beschriebenen methodischen Prinzips des RNase Protection Assays. Unter nicht denaturierenden Bedingungen wurde total RNA aus neonatalen Kardiomyocyten präpariert.

Zusätzlich zur standardmäßigen DNase I Behandlung wurde die RNA-Präparation einer RNase A Digestion ausgesetzt.

Die Effizienz der RNase A Behandlung wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits anhand zweier Referenzgene nachgewiesen. Für beta-Actin und GAPDH konnte in früheren Untersuchungen keine antisense RNA Transkripte nachgewiesen werden. Bei diesen beiden Genen liegt also nur mRNA in einzelsträngiger Form vor. Nach der Zersetzung der einzelsträngigen durch RNase A konnten für beta-Actin und GAPDH keine PCR-Produkte mehr nachgewiesen werden [Podlowski *et al.* 2002].

Die angenommene Duplexbildung aus sense und antisense RNA konnte allerdings bisher nur in einigen wenigen Fällen, in denen auch antisense RNA existiert, nachgewiesen werden. Dies könnte unter anderem darin begründet liegen, dass Zellen ein System von natürlichen Doppelstrang-RNasen besitzen, welches doppelsträngige RNA erkennt und degradiert noch bevor man sie nachweisen kann.

Das Vorkommen von RNA-Duplexen im Kern und im Zytoplasma könnte theoretisch sekundär durch die Untersuchungsmethodik *in vitro* verursacht sein. Weiterhin ist nicht bekannt, in welchem Zellkompartiment die Duplexe entstehen. Sie könnten sich sowohl primär *in vivo* in beiden Kompartimenten bilden oder auch in einem Kompartiment gebildet und nachfolgend in das andere transportiert werden.

Der Nachweis von RNA-Duplexen kann als Hinweis auf den potentiellen Mechanismus der antisense RNA vermittelten Modulation der Translation gewertet werden. Die Formung eines RNA-Duplex könnte entweder als Target für dsRNasen dienen oder durch sterische Alterationen und Verhinderung der Initiation der Translation zur Inhibition der Proteinsynthese führen.

C. Lokalisation

C. 1. Koexpression von sense und antisense RNA Transkripten im Myokard

In allen Fällen, in denen mit einem Primerpaar sense RNA nachgewiesen werden konnte, gelang in der vorliegenden Arbeit auch die Identifikation von antisense RNA für den β 1-adrenergen Rezeptor. Dieses Ergebnis wird durch die Resultate von Rosok gestützt, welche in 15 Fällen von 17 Kandidatensequenzen zum jeweiligen sense Transkript den antisense RNA Partner nachweisen konnte [Rosok *et al.* 2004].

C. 2. Detektion von Antisense RNA in Nukleus und Zytoplasma

Ziel dieser Untersuchung war die Aufklärung der zellkompartimentspezifischen Verteilung endogener antisense RNA. Aus Myokardgewebe wurde daher bei der RNA-Präparation einerseits Kern-RNA, andererseits zytoplasmatische RNA angereichert.

Sowohl in der zytoplasmatischen als auch in der nukleären Zellfraktion gelang der Nachweis von PCR Produkten für endogene antisense RNA des β 1-adrenergen Rezeptors (Abbildung 11 Seite 46).

Über den Ursprung der antisense RNA lassen sich hier nur Vermutungen anstellen. Einerseits ist es möglich, dass die antisense RNA Transkripte direkt im Nukleus von der DNA transkribiert werden und nachfolgend wie die mRNA ins Zytoplasma gelangt. Untermauerung findet diese Hypothese durch den Nachweis eines Poly(A)-Tails bei der antisense RNA. Die Poly(A)-Sequenz hat offenbar zumindest Einfluss auf die Effektivität des Exports von (sense) mRNA ins Zytoplasma [Hilleren *et al.* 2001].

Die Transkription der DNA in RNA erfolgt im Nukleus. Die mRNA wird bei Eukaryonten vom Nukleus in das Zytoplasma zu den Ribosomen transportiert und an diesen translatiert. Theoretisch besteht die Möglichkeit, dass die antisense RNA im Zytoplasma von der sense RNA transkribiert wird. Dies würde voraussetzen, dass im Zytoplasma RNA-abhängige RNA Polymerasen existieren. Auf diese Weise könnte es zu einer weiteren Amplifikation des genetischen Signals kommen. Somit könnte zumindest in der Theorie eine Regulation der Proteinexpression vermittelt werden (vgl. Funktion von antisense RNA, Kapitel VII. E Seite 71).

Zum Vergleich wurden die beiden Zellkompartimente auch sense RNA untersucht sowie eine Gesamt-RNA-Präparation vorgenommen.

Diese Überlegungen betreffen das Vorkommen von antisense RNA im Zytoplasma. In der vorliegenden Untersuchung konnte allerdings darüber hinaus auch antisense RNA in der Kernfraktion nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis müsste in eine umfassende Hypothese zur Funktionsweise von antisense RNA eingebunden werden. Darüber hinaus müsste diese qualitative Beobachtung durch quantitative Aussagen unterstützt werden.

D. Quantität

D. 1. Tendenz zur Verminderung der antisense RNA im insuffizienten Myokardgewebe

Viele zelluläre Vorgänge, welche Wachstum, Differenzierung und Überleben von Zellen betreffen, werden durch Veränderungen der Expression verschiedener Gene vermittelt. Die Quantifi-

zierung spezifischer Gene auf Transkriptionsebene ist daher von jeher zentraler Bestandteil bei der Erforschung von Genfunktionen [Zamorano *et al.* 1996]. Als Teil der Charakterisierung der antisense RNA sollte eine Semiquantifizierung der nachgewiesenen antisense RNA im Vergleich bei Patienten und Kontrollen erfolgen. Ziel der Quantifizierung war es, eine mögliche Korrelation ihrer Menge mit der in der Literatur beschriebenen Downregulation des β 1-adrenergen Rezeptors auf Proteinebene nachzuweisen. Hieraus könnten dann Hinweise auf eine mögliche Beteiligung am Regulationsmechanismus des β 1-adrenergen Rezeptors abgeleitet werden.

Eine Quantifizierung der Ausgangsmenge an RNA kann bei der konventionellen PCR über die Bestimmung der Ausdehnung der Banden im Agarose-Gel erfolgen. Diese Extrapolation ist jedoch nicht in jedem Fall korrekt. Es handelt sich hierbei um die Endpunktbetrachtung einer PCR. Die Kinetik der Reaktion (z.B. Variationen der Effektivität) wird dabei nicht beachtet. Mit Hilfe der Taqman RT-PCR mit SYBR® Markierung besteht die Möglichkeit, den PCR-Prozess direkt zu verfolgen. Dies erlaubt einen besseren Ansatz zur Quantifizierung von Nukleinsäuren.

Die Untersuchungen ergaben, dass antisense RNA Transkripte im insuffizienten Myokard von DCM Patienten im Vergleich zu den Kontrollen in geringerer Menge vorhanden sind (as/s = 0,7/1,0, vgl. Abbildung 13 Seite 47). Da die Ergebnisse statistisch jedoch nicht signifikant sind, kann lediglich von einem Hinweis auf eine Tendenz der Downregulation der antisense RNA bei DCM-Patienten ausgegangen werden.

Diese Tendenz steht im Gegensatz zur Hypothese, nach welcher im insuffizienten Myokardgewebe als Ausdruck der Inhibition mehr antisense RNA vorhanden sei und damit das inhibitorische Potential der antisense RNA untermauert wird. Eine Korrelation konnte hier jedoch nicht nachgewiesen werden. Dies steht im Gegensatz zu den *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit und wird unter Punkt IV.E. 1. Seite 71 diskutiert.

Ganz im Gegenteil spiegelt sich die in vielen Arbeitsgruppen auf Proteinebene nachgewiesene Downregulation des β 1-adrenergen Rezeptors (vgl. Kapitel VI.D.3) in der vorliegenden Untersuchung auf der Ebene des zur mRNA komplementären antisense Nukleinsäure-Transkripts ebenfalls wider.

Zur Erklärung wird in Kapitel V.A. (ab S. 75) ein Modell entworfen, in welchem antisense RNA sowohl die Verstärkung als auch die Inhibition der Translation vermitteln kann.

D. 2. Keine Verminderung der sense RNA im insuffizienten Myokardgewebe

Weiterhin zeigten die quantitativen Analysen, dass die sense Transkripte des β 1-adrenergen Rezeptors bei DCM-Patienten etwa 20 % stärker als bei Kontrollen exprimiert wurden. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Resultaten, welche überwiegend ei-

ne Desensibilisierung des β -adrenergen Rezeptorsystems im herzinsuffizienten Myokard nachwiesen [Bohm *et al.*, 1993, Brodde *et al.* 1993, Feldmann *et al.* 1993]. Insbesondere die Menge der mRNA des β 1-adrenergen Rezeptors wurde im insuffizienten Myokardgewebe als geringer im Vergleich zu herzgesundem Material beschrieben [Ungerer *et al.*, 1993, Bristow *et al.*, 1993].

Die Ursache der Abweichungen der vorliegenden Ergebnisse von den in der Literatur für den β 1-adrenergen Rezeptor beschriebenen Resultaten können formal entweder auf Besonderheiten im untersuchten Material oder auf methodischen Mängeln beruhen [Freeman *et al.* 1999] oder durch eine von der bisherigen Auslegung abweichenden Interpretation der Ergebnisse erklärt werden. Diese Möglichkeiten sollen im Folgenden näher betrachtet werden.

D. 2.1. Faktoren des Materials als Ursache der abweichenden Ergebnisse der sense RNA

a) Nachweis der Downregulation des β 1-adrenergen Rezeptor-Proteins

Im vorherigen Abschnitt wurde die Quantität der sense und antisense RNA des β 1-adrenergen Rezeptors untersucht. Die in der Literatur beschriebene Downregulation des β 1-adrenergen Rezeptors konnte in der vorliegenden Arbeit auf RNA-Ebene nicht reproduziert werden. Daher sollte zum Vergleich und zur Validierung die in der Literatur beschriebene Downregulation des β 1-adrenergen Rezeptors auf Proteinebene reproduziert werden. Die Proteinexpression des β 1-adrenergen Rezeptors wurde im insuffizienten Myokard von DCM-Patienten und bei Kontrollen mittels Westernblot untersucht. Es ergab sich eine signifikante ($P < 0,001$) Minderexpression des β 1-adrenergen Rezeptors bei DCM-Patienten im Vergleich zu den herzgesunden Kontrollen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen, in denen eine Downregulation des β 1-adrenergen Rezeptor-Proteins nachgewiesen wurde, überein [Shear *et al.* 1976, Su *et al.* 1979, Su *et al.* 1980, Homburger *et al.* 1980, Baumann *et al.* 1981, Bristow *et al.* 1982, Hadcock *et al.* 1988, Bristow *et al.* 1991, Lazar-Wesley *et al.* 1991, Ungerer *et al.* 1993, Bohm *et al.* 1994, Bristow *et al.* 1993].

Somit unterscheidet sich das verwendete Myokardgewebe im Hinblick auf die Expression des β 1-adrenergen Rezeptors nicht von dem Material, welches in anderen Untersuchungen verwendet wurde. Allerdings wurde in diesen Arbeitsgruppen eine enge Korrelation zwischen der steady-state Menge der mRNA mit dem Ausmaß der Protein-Downregulation nachgewiesen [Bristow 1991, Lazar-Wesley 1991, Bohm 1994]. Weitere Studien ergaben, dass verminderte mRNA Mengen beim β 1-adrenergen Rezeptor Ausdruck reduzierter Transkription und Proteinsynthese sind [Hadcock *et al.* 1988, Ungerer *et al.* 1993, Bristow *et al.* 1993]. Diese Ergebnisse,

welche die These stützen, dass die Regulation des β_1 -adrenergen Rezeptors vorwiegend auf transkriptionaler Ebene erfolgt [Ihl-Vahl *et al.* 1996, Sylven *et al.* 1995], werden durch die vorliegenden Arbeit nicht unterstützt.

b) Genetische Variabilität

Eine Besonderheit im untersuchten Material zur Erklärung gleicher Mengen an sense RNA des β_1 -adrenergen Rezeptors bei Patienten und Kontrollen könnte im Vorkommen eines erst kürzlich beschriebenen genetischen Polymorphismus (Ser49 / Gly49 Substitution) des Aminoterminus liegen. Die beiden Rezeptoren zeigten identische Bindungsaffinitäten sowohl für Agonisten als auch für Antagonisten. Auch die basale sowie die Agonist-induzierte Adenylatcyclase-Aktivität waren gleich. Allerdings zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der langzeitvermittelten, agonistinduzierten Downregulation bzw. Internalisierung der Rezeptorproteine. Beim Gly49-Rezeptor kam es zu einer Reduzierung der Rezeptordensität ($24 \pm 3\%$) nach der Exposition von Isoprotenerol für 18 Stunden, während beim Ser-49-Rezeptor keinerlei Veränderungen zu beobachten waren [Rathz *et al.* 2002].

Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse basieren auf einer vergleichsweise geringen Fallzahl. Statistische Auswertungen könnten daher leicht durch das Vorkommen dieser – oder anderer genetischer Varianten beeinflusst worden sein. Allerdings muss eingeräumt werden, dass sich die Ergebnisse des Ser49 / Gly49-Polymorphismus auf Proteinebene bezieht. Aussagen über die Menge der RNA wurden nicht getroffen.

c) Anatomische Variabilität

Eine zweite Möglichkeit von Besonderheiten im untersuchten Material könnte die systematische Entnahme unterschiedlicher anatomischer Teile des Myokards in den verschiedenen Arbeitsgruppen darstellen. Eine heterogene Verteilung der β_1 -adrenergen Rezeptoren im Myokard ein und desselben rechten Ventrikles wurde bereits beschrieben [Lemoine *et al.* 1991].

In autoradiographischen Untersuchungen zur transmuralen Verteilung konnte gezeigt werden, dass die größte Dichte von β_1 -adrenergen Rezeptoren im gesunden Myokard im Subendokard vorkommen. Die Analyse von herzinsuffizientem Myokard ergab darüber hinaus eine selektive Reduktion von β_1 -adrenergen Rezeptoren in subendokardialen Myozyten ($63 \pm 5\%$ subepikardiale Rezeptordichte vs. $115 \pm 6\%$ in Kontrollen, $p < 0.0001$) [Murphree *et al.* 1989]. Auch die Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Beau zeigen, dass die Downregulation transmural verschieden stark ausgeprägt sein kann [Beau 1993].

Die Regulation der mRNA des β_1 -adrenergen Rezeptors ist ebenfalls regional im Herz verschie-

den. Es konnten Unterschiede zwischen rechten Vorhof und linkem Ventrikel in der β_1 -adrenergen Signaltransduktion nachgewiesen werden [Ping *et al.* 1994].

Systematische Unterschiede bei der Auswahl der Entnahmeorte des Myokards könnten daher den Nachweis der Downregulation maskiert haben. Hierfür spricht auch, dass β_1 -adrenerge Rezeptoren offenbar eher primär durch die lokale Freisetzung von Noradrenalin als durch zirkulierendes Adrenalin aktiviert und wahrscheinlich auch reguliert sind [Bristow 1992]. Unterschiede in der regionalen Noradrenalinfreisetzung könnten damit ebenfalls Unterschiede in der Dichte der Verteilung der Rezeptoren und des Vorkommens der mRNA bedingen.

d) Therapie mit β -Blockern

Drittens wurden die ersten Studien zur Downregulation der mRNA des β_1 -adrenergen Rezeptors Ende der 80er Jahre durchgeführt - in einer Zeit, in der bei der Therapie der Herzinsuffizienz β -Blocker noch nicht etabliert waren. Die vorliegenden Untersuchungen wurden allesamt an Patienten durchgeführt, welche Ende der 90er Jahre erkrankten und standardmäßig einer Therapie mit β -Blockern unterzogen wurden. Diese Therapie hatte zwar offenbar keinen Einfluss auf die Downregulation des Rezeptorproteins (vgl. Abschnitt III. E. 3. Seite 51). Möglicherweise ist dennoch die posttranskriptionale Signaltransduktion und damit das Vorkommen von sense RNA hierdurch von Veränderungen betroffen. Für diese Hypothese spricht, dass in Zellen, in denen zunächst durch Zusatz eines Agonisten eine Downregulation der mRNA des β_1 -adrenergen Rezeptors ausgelöst wurde, im folgenden Schritt durch Zusatz des Antagonisten Propranolol eine Upregulation (90% innerhalb von 12 Stunden, steady state Menge innerhalb von 60 Stunden) verzeichnet werden konnte. Offenbar wurde durch den β -Blocker dosisabhängig die Fähigkeit von Isoprotenerol zur Downregulation der Rezeptor mRNA Menge inhibiert [Hadcock 1988]. Eine Erklärung für steady state Mengen an mRNA bei gleichzeitiger Rezeptorprotein-Downregulation könnte ein erhöhter Umsatz, d.h. eine höhere Rate von Synthese und Degradation von Rezeptorproteinen darstellen.

e) Klinische Variation

Die vierte Möglichkeit der Ursache der Unterschiede bei den Ergebnissen bei der Menge der nachgewiesenen RNA-Mengen, welche auf Besonderheiten des Gewebes beruhen könnten, liegt im klinischen Stadium der Herzinsuffizienz. Untersuchungen zur Relation zwischen dem Schweregrad der Herzinsuffizienz und dem Ausmaß der Reduktion der mRNA des β_1 -adrenergen Rezeptors ergaben zwar einerseits eine gute Korrelation zwischen hämodynamischen Indikatoren der Herzinsuffizienz und mRNA Mengen [Engelhardt 1996]. Andererseits konnte jedoch gezeigt

werden, dass hyperthrophiertes Myokard, welches in kompensiertem Stadium untersucht wurde, keine Veränderung der β 1-adrenergen Rezeptordichte aufwies [DiPaola *et al.* 2001]. Auch wurde gezeigt, dass die Mengen an zirkulierenden Katecholaminen mit dem klinischen Stadium bzw. dem Ausmaß der kardialen Dysfunktion korrelieren [Swedberg *et al.* 1990]. Hieraus wurde geschlossen, dass die Downregulation der β 1-adrenergen Rezeptoren Ausdruck des dekompenzierten Stadiums der Herzinsuffizienz ist und nicht notwendigerweise bei Patienten mit linksventrikulärer Hypertrophie und eingeschränkter systolischer Ventrikelfunktion vorkommt [DiPaola *et al.* 2001]. Somit könnte das hier untersuchte Myokardgewebe von Patienten entstammen, welche kurz vor der Transplantation kein akut dekompenziertes Stadium der Herzinsuffizienz aufwiesen.

D. 2.2. Faktoren der Methodik als Ursache für abweichende Ergebnisse der sense RNA

a) Unterschiede in RNA-Extraktion und Spezifität der Primer

Charakteristikum des β 1-adrenergen Rezeptors ist die extrem geringe Menge des Vorkommens an mRNA [Bristow *et al.* 1993]. Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass sich diese geringen Mengen zusätzlich sowohl aus sense als auch aus antisense Transkripten zusammensetzen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass bisherige RT-PCR Untersuchungen, welche mit Random Hexameren oder Oligo-dT Primern vorgenommen wurden jeweils einen Summationseffekt der Regulation von sense und antisense RNA nachwiesen.

Durch die Wahl der Methode zur RNA-Extraktion und die Auswahl der Primer werden verschiedene Arten von RNA detektiert. Eine der Arbeitsgruppen verwendete beispielsweise eine RNA-Extraktionsmethode, in der polyadenylierte RNA angereichert wird. Hier wird eine 50%ige Downregulation der mRNA des β 1-adrenergen Rezeptors ($4,2 \pm 0,7 \times 10^7/\mu\text{g}$ in NF auf $2,1 \pm 0,3 \times 10^7/\mu\text{g}$ RNA HF) beschrieben [Bristow *et al.* 1993]. Geht man von der Annahme aus, dass für die sense und für die antisense RNA sowohl polyadenylierte als auch nicht-polyadenylierte Transkripte existieren, wird hierdurch die Spezifität der Aussage stark eingeschränkt. Da in der vorliegenden Untersuchung bereits nachgewiesen werden konnte, dass die antisense Transkripte ebenfalls polyadenyliert sein können (vgl.), geben diese Ergebnisse, welche durch Verwendung von Random Hexamer Primern in der Reversen Transkription in Poly-A angereicherter RNA generiert wurden, formal keinerlei Auskunft darüber, welches der beiden polyadenylierten Transkripte downreguliert ist. Es lassen sich lediglich Aussagen über die Summation von sense und antisense RNA Transkripten treffen. Über nicht polyadenylierte Nukleinsäuren kann keine Aussage getroffen werden.

Andere Arbeitsgruppen, welche jeweils etwa eine 50%ige Reduktion der β 1-adrenergen Rezep-

tor mRNA nachwiesen, verwendeten zwar RNA-Extraktionsmethoden, welche total-RNA anreicherten, führten jedoch die Reverse Transkription ebenfalls genunspezifisch mittels Random Hexamer Primern durch [Ungerer *et al.* 1993, Bohm *et al.* 1994, Engelhardt *et al.* 1996]. Damit könnte theoretisch die auf Basis der RT-PCR Methode nachgewiesene Reduktion der RNA beispielsweise auf einer alleinigen Reduktion der antisense RNA bei gleichbleibenden Mengen an sense RNA beruhen.

Dagegen spricht das Ergebnis einer einzigen Arbeitsgruppe um Ihl-Vahl, welche ebenfalls eine etwa 50% ige Reduktion der mRNA des β 1-adrenergen Rezeptors ($1,22 \pm 0,22$ in NF auf $0,63 \pm 0,14$ pg/ μ g total RNA in DCM) jedoch in diesem Fall nach genspezifischer Reverser Transkription identifizierte [Ihl-Vahl 1996].

b) Verwendung der SYBR Green™ real-time RT-PCR

Die Einführung von Fluoreszenztechniken und die Verwendung spezieller Geräte für die RT-PCR, welche die Amplifikation, Detektion und Quantifizierung kombiniert ermöglichen, haben zur Entwicklung kinetischer RT-PCR Methoden geführt. Diese haben die Möglichkeiten zur Quantifizierung von Nukleinsäuren revolutioniert, denn sie kommen ohne Bearbeitung der Proben nach der Amplifikation aus [Orlando *et al.* 1998]. Dies minimiert Probleme durch Kontamination, führt zu immenser Zeitersparnis bei Datengewinnung und Auswertung und Schonung von Arbeitskraft.

Bei der SYBR Green™ real-time RT-PCR bindet der Fluoreszenzmarker spezifisch an Doppelstrang-DNA [Morrison *et al.* 1998]. Im Vergleich zu Techniken, welche Marker verwenden, die auf einer spezifischen Hybridisierung der fluoreszenzmarkierten Probe mit dem korrekten Amplikon beruhen, ist diese Methode weniger spezifisch. Allerdings kommt es, insbesondere nach dem Durchlaufen vieler Zyklenzahlen bei allen Methoden zur Bildung von Artefakten infolge unspezifischer Produktamplifikation [Bustin 2000]. Vorteil der Methode mit SYBR Green™ ist das Auskommen ohne die aufwendige Herstellung von target-spezifischen Fluoreszenzproben. Nachteilig ist, dass die Spezifität allein durch die Primer bestimmt wird. Da jegliche vorkommende doppelsträngige DNA ein Fluoreszenzsignal bewirkt, weist diese Methode allein keine höhere Spezifität als eine konventionelle RT-PCR auf [Bustin *et al.* 2000]. Erst die Kombination mit einer Schmelzpunktanalyse erhöht die Spezifität erheblich. Hierbei wird das Fluoreszenzsignal als Funktion der Temperatur dargestellt [Ririe *et al.* 1997]. Dies ist möglich, da der Fluoreszenzfarbstoff ausschließlich in doppelsträngige DNA interkaliert und verschwindet, sobald die DNA denaturiert wird. Die Schmelztemperatur des Amplikons hängt klar mit der Nukleinsäuresequenz zusammen. Der charakteristische Peak der Schmelzkurve am Schmelzpunkt des

Amplikons kann zur Unterscheidung von Artefakten, welche bei niedrigeren Temperaturen und mit breiteren Peaks schmelzen, herangezogen werden [Bustin *et al.* 2000]. Die Schmelzpunktanalyse bei der Quantifizierung ergab, dass es sich bei den Produkten ausschließlich um die RNA des β 1-adrenergen Rezeptors handelt (vgl. Abbildung 15 Seite 40).

Die Quantifizierung von mRNA kann entweder relativ oder absolut erfolgen. In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Quantifizierung vorgenommen. Die relative Quantifizierung erfasst Veränderungen der basalen Transkription eines Genes, während die absolute Quantifizierung die Ermittlung der Anzahl der Nukleinsäuren je Zelle oder der Gesamt-RNA Konzentration erlaubt. Die absolute Quantifizierung erfordert es, die Standardkurve in aufwendigen Schritten, die Klonierung und *in vitro* Transkription sowie mehrfache Wiederholungen von Messreihen umfassen, zu generieren. Für die vorliegende Arbeit wurde sich auf die relative Quantifizierung beschränkt. Möglicherweise wären weitere Untersuchungen mit absoluter Quantifizierung aufschlussreich.

Die RT-PCR ist eine hinsichtlich ihrer Reproduzierbarkeit sehr anfällige Methode. Sie wird durch eine signifikante Variation und häufig mangelnde Reproduzierbarkeit zwischen Laboratorien, sogar bei identischen Proben, charakterisiert [Keilholz *et al.* 1998]. Auch die Effizienz der Reversen Transkription schwankt zwischen einzelnen Versuchen erheblich. Ursachen hierfür liegen in der variablen Effizienz der Reversen Transkription selbst - sie kann zwischen 10% und 90% liegen [Rappolee *et al.* 1990] - und der Notwendigkeit der Durchführung von zwei enzymatischen Schritten [Bishop *et al.* 1997]. Die exponentielle Vervielfältigung bei der PCR Amplifikation zusammen mit den so geringen Mengen der Zielmoleküle haben zur Folge, dass schon geringste Variationen bei den Reagenzien oder den Reaktionsbedingungen sowie Fehlpriming in frühen Amplifikationsstadien großen Einfluss auf die Menge des amplifizierten Produkts haben [Wu *et al.* 1991]. Dies gilt sowohl für die konventionelle RT-PCR als auch für die verschiedenen real-time Verfahren. In der vorliegenden Arbeit wurde aufgezeigt, dass die mRNA des β 1-adrenergen Rezeptors sowohl aus sense als auch aus antisense Transkripten zusammensetzt. Bei der Quantifizierung der sense RNA kann man also davon ausgehen, dass die mRNA für den β 1-adrenergen Rezeptor in noch geringeren Mengen auftritt, als ohnehin schon angenommen [Bristow *et al.* 1993]. Dies verstärkt die Variabilität der durch die RT-PCR gewonnenen Ergebnisse. Es konnte gezeigt werden, dass die Reproduzierbarkeit bei Genen mit sehr geringer Kopienzahl aufgrund stochastischer Effekte bei der Quantifizierung stark eingeschränkt ist [Pecoud *et al.* 1996].

Das Ausmaß der Reduktion der Menge der mRNA des β 1-adrenergen Rezeptors bei Herzinsuffizienz variiert erheblich. zwischen 30% [Sato *et al.* 1995] und bis zu 50 % [Ungerer *et al.* 1993, Pende *et al.* 1996]. Auch andere Arbeitsgruppen fanden eine erhebliche Varianz zwischen ver-

schiedenen Versuchen mittels quantitativer RT-PCR [Engelhardt *et al.* 1996]. Als Ursache wurde die unterschiedliche Behandlung des Gewebes bei der Asservierung sowie Unterschiede bei der RNA-Präparation identifiziert [Engelhardt *et al.* 1996].

Ernste Zweifel an der Reliabilität des PCR Assays wurden daher laut, insbesondere wenn es in der klinischen Routine für diagnostische Zwecke benutzt werden sollte [Sokoloff *et al.* 1996, Gala *et al.* 1998, de la Taille *et al.* 1999]. Kein Zweifel jedoch besteht darüber, dass die real-time RT-PCR signifikant weniger variabel ist als die konventionelle RT-PCR Methode. Es konnte gezeigt werden, dass die Variationskoeffizienten für die C_T -Werte gewöhnlich unter 5% liegen [Heid *et al.* 1996, Gerard *et al.* 1998, Wittwer *et al.* 1997], wohingegen die Variabilität bei der konventionellen RT-PCR mit 14% beschrieben wurde [Zhang *et al.* 1997]. Diese mögliche Variabilität ist bei der Interpretation der Ergebnisse der quantitativen RT-PCR in der vorliegenden Arbeit ebenfalls mit zu berücksichtigen.

c) GAPDH als interner Standard ungeeignet

Eine charakteristische Fehlerquelle bei der Quantifizierung mittels RT-PCR ist die auch nur minimale Variation der Menge des eingesetzten Materials zu Beginn der Reaktion. Dies ist besonders relevant, wenn Material von verschiedenen Individuen untersucht wird. Daher ist ein wichtiger Aspekt des experimentellen Designs, was als geeigneter interner Standard verwendet werden kann [Thellin *et al.* 1999, Bustin *et al.* 2000]. Die Standardmethode zur Minimierung dieser Fehler ist die gleichzeitige Amplifizierung der Ziel-RNA und einer RNA, welche als interne Referenz verwendet wird. Gegen diese wird dann die Ziel-RNA normalisiert. Die ideale Standard-RNA würde in verschiedenen Geweben und in allen Entwicklungsstufen konstant exprimiert und bliebe durch jegliche experimentelle Handhabung unbeeinflusst. Gleichzeitig würden sie in etwa derselben Menge exprimiert, wie die zu untersuchende RNA. Der 'perfekte Standard', welcher alle diese Eigenschaften besitzt, ist bisher nicht identifiziert. Dennoch lassen sich einige Unterschiede zwischen den üblicherweise verwendeten housekeeping genes ausmachen. Zahlreiche Untersuchungen der letzten Jahre belegen beispielsweise, dass das häufig verwendete Gen der Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase (GAPDH) als interner Standard ungeeignet ist [Oliveira *et al.* 1999, Thellin *et al.* 1999]. Die GAPDH-Konzentrationen variieren signifikant zwischen verschiedenen Individuen [Bustin *et al.* 2000], während der Schwangerschaft, in verschiedenen Entwicklungsstadien sowie während des Zellzyklus. Insulin, Wachstumshormone, Vitamin D, oxidativer Stress und Hypoxie wurden allesamt als Induktoren der GAPDH-Transkription identifiziert. Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass mehrere, die Transkription regulierende Domänen in der GAPDH-Promotorregion bei Hefen existieren. Alle diese Ergebnisse lassen

vermuten, dass dieses Gen einer komplexen transkriptionalen Regulation unterliegt [Übersicht in Bustin *et al.* 2000].

Aus diesem Grund sind die Ergebnisse einiger Arbeitsgruppen bei der RNA-Quantifizierung des β_1 -adrenergen Rezeptors kritisch zu betrachten. Sie wiesen jeweils eine Reduktion von etwa 50% nach, verwendeten jedoch als internen Standard das Gen GAPDH [Ungerer *et al.* 1993, Bohm *et al.* 1994, Engelhardt *et al.* 1996, Ihl-Vahl *et al.* 1996].

d) Vergleich der RT-PCR Ergebnisse mit denen weiterer Methoden

Zur Quantifizierung von mRNA sind vier unterschiedliche Methoden gebräuchlich: Northern Blot und in situ Hybridisierung [Parker *et al.* 1999], RNase Protection Assay [Hod *et al.* 1992, Saccomanno *et al.* 1992] und die Reverse Transkription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) [Weis *et al.* 1992]. Die entscheidende Limitation der ersten drei genannten Methoden ist deren vergleichsweise geringe Sensitivität [Melton *et al.* 1984], während die RT-PCR Methode dagegen eine der sensitivsten und flexibelsten Methoden zur Quantifizierung darstellt [Wang *et al.* 1999].

Die Reduktion der mRNA des β_1 -adrenergen Rezeptors wurde daher neben der RT-PCR auch mit anderen Methoden bestätigt. Auch mittels RNase Protection Assay konnte eine Downregulation der mRNA des β_1 -adrenergen Rezeptors im insuffizienten Herz nachgewiesen werden [Bristow 1993, Mittmann *et al.* 1998]. Auch die Arbeiten von Hadcock zeigten eine Reduktion der mRNA des β_1 -adrenergen Rezeptors von etwa 40% in Zellkulturen, welche 16 Stunden mit Isoprotenerol behandelt wurden. Die Quantifizierung erfolgte hier mittels DNA-excess Solution Hybridisierung und RNA Dot-Blot Analyse von Poly-(A)⁺ RNA [Hadcock 1988].

Dementgegen konnte mit der gleichen Methode der Solution Hybridisierung die Arbeitsgruppe von Sylven ebenfalls *keine* Reduktion der β_1 -adrenergen Rezeptor RNA bei Patienten mit DCM nachweisen [Sylven *et al.* 1995].

D. 2.3. Schlußfolgerung zur Quantifizierung der sense RNA

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Abweichungen der Ergebnisse bei der Quantifizierung der RNA des β_1 -adrenergen Rezeptors im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen mutmaßlich auf die Kombination einer ganzen Reihe von Faktoren zurückzuführen ist. Die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit gründen sich auf Untersuchungen mittels genspezifischer reverser Transkription von sense RNA, während die Analysen in anderen Arbeitsgruppen größtenteils mittels genspezifischer Reverser Transkription auf Basis der endständigen Poly-(A)-Sequenz durchgeführt wurden. In der vorliegenden Untersuchung konnte dagegen, wie auch in vielen an-

deren Arbeitsgruppen, die Downregulation des β_1 -adrenergen Rezeptors auf Proteinebene (vgl. VII.D.2) nachgewiesen werden.

Daher lassen die Ergebnisse vermuten, dass die Regulation des β_1 -adrenergen Rezeptors auf posttranskriptionaler Ebene vermittelt wird. Insbesondere wurde mit einer sensitiveren Methode, der SYBR Green™ real-time RT-PCR und einem im Vergleich zu GAPDH geeigneteren internen Standard gearbeitet. Dennoch wurden auch formale Ursachen als Erklärung diskutiert. Es könnten theoretisch Unterschiede im Material, wie genetische Polymorphismen oder Abweichungen bei der Entnahme von Material aus unterschiedlichen anatomischen Strukturen die Ergebnisse beeinflusst haben. Unklar ist weiterhin, inwiefern die im Vergleich zu den 90er Jahren nun standardmäßig durchgeführte Therapie der Herzinsuffizienz mit β -Blockern einen Einfluss auf molekulare Regulationsmechanismen des Rezeptors haben.

Es muss weiterhin festgehalten werden, dass antisense RNA nicht in jedem Fall die Translation eines Proteins beeinflusst, selbst wenn exzessive Mengen vorliegen [Crooke 1996].

E. Funktion

E. 1. In vitro Inhibition der Translation des β_1 -adrenergen Rezeptors durch antisense Oligonukleotide

In diesem Abschnitt wurde die Hypothese geprüft, nach welcher die Downregulation des β_1 -adrenergen Rezeptors auf eine verminderte Expression des Rezeptorproteins, ausgelöst durch die Wirkung endogener antisense RNA, zurückzuführen sein könnte. Der potentielle Effekt der Modulation der mRNA Translation durch antisense-sense RNA Duplexe wurde durch ein in vitro Translations-Transkriptions-Essay illustriert.

Die Analyse der Korrelation zwischen zugegebenen antisense Oligonukleotiden und dem Ausmaß der Suppression der Translation ergab eine konzentrationsabhängige Verminderung der Expression von Proteinstrukturen durch den Zusatz von antisense Oligonukleotiden. Somit sprechen diese Ergebnisse stark dafür, dass antisense Oligonukleotide einen inhibitorischen Einfluss auf die in vitro Synthese des β_1 -adrenergen Rezeptors haben.

Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit früheren Resultaten unserer Arbeitsgruppe, welche eine Inhibition der Translation in vitro durch synthetische antisense Oligonukleotide demonstrierte. [Luther *et al.* 2001]. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass micro RNAs, welche komplementär zu Sequenzen der 3' UTR sind, eine negative post-transkriptionale Regulation durch die Bildung von RNA-Duplexen bewirken können [Lai *et al.* 2002]. Obwohl bisher in der Literatur nur wenig weitere Beispiele der in vitro Inhibition der Translation durch antisense RNA ge-

nauer beschrieben wurden, geht man dennoch davon aus, dass antisense Transkripte die Expression von sense Transkripten beeinflusst. Resultate anderer Arbeitsgruppen belegen, dass beispielsweise eine geringe Expression von bFGF mRNA mit einer hohen Rate des Vorkommens von antisense RNA Transkripten – und vice versa, assoziiert ist [Murphy *et al.* 1994]. Es konnte gezeigt werden, dass viele der 21 bis 22-Nukleotid-langen RNAs (microRNAs) sowohl in wirbellosen Organismen als auch bei Wirbeltieren in hoch konservierter Form vorkommen. Diese Beobachtung lässt vermuten, dass hier ein genereller und weit verbreiteter spezifischer, posttranskriptionaler Regulationsmechanismus vorliegt [Lagos-Quintana *et al.* 2001], welcher potentiell breite regulatorische Funktionen vermittelt [Lau *et al.* 2001].

Interessant wäre es nun, der Hypothese nachzugehen, wonach der Zusatz eines Gemisches aus sense und antisense Transkripten zu einer immensen Verstärkung der inhibitorischen Eigenschaften der RNA im Vergleich zur Verwendung lediglich des antisense Transkripts führen könnte, wie es in der Arbeitsgruppe von Fire demonstriert wurde [Fire 1998].

E. 2. In vitro Inhibition durch antisense Oligonukleotide ist sequenzabhängig

Die Frage nach der biologischen Funktion von endogener antisense RNA ist bisher weitgehend ungeklärt. Postuliert wird aufgrund der Komplementarität zum einen eine Funktion bei der Regulation der Transkription, zum anderen die Kodierung für ein Protein oder die Vermittlung anderer, bisher unbekannter Rollen bei der Regulation der Translationen. Als Mechanismus wird entweder Konkurrenz oder eine Basenpaarung zwischen homologen sense und antisense Strang vermutet. Letzteres könnte posttranskriptionale Mechanismen, wie das Splicing, den RNA-Transport, RNA-Interferenz, die Stabilität der mRNA oder die Translation betreffen [Murphy *et al.* 1994, Vanhee-Brossollet *et al.* 1997, Li *et al.* 2000, Rosok *et al.* 2004]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen diese Hypothese der Sequenzabhängigkeit der Wirkung von antisense RNA. Zur Sequenz des β 1-adrenergen Rezeptors komplementäre Nukleotide führten zu einer stärkeren Inhibition der Translation als unspezifische Moleküle. Dies spricht für die Spezifität der Inhibition. Für diesen Mechanismus spricht weiterhin der bereits in Abschnitt IV. B. 4 Seite 46 beschriebene Nachweis von antisense-sense RNA-Duplexen *in vivo*. Dies kann als entscheidender Hinweis auf den Mechanismus und die Funktion der Modulation der mRNA Translation gewertet werden [Podlowski *et al.* 2002]. Gestützt werden diese Ergebnisse darüber hinaus durch die Reproduktion des inhibitorischen Effekts nach Zusatz von Oligonukleotiden, welche zu einem anderen Abschnitt nahe des 3' –Ende der Sequenz komplementär sind. Beide Sequenzabschnitte führten zu einer signifikanten Inhibition der Genexpression *in vitro*.

E. 3. In vitro Inhibition durch antisense Oligonukleotide erfolgt auf posttranskriptionaler Ebene

Insgesamt sprechen die Ergebnisse des in vitro Translations-Transkriptions-Essays dafür, dass die antisense Oligonukleotide einen inhibitorischen Einfluss auf die in vitro Synthese des β 1-adrenergen Rezeptors auf posttranskriptionaler Ebene haben. Unter Einbeziehung der Beobachtung, dass für die sense RNA in der vorliegenden Arbeit keine Reduktion bei DCM-Patienten nachgewiesen werden konnte, sprechen diese Ergebnisse gleichzeitig für eine posttranskriptionale Regulation des β 1-adrenergen Rezeptors.

Der Vergleich mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen zeigt, dass schon früher vermutet wurde, dass zumindest der Agonist-induzierten Destabilisierung der mRNA des β 1-adrenergen Rezeptors ein von der Translation unabhängiger Prozess zugrunde liegt, welcher dennoch gleichzeitig Einfluss auf die de novo Proteinsynthese hat [Mitchusson *et al.* 1998]. Möglicherweise wird dieser posttranskriptionale Prozess durch antisense RNA vermittelt.

E. 4. In vitro Inhibition ist abhängig von der Länge der antisense Oligonukleotide

In der vorliegenden Untersuchung wurde das in vitro Translations-Transkriptions-Essay mit synthetischen antisense Oligonukleotiden von 20 Basenpaaren Länge erfolgreich inhibiert. Im Gegensatz dazu ergaben die Untersuchungen zur Größe der endogenen antisense RNA Hinweise darauf, dass die antisense RNA die gesamte Gensequenz des β 1-adrenergen Rezeptors überspannt und damit mehrere hundert Basenpaare lang ist. Experimente mit synthetischen antisense Transkripten zeigten, dass deren Länge die inhibitorische Potenz entscheidend beeinflusst [Bechler 1997]. Der Grad der Inhibition korreliert mit der Länge der dsRNA, wobei längere Transkripte effektiver waren als kürzere [Elbashir *et al.* 2000]. Weitere in vitro und in vivo Analysen zum Einfluss der Länge von dsRNA auf die RNA Interferenz erbrachten ähnliche Ergebnisse. Auch hier waren kurze dsRNAs (<150 bp) zur Degradation der target mRNA weniger effektiv als lange dsRNAs [Ngo *et al.* 1998; Tuschl *et al.* 1999; Caplen *et al.* 2000; Hammond *et al.* 2000]. Andererseits werden auch Experimente beschrieben, welche mit langen doppelsträngigen RNAs in kultivierten Säugetierzellen oder Zellextrakten bei der Inhibition der Genexpression wenig erfolgreich waren [Caplen *et al.* 2001, Elbashir *et al.* 2001]. Die Gründe für die reduzierte Effizienz bei der Degradation in Abhängigkeit von der Transkriptgröße [Elbashir *et al.* 2000] sind jedoch bisher nicht verstanden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um den Einfluss der Transkriptgröße auf Translationsebene in vitro und in vivo zu evaluieren

E. 5. Unveränderte antisense/sense Ratio RNA in vivo

In diesem Teil der Versuche erfolgte der Vergleich des Verhältnisses von antisense zu sense RNA (Ratio) bei DCM-Patienten und herzgesunden Kontrollen. Es zeigt sich, dass bei den Kontrollen die Menge an antisense zu sense RNA etwa das 2,5 fache ($\pm 1,22$) beträgt. Bei den Patienten beträgt dieses Verhältnis etwa das 1,5 fache ($\pm 0,59$). Die Ratio aus antisense und sense RNA scheint bei Patienten also niedriger als bei der Kontrollgruppe, verfehlt jedoch mit $p=0.052$ das Signifikanzniveau. Bezogen auf das housekeeping Gen 18 S ergibt sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und Patienten bei sense RNA (K=1; DCM=1,92) oder antisense RNA (K=1; DCM=0,55).

Es ergaben sich also gleiche Größenordnungen bei der Menge der sense und antisense Transkripte. Somit wird die Überlegung, dass die antisense RNA in einer ausreichenden Menge vorliegen müsste, um relevanten regulatorischen Einfluss auf die Genexpression des β 1-adrenergen Rezeptors nehmen zu können, bestätigt.

Die Hypothese, nach welcher eine Tendenz von inversen Mengen antisense und sense RNA bei DCM-Patienten und Kontrollen nachweisbar wäre, bestätigte sich somit nicht. Hintergrund war die Beobachtung, nach welcher inverse Mengen von sense und antisense RNA bei der bFGF RNA während der Embryogenese nachgewiesen wurden [Zuniga *et al.* 1993]. Dies wäre ein Argument für eine Möglichkeit der regulatorischen Funktion von antisense RNA.