

Aus der Medizinischen Klinik II
Kardiologie und Pulmologie der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin
Berlin

DISSERTATION

Die Rolle des Proteinkinaseinhibitors α in der Modulation
der Phospholamban-abhängigen Ca^{2+} -Aufnahme in das
sarkoplasmatische Retikulum

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Mehmet Gövercin

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. W. Poller
2. Prof. Dr. med. M. Pauschinger
3. Prof. Dr. P. Schwimmbeck

Datum der Promotion: 7. September 2012

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	5
1.1	EPIDEMIOLOGIE UND HINTERGRUND	5
1.2	SCHLÜSSELPROTEINE DER B-ADRENERGEN SIGNALKASKADE	7
1.3	DIE BEDEUTUNG DER Ca^{2+} -HOMÖOSTASE IN DER KONTRAKTION UND RELAXATION DES HERZENS	11
1.3.1	<i>Die Rolle der Proteinkinase A (PKA)</i>	11
1.3.2	<i>PLB und SERCA2a</i>	14
1.4	DER PROTEINKINASEINHIBITOR A (PKIA)	17
1.4.1	<i>Zelluläre Funktionen</i>	17
1.4.2	<i>Verteilung der Isoformen</i>	18
1.4.3	<i>Physiologische Funktion</i>	19
1.5	GENTHERAPIE KARDIOVASKULÄRER ERKRANKUNGEN.....	22
1.5.1	<i>Definition und Anwendungsfelder</i>	22
1.5.2	<i>Präklinische Studien</i>	23
1.5.3	<i>Klinische Studien</i>	24
1.5.4	<i>Adenoviren in der Gentherapie</i>	28
1.6	FRAGESTELLUNG.....	31
2	MATERIAL UND METHODEN	33
2.1	MATERIAL	33
2.1.1	<i>Zelllinien</i>	33
2.1.2	<i>Plasmide</i>	33
2.1.3	<i>Chemikalien und Enzyme</i>	34
2.1.4	<i>Medien und Gele</i>	34
2.1.5	<i>Puffer</i>	35
2.1.6	<i>Primer</i>	36
2.1.7	<i>Kommerzielle Testsysteme</i>	36
2.1.8	<i>Laborgeräte</i>	37
2.2	METHODEN	38
2.2.1	<i>Die Agarosegelelektrophorese</i>	38
2.2.2	<i>SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese</i>	39
2.2.3	<i>Die Polymerasenkettenreaktion (PCR)</i>	39
2.2.4	<i>Präparation und Kultivierung von nRCM, EA.hy926, A7r5 und HEK 293 Zellen</i>	40
2.2.5	<i>Synthese des PKI-pZS2 Inserts</i>	42
2.2.6	<i>Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen (Mini- Midipräparation)</i>	43
2.2.7	<i>DNA-Sequenzierung</i>	44
2.2.8	<i>Ligation von RR5 mit pZS2-PKIsense und pZS2-PKIantisense</i>	44
2.2.9	<i>Sorbianalyse des Primärlsates nach Transfektion der 293-Zellen</i>	46
2.2.10	<i>mRNA Analyse von PKIsense und PKIantisense in Rattenkardiomyozyten</i>	47
2.2.11	<i>Northern-Blot</i>	47
2.2.12	<i>PKIα-Nachweis in Rattenkardiomyozyten - Solubilisierung und Proteinextraktion</i>	48
2.2.13	<i>Western Blot</i>	49
2.2.14	<i>Oxalat-stimulierter $^{45}Ca^{2+}$-Transport in Membranvesikel des SR</i>	51
3	ERGEBNISSE	53
3.1	KONSTRUKTION UND KONTROLLE DER VEKTOREN ADVPKIANTISENSE UND ADVPKISENSE	53
3.2	NACHWEIS VON PKISENSE UND PKIANTISENSE DURCH DNA-SEQUENZANALYSE	54
3.3	LIGATION VON RR5-LONG ARM MIT LINEARISIERTEM PKI-pZS2SENSE UND PKI-pZS2ANTISENSE.....	56
3.4	SYNTHESE DER ADENOVIRALEN VEKTOREN IN DER KOMPLEMENTIERENDEN ZELLINIE 293.....	57
3.5	PCR-NACHWEIS VON PKIA CDNA IN DEN VEKTOREN ADVPKISENSE UND ADVPKIANTISENSE	59
3.6	RNA-PRÄPARATION UND NORTHERN BLOT ANALYSE	63
3.7	PCR ZUM NACHWEIS VON ENDOGENER UND VEKTORSPEZIFISCHER PKIA CDNA.....	65
3.8	MODULATION VON PKIA UND PLB NACH TRANSDUKTION VON nRCM MIT ADVPKISENSE UND ADVPKIANTISENSE	67
3.9	SERCA2A INDUZIERTER Ca^{2+} -AUFNAHME DURCH ADV-VERMITTELTE EXPRESSION VON PKIA IN nRCM.....	72

4	DISKUSSION	75
4.1	PRIMÄRE UND SEKUNDÄRE ZIELE.....	75
4.2	ADENOVEKTOR VERMITTELTE MODULATION VON PKIA IN NRCM	77
4.3	ADVPKIANTISENSE INDUZIERTER MODULATION VON PLB IN NRCM	79
4.4	DIE MODULATION DES PKA-PLB-SERCA2A SIGNALWEGES DURCH ADVPKIANTISENSE UND ADVPKISENSE	85
4.5	DIE REGULATION DER Ca^{2+} -AUFNAHME IN DAS SR DURCH SUPPRESSION UND ÜBEREXPRESSION VON PKIA	87
4.6	DER STELLENWERT DER ADV-PKI MODULIERTEN SIGNALTRANSDUKTION	89
4.7	AUSBlick	91
5	ZUSAMMENFASSUNG	93
6	LITERATURVERZEICHNIS	95
7	ABKÜRZUNGEN	117
8	CURRICULUM VITAE	119
9	PUBLIKATIONEN	120
10	ERKLÄRUNG	124
11	WIDMUNG	125

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Hintergrund

Herzkreislauferkrankungen stellen in Deutschland und den meisten westlichen Industrieländern die häufigste Todesursache dar. In Deutschland sind im Jahr 2005 allein 367.361 Menschen an Kreislauferkrankungen verstorben (1). Die häufigsten Diagnosen waren dabei ischämische Herzkrankheiten mit einem Anteil von 148.641 Verstorbenen. Der mit Abstand größte Anteil von 86.502 Menschen in dieser Kohorte war herzinsuffizient. Betrachtet man die Krankenhausdiagnosen, war die Herzinsuffizienz mit 317.000 Fällen die zweithäufigste Einzeldiagnose gefolgt von Angina pectoris mit 301.000 Fällen. Kreislauferkrankungen verursachen in Deutschland direkte Krankheitskosten von 15,5 Mrd. Euro. Für die ischämische Herzkrankheit sind es ca. 4 Mrd. Euro und für die Herzinsuffizienz 916 Mio. Euro (2).

Die Herzinsuffizienz bezeichnet das Unvermögen des Herzens, die vom Organismus benötigte Blutzirkulation aufrecht zu erhalten. Die akut auftretende Form ist durch Herzrhythmusstörungen, Perikardtamponaden und Myokarditiden lebensbedrohlich. Die mit Abstand häufigste Form verläuft chronisch progredient und betrifft meist ältere Menschen. Diese entwickelt sich innerhalb von Monaten bis Jahren und ist zunächst durch verschiedene Kompensationsmechanismen des Herz-Kreislaufsystems charakterisiert. Hierbei versucht das Herz durch eine positiv inotrope und chronotrope Reaktion das geforderte Volumen aufrecht zu erhalten. Zusätzlich beeinflussen verschiedene humorale Faktoren den Elektrolyt- und Wasserhaushalt. Eine zunächst physiologische Reaktion auf die Herzbelastung stellt die Hypertrophie dar. Die Mechanismen des Übergangs einer kompensierten Hypertrophie in eine myokardiale Insuffizienz sind nur teilweise bekannt und Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Ein verändertes Genexpressionsmuster von Schlüsselproteinen der elektromechanischen Kopplung, DNA-Strangbrüche, Veränderungen der extrazellulären Matrix und Myokardfibrose gehören zu den Erklärungsansätzen (3–7).

Die häufigste Ursache für eine Herzinsuffizienz ist die koronare Herzkrankheit (KHK). In der Häufigkeit absteigend folgen der unbehandelte Hypertonus und Kardiomyopathien verschiedener Ursache. Nach der New York Heart Association (NYHA) werden vier klinische Stadien der Herzinsuffizienz unterschieden. Die Prognose für Erkrankte mit NYHA III/IV (Beschwerden bei leichter körperlicher Belastung/ in Ruhe) ist durch das Auftreten einer Vielzahl von Komplikationen wie Herzrhythmusstörungen, Lungenödem, kardiogener Schock und Thrombosen schlecht. Etwa 40-50% der Patienten sterben innerhalb von fünf Jahren. Die

Behandlung und Vorbeugung der Herzinsuffizienz sowie deren Folgen sind von großem medizinischem, volkswirtschaftlichem und sozialem Interesse.

Pathophysiologisch ist die dekompenzierte Herzinsuffizienz mit einem zunehmend verminderten Kontraktionsvermögen (Inotropie), sowie verzögertem Relaxationsvermögen (Lusitropie) vergesellschaftet (8–10). Sowohl im Tierversuch als auch bei humanen insuffizienten Herzen konnte gezeigt werden, dass die verminderte Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) eine Ursache für die verzögerte diastolische Relaxation ist (11–13). Die Relaxation des Herzmuskels während der Diastole ist abhängig von der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR. Die wichtigsten Regulatoren dabei sind die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) sowie der sarkolemmale Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher. Folgende Faktoren sind direkt oder indirekt an der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase im Herzmuskel beteiligt (siehe Tabelle 1-1):

Einflussfaktoren auf die myokardiale Kontraktilität	
Erhöhte Kontraktilität	Reduzierte Kontraktilität
<ul style="list-style-type: none"> • β-adrenerge Stimulation (14,15) • Überexpression von G_{α} unter Stimulation mit Iso (16) • Überexpression von SERCA2a (17) • PLB-Defizienz (18) • Adenovirus-basierte PLB antisense Expression (19) • pseudophosphorylierte PLB Mutante über transkoronare rAAV Injektion bei Hamstern mit Kardiomyopathie (20) • Intrazelluläre Ca^{2+}-Erhöhung (21) • Gesteigerte Expression von Adenylatcyclase VI (22) • Intrakonore Injektion von Adenylatcyclase VI bei herzinsuffizienten Mäusen (23) • AdV-vermittelte βAR Überexpression (24) • Überexpression von SERCA2a (25) • Suppression der SERCA2-Aktivität durch rAAV9-shPLB (26) 	<ul style="list-style-type: none"> • Überexpression von PLB (18,27) • Verminderte mRNA - Konzentrationen von SERCA2a (12,13,28) • Verminderte SERCA2a Proteinkonzentrationen im humanen insuffizienten Herzen (29,30)*

Tabelle 1-1 Einflussfaktoren auf die myokardiale Kontraktilität

Beispielhafte Auflistung von Faktoren, die eine verstärkte Kontraktion und/oder eine beschleunigte Relaxation zur Folge haben sowie Faktoren, die eine verminderte Kontraktion und/oder verlangsamte Relaxation zur Folge haben. * abweichende Ergebnisse mit gleichbleibender SERCA2a Proteinkonzentration der insuffizienten Herzen im Vergleich zu normalen Herzen werden bestätigt durch (31–33).

1.2 Schlüsselproteine der β -adrenergen Signalkaskade

Für das Verständnis der Herzaktion und der Pathophysiologie des insuffizienten Herzens ist die β -adrenerge Signalkaskade von grundlegender Bedeutung. Eine β -adrenerge Stimulation des intakten Herzens führt zu einer positiv inotropen, chronotropen und lusitropen Reaktion (34). Earl Sutherland und Kollegen gelang der entscheidende Durchbruch bei der Aufklärung des Mechanismus der Hormonwirkung (35). Sie entdeckten die Wirkung des Adenosin $3',5'$ -monophosphat (zyklisches AMP) als second messenger. Zyklisches AMP wird aus ATP unter Wirkung der Adenylat-Cyclase eines integralen Membranproteins gebildet (Abbildung 1-1) und durch die spezifische Phosphodiesterase abgebaut. Dabei führt die Bindung eines Hormons wie Adrenalin oder Glucagon an seinen Rezeptor an der Zelloberfläche zur Aktivierung oder Inhibierung eines membranständigen G-Proteins (guanylnukleotidbindendes Protein). Die Adenylat-Cyclase wird durch die α -Untereinheit des G-Proteins ($G_{S\alpha}$) stimuliert und katalysiert dadurch die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP).

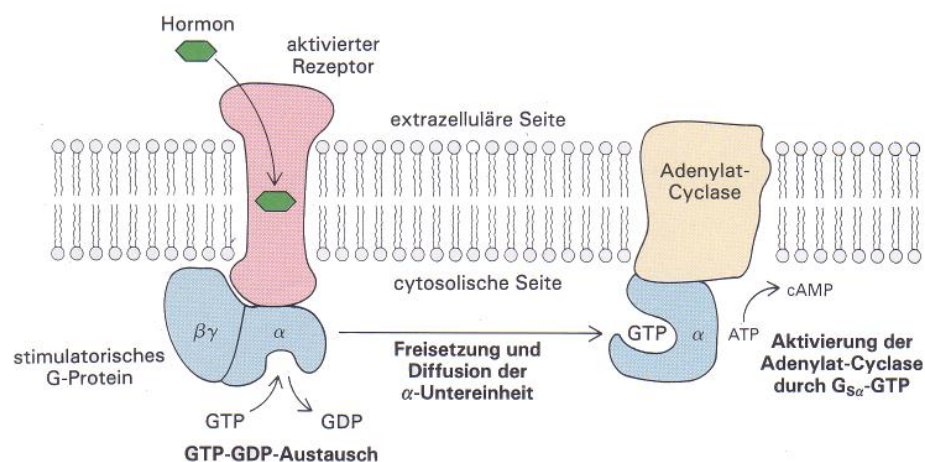
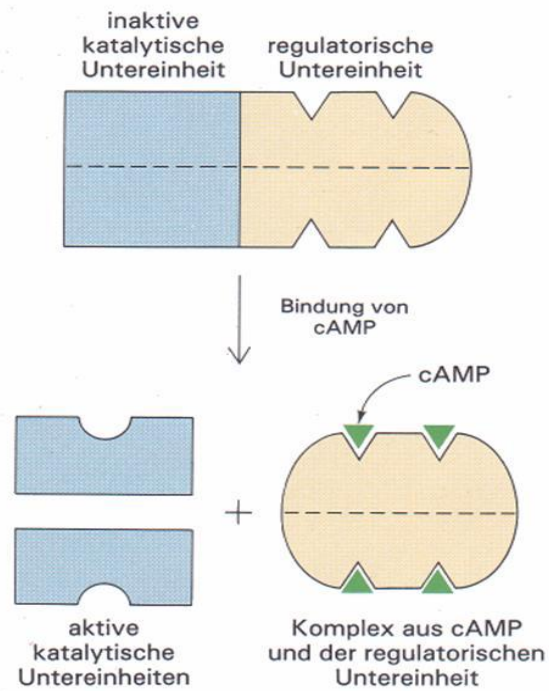


Abbildung 1-1 G-Protein-vermittelte Signalkaskade

Ein Signal (Hormon) führt über seinen Rezeptor zur Stimulation oder Inhibition eines GTP-GDP-Austausches am membranständigen guanylnukleotidbindenden (G)-Protein. Dabei wird $G\alpha$ freigesetzt, das die Adenylatcyclase zur Bildung vom second messenger cAMP stimuliert. Quelle: (36)

Zu den über cAMP regulierten zellulären Prozessen gehören der Stoffwechsel (37), die Genregulation/Transkription (38), die Zellteilung und das Zellwachstum (39), die Zelldifferenzierung (40), die Spermienmotilität (41) und die Leitfähigkeit von Ionenkanälen (42). Zyklisches AMP aktiviert Ionenkanäle und Rap1 (ein G-Protein). Die Hauptfunktion des cAMP in der Säugetierzelle ist jedoch die Phosphorylierung von Zielproteinen über die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA oder cAPK).

Im inaktiven Zustand besteht das tetramere Holoenzym PKA aus jeweils zwei regulatorischen (R) und zwei katalytischen (C) Untereinheiten. Die Bindung von zwei cAMP-Molekülen an jede regulatorische Untereinheit führt zur Dissoziation des R₂C₂- Komplexes in eine regulatorische (1xPKA-R₂) und zwei katalytische (2xPKA-C) Untereinheiten (Abbildung 1-2).



Die katalytischen Untereinheiten sind enzymatisch aktiv indem sie ihre Zielproteine an Serin- oder Threoninresten innerhalb der Konsensussequenz Arg-Arg-X-(Ser oder Thr) phosphorylieren, wobei X eine beliebige neutrale Aminosäure ist.

Aktuelle Untersuchungen zeigen die Relevanz der Adenylatcyclase Kaskade nicht nur in der β -adrenergen Signaltransduktion und Ca^{2+} -Homöostase, sondern auch bei dem Verständnis und der Therapie der Herzinsuffizienz. Takahashi konnte zeigen, dass eine gesteigerte Expression der Adenylatcyclase VI (ACVI) bei Mäusen mit akutem Myokardinfarkt die linksventrikuläre Kontraktilität erhalten, das Remodeling verhindern und die Mortalität reduzieren kann. Eine verbesserte LV-Funktion ist dabei mit einer erhöhten cAMP-

Produktion, PLB-Phosphorylierung, einer erhöhten Affinität der SERCA2a für Calcium und einer verkürzten AV-Überleitung assoziiert (22). Darüber hinaus konnte die Arbeitsgruppe demonstrieren, dass eine Aktivierung der ACVI-Expression bei Mäusen mit ischämischer Kardiomyopathie und schwerer Herzinsuffizienz die Funktion des insuffizienten Herzen verbessern kann (23,43).

Die Phosphorylierung von Proteinen ist einer der wichtigsten Prozesse in der Zellregulation und Signaltransduktion in eukaryotischen Zellen. Proteinkinasen sind verantwortlich für die Phosphorylierung von Zielproteinen. Mehrere hundert Proteinkinasen sind bekannt, die nahezu alle wichtigen zellulären Prozesse steuern. Die cAMP abhängige Proteinkinase (PKA; cAPK) ist ein Holoenzymkomplex aus je zwei regulatorischen und zwei katalytischen Untereinheiten. Es sind zwei Isoformen der PKA bekannt, die als PKA I und PKA II bezeichnet werden (44,45). Außerdem existieren Isoformen der regulatorischen Untereinheit RI α , RI β , RII α , RII β (46–49) und der katalytischen Untereinheit C α , C β , C γ (50) mit jeweils gewebespezifischem Expressionsmuster. Studien von Cadd und Kollegen zeigten, dass RI α im Herzen sowie im ZNS von Mäusen exprimiert wird, während RI β nur im ZNS exprimiert wird (51). RII α wird hauptsächlich im Herzen und RII β in der Leber exprimiert (52). Eine Interaktion der cAMP/PKA Signalkaskade mit der Proteinkinase C wurde von Taskén et al. beschrieben. Dabei führt die Aktivierung der Proteinkinase C zu einer erhöhten mRNA-Expression der regulatorischen Untereinheiten RI α und RII β in HT-29 Zellen (53). Die Existenz multipler regulatorischer und katalytischer Untereinheiten der PKA mit unterschiedlichen biochemischen Eigenschaften ist eine mögliche Erklärung für die Spezifität der cAMP/PKA Signalkaskade.

Neben der gewebespezifischen Expression und der Existenz multipler Isoformen der PKA ist die unterschiedliche subzelluläre Verteilung der PKA in den Kompartimenten der Zelle von Bedeutung. Die subzelluläre Verteilung der PKA erfolgt durch Bindung an „A kinase anchoring proteins“ (AKAP) (54). Diese Haftproteine, von denen mehr als 20 bekannt sind, verteilen sich auf unterschiedliche Kompartimente der Zelle, wie z.B. dem Zellkern (AKAP95/n150), dem endoplasmatischen Retikulum (AKAP 100) und den Ionenkanälen (AKAP15/18). Sowohl im zentralen Nervensystem (ZNS) als auch im peripheren Nervensystem wurden AKAP identifiziert. Ein Beispiel ist das Mikrotubuli- assoziierte Protein 2 (MAP2) im Gehirn von Rindern (55). Untersuchungen zeigen, dass AKAP auch eine wichtige Rolle in der Ca²⁺-Homöostase spielen können. Lygren et al. konnten demonstrieren, dass AKAP18delta als Gerüst für die Koordinierung der PKA Phosphorylierung des PLB dient und den adrenergen Effekt auf die Ca²⁺-Aufnahme in das SR beeinflussen kann (56).

Insbesondere hemmt es die Dissoziation von PLB und SERCA2a (57). Die Proteinkinase A hat nicht nur die Eigenschaft andere Proteine zu phosphorylieren sondern unterliegt ihrerseits der Regulation durch Kinasen. Liegt die PKA in phosphorylierter Form vor, so ist sie aktiv und vermag die Phosphorylierung des Zielproteins wesentlich effektiver zu katalysieren. Die Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung erfolgt an der Aminosäure Thr-197 im aktiven Zentrum der katalytischen Untereinheit der PKA. Verantwortlich für die Phosphorylierung ist die phosphoinositidabhängige Proteinkinase PDK1 (58). PDK1 ist jedoch nicht der einzige Regulator. Beispielsweise konnte in *Escherichia coli* durch Überexpression der PKA-C gezeigt werden, dass sie die Fähigkeit zur Autophosphorylierung besitzt (59).

1.3 Die Bedeutung der Ca²⁺-Homöostase in der Kontraktion und Relaxation des Herzens

1.3.1 Die Rolle der Proteinkinase A (PKA)

Die PKA ist der Mediator der β -adrenergen Stimulation am Herzen (siehe 1.2). Sie vermittelt die positiv inotrope und lusitrope Wirkung durch Veränderung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration. Zu den Proteinen, die von der PKA phosphoryliert werden, gehören der spannungsabhängige Ca²⁺-Kanal im Sarkolemm (L-Type Ca²⁺ channel=LTCC); (60), der ryanodinsensitive Ca²⁺-Kanal (RyR), das PLB des sarkoplasmatischen Retikulums (15,61) und das Troponin I des Myofilaments (62). Die Phosphorylierung des Ca²⁺-Kanals hat eine Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit (63) und damit einen vermehrten Einstrom von Ca²⁺ in die Zelle zur Folge. Die Phosphorylierung von PLB hat eine verminderte Hemmwirkung auf die SERCA2a und damit einen vermehrten Einstrom von Ca²⁺ in das SR zur Folge. Durch Phosphorylierung von Troponin I vermindert sich die Affinität von Troponin C zu Ca²⁺ und dadurch die Rate der Dissoziation des Ca²⁺ vom Troponin C (64). Der verstärkte Einstrom von Ca²⁺ über das Sarkolemm sowie die beschleunigte Aufnahme von Ca²⁺ in das SR werden als ursächlich für die verlängerte und verstärkte Kontraktion in Folge einer β -adrenergen Stimulation des Herzmuskels angesehen. Ein verstärkter Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR wird außerdem durch die Phosphorylierung des ryanodinsensitiven Ca²⁺-Kanals erreicht (61). Ein weiteres interessantes Substrat von PKA-C ist das cAMP response element binding protein (CREB) (65). Dabei erfolgt eine Translokation von PKA-C in den Zellkern. Das durch Phosphorylierung aktivierte CREB ist ein Transkriptionsfaktor für „immediate early genes“ über den Regulator CRE (cAMP response element). Diese kodieren für Transkriptionsfaktoren, welche die Regulation von phenotypisch wichtigen „delayed response genes“ steuern. Hier besteht eine Verbindung zum PKC Signaltransduktionsweg, da CREB zumindest in vitro auch von PKC phosphoryliert wird. Auf der anderen Seite aktiviert die PKC die β -Rezeptor-Kinase (β ARK) durch verstärkte Translokation in die Zellmembran (66). In der Zellmembran führen sie durch Phosphorylierung von β -Rezeptoren zur Entkopplung zwischen Rezeptor und G-Protein und damit zur Unterbrechung der Signaltransduktion. Eine weitere interessante Interaktion der PKA ist die Phosphorylierung von Raf (in Fibroblasten gezeigt) mit konsekutiver Inhibition des MAPK Signaltransduktionswegs (67).

Der Mechanismus einer Herzaktion im Anschluss eines elektrischen Reizes kann folgendermaßen beschrieben werden: Die Depolarisation des Sarkolemm führt zur Öffnung von L-Typ Ca²⁺-Kanälen, die die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration [Ca²⁺]_i erhöhen. Die

lokale Ca^{2+} -Erhöhung führt zur Aktivierung der ryanodinsensitiven SR Calcium release channels (CRC) und damit zu einem erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR und zu einer erhöhten $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dieser Mechanismus wird als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung bezeichnet. Möglich wird dies durch unmittelbare Nähe des L-Typ Ca^{2+} -Kanals zum CRC. Der CRC wird durch Calmodulin blockiert bzw. gehemmt und durch die Ca^{2+} -Calmodulin abhängige Proteinkinase II (CalPK/CaMK II) durch Phosphorylierung von CRC stimuliert. Die Höhe der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR ist abhängig von der Höhe des Ca^{2+} -Influx über den L-Typ- Ca^{2+} -Kanal und der Menge an gespeichertem Ca^{2+} im SR. Die vorübergehende intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung wird durch Wiederaufnahme in das SR über die SERCA2 und Ca^{2+} -Efflux via sarkolemalem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) terminiert.

Modulationen in einem oder mehreren dieser Prozesse sind wahrscheinlich ursächlich für die Entstehung einer Herzinsuffizienz. Es gibt Hinweise dafür, dass die Effektivität des Ca^{2+} als Trigger für die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR in insuffizienten und hypertrophierten Herzen gestört ist (68). Dieser Defekt in der Signaltransduktion kann durch β -Mimetika in hypertrophierten Kardiomyozyten ausgeglichen werden, nicht jedoch in insuffizienten Herzmuskelzellen. Andererseits sprechen Untersuchungen gegen diese Theorie. Diese belegen, dass sich die Ca^{2+} -Konzentrationen in gesunden und insuffizienten Herzen nicht bei niedriger Kontraktionsfrequenz sondern nur bei höherer Frequenz signifikant voneinander unterscheiden. Eine frequenzabhängige Reduktion des Ca^{2+} -Einstromes in insuffizienten humanen Myozyten erscheint ursächlich wahrscheinlicher (69,70).

Die Arbeitsgruppe von Pieske zeigte hingegen, dass der abgeflachten Kraft-Frequenz-Beziehung des insuffizienten Herzen eine nicht adäquat ansteigende SR Ca^{2+} -Aufnahme bei steigender Herzfrequenz zugrunde liegt (71). Die Phosphorylierung des CRC in insuffizienten Herzen scheint gestört zu sein, was dazu führt, dass der Ca^{2+} - Efflux aus der Zelle beeinträchtigen sein kann. Die Tabelle 1-2 zeigt eine Literaturübersicht der Regulatorproteinexpression bei humaner Herzinsuffizienz auf transkriptioneller und translationaler Ebene.

Molekül	Ebene	Untersuchung	Quantität	Referenz
L-Typ-Ca ²⁺ -kanal (Dihydropyridinrezeptor)	mRNA	Northern Blot	Vermindert	(72)
	Protein	Western Blot	Kein Unterschied	(73)
	Protein	Ligandenbindung	Vermindert	(28)
PLB	mRNA	Northern Blot	Vermindert	(74)
	Protein	Western Blot	Vermindert	(12)
	Regulation	Phosphorylierung		(75,76)
Ryanodinsensitiver calcium- release-channel (CRC)	mRNA	Northern Blot	Vermindert	(74,77);(ICM)
	mRNA	Northern Blot	Kein Unterschied	(74) (DCM)
	Protein	Western Blot	Kein Unterschied	(30,77)
	Protein	Ligandenbindung	Vermindert	(78)
SR Ca ²⁺ -ATPase (SERCA2a)	mRNA	Northern Blot	Vermindert	(12,33,72,77,79,80)
	Protein	Western Blot	Kein Unterschied	(28,32,33,81)
	Protein	Western Blot	Vermindert	(9,29,30)
	Aktivität	Präparation	Vermindert	(81)
	Aktivität	Vesikulär	Kein Unterschied	(82)
Natrium-Ca ²⁺ -Austauscher	mRNA	Northern Blot	Gesteigert	(29) (29,83)
	mRNA	Northern Blot	Kein Unterschied	(84)
	Protein	Western Blot	Gesteigert	(29)
	Protein	Western Blot	Kein Unterschied	(76)
	Aktivität	Vesikulär	Gesteigert	(83)

Tabelle 1-2 Regulatorproteinexpression

Literaturübersicht der Regulatorproteinexpression bei humaner Herzinsuffizienz auf transkriptioneller und translationaler Ebene. Als Kontrollgruppen dienten in allen Versuchsreihen gesunde humane Herzen. ICM = ischämische Kardiomyopathie; DCM = dilatative Kardiomyopathie.

1.3.2 PLB und SERCA2a

Die Herzmuskelfaser wird von zwei verschiedenen Hohlräumen durchzogen. Unterschieden wird zwischen einem transversalen T-System und einem longitudinalen L-System. Die transversalen Tubuli stellen schlauchförmige Einstülpungen des Sarkolems an der Grenze zwischen isotropen und anisotropen Arealen dar. Sie bilden ein Netzwerk, das mit dem extrazellulären Raum in Verbindung steht. Ihre Aufgabe ist die einheitliche Kontraktion der Muskelfaser. Das L-System besteht aus longitudinal verlaufenden Schläuchen und ist Teil des SR. Es hat keine Verbindung zum Extrazellulärraum. Das SR ist, nach derzeitigem Wissensstand, der wichtigste Regulator der Ca^{2+} -Homöostase. Die Funktion besteht in der Ca^{2+} -Aufnahme und Speicherung während der Diastole und Freisetzung von Ca^{2+} zur Kontraktionsauslösung, sowie dem Transport von Nährstoffen und Stoffwechselprodukten. Die SERCA2a sowie PLB sind Membranproteine des SR. Die SERCA2a transportiert Ca^{2+} vom Cytosol in das Lumen des SR (85,86), während PLB die Aktivität der SERCA2a durch Phosphorylierung und Dephosphorylierung reguliert. Liegt PLB in dephosphorylierter Form vor, so vermag es die Aktivität der SERCA2a durch Verminderung der Ca^{2+} -Affinität zu vermindern. Phosphorylierung durch cAMP-abhängige, Ca^{2+} -Calmodulin und Ca^{2+} -phospholipid-abhängige Proteinkinasen hebt diesen Effekt auf (87–89). Dies wird bestätigt durch Untersuchungen an transgenen Mäusen (PLB-Knockout), bei denen eine erhöhte Affinität der SERCA2a für Ca^{2+} in Abwesenheit von PLB festgestellt wurde (18).

Bei Untersuchungen an humanen Herzen mit dilatativer Kardiomyopathie (DCM) konnte eine verminderte Aktivität der SERCA2a sowie eine verminderte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR nachgewiesen werden (9,33). Die verspätete Relaxation im insuffizienten Herzen wird auf eine verminderte Aktivität der SERCA2a zurückgeführt. Die Untersuchungen zeigen, dass eine gestörte Ca^{2+} -Mobilisierung auf der Ebene der SERCA2a und des PLB sowohl bei chronischer Herzinsuffizienz als auch bei der DCM von entscheidender Bedeutung für das Krankheitsgeschehen sind und eine Erklärung für das Fortschreiten der Erkrankung sein können. Eine Schlüsselfunktion kommt dem Ca^{2+} als Auslöser der Kontraktion zur Steuerung der Kontraktionskraft und Relaxation zu. Der Ca^{2+} -Einwärtsstrom in die Herzmuskelzelle während des Aktionspotentials wird durch den spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanal (ICa-L-Typ) vermittelt. Die einwärts strömenden Ca^{2+} -Ionen bewirken allerdings nur zu einem geringen Teil eine direkte Aktivierung des kontraktilen Apparates. Weitaus wichtiger ist die Funktion des Ca^{2+} für die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR (90,91). Der Ca^{2+} -Influx in die Herzmuskelzelle führt dabei zur Mobilisierung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern durch Aktivierung von CRC des SR (92). Wie bereits weiter oben beschrieben, wurden die CRC für

die Herz- sowie Skelettmuskulatur als Ryanodinrezeptor identifiziert (93–95), wobei der Begriff Ryanodinrezeptor von der Ryanodinsensitivität dieses Ca^{2+} -Kanals geprägt wird. Der CRC des SR unterliegt der Regulation durch Proteinkinasen. Liegt der CRC in nicht phosphorylierter Form vor, so ist er inaktiv. Die PKA und die CalPK aktivieren den CRC im Herzmuskel durch Phosphorylierung (96). Es konnte ferner gezeigt werden, dass die β -adrenerge Stimulation von Herzmuskelzellen neonataler Ratten zu einer Phosphorylierung des CRC durch die PKA führt (97). Bei einer β -adrenergen Stimulation von Herzmuskelzellen kommt es zu einer verstärkten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR. Dies führt zu einer erhöhten Aktivität der PKA und damit zu einer verstärkten Phosphorylierung des CRC. Eine verstärkte Freisetzung von Ca^{2+} aus dem SR durch die höhere CRC-Aktivität ist die Folge. Die durch PKA stimulierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR wird durch die inhibitorische Eigenschaft des Ca^{2+} -Calmodulin Komplexes (Calmodulin = Ca^{2+} -bindendes Protein) auf den CRC in einem Gleichgewicht gehalten (98–100). Je mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt wird, desto mehr Ca^{2+} -Calmodulin Komplex entsteht, wodurch die Inhibierung des CRC zunimmt. Eine erhöhte Freisetzung von Ca^{2+} durch den CRC führt demnach zu einer Inaktivierung des CRC. Eine effektive Regulierung des Ca^{2+} -Ausstromes aus dem SR durch den oben beschriebenen Mechanismus ist für die Relaxation des Herzmuskels von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung.

Zusammenfassend wird die intramyokardiale Ca^{2+} -Konzentration als Mediator der kontraktilen Funktion des Herzens nach derzeitigem Kenntnisstand hauptsächlich durch die PKA und CalPK/CaMK II im Gleichgewicht mit der Phosphataseaktivität von Phosphatase Typ 1 (PP1) und 2a (PP2a) reguliert (101,102). Die Adenylatcyclase-Kaskade, die durch den β -adrenergen Rezeptor aktiviert wird, triggert durch cAMP die Aktivierung der PKA und CalPK, wohingegen PP1 und PP2a über den PKC-Signalweg aktiviert werden. Die PKA phosphoryliert drei wesentliche Regulatoren der Ca^{2+} -Homöostase, nämlich den LTCC, PLB und RyR. Diese Regulatoren führen zu einem erhöhten Ca^{2+} -Einstrom und einer erhöhten Geschwindigkeit und Amplitude des Ca^{2+} -Ausstroms aus dem SR. Die Phosphatasen PP1 und PP2A dephosphorylieren die phosphorylierten Regulatorproteine (siehe Abbildung 1-3).

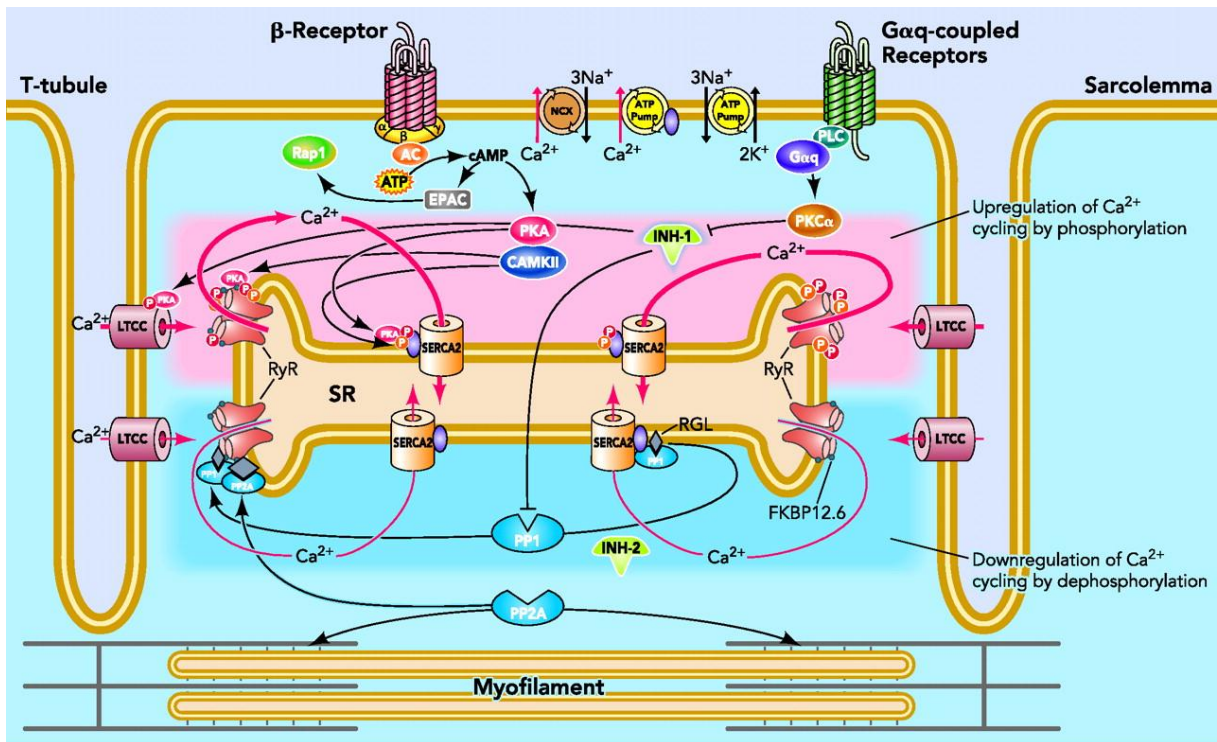


Abbildung 1-3 Regulation der Ca^{2+} Homöostase in Kardiomyozyten.

Die Amplitude und Geschwindigkeit der intramyokardialen Ca^{2+} -Konzentration wird durch das Zusammenspiel von Kinasen (Proteinkinase A und Ca^{2+} / Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) und Phosphatasen (PP1, PP2A) reguliert. Die β -adrenerge Signalkaskade aktiviert dabei den PKA und CaMK Signalweg, während die Gq-Rezeptor vermittelte PKC Aktivierung den PP1-assoziierten Signalweg steuert. Quelle: (101)

1.4 Der Proteinkinaseinhibitor α (PKI α)

1.4.1 Zelluläre Funktionen

Die Arbeitsgruppe von E.G. Krebs beschrieb 1964 erstmals die Existenz eines hitzestabilen Proteins, welches in der Lage ist die PKA in ihrer Wirkung zu inhibieren (103). Es gelang ihnen 1971 PKI α zu isolieren. Das Protein hat eine Größe von 70-75 Aminosäuren (104) und ist ein hochspezifischer, potenter und kompetitiver Inhibitor der katalytischen Untereinheit der PKA (PKA-C) (105–107). Neben der regulatorischen Untereinheit (R) der PKA, die über cAMP als second messenger reguliert wird, ist PKI α eine cAMP unabhängige Möglichkeit der Zelle, die Funktion der PKA, insbesondere PKA-C, zu inhibieren. Die PKI α Bindung erfolgt im aktiven Zentrum von PKA-C (siehe Abbildung 1-4). In Anwesenheit von cAMP dissoziiert PKA-C vom tetramären Holoenzymkomplex der PKA und bindet PKI mit hoher Affinität. Das N-terminale Ende von PKI α (Aminosäuren 18-24) bildet die Inhibitor-domäne für PKA-C, die für die inhibitorische Aktivität notwendig ist (104,108). Sie wird durch die Aminosäuren 5-13 um das 100-fache in ihrer inhibitorischen Wirkung verstärkt (109).

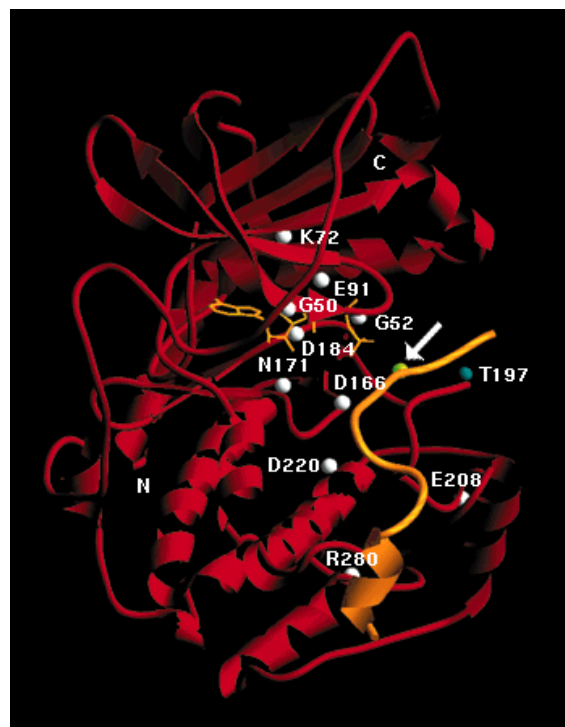


Abbildung 1-4 PKI-PKA-Struktur

Dreidimensionale Proteinstruktur der Proteinkinase A (cAMP dependent protein kinase, cAPK) im Komplex mit dem Proteinkinase Inhibitor (orange Schleife), konservierte Residuen (weiße Kugeln), gebundenes ATP (orange Linien) und die Phosphorylierungsstelle (weißer Pfeil). Quelle: The Molecular Interactive Collaborative Environment (MICE) project 2008

Die räumliche Struktur und Konformation von PKI spielt eine wichtige Rolle bei der Substratspezifität und der möglichen Liganden des Proteins. Die Arbeitsgruppe von David A. Johnson und Hauer et al. fanden 1999 mit Hilfe der Röntgenkristallographie sowie NMR- und TRFA (time resolved fluorescence anisotropy) Spektroskopie heraus, dass ungebundener PKI α hochflexibel ist, wohingegen bei Bindung mit PKA-C die Flexibilität im N-terminalen Bereich des Proteins abnimmt (110). Der C-terminale Bereich des Proteins, einschließlich der Kernlokalisationssequenz (NES) bleibt jedoch auch nach Bindung mit PKA-C flexibel (siehe Abbildung 1-5). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, dass die NES und die damit verbundenen Funktionen des PKI α von hoher physiologischer Bedeutung sind (siehe Kapitel 1.4.3).

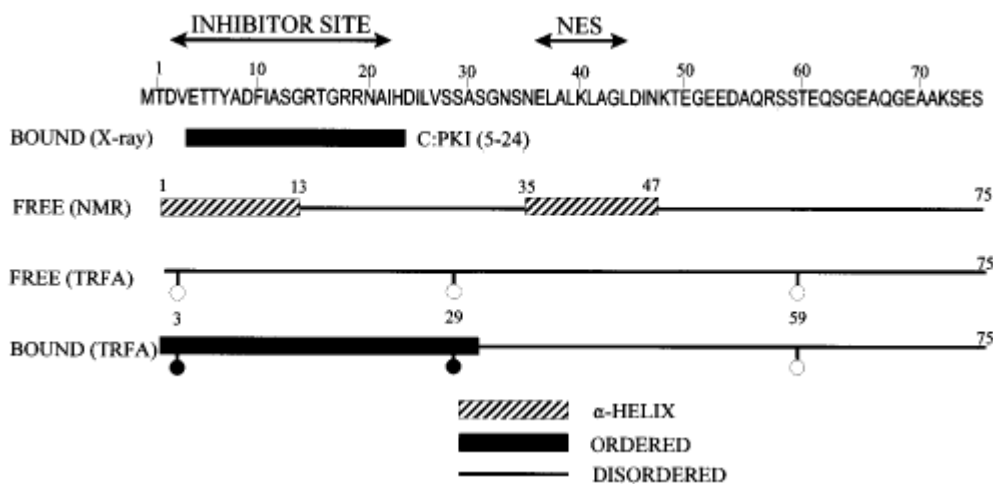


Abbildung 1-5 NMR-/TRFA PKI α

Aminosäuresequenz sowie Konformation von PKI α in freier Flüssigkeit und in gebundener Form; dargestellt durch Röntgenkristallographie, NMR- und TRFA Spektroskopie, NES=nuclear export signal; TRFA=time-resolved fluorescence anisotropy. Quelle: (110)

1.4.2 Verteilung der Isoformen

PKI α ist nicht der einzige Proteinkinaseinhibitor. Bisher konnten drei Isoformen isoliert werden: PKI α (111), PKI β (112) und PKI γ (113). Von PKI β sind mindestens zwei alternative Spleißprodukte bekannt, die PKI β 1 und PKI β 2 genannt werden (114). Die höchste Expression von PKI α wird in Herzmuskel, Skelettmuskel, im kortikalen und zerebellärem Gewebe gefunden (115). PKI β mRNA wird in höchsten Konzentrationen im Testes exprimiert, jedoch nicht im Muskel (112,116,117). PKI γ wird in Herz und Testes exprimiert (113).

PKI α ist hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (118), wobei die PKI α Aktivität

entwicklungsspezifisch (119) sowie hormonell (120) reguliert wird. Van Patten et al. konnten in ihrer 1992 veröffentlichten Arbeit zeigen, dass neonatales Testesgewebe von Ratten PKI α enthält. Es erfährt eine progressive Reduktion mit zunehmendem Alter der Ratten, während PKI β bis 20 Tage post partum undetektierbar ist und dann stetig ansteigt. PKI β stellt in adulten Ratten den prädominanten Phenotyp dar (115).

Die Expression sowie die intrazelluläre Verteilung des PKI α sind außerdem abhängig vom Zellzyklus (121). Während Zellen in der G1- oder Hungerphase eine sehr geringe Expression von PKI α zeigen, werden in der S-Phase des Zellzyklus größere Mengen PKI α exprimiert. Die PKI α -Konzentration ist im Zellkern während der G2 und Mitosephase am höchsten und nimmt in der G1-Phase wieder ab.

1.4.3 Physiologische Funktion

PKI α ist ein hochpotenter Inhibitor der PKA. Die Bedeutung in der β -adrenergen Signalkaskade wurde im Kapitel 1.2 und 1.3 dieser Arbeit beschrieben. Im folgenden Kapitel sollen nun weitere Funktionen des PKI α beschrieben werden, die über die Regulation der PKA-Aktivität hinausgehen. Neben der Funktion des PKI α als potenter Inhibitor der PKA konnte Mitte der neunziger Jahre gezeigt werden, dass eine weitere wesentliche Funktion des PKI α darin besteht, PKA-C aus dem Zellkern in das Zytoplasma zu transportieren (121). Ein leucinreiches Motiv (Aminosäuren 37-46), das nuclear export signal (NES), ist für den schnellen Transport von PKA-C aus dem Zellkern durch PKI α verantwortlich (122). PKI α reguliert damit die Kinaseaktivität von PKA-C im Zellkern (s.u.), wie z.B. die Phosphorylierung von CREB und anderen Transkriptionsfaktoren. Schließlich wird der Proteinkinaseinhibitor seinerseits durch die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors (epidermal growth factor receptor) phosphoryliert. Die phosphorylierte Form des PKI α führt zur 6-9 fachen Reduktion ihrer inhibitorischen Aktivität (123). Dies könnte ein weiterer Hinweis auf die Rolle des PKI α bei der Proliferation bzw. Apoptose der Zelle sein. Ding et al. fanden weitere Hinweise für eine mögliche Regulation der Apoptose von Herzmuskelzellen bei Herzinsuffizienz (124), wie die Phosphodiesterase 3A (PDE3A) und das Inducible cAMP early repressor (ICER). Die Arbeitsgruppe um Ding konnte zeigen, dass diese Proteine/Enzyme durch den cAMP-PKA Signaltransduktionsweg reguliert werden. Es handelt sich dabei um Proteine mit verändertem Expressionsmuster bei insuffizienten humanen Kardiomyozyten. Es wurde ferner gezeigt, dass die Aktivität dieser Proteine und damit die Regulation der Apoptose der Herzmuskelzelle durch den cAMP-PKA Signalweg und durch PKI α moduliert werden kann (125).

Hinweise dafür, dass PKI α eine wichtige Funktion im Zellzyklus hat, zeigen Arbeiten von Browne und seiner Arbeitsgruppe (126). Sie konnten in PtK2-Zellen durch Lokalisationsuntersuchungen zeigen, dass PKI α mit Mikrotubuli im Zytoplasma während der Interphase und während der Mitose mit dem Spindelzellapparat assoziiert ist (127). In Ovarialzellen des chinesischen Hamsters konnten Veränderungen in der Proteinkonzentration von PKI α im Verlauf des Zellzyklus beobachtet werden, die antiproportional zur Proteinkonzentration der PKA waren (128). In einer weiteren Untersuchung konnte ein verminderter PKI α Gehalt in der Niere von Hühnern bei Vitamin D Mangel, einhergehend mit einer verminderten PKA Aktivität, beobachtet werden (129). Andererseits zeigten Untersuchungen von Mäusenieren erhöhte PKI α -Proteinkonzentrationen bei Vitamin D Mangel, ohne Effekt auf die PKA-Aktivität (130). Die Vitamin D Effekte sind beschränkt auf die Niere und konnten nicht in anderen Organen nachgewiesen werden (131). In allen oben genannten Untersuchungen sind trotz reziprokem Nachweis der Proteinkonzentrationen die relativen Aktivitäten von PKA und PKI α zueinander nicht bestimmt worden. In Nierenzellen ist die PKI α -Konzentration zu niedrig, um die PKA-Aktivität signifikant beeinflussen zu können. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die Höhe der beobachteten Unterschiede der PKI α -Aktivität für die endogene PKA-Aktivität verantwortlich ist. In Herz-, Gehirn- und Testesgewebe ist eine Beeinflussung der PKA-Aktivität durch PKI α aufgrund der höheren endogenen PKI α -Aktivität sehr viel wahrscheinlicher. In Kardiomyozyten der Ratte konnte gezeigt werden, dass die endogene PKI α -Konzentration ausreicht, um 20% der endogenen PKA Aktivität zu inhibieren (132). Die PKI α Konzentration konnte dabei um etwa das Zweifache durch β -adrenerge Stimulation, exogene dibutyryl cAMP Zugabe oder Alloxan (2,4,5,6-Tetraoxohexahydropyrimidin; mit Barbitursäure und Harnsäure strukturell verwandt) vermindert werden. PKI α vom Testes der Ratte zeigte einen mehrfachen Anstieg der PKI α -Konzentration mit dem Alter des Tieres (133). Des Weiteren war eine Reduktion um das 5-6 fache nach Hypophysektomie bei adulten Tieren nachweisbar, welche durch FSH Gabe restituiert werden konnte. Ein weiteres Ergebnis ist, dass die Halbwertszeit von Testes-PKI ca. 10 Stunden beträgt. Das verminderte Lernvermögen von Drosophila bei Überexpression von PKI α durch Verhinderung der PKA vermittelten Phosphorylierung von Ionenkanälen im ZNS (134) stellt einen weiteren Hinweis für die vermutlich sehr hohe physiologische Bedeutung des PKI α dar (115). Zusammenfassend können folgende physiologische Funktionen des Proteinkinaseinhibitors festgehalten werden:

- PKI α ist ein hochpotenter Inhibitor der PKA
- Die Regulation der Kinaseaktivität der PKA im Zellkern erfolgt durch Transport von PKA-C aus dem Zellkern in das Zytoplasma (NES)
- Phosphorylierung von PKI α durch die Tyrosinkinaseaktivität des EGF-Rezeptors führt zu einer 6-9 fachen Reduktion der inhibitorischen Aktivität
- PKI α kann über den PKA-Signalweg die Aktivität der Phosphodiesterase 3A (PDE3A) und des Inducible cAMP early repressor (ICER) regulieren, welche bei humaner Herzinsuffizienz ein spezifisches Expressionsmuster zeigen und an apoptotischen Prozessen beteiligt sind.
- Während der Interphase ist PKI α mit Mikrotubuli im Zytoplasma und während der Mitose mit dem Spindelzellapparat assoziiert
- PKI α moduliert die Phosphorylierung von Ionenkanälen im ZNS (in Drosophila gezeigt) und verändert das Lernvermögen.

1.5 Gentherapie kardiovaskulärer Erkrankungen

1.5.1 Definition und Anwendungsfelder

Gentherapie kann als Fähigkeit zur Transduktion von genetischem Material (DNA, RNA) in eine Zelle oder in ein Gewebe, mit dem Ziel der Modifikation des Genexpressionsmusters zum Erreichen eines therapeutischen Effektes definiert werden (135). Gentherapie wird am Menschen seit den 1990er Jahren zur Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten angewandt. Dabei ist der ursprüngliche Ansatz der Behandlung monogenetisch hereditärer Erkrankungen mit dem Ersatz defekter oder fehlender Genprodukte durch den polygenetischen und translationalen Ansatz auch erworbener Störungen erweitert worden. So hat die Gentherapie kardiovaskulärer Erkrankungen heute das Ziel physiologische zelluläre Prozesse wiederherzustellen, bzw. pathophysiologische Prozesse zu unterbrechen. Wesentliche Erfolgsfaktoren sind dabei die Auswahl von therapeutisch wirksamen Zielen und die Entwicklung von nicht toxischen aber effektiven Gentransfer- und Genexpressionssystemen. Die Modulation von Regulatorproteinen der Ca^{2+} -Homöostase ist dabei ein wesentlicher Schwerpunkt in der Therapie. Es werden aber auch andere erfolgversprechende Ziele identifiziert und auch miteinander kombiniert. So kann die Regulation des Coxsackievirus-Adenovirus-Rezeptor (CAR) zu einem effektiveren Transport von Vektorsystemen in die Zielzellen führen, wie durch die Arbeitsgruppe von Fechner, Poller u.a. gezeigt werden konnte (136–138). Folgende Zielsysteme werden im Folgenden zusammengefasst: die intramyokardiale Kalziumregulation-/ und Homöostase, die adrenerge Signaltransduktion, die (Anti-)Apoptose und die Angiogenese (24,139,140). Die an der elektromechanischen Kopplung des Herzens beteiligten Proteine haben nach derzeitigem Forschungsstand einen großen Einfluss auf pathophysiologische Prozesse und sind daher Hauptziel gentherapeutischer Ansätze. Dazu zählen der Ryanodin-Rezeptor (RyR), die SERCA2a, das Phospholamban und der Na-Ca-Austauscher (9,29,141–144). Die Steigerung der SERCA2a Aktivität wurde in den letzten Jahren insbesondere durch die klinischen Studien von Hajjar et al., Jaski et al. und Jessup et al. gut untersucht.

1.5.2 Präklinische Studien

Trotz der pharmakologischen Fortschritte in der Behandlung, bleibt die chronische Herzinsuffizienz weltweit die häufigste Ursache für Morbidität und Mortalität im Alter. Grundsätzlich kann man drei wesentliche präklinische Forschungsfelder identifizieren, nämlich die β -adrenerge Signalkaskade, die Ca^{2+} -Homöostase und der programmierte Zelltod.

Betrachtet man die **β -adrenerge Signalkaskade**, sind Schwerpunkte wie die Dysfunktion des β -adrenergen Rezeptors (β AR) und die G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase 2 (GRK2) zu nennen. Die Arbeitsgruppe von Rengo et al. konnte zeigen, dass ein Peptidinhibitor der β AR – die β ARKct – die Kontraktilität und das Remodeling insuffizienter Herzen verbessern kann (145). Eine AdV-vermittelte β AR Überexpression führt bei Kaninchen zu einer verbesserten Herzleistung (24,146). Bei der Gabe eines AdV-Konstrukts (β ARKct) drei Wochen nach einem Myokardinfarkt konnte beim Kaninchen eine deutliche Rückbildung der ventrikulären Dysfunktion beobachtet werden (147). Außerdem führt die intrakoronare Gabe eines AdV mit Adenylatcyclase VI zu einer verbesserten linksventrikulären Funktion (148). Insgesamt kann die β -adrenerge Signalkaskade als ein vielversprechendes Ziel gentherapeutischer Maßnahmen gelten.

Betrachtet man die **Ca^{2+} -Homöostase**, sind insbesondere die SERCA2a sowie deren Modulatoren wie Phospholamban und PP1 zu nennen. Zumindest SERCA2a ist bereits in Phase I und Phase II Studien evaluiert worden (siehe unten). Bezüglich der **Apoptose** sind die antiapoptotischen Effekte und positiv inotropen Effekte von Bcl-2 und S100A1 zu nennen.

Zu den zweifelsfrei am häufigsten evaluierten Regulatorproteinen gehört die SERCA2a. Eine Überexpression von SERCA2a verbessert die hämodynamischen Eigenschaften des Myokards mit einer Reduktion von kardialen Arrhythmien, positiver Inotropie und verbesserter Systolie und Diastolie (25,149–152). SERCA2a inhibiert aber auch die Proliferation von glatten Muskelzellen *in vitro* und *in vivo*, wobei letztlich die Koronarperfusion über einen direkten Effekt auf Endothelzellen verbessert wird (25,153). Eine Verbesserung hämodynamischer Parameter durch reduzierte Suppression der SERCA2-Aktivität ist auch durch einen rAAV9-shPLB Vektor gezeigt worden, der von der Arbeitsgruppe Poller und Fechner et al. bei neonatalen kardiomyozyten eingesetzt wurde (26).

Die Angiogenese betreffende Ansätze beinhalten z.B. die Plasmid induzierte Transduktion und Expression von VEGF cDNA zur Stimulation der Angiogenese bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit (pAVK) (154–156). Die erzielten positiven Ergebnisse, unter anderem die verstärkte Neubildung von Kollateralen der ischämischen

Extremität, wurden allerdings durch die Untersuchungen von Markkanen et al. teilweise relativiert (157). Ein weiteres Beispiel in diesem Bereich stellen „DNA-Fallen“ dar. Eine DNA-Falle für den E2F-Transkriptionsfaktor war effektiv bei der Verhinderung von Restenosen nach arteriovenösen Bypassoperationen. Diese 20bp Oligonukleotide binden an Promotoren zellproliferativer Gene wie c-myc, c-myb oder PCNA und verhindern deren Aktivierung. In der PREVENT Studie konnte so eine Inhibierung der Proliferation von glatten Muskelzellen der betroffenen Gefäße erreicht werden (158). Die Effektivität hinsichtlich klinischer Endpunkte muss jedoch in weiteren kontrollierten Untersuchungen bestätigt werden (159).

Die kontrollierte Genexpression wie z.B. die Hypoxie induzierte Genexpression ist ein weiteres interessantes Feld aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen. Es konnte gezeigt werden, dass VEGF und andere Faktoren speziell unter hypoxischen Bedingungen, wie sie bei Myokardischämien auftreten, exprimiert werden können. Zur kontrollierten Genexpression gehören auch Tetracyclin- und Rapamycin abhängige Promotoren (160,161). Rapamycin wird neben seiner Funktion als externer Regulator der Genexpression bei beschichteten Stents (Drug Eluting Stents) eingesetzt und verhindert die Restenose von Koronarien durch Hemmung der Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäßwand (162). Schließlich sei hier beispielhaft noch die Bedeutung der Häm-Oxygenase-1 (HO-1) zu nennen, einem antiinflammatorischen und proangiogenem Faktor. HO-1 cDNA konnte durch einen AAV Vektor erfolgreich in Rattenherzen injiziert werden und wurde in einer 50fachen Konzentration im Vergleich zur endogenem HO-1 exprimiert. Hierdurch konnten im Tierversuch Myokardinfarkte verhindert werden (163).

1.5.3 Klinische Studien

Im Folgenden sind die Ergebnisse eines kritischen Reviews im Rahmen dieser Arbeit dargestellt. Dabei wurden anhand von drei Suchstrategien klinische Studien mit gentherapeutischen Ansätzen identifiziert. Die erste Suchstrategie bestand aus einer Abfrage der Datenbank für gentherapeutische klinische Studien (164). Hierbei wurde die Datenbank *mit* und *ohne* die Limits abgefragt: „cardiovascular disease“, „Phase I“, „Phase II“, „Phase III“. Ziel der ersten Suchstrategie war es eine Übersicht über die aktuell (Dezember 2011) laufenden klinischen Studien der Phasen I-III zu gewinnen. Die Suchstrategie 2, die in der PubMed Datenbasis durchgeführt wurde, beinhaltete die Suchbegriffe „Adenovirus“ oder „AAV“ jeweils kombiniert mit „Gene Therapy“ und den Limits „Humans“, „Clinical Trial“ oder „Metaanalyse“ und dem Field „Title“. Die Suchstrategie 3 wurde mit den MeSH-

Begriffen „Heart Failure“ und „Gene Therapy“ in der PubMed Datenbasis durchgeführt und beinhaltete lediglich das Limit „Title“. Ziel der zweiten und dritten Suchstrategie war es, bereits publizierte Ergebnisse genterapeutischer Studien zu identifizieren. In der zweiten Suchstrategie wurden explizit Studien selektiert, die die Verwendung von Adenovektoren und Adeno-assoziierten Vektoren beinhalteten.

Die Ergebnisse der drei Suchstrategien sind im Folgenden kurz dargestellt. Mit der ersten Suchstrategie (Studiendatenbank) konnten im Dezember 2011 n=1714 Studien der Phasen I-IV mit genterapeutischen Ansätzen in der Datenbank gefunden werden. Dabei handelt es sich sowohl um aktuell laufende, wie auch bereits abgeschlossene Studien. 146 Studien wurden mit dem Limit „cardiovascular diseases“ gefunden. Davon waren 7 Phase III-Studien („Zulassungsstudien“), 39 Phase II-Studien und 64 Phase I-Studien. Die restlichen Studien waren Phase I-II und II-III Studien. Es wurden etwa 34 verschiedene virale Vektoren in der Genterapie verwendet. Die Häufigkeit des Einsatzes dieser Vektoren in der klinischen Forschung (Phase I bis Phase IV) ist in Abbildung 1-6 dargestellt.

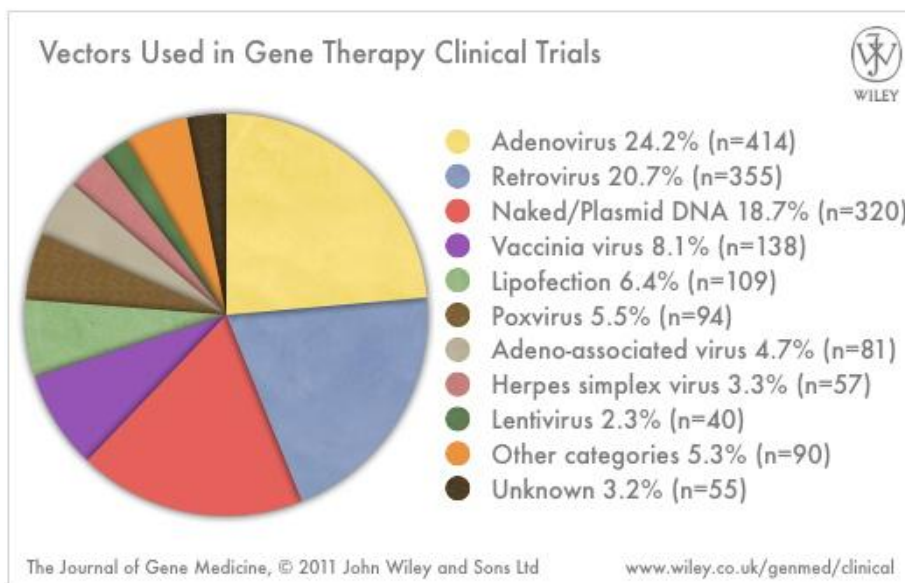


Abbildung 1-6 Häufigkeit verwendeter Vektoren in Genterapiestudien.

Häufigkeit und Anzahl des Einsatzes verschiedener viraler Vektoren in klinischer Studien mit Genterapieansatz im Dezember 2011 insgesamt (164). Erfasst wurden sowohl aktuell laufende Untersuchungen, als auch bereits abgeschlossene. Der am häufigsten verwendete Vektor war mit 24% Adenovirus gefolgt von 21% Retrovirus.

Vektor	Gene Therapy Clinical Trials	
	Number	%
Adeno-associated virus	81	4.7
Adenovirus	406	24
Adenovirus + Retrovirus	3	0.2
Adenovirus + Vaccinia virus	3	0.2
E. coli	2	0.1
Flavivirus	8	0.5
Gene gun	5	0.3
Herpes simplex virus	57	3.3
Lactococcus lactis	4	0.2
Lentivirus	40	2.3
Lipofection	109	6.4
Listeria monocytogenes	5	0.3
Measles virus	6	0.4
Naked/Plasmid DNA	318	19
Naked/Plasmid DNA + Adenovirus	2	0.1
Naked/Plasmid DNA + Vaccinia virus	1	0.1
Newcastle disease virus	1	0.1
Poliovirus	1	0.1
Poxvirus	66	3.9
Poxvirus + Vaccinia virus	28	1.6
Retrovirus	352	21
RNA transfer	27	1.6
RNA virus	5	0.3
Saccharomyces cerevisiae	6	0.4
Salmonella typhimurium	3	0.2
Semliki forest virus	1	0.1
Sendai virus	2	0.1
Shigella dysenteriae	1	0.1
Simian virus 40	1	0.1
Sleeping Beauty transposon	3	0.2
Streptococcus mutans	1	0.1
Vaccinia virus	106	6.2
Venezuelan equine encephalitis virus replicon	2	0.1
Vesicular stomatitis virus	2	0.1
Vibrio cholerae	1	0.1
Unknown	55	3.2
Total	1714	

Abbildung 1-7 Vektoren in der Gentherapie.

Anzahl, Art und prozentuale Verteilung der verwendeten viralen Vektorsysteme in der Gentherapie im Dezember 2011. Erfasst wurden sowohl aktuell laufende Untersuchungen, als auch bereits abgeschlossene (164). Insgesamt sind 1714 gentherapeutische klinische Studien aller Phasen (I-IV) durchgeführt worden. Es sind bereits 406 klinische Studien mit Adenoviren durchgeführt worden.

Aus der Abfrage wird deutlich, dass die mit Abstand am häufigsten in der klinischen Forschung verwendeten Vektoren Adenoviren sind. Mit 24% aller klinischen Studien (n=406) zum Zeitpunkt Dezember 2011 liegen sie noch deutlich vor den Retroviren mit 21% (n=352). Adeno-assoziierte Viren wurden in 4,7% der Studien (n=81) eingesetzt. Die Anzahl der Probanden wurde hier nicht erfasst. Zwei Drittel der insgesamt 1714 klinischen Studien waren

Sicherheits- und Verträglichkeitsstudien der Phase I. Lediglich 3,5% (n=60) waren klinische Studien der Phase III und damit Effektivitätsuntersuchungen (164). Einschränkend ist zu den Daten der Studiendatenbank zu sagen, dass multizentrische Untersuchungen teilweise als einzelne Studien erfasst werden. Es erscheint daher wahrscheinlich, dass es weniger als 1714 Studien gibt.

Mit der Suchstrategie 2 wurden 25 Publikationen für „Adenovirus“ und 10 für „AAV“ in der PubMed-Datenbasis identifiziert. Nach Selektion anhand der Abstracts und Volltexte resultierten 17 (AdV) + 8 (AAV) Studien. Ausgeschlossen wurden Reviews und präklinische Untersuchungen. Mit der Suchstrategie 3 konnten insgesamt 42 Publikationen und nach Selektion noch jeweils eine Studie für AdV und eine für AAV zusätzlich zur Suchstrategie 2 identifiziert werden. Die identifizierten klinischen Studien sind tabellarisch durch die Variablen „Trial Type“, „Disease“, „Author“, „Year“ und „Gene Therapy“ beschrieben (siehe Tabelle 1-3 und Tabelle 1-4).

Trial Type	Disease	Author	Year	AdV-Gene Therapy
Phase II	Coronary heart Disease	Yang	2009	Ad-HGF
Phase I	Prostate Cancer	Freytag	2007	Ad5-yCD/mutTKSR39rep-ADP
Follow Up	Prostate Cancer	Freytag	2007	Ad5-yCD/mutTK _{SR39} rep-ADP
Follow-Up	Pleural mesothelioma	Sterman	2007	Adv-HSV-tk + Ganciclovir
Phase I	Prostate Cancer	Matyas	2005	Ad5-fibroblast growth factor-4
Phase I	Prostate Cancer	Van der Linden	2005	Adv-HSV-tk + Ganciclovir
RCT	Limb Ischaemia	Sterman	2005	Adv-HSV-tk + Ganciclovir
RCT	Head and Neck Cancer	Zhang	2005	p53
Phase I	Prostate Cancer	Freytag	2003	Ad5-CD/TKrep
Phase I	Glioma	Lang	2003	p53
Phase I	Ovarian Cancer	Hasenburg	2002	CAR
Phase II	Hepatocellular Cancer	Habib	2001	dl1520 + 5FU
Phase I	SCLC	Boulay	2000	p53
Phase I	Ovarian cancer (erbB2+)	Alvarez	2000	anti-erbB-2
Phase I	Coronary Artery Disease	Rosengart	1999	VEGF121
Phase I	Plerural Mesothelioma	Sterman	1998	Thymidine Kinase + Ganciclovir
Phase I	Cystic Fibrosis	Boucher	1994	CFTC Regulator

Tabelle 1-3 Publierte klinische Studien mit Adenoviralen Vektoren.

Übersicht über veröffentlichte Ergebnisse klinischer Studien mit einer AdV-vermittelten Gentherapie (Stand Juli 2011) Ergebnisse aus einer PubMed Recherche (kritisches Review): 25 +42 Treffer nach Selektion 17 mit den Suchstrategien 2 und 3. Neben der zystischen Fibrose und zwei Studien zur Behandlung der KHK sind alle vorhandenen Studien onkologischer Herkunft.

Trial Type	Disease	Author	Year	AAV-Gene Therapy
Phase II (RCT)	Heart Failure	Jessup	2011	AAV1-SERCA2a
Phase I	LPL-Deficiency	Mingozzi	2009	AAV_LPLS447X
Phase I	LPL-Deficiency	Mingozzi	2008	AAV1-LPL
Phase Ib	Cystic Fibrosis	Moss	2007	AAV-CFTR
Phase I	Parkinson's Disease	Kaplitt	2007	AAV-GAD
Phase I	Canavan Disease	McPhee	2006	rAAV-ASPA
Phase I	Hemophilia	Manno	2006	rAAV2-FactorIX
Phase I	Hemophilia	Kay	2000	rAAV2-FactorIX
Phase I	Cystic Fibrosis	Wagner	1999	AAV-CFTR

Tabelle 1-4 Publierte klinische Studien mit Adeno-assoziierten Vektoren .

Übersicht über klinische Studien mit einer AAV-vermittelten Gentherapie (Stand Juli 2011) Ergebnisse der PubMed Recherche (kritisches Review): 10 +42 Treffer nach Selektion 9 mit den Suchstrategien 2 und 3. Der CFTR-Rezeptor bei zystischer Fibrose wurde Mitte der 90er Jahre zunächst in einem AdV-System eingesetzt und später als AAV-System. Es wurde lediglich eine publizierte klinische Studie mit AAV-Vektoren für die Behandlung von Herzkrankheiten gefunden.

Eine für diese Arbeit sehr wichtige Phase II-Studie wurde durch die Arbeitsgruppe von Hajjar et al. Veröffentlicht. Sie demonstrierten 2008 das Design einer Phase 2 Studie, die eine intrakoronare Applikation eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (AAV1) als Carrier der SERCA2a cDNA bei insgesamt 46 Patienten mit einer symptomatischen Herzinsuffizienz im Stadium NYHA III/IV darstellten. Primärziel war die Erfassung der Sicherheit und Durchführbarkeit gemessen an der Anzahl der unerwünschten Reaktionen in den verschiedenen Dosisstufen. Sekundärziele waren die *in vivo* AAV1/Serca2a – Aktivität, Mortalität und Drop-Out Rate. Etwa drei Jahre später (2011) erfolgte die Publikation der Ergebnisse dieser Studie durch Jessup et al. in eine der wichtigsten Publikationen der letzten Jahre in diesem Bereich (165).

1.5.4 Adenoviren in der Gentherapie

Derzeit sind adenovirale Vektoren (AdV) in der Gentherapie die am häufigsten eingesetzten Vektoren (siehe 1.5.3 und (164)). 24% (n=406) aller klinischen Studien wurden mit AdV durchgeführt, 21% mit Retroviren und 4,6% mit Adeno-assoziierten viralen Vektoren. Die langjährigen Erfahrungen in der Herstellung und in der Anwendung am Menschen sind ausschlaggebend dafür, dass AdV nach wie vor einen hohen Stellenwert in der Gentherapie haben. Für diese Arbeit waren außerdem die hohe Transduktionseffizienz und die Herstellbarkeit in hohen Titern von AdV ausschlaggebend. Seit 1990 werden replikationsdefiziente AdV für Gentherapieuntersuchungen an Tieren und Menschen angewandt. Adenoviren enthalten doppelsträngige DNA (36-kDa) und verursachen als Wildtyp selbstlimitierende Infektionen des Respirationstraktes beim Menschen. AdV sind für

gentherapeutische Untersuchungen kardiovaskulärer Erkrankungen besonders geeignet. Sie können viele verschiedene Zelllinien, insbesondere auch Kardiomyozyten, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* infizieren (166–168). Zum anderen können AdV in hohen Titern (bis zu 10¹² pfu/ml) produziert werden und eine große Promotor/Transgen-Kassette aufnehmen (etwa 6 Kilobasen in AdV der 1. Generation und etwa 20 kb in modifizierten Vektoren). Adenovirus Typ 5 wird bei gentechnischen Arbeiten zunehmend zur Übertragung von heterologen Genen verwendet. Sie weisen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine hohe Transduktionseffizienz auf, infizieren eine Vielzahl verschiedener Zelltypen, einschließlich nicht-teilende Zellen und können hochtitrig angezüchtet werden (169). Das Adenovirion kann bis zu 105% der Länge des Wildtyp-Genoms verpacken, was bei dem in der zugrundeliegenden Arbeit verwendeten Ad5 mit einer Genomlänge von ca. 36 kb einer Aufnahmekapazität von ungefähr 1,8 - 2,0 kb fremder DNA entspricht. Bei der Verwendung von Deletionsmutanten können entsprechend größere DNA-Fragmente in das Ad-Genom inseriert werden. Je nach Funktion des deletierten Bereichs resultieren Replikationsdefekte oder replikationskompetente Ad5-Deletionsmutanten. Für den adenoviralen Gentransfer werden zur Zeit überwiegend Ad5-Vektoren verwendet, deren E1-Region deletiert ist, bei manchen dieser Vektoren wird zur Erhöhung der Aufnahmekapazität für fremde DNA noch zusätzlich die E3-Region deletiert („adenovirale Vektoren der ersten Generation“). Die Deletion des E1-Bereichs führt zu replikationsdefekten adenoviralen Vektoren. Das von replikationsdefizienten-, rekombinanten-, adenoviralen Vektoren auf nicht-komplementierende Zielzellen übertragene defekte virale Genom verweilt normalerweise episomal, wodurch das übertragene Gen (Transgen) lediglich transient exprimiert wird. Es erfolgt keine Produktion neuer viraler Partikel (170).

Ein Problem adenoviraler Vektoren ist die Erzeugung einer akuten Entzündungsreaktion mit Freisetzung von Interleukin 6,8 und TNF α innerhalb von Stunden nach Adenovirus-Injektion beim Wirt. Diese Reaktion erfordert keine *de novo* Virusreplikation und tritt auch bei AdV der 2. Generation auf. Ursächlich scheint hierbei das Viruskapsid zu sein (171). Des Weiteren kommt es zu einer humoralen und zellulären Immunreaktion gegen das Virus aber nicht gegen das Transgen. Als Folge kommt es zur verminderten Transgenexpression durch Stimulation der Bildung neutralisierender Antikörper aber auch durch Adenovirus spezifische T-Lymphozyten.

AAV-Vektoren haben sich in der letzten Dekade aufgrund der niedrigen Pathogenität, geringen Immunogenität und Langzeit-Transgenexpression in der präklinischen und zunehmend auch in der klinischen Forschung etabliert (172,173). Bei direkter intrahepatischer

(A. hepatica) Injektion hat sich jedoch auch bei AAV-Vektoren in 30-50% der Patienten eine T-Zell Antwort gezeigt (174,175). Der Tod einer 36 jährigen Patientin mit Rheumatoider Arthritis in einer Phase I Studie, die kurz zuvor die zweite Injektion eines AAV-Vektors mit TNF α Rezeptors erhielt und an einem Multiorganversagen in Folge einer Histoplasmose-Sepsis starb, hatte nicht nur den Studienabbruch, sondern auch eine Untersuchung durch die FDA zur Folge. Letztlich war im Zusammenhang mit der immunsuppressiven Medikation die Gabe des Vektors als „ungünstig“ eingestuft und vor allem das Monitoring von Krankheitssymptomen während der Studie kritisiert worden. Ein direkter Zusammenhang mit der Entstehung der Histoplasmose konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (176). Die Patientin hatte trotz der lokalen intraartikulären Injektion nach der Gabe Antikörper-Titer gegen das AAV-Kapsid entwickelt. Die systemische Konzentration des AAV war in der PCR als sehr gering gemessen worden. Eine Immunreaktion trotz lokaler Gabe und sehr geringer zu erwartender systemischer Konzentration, kann also nicht ausgeschlossen werden. Sowohl für AdV als auch für AAV kann die somatische Gentherapie heute unter strenger Indikationsstellung und strengem Monitoring der Probanden als etwa gleich „sicher“ bzw. „unsicher“ gelten, wie vergleichbare medikamentöse Therapieoptionen der jeweiligen Krankheitsbilder (177).

1.6 Fragestellung

Herzinsuffizienz ist durch eine verminderte Kontraktionskraft sowie eine verzögerte Relaxation des Herzens charakterisiert. Sowohl im Tierversuch als auch bei humanen insuffizienten Herzen konnte gezeigt werden, dass eine verzögerte diastolische Relaxation des Herzens Folge einer verminderten Aufnahme des zytosolischen Ca^{2+} in das SR durch die SERCA2a ist (11–13). PLB ist ein potenter Inhibitor der SERCA2a (15,16) und kann durch Phosphorylierung, z.B. infolge einer β -adrenergen Stimulation oder durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen, seine inhibitorische Wirkung auf die SERCA2a verlieren. Die Folge ist eine erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR, was zu einer erhöhten Myokardkontraktilität führt (18,27).

Primärziel dieser Arbeit ist der Nachweis der Wirksamkeit von AdVPKIantisense zur Suppression von PKI α in nRCM mit der Folge einer gesteigerten Phosphorylierung von PLB und einer verstärkten Aufnahme von Ca^{2+} über die SERCA2a in das SR. Die Steigerung der Kontraktilität insuffizienter Herzen über eine AdV-vermittelte Modulation der β -adrenergen Signaltransduktion durch den PKI-PKA-Signalweg, könnte neben den bereits erfolgreich geprüften Mechanismen (präklinisch z.B.: β AR, PLB, PP1 und klinisch: SERCA2a, siehe 1.5.2, 1.5.3) eine neue Möglichkeit in der Behandlung der Herzinsuffizienz darstellen. Diese Arbeit hat daher das Ziel die Modulation des PKI-PKA Signalweg über ein AdV-Konstrukt aufzuzeigen.

Folgende zentrale Hypothesen sollen in dieser Arbeit geprüft werden:

- 1. AdVPKIantisense ist in der Lage PKI α in nRCM zu supprimieren.*
- 2. Die AdV-induzierte Suppression führt über eine PKA vermittelte Phosphorylierung von PLB und Aktivitätssteigerung der SERCA2a in nRCM zur verstärkten Aufnahme von Ca^{2+} in das SR.*
- 3. AdVPKIantisense kann PKI α in nRCM überexprimieren und den Effekt der Suppression durch AdVPKIantisense dosisabhängig aufheben.*

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Kultivierungsmedium
A7r5	Glatte Muskelzellen der Ratte	DMEM (Gibco BRL)***
EA.hy 926	Humane Endothelzellen	DMEM (Gibco BRL)*
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM (Gibco BRL)*
HeLa	Humane Zervix-Karzinomzellen	DMEM (Gibco BRL)*
nRCM	Primäre Neonatale Rattenkardiomyozyten	CMRL 1415-ATM (Biochrom AG)**

Tabelle 2-1 Ursprung und Kultivierungsmedium der verwendeten Zelllinien

* Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Zellkulturmedien mit 10 % FKS (CCPro, Neustadt, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) versetzt.** Medium wurde mit 10 % FKS (Biochrom AG, Deutschland) und 0,02 mg/ml Gentamycin (Biochrom AG, Deutschland) versetzt.*** 4 mM L-Glutamin, 1,5 g/L Natriumbikarbonat und 4,5 g/L glucose (low glucose), 90% (ATCC, Manassas Cat. No. 30-2002); FKS 10% (ATCC, Manassas Cat. No. 30-2020)

2.1.2 Plasmide

Plasmid	Selektionsmarker	Hersteller
pZS2	Amp ^r	Zegi Sheng, Dallas

Tabelle 2-2 Verwendetes Plasmid (für eine detaillierte Beschreibung siehe Methoden)

2.1.3 Chemikalien und Enzyme

Alle verwendeten Chemikalien entsprechen der höchsten Reinheitsstufe. Die Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

Substanz	Hersteller
Agarose	Gibco BRL Karlsruhe
Ampicillin	Sigma, Deisenhofen
BSA	Biorad, München, Deutschland
β -Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
DNA-Marker VIII,IX, X	Boehringer Mannheim
DNTP-Mix 1mM	Boehringer Mannheim
DNase I	Roche Cat.No. 776785
Ethanol	Mallinkrodt Baker
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen
Natriumazetat, pH 4,8	Merck, Deutschland
Proteinase K	Boehringer Mannheim
Taq-DNA-Polymerase	PE Applied Biosystems, USA
Template Supression Reagent (TSR)	PE Applied Biosystems, Foster City, USA
Trypsin-EDTA	Sigma, Deisenhofen

Tabelle 2-3 Liste der verwendeten Chemikalien und Enzyme

2.1.4 Medien und Gele

Medium	Hersteller/Zusammensetzung
LB Medium	Gibco BRL/ Life Technologies
DMEM (Dublecco's Mod Eagle Medium)	2% FKS(10%FKS=high), 1% Penicillin-Streptomycin, 1000mg/l Glucose, Life Technologies
Blockierlösung	80ml TBST+ 20 ml 15% Ovalbumin
Trenngel	16ml Acrylamid, 13.6ml H ₂ O, 10ml 1.5M Tris pH 8.8, 0.4ml 10% SDS, 25 μ l Temed, 0.2ml 10% Ammoniumpersulfat (Sigma)
Sammelgel	2.6ml Acrylamid, 12.2ml dest. H ₂ O, 5ml 0.5M Tris pH6.8, 0.2ml 10% SDS, 20 μ l Temed, 100 μ l Ammoniumpersulfat,

Tabelle 2-4 Liste der verwendeten Medien und Gele sowie deren Zusammensetzung

2.1.5 Puffer

Puffer	Hersteller/Zusammensetzung
10X-PCR Reaktionspuffer mit MgCl ₂	Boehringer Mannheim
10 X MOPS-Puffer	0,2M MOPS (6-Morpholinpropansulfonsäure;Sigma) 0,01M EDTA (pH 7,0; Sigma) 0,05M Na-Acetat (Merck)
20xSSC-Puffer	3M NaCl (Sigma), 0.3M Na-Zitrat (Sigma)
RNA-Ladepuffer	Formamid (Amresco), Formaldehyd (37%, Sigma), 10xMOPS-Puffer, Bromphenolblau (Sigma), Rnase- freies H ₂ O (Amersham)
Blottingpuffer pH 8.3	7.57g Tris (25mM), 36g Glycin (192mM), 500ml Methanol (20%), 1.25ml 20%iges SDS (0.01%), ad 2.500ml A.bidest
5x Laufpuffer pH 8.3	45g Tris,216g Glycin,15g SDS, ad 3000ml H ₂ O
Lowry-Lösung	100ml 2%Na ₂ CO ₃ , 1ml 1% CuSO ₄ , 1ml 2% NaK-Tartrat
Gelladepuffer	40% Saccharose; 0,25% Bromphenolblau; 0,25% Xylene Cyanol FF
Puffer P1	(10mM EDTA, 50mM Tris-HCL, pH 8,0
Puffer P2	(200mM NaOH, 1% SDS
Puffer N3	3M Kaliumacetat, pH 5.5
Puffer QF	1M NaCl, 50 mM MOPS, 15 %Ethanol
PBS (pH7.2)	NaCl, NaH ₂ PO ₄ , KCl, KH ₂ PO ₄ , CaCl ₂ , MgCl ₂
TAE-Puffer (Stammlösung 20x)	40 ml 0,5 M EDTA (Sigma) 22,8ml Essigsäure (Sigma)0,8 M (96,8 g) Tris-Base (Trizma-Base; Sigma) Aqua bidest. ad 1000ml
2xBBS	pH 6.95, 1.07g/l BES, 1.6g/l NaCl, 0.026g/l Na ₂ HPO ₄
Sorianolysepuffer	0.1M Ammoniumsulfat, 0.1M Tris HCl(pH8.8),0.1M MgCl ₂ , 0.04% β-Mercaptoethanol, 1.7mM SDS, 6.7µM EDTA (pH8.8)
TE-Puffer	10mM Tris HCl (pH8.0), 1mM EDTA
Solubilisierungspuffer	0.2ml 500mM EDTA, 2ml 20%SDS, 2ml 1% Glycerin, 1ml 1M H ₃ PO ₄ , 200µl Mercaptoethanol, ad 20ml A.bidest
TBS	220g NaCl; 250 ml 1m Tris pH 8,0; 2,5 Liter
TBS-T	150 mM NaCl, 10mM Tris, 0,05% Tween, für 5 Liter: 500ml TBS (10x), 2,5ml Tween 20 (0,5ml/l;Serva)

Tabelle 2-5 Liste der verwendeten Puffer

2.1.6 Primer

Alle Primer sind in dem Syntheselabor von TIB MOLBIOL® in Berlin hergestellt worden.

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
3'UTR	5'- GAGCTCGGTACCCGGGGATC
CMV 480s	5'- Agg TCT ATA TAA gCA gAg CT
3'UTR-pzs2A	5'- Tgg CTg gCAACT AgA Agg C
PKI 590a	5'- Cag CTA ggT Cag TgC TA CTC
PKI 60s	5'- Atg ACT g Atg Tgg AAA CTA C
PKI 1163a	5'- TCT Agg TCgg Ag CTA CTC
TTP 219s DSH	5'- ATT ACA ggM gAg Cag AAT g

Tabelle 2-6 Liste der verwendeten Primer sowie deren Basensequenz

2.1.7 Kommerzielle Testsysteme

Kitname	Hersteller
EndoFree Plasmid Maxi, Mega Kits	Qiagen
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab
QIAquick GelExtraction Kit	Qiagen
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
Transfektion - Kalzium-Phosphat-Kit	Stratagene

Tabelle 2-7 Verwendete Testsysteme

2.1.8 Laborgeräte

Name	Hersteller
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Wellesley- USA
Agarosegel-Kammer Hoefer® HE 33	Pharmacia Biotech, Uppsala- Schweden
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Jena- Deutschland
Brutschrank Modell 5420	Labotect Labortechnik, Göttingen- Deutschland
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus, Wellesley- USA
Elektrophoreseeinheit PP3000	Biometra GmbH, Göttingen- Deutschland
Feinwaage BL 310	Sartorius, Göttingen- Deutschland
Gene Amp® PCR System 9700	PE Applied Biosystems, Foster City- USA
Genesys 6 UV-Spektrometer	Thermo Electron Corporation, USA
Hybridisierungssofen Compact Line OV 4	Biometra GmbH, Göttingen- Deutschland
Immunfluoreszenzmikroskop Olympus IX 50	Olympus, Tokyo- Japan
Kamera Coolpix 990	Nikon, Tokyo- Japan
Lumat LB 9501	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad- Deutschland
Mikrowelle	Bosch, Deutschland
pH-Meter HI 8314 membrane pH-Meter	HANNA instruments, Woonsocket- USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg- Deutschland
Phosphoimager Fuji Film BAS-1500	Fuji Photo Film, Frankfurt-Germany
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg- Deutschland
Transilluminator BioDoc Analyze	Biometra GmbH, Göttingen- Deutschland
TRIO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen- Deutschland
Ultra-Zentrifuge Centrikon T_2050	Kontron Instruments, Zürich- Schweiz
UV Stratalinker®1800	Stratagene, La Jolla- USA
Vortex-Genie 2	Scientific Industries Inc., Bohemia- USA
Wasserbad	Memmert GmbH, Schwabach- Deutschland
Zentrifuge 5415D, 5415R und Zentrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg- Deutschland
Zentrifuge Avanti™J-25	Beckman Coulter, Fullerton- USA
Zentrifuge Varifuge RF	Heraeus Sepatech, Osterode- Deutschland

Tabelle 2-8 Übersicht der verwendeten Laborgeräte

2.2 Methoden

2.2.1 Die Agarosegelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde zur Größenbestimmung und Charakterisierung von PCR-Produkten, Sequenzreaktionen sowie zur Auftrennung von Proteinen verwandt. Zu diesem Zweck werden die zuvor mit Gelladepuffer (1/10 des Ansatzvolumens) versetzten Proben in ein unterschiedlich konzentriertes Agarosegel pipettiert. Allgemein gilt, dass Agarosegele niedriger Konzentration für die Auftrennung von Fragmenten höheren Molekulargewichtes geeignet sind (Tabelle 2-9).

Prozentualer Anteil von Agarose	Molekulargewicht des Proteins in kd
0,8 %	> 1500
1,5 %	450 – 1500
2,0 %	100 -450
3,0 %	< 100

Tabelle 2-9 Konzentration der Agarose in Abhängigkeit der zu untersuchenden Molekülgröße

Je nach Bedarf wurden verschiedene standardisierte Marker verwendet, um das Molekulargewichtes zu bestimmen (DNA-Ladder Mix für Fragmente < 1 kb und 1kb-DNA-Ladder für Fragmente > 1 kb). Zunächst wurde die dem Bedarf entsprechende Menge an Agarose in 1 x TAE-Puffer gelöst und bis zum Schmelzen in einer Mikrowelle (Bosch, Deutschland) erhitzt. Nach dem Abkühlen (ca. 60 °C) wurde bis zu einer Konzentration von 0,005% die Ethidiumbromid-Lösung von Sigma zugegeben. und zusammen mit dem Kamm in die Gelkammer (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Schweden) gegossen. Nach Verfestigung wurden die Kämmen aus dem Gel genommen. Das Gel wurde anschließend in die Elektrophorese-Apparatur (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Schweden) gelegt. Die DNA-Proben wurden mit DNA-Lade-Puffer im Verhältnis 10:1 gemischt (PeqLab Biotechnologie GmbH, Germany) und in die Kammern injiziert. Die Trennung erfolgte bei 120 Volt, 200 mA in 1 x TAE-Puffer. Anschließend wurde das Ergebnis im Transilluminator (Biometra) visualisiert. Zur Auftrennung von DNA können durch das Ausschneiden der Banden im UV-Licht und anschließender Reinigung Proben unterschiedlicher Art aufgetrennt werden. Die Methode ist jedoch nicht geeignet DNA mit geringer Konzentration zu trennen, da es durch die Aufreinigung zu einem deutlichen Konzentrationsverlust kommt.

2.2.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur analytischen Trennung von PKI ist die denaturierende Gelelektrophorese nach Laemmli verwendet (Laemmli 1970) worden. Dabei wurden die Proteine nach ihrer molaren Masse getrennt. Grundsätzlich beruht das Prinzip darauf, dass das stark negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) die zu untersuchenden Proteine bindet und den Einfluss der Oberflächenladungen auf die Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld aufhebt. In einem Gelsystem (Mini Protean 3 von Bio-Rad) aus Sammelgel (4% Acrylamid) und Trenngel (z.B. 12% Polyacrylamid, siehe Tabelle) wurden die Proben konzentriert und separiert, sowie mit TCA gefällt. Anschließend sind die Proben im Laemmli Probenpuffer (SDS-Puffer, BIO-RAD, München) aufgenommen und 3min bei 100° erhitzt worden. Als Längenstandard ist das LMW-Marker Kit (14,4-97 kDa, GE-Healthcare) verwendet worden. Bei 20mA und 6W wurde die Elektrophorese 1h durchgeführt.

Acrylamid Konzentration (%)	Auftrennung (kd)
15	12-43
12	16-68
7.5	36-94
5.0	57- 212

Tabelle 2-10 Acrylamid-Konzentration im Trenngel abhängig von dem zu trennenden Protein.

2.2.3 Die Polymerasenkettenreaktion (PCR)

Die PCR diene in der vorliegenden Arbeit dem Nachweis adenoviraler Genomsequenzen und der Qualitätskontrolle von DNA-Präparationen. Bei der PCR wird eine DNA-Sequenz durch Bindung von Primern und anschließender Amplifizierung durch die Taq-Polymerase (PE Applied Biosystems, USA) oder der Proof-Reading (PWO)- Polymerase (PE Applied Biosystems, USA) vervielfacht. Primer sind aus etwa 20 Nukleotiden bestehende einzelsträngige DNA-Sequenzen, die in der Lage sind eine komplementäre Nukleotidsequenz zu binden. Der Reaktionsansatz, die Primer, die Annealingtemperatur, die Elongationszeit und die Anzahl der Zyklen können abhängig vom gewünschten Ergebnis abweichen. Die PCR erfolgte im Gene Amp Thermocycler 9700 (PE Applied Biosystems, CA, USA). Der Reaktionsansatz für 50 µl Gesamtvolumen ist nachfolgend dargestellt:

Reagenzien	Volumina in μl
Taq-DNA-Polymerase	0,25
10 X-PCR-Reaktionspuffer mit 15 mM MgCl ₂	5
dNTP-PCR Nukleotid Mix 1 mM	1
PCR-Primer	1
DNA	1
Aqua bidest.	41,75

Tabelle 2-11 Verwendete Reagenzien für eine Standard-PCR

Die Programmeinstellungen für den Gene Amp Thermocycler 9700 wurden anschließend wie folgt vorgenommen:

1. Denaturierung bei 94°C für 2 min
2. Denaturierung bei 95°C für 30 s
3. Annealing bei 56°C für 30s
4. Extension bei 72°C für 90 s
5. Inkubation bei 72°C für 10 min
6. Kühlung bei 4°C bis zur weiteren Verwendung

Die Schritte 2-4 wurden in 40 Zyklen (s.o.) wiederholt. Anschließend erfolgte eine Kontrolle des PCR Produktes mittels Agarosegelelektrophorese.

2.2.4 Präparation und Kultivierung von nRCM, EA.hy926, A7r5 und HEK 293 Zellen

Es wurden drei permanente Zelllinien (EA.hy 926, HEK 293, A7r5) sowie primäre neonatale Rattenkardiomyozyten für die Untersuchungen verwendet. Die Zelllinie EA.hy 926 wurde durch Fusion humaner Nabelschnur-Endothelzellen mit der humanen epithelialen Zell-Linie A549 entwickelt (178). Sie besitzt viele biochemische und physiologische Eigenschaften primärer Endothelzellen. Die HEK 293 Zelllinie geht aus der Transformation von primär humanen embryonalen Nierenzellen mit dem E1-Genom des Adenovirus Typ 5 hervor. A7r5-sind glatte Muskelzellen, die von der Brust-Aorta der embryonalen Ratte abgeleitet sind. Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten (nRCM) wurden freundlicherweise von Dr. Vetter (Institut für Pharmakologie des CCBF der Charité Berlin) zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der HEK 293 Zellen erfolgte, nach Standardprotokollen (Kruse and Patterson 1973) bei 37°C und Feuchtigkeitssättigung. Die Zellen wuchsen adhärent. Sie wurden bei Konfluenz mit sterilem PBS-Puffer gewaschen und mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst. Für eine Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm wurde 1,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung eingesetzt. Die abgelösten Zellen wurden sofort in 6 ml Kulturmedium aufgenommen, um den Trypsinisierungsvorgang zu stoppen, und in sterile 15 ml Zentrifugationsröhrchen überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation pelletiert (400, 5 min, RT), in Kulturmedium resuspendiert und in einer Verdünnung von 1:4 bis 1:8 wieder ausgesät. Die Verdopplungsrate betrug ca. 24-36 Stunden.

Primäre Neonatale Rattenkardiomyozyten (nRCM) wurden aus dem ventrikulärem Gewebe von ein bis drei Tage alten Wistar Ratten (Charles River, Berlin, Deutschland) isoliert (Vetter et al., 1998). Die nRCM wurden im Vollmedium ausgesät (Biochrom AG, Deutschland) übernommen und enthielten 20µg/ml Gentamycin.

Konzentration	Mediumzusatz
415ml	CMRL1415-ATM-Medium (Biochrom AG, Deutschland)
10%	FKS (Fetales Kälberserum, Biochrom AG, Deutschland)
20µg/ml	Gentamycin (Biochrom AG, Deutschland)
5,4mM	KCl
1,26mM	CaCl
2,8mM	Glukose
2 µM	FUDR (Aldrich, Deutschland)

Tabelle 2-12 Vollmedium Gesamtvolumen 500ml

Der Mediumwechsel erfolgte bei den permanenten Zelllinien alle drei bis vier Tage, bei den nRCM täglich. Für die Zellkulturexperimente wurden die permanenten Zelllinien grundsätzlich auf 24-Well-Zellkulturplatten (Nunc), die neonatalen Rattenkardiomyozyten sowohl auf 24- als auch auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät, wobei 1 ml Medium je Well verwendet wurde. Zur Gewinnung der Zellen und zur Bestimmung der Zellzahl bei den permanenten Zelllinien wurden die Zellen nach Entfernung des Mediums mit 1 X PBS (Gibco BRL) gewaschen und 0,5 ml 0,25%iges Trypsin-EDTA (Sigma) zugegeben, welches nach 20s sofort entfernt wurde. Anschließend wurden die Zellen für drei Minuten bei 37°C inkubiert. Das Ablösen der Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale wurde unter einem Mikroskop kontrolliert, die Reaktion durch Zugabe von 1 ml frischem Medium gestoppt und

die Zellen gezählt. Dazu wurden die in 1 ml Medium resuspendierten Zellen mit 100 µl 1 X PBS (Gibco BRL) und 100 µl Tryptophanblau (Sigma) versetzt, gevortext und anschließend in einer Zählkammer nach Neubauer ausgezählt. Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden bereits im Zusammenhang mit der Isolierung in der erforderlichen Dichte ausgesät.

2.2.5 Synthese des PKI-pZS2 Inserts

Zur Synthese der Adenovektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense war es zunächst erforderlich das Plasmid pZS2 mit der PKI cDNA zu ligieren und das Ligationsprodukt in XL2-Blue MRF ultrakompetente Zellen zu übertragen. Dabei wurde zunächst der bereits EcoRI-linearisierte Expressionsvektor (pZS2) und das zuvor mittels EcoRI geschnittene cDNA Fragment (PKI) im Verhältnis 1:3 ligiert. 100 ng linearisiertem Plasmid (cDNA) wurden 300 ng PKI (cDNA) zugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde mit 1/10 des Endvolumens (EV) 10X Ligationspuffer (siehe Puffer 2.1.5), 1/10 EV 10mM rATP ad 49 µl A.bidest versetzt. Zuletzt wurde 1µl eisgekühlte T4-Ligase (NEB, Frankfurt, Deutschland) zugegeben. Es folgte eine Inkubation bei 4°C über Nacht. Bei erfolgreicher Ligation sollten die Banden für die PKI cDNA sowie für das linearisierte Plasmid in der Gelelektrophorese nicht mehr nachweisbar sein. Stattdessen sollte bei ausreichender Menge das Ligationsprodukt als verdrehte Struktur (Bande) bei 6000bp zu sehen sein (DNA Marker X). Die ultrakompetenten E-Coli Zellen wurden mit dem Ligationsansatz PKI-pZS2 (s.o.) versetzt und unter sanftem Kreisen mit der Hand auf Eis aufgetaut. 100µl der XL2-Zellen wurden in ein vorgekühltes 15 ml Falcon-Gefäß gegeben und anschließend mit 2µl eines im Transfektionskit befindlichen β-Mercaptoethanols versetzt (Endkonzentration 25mM). Während der anschließenden Inkubation auf Eis für 10 min wurde alle 2 min sanft gekreist. Währenddessen wurde das Kontroll-Plasmid pUC18 1:10 mit A.bidest verdünnt (Endkonzentration 10pg/µl). 6.25 µl des Ligationsprodukts PKI-pZS2 wurden dann zu den XL2-Zellen gegeben und sanft geschüttelt. Als Kontrolle wurde 1µl der 1:10 Verdünnung des Kontroll-Plasmids pUC18 zu einem anderen 100µl –Aliquot gegeben. Während des Erhitzens von LB-Medium (ohne Ampicillin) auf 42°C, erfolgte eine Inkubation auf Eis für 30 min mit anschließendem Hitze-Schock in einem Wasserbad für 30 s. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis für 2 min erfolgte die Zugabe von 0.9 ml des auf 42°C vorgewärmten LB-Mediums mit anschließender Inkubation bei 37°C und 225-250 rpm. Das Ausplattieren erfolgte dann mit 100-200µl der transformierten XL2-Zellen auf Agarplatten (50 mg/ml sterilem Ampicillin) mit einem sterilen Glasspatel. Einzelne Kolonien wurden mit einem spitzen Instrument steril entnommen und in ein mit 50 µg/ml Ampicillin versetztem LB-Medium (2,5

ml/Kolonie) gegeben. Über Nacht wurden die Ansätze bei nicht vollständig verschlossenem Falcon-Röhrchen bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Eine Stocklösung wurde aus 0,8 ml der Übernachtskultur und 0,2 ml 75 % Glycerin in ein Kryoröhrchen gegeben und bei -70°C aufbewahrt.

2.2.6 Plasmid-Präparation aus Bakterienzellen (Mini- Midipräparation)

Zunächst wurde eine Isolierung von DNA aus den Bakterienzellen durch Mini- oder Midipräparation durchgeführt. Dabei wurden 2 ml der Übernachtskultur (5ml LB-Medium, 50 mg/l Ampicillin bei 37°C im Inkubator) transformierter Bakterienzellen bei 14.000 rpm 30 s zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet (Sediment) wurde in 250µl Puffer P 1 resuspendiert (Vortex oder Pipette). Nach Zugabe von 250µl Puffer P2 wurde es durch mehrmaliges Umdrehen vorsichtig gemischt. Die Suspension ist dabei klar (Lyse) geworden. Nach Zugabe von 350µl Puffer N3 wurde sofort gemischt. Nach 10 min Zentrifugieren bei 14.000 rpm wurde der Überstand in eine Qiapräpssäule (Qiagen) gegeben. Die Säule wurde zweimal mit 500 µl Puffer PB und einmal mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Nach Zugabe von 50µl TE Puffer und Zentrifugation von 1 min bei 14.000 rpm wurde die Plasmid- DNA eluiert und die DNA bei -20°C gelagert. Für die Midipräparation ist das maximal empfohlene Kulturvolumen transformierter Bakterienzellen 100ml für low-copy Plasmide (10-20 Plasmidkopien/Zelle) und 25 ml für high-copy Plasmide (300 und mehr Plasmidkopien/Zelle). Die Inkubation der Bakterienzellen erfolgte 12-16 h bei 37°C. Die Bakterienkultur wurde bei 6000 x g 15 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde in 4ml Puffer P1 durch Vortexen oder Pipettieren resuspendiert. Nach Zugabe von 4 ml Puffer P2 und vorsichtigem Mischen (4-6 x umdrehen) erfolgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 5min. Der auf 4°C vorgekühlte Puffer P3 wurde zugegeben, vorsichtig gemischt und auf Eis inkubiert. Bei 20.000 x g und 4°C wurde 30 min zentrifugiert. Vier ml QBT-Puffer wurden in einen Qiagen-Tip 100 gegeben und durchlaufen gelassen. Der zuvor gewonnene Überstand wurde zügig in den Qiagen-Tip 100 gegeben und durchlaufen gelassen. Der Qiagen-Tip wurde mit 2 x 10 ml QC-Puffer gewaschen. Anschließend wurde 5 ml QF-Puffer auf den Qiagen-Tip gegeben und das Eluat in einem 10 ml Gefäß aufgefangen. 3,5 ml (0,7 Volumen) Isopropanol (Raumtemperatur) wurden in das Eluat gegeben und sofort gemischt und zentrifugiert (bei 15.000 x g 30 min und 4°C). Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert. Nach Zugabe von 2 ml 70 % Ethanol (Raumtemperatur) zum Pellet wurde die Suspension bei 15.000 x g 10 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig dekantiert. Das Pellet wurde

luftgetrocknet und in einem passenden Volumen Puffer (z.B. TE/pH8, oder 10mM Tris-Cl/pH8.5) durch Spülen gelöst.

2.2.7 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde zum Nachweis von PKI α in Sense- und Antisense-Orientierung im pZS2 Expressionsvektor verwandt. Bei der Sequenzreaktion wurden bis zu 50 ng PCR-Fragment oder 400 ng linearisiertes Plasmid eingesetzt. Zum Fragment bzw. linearisiertem Plasmid wurden 2 μ l Prämix (Applied Biosystems, CA, USA) und 1 μ l eines 10 μ M Primers ad 10 μ l A.bidest hinzugefügt. Es handelte sich dabei um die Primer PKI 1 und 3'UTR (siehe 2.1.6). Die Sequenzreaktion erfolgte im Gene AmpTM Thermocycler 9700 mit 25 Zyklen (96°C 10s, 50°C 5s, 60°C 4min). Anschließend erfolgte eine Aufarbeitung der Proben als Vorbereitung für die Sequenzierung. Dazu wurden 90 μ l A.bidest, 10 μ l 3M Natriumacetat (pH 4,8; Merck) und 250 μ l 100% Ethanol (Mallinkrodt Baker; Raumtemperatur) zu jeder Probe gegeben. Nach dem Zentrifugieren bei 14.000 rpm für 15 min (Eppendorf, Deutschland) wurde der Überstand mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Nach Zugabe von 400 μ l 70% Ethanol (Raumtemperatur) wurde nochmals bei 14.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder abgesaugt, worauf sich eine Vakuumtrocknung für 10 min anschloss. Nach Zugabe von 25 μ l Template Suppression Reagent (TSR) wurde der Ansatz auf 90°C für 2 min erhitzt und wieder auf 4°C abgekühlt. Die Sequenzierung und Auswertung erfolgte mit Hilfe des Gene Analyzer ABI Prism 310 Analyzer (PE Applied Biosystems, CA, USA) unter Verwendung der ABI DNA Sequencing Analysis Software.

2.2.8 Ligation von RR5 mit pZS2-PKI_{sense} und pZS2-PKI_{antisense}

In dieser Arbeit wurde der Adenovirus Typ 5 verwendet, dessen Genom (35953 bp) durch Rekombination und Deletion in der E1- Region (bp 445-3333) den RR5 Vektor ausmacht. Diese Deletion macht das Virus replikationsdefizient. Das RR5 Genom hat an der Position bp 445 eine Xba I Schnittstelle. Das verwendete Plasmid pZS2 (Abbildung 2-1) wurde am 25.01.1993 von Zegi Sheng (Dallas TX) konstruiert. Vom 5'-Ende zum 3'-Ende besteht das Plasmid aus Adenovirus 5 Sequenz (bp 1-452), CMV-Promotor, multipler Klonierungsstelle, bGH 3'UTR und Adenovirus 5 Sequenz (bp 3334-6103). Insgesamt besteht der Vektor aus 6.8 kb. Für die positive Selektion steht eine Ampicillin Resistenz zur Verfügung.

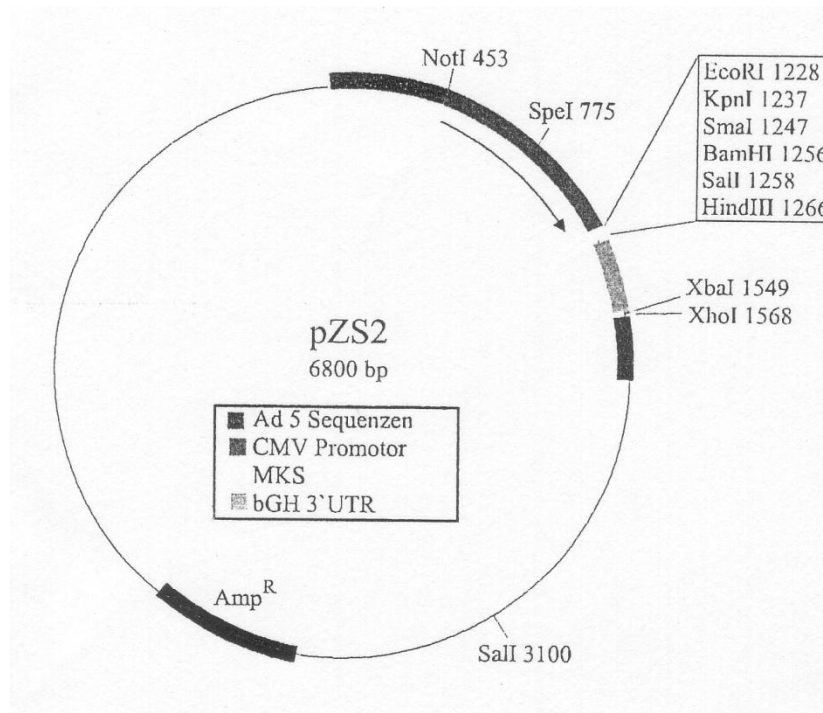


Abbildung 2-1 Plasmid pZS2

Konstruiert von Zegi Sheng 1993. Dunkelgrau dargestellt sind Adenovirus 5 Sequenzen bp 1-452 und bp 3334-6103. Der CMV Promotor ist mittelgrau dargestellt und schließt sich an die erste Ad5 Sequenz an. Die darauf folgende multiple Klonierungsstelle ist weiß dargestellt. Der bovine Wachstumsfaktor bGH 3' UTR ist hellgrau dargestellt und liegt vor der XbaI Schnittstelle bp1549. Das Plasmid ist insgesamt 6.800 bp lang und kodiert noch eine Ampicillin-Resistenz.

In dieser Arbeit erfolgte die Ligation des Virusgenoms (Long Arm des RR5 Vektors, bp 3334 bis 35953) mit dem Fremd-Gen tragenden linearisiertem Plasmid pZS2-PKI_{sense} (Klon 9) und pZS2-PKI_{antisense} (Klon 25). Durch die Restriktionsendonuklease Xba I wurde das Plasmid pZS2-PKI in 120 min linearisiert. Die Ligation erfolgte im Anschluss an eine Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol- Fällung (s.o.) mit 250 ng linearisiertem Plasmid (Klon 9 = 2,66 µl, Klon 25 = 2,16µl), 100ng/µl RR5 Long Arm (=1µg), 5 µl T4-Ligase (NEB, Frankfurt, Deutschland), 6µl 10xT4-Ligationspuffer, 6µl 10mM rATP ad 60µl A.bidest. Die Ligation wurde über Nacht bei 16°C angesetzt.

Einen Tag vor der Transfektion wurden die HEK 293 Zellen, die eine stabile Ad5-E1-Region haben, passagiert (gesplittet). Mit Hilfe von 2.5 ml Trypsin-EDTA wurde der Zellrasen von der Kulturgefäßwand abgelöst, in 10 ml DMEM (High Glucose, 10%FCS)-Medium suspendiert und im Verhältnis 1:10 verdünnt (2ml Suspension+18ml DMEM-Medium). Nach der Verdünnung wurde die Suspension auf neue Kulturgefäße verteilt. Die Ca²⁺-Phosphat-Präzipitation wurde in dieser Arbeit zur Transfektion von 293-Zellen mit dem Ligationsprodukt pZS2-PKI (Klon 9) und pZS2-PKI (Klon 25) durchgeführt. Dazu wurden 20µl, 30µl und 60µl des Ligationsprodukts mit sterilem H₂O auf ein Volumen von 450 µl

aufgefüllt und nach Zugabe von 500 µl 2xBBS, 50 µl einer 2.5M CaCl₂-Lösung unter vorsichtigem Mischen titriert. Das Präzipitat bildete sich nach 20 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur aus. Das Präzipitat wurde auf 2x 6cm Gewebekulturschalen mit 293 Zellen verteilt, wobei eine Kontrolle ohne Zusatz des Präzipitates erfolgte. Einen Tag nach der Transfektion wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen und anschließend mit DMEM (Low Glucose, 2% FCS)-Medium versetzt. Nach weiteren fünf Tagen Inkubation bei 37°C wurde den Zellen DMEM (High Glucose, 10% FCS) Medium gegeben. Die vorbereiteten 293-Zellen wurden mit den Ligationsprodukten nach folgendem Ansatz transfiziert: 50 µl Ligationsprodukt + 400µl A.bidest + 500µl Solution II + 50 µl Solution I. Der Ansatz wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in 6 cm Gewebekulturschalen gegeben, die 500 µl DMEM (high)-Medium beinhalten. Die mit dem Transfektionsansatz versetzten 293-Zellen wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am ersten Tag nach der Transfektion erfolgte der erste Medienwechsel. Hierzu wurden die transfizierten 293- Zellen mit je 3 ml PBS gewaschen und anschließend mit 5 ml DMEM (low)-Medium versetzt. Die Inkubation erfolgte 6 Tage bei 37°C. Der zweite Medienwechsel erfolgte nach dem Waschen mit 3 ml PBS durch Zugabe von 5 ml DMEM(high)-Medium.

2.2.9 Sorianalyse des Primärlysates nach Transfektion der 293-Zellen

Die DNA-Isolation aus Viruslösung wird als Sorianalyse bezeichnet. Die anfangs kometenschweifartigen Lyseherde (Plaques) erweiterten sich innerhalb von 12 Tagen zu einem Totallysat, das nach folgendem Protokoll behandelt wurde:

100 µl Totalviruslösung wurde dreimal bei -80°C eingefroren und wieder aufgetaut (Raumtemperatur). Nach Zugabe von 400 µl Sorianalysepuffer und 2.5 µl Proteinase K (50 µg /ml Totallysat) erfolgte eine 30 min Inkubation bei 37°C. Einer 10 minütigen Inkubation bei 85°C und Abkühlen auf Raumtemperatur, folgte eine Zugabe von 1 Volumen = 500µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) und Zentrifugation für 5 min bei 3000 rpm. Die Oberphase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 1/20 Volumen 5M NaCl und 2 Volumen 100% Ethanol (-20°C) versetzt. Die Fällung der DNA erfolgte bei -80°C für 60 min und anschließender Zentrifugation bei 4°C für 30 min bei 14.000 rpm. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet mit 500 µl 70% Ethanol (-20°C) gewaschen. Nach dem Zentrifugieren bei 4°C und 14.000 rpm für 5 min wurde der Überstand dekantiert und das Pellet getrocknet. Das Sediment wurde in 20 µl TE-Puffer resuspendiert.

2.2.10 mRNA Analyse von PKIsense und PKIantisense in Rattenkardiomyozyten

Mit Hilfe des radioaktiv markierten Desoxynukleotids dCTP-P32 wurden Einzelstrangsonden hergestellt. Der Reaktionsansatz bestand aus 2.5µl 10xPCR-Puffer, 0.5µl 1mM dNTP, 0.25µl Primer (100µM), 0.25µl Taq-Polymerase, DNA-Matrize > 50ng, 3.5µl 32P-dCTP, Aqua bidest ad 25 µl. Der Ansatz wurde mit 20µl Mineralöl überschichtet und im Thermocycler 2min bei 94°C, 35 Zyklen mit jeweils 30s bei 95°C/ 30s bei 56°C/3.5min bei 72°C und im letzten Zyklus 7 min bei 72°C. Als DNA-Matrize wurde für die Sense- und Antisense-Sonde 5µl PKIsense verwendet. Für die Herstellung der Antisense-Sonde wurde der Primer pZS2-3'UTR und für die Sense-Sonde CMV 480 (sieheTabelle 2-6) verwendet. Die Aufreinigung der Sonden erfolgte über eine Sephadex G50-Lösung in einer zu diesem Zweck präparierten Pasteurpipette, wobei zunächst die Sonde und anschließend A.bidest solange nachpipettiert wurde, bis in jeden der zehn Eppendorf-Gefäße je 4 Tropfen aus der Pipette getropft waren. Im Bioscan QC-2000 erfolgte die Radioaktivitätsmessung der Proben.

2.2.11 Northern-Blot

Die elektrophoretische Trennung der RNA-Proben erfolgte durch ein 1% Agarose-Formaldehyd-Gel. Das Endvolumen von 30 ml enthält 0.3g Agarose, 21.9 ml H₂O, 3ml 10xMOPS, 5.1 ml 35% Formaldehyd (nach abkühlen auf 60°C), 2µl Ethidiumbromid (10mg/ml). 10-25µg Gesamt-RNA wurden mit 10µl RNA-Ladepuffer versetzt und auf ein Volumen von 25µl mit Rnase-freiem Wasser ergänzt. Die Denaturierung der RNA erfolgte 5min bei 65°C. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte mit 1xMOPS bei 100V für eine Stunde. Zur Kontrolle der 18s- und 28s-rRNA, kann das Gel unter dem Transilluminator betrachtet werden. Nach zweimaligem Wässern des Agarosegels in 20xSSC, erfolgte der RNA-Transfer (siehe Abbildung 2-2).

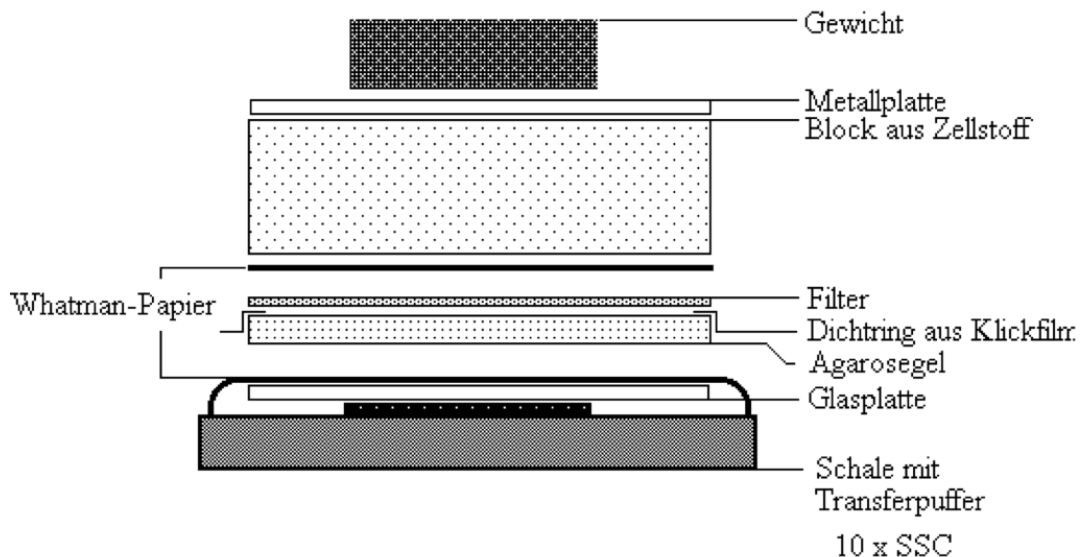


Abbildung 2-2 Blotting-Konstruktion für den RNA-Transfer. Quelle: Abbildung Labor H. Fechner

Das Agarosegelformaldehydgel wurde mit den Geltaschenöffnungen nach unten auf das Whatman-Chromatografiepapier (3MM) gelegt. Als Transferpuffer diente 10xSSC, wobei 12-16h für den Transfer auf die Filtermembran (Hybond™ N+-Hybridization Membrane, Amersham) gebraucht wurden. Nach erneuter Kontrolle unter dem Transilluminator und Lufttrocknung für 30 min, erfolgte das Cross-Linking.

2.2.12 PKI α -Nachweis in Rattenkardiomyozyten - Solubilisierung und Proteinextraktion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Proteinextraktion durch Solubilisierung dazu verwendet, die mit PKIsense, PKIantisense und Luciferase transfizierten Rattenkardiomyozyten vom enthaltenen Proteinanteil zu trennen. Dazu wurde das Kulturmedium der Zellen abgenommen, die Zellen mit 37°C warmem PBS (1.5ml) gewaschen, mit 0.5ml eiskühlem TCA (20 %) versetzt, auf Eis gestellt und sofort wieder abgesaugt. Nach erneuter Zugabe von 3ml TCA (5%) und erneutem Absaugen, Zugabe von 1.5ml TCA (5%) und anschließendem Abnahme des Zellrasens mittels Zellspatel. Die Suspension wurde dann 10min bei 3000rpm und 4°C zentrifugiert und anschließend der Überstand abgesaugt. Das Sediment wurde in 80 μ l Solubilisierungspuffer gelöst. Falls der pH-Wert nicht 6.8 betrug, musste mit Tris-Base titriert werden. Die photometrische Messung der extrahierten Proteinmenge erfolgte nach der Methode von Lowry. Als Proteinstandard wurde BSA in den Konzentrationen 3 μ g/ml, 6 μ g/ml, 15 μ g/ml, 30 μ g/ml, 45 μ g/ml, 90 μ g/ml verwandt. Es wurden 2.5 μ l solubiliertes Protein zu

200µl Aqua bidest gegeben, 1ml Lowry-Lösung hinzugefügt und bei Raumtemperatur 15min inkubiert. Anschließend wurden 1ml 10% SDS und 0.1ml Folinreagenz (zuvor 1:1 mit H₂O verdünnt) hinzugefügt und bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Es erfolgte dann die Messung der Extinktion im Photometer bei 585nm. Die BSA-Standards wurden jeweils zweifach bestimmt, wobei die Proteinproben jeweils dreifach bestimmt wurden. Für die Berechnung der notwendigen Proteinmenge für den Western Blot diente das Programm „Ligand“. Dabei wurde durch Angabe des Probenvolumens und der gemessenen Extinktion die Proteinmenge pro ml berechnet. Mithilfe der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe Anhang) wurden die zuvor solubilisierten Proteinextrakte elektrophoretisch aufgetrennt. Hierzu wurde ein 12% Trenngel, sowie ein 4% Sammelgel nach Laemmli hergestellt (siehe 2.1.5). Zunächst wurde das Trenngel gegossen, mit Isopropanol überschichtet, nach der Polymerisierung (ca. 5h) wieder abgegossen und mit H₂O gespült. Das überschüssige Wasser wurde mit Filterpapier aufgesogen. Anschließend wurde das Trenngel mit einem 4% Sammelgel überschichtet. Die zuvor berechneten Proteinproben wurden bei 95°C 3 min inkubiert und mit Multiflex Tips (PeqLab) in die Geltaschen pipettiert. Die Gelapparatur (Biorad) wurde mit 1x Laufpuffer (siehe 2.1.5) aufgefüllt, die ihrerseits in eine Schale mit Eis gestellt wurde, um die Hitze während der Elektrophorese abzuleiten. Die Elektrophorese lief über 30min bei 100V und 64mA, sowie danach 45min bei 150V.

2.2.13 Western Blot

Das eigentliche Blotting erfolgte in dieser Arbeit nach der Methode von Towbin et al. (Towbin, Staehelin et al. 1979). Im Anschluss an die Extraktion wurden dabei die aufgetrennten Proteine in einem elektrischen Feld vom Gel auf eine Trägermembran übertragen. Die immobilisierten Proteine wurden mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper inkubiert (Abbildung 2-3). Der Nachweis der gebundenen Antikörper erfolgt üblicherweise nicht-radioaktiv: ein sekundärer Antikörper, der gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt ist, katalysiert eine leicht detektierbare Reaktion (Abbildung 2-3).

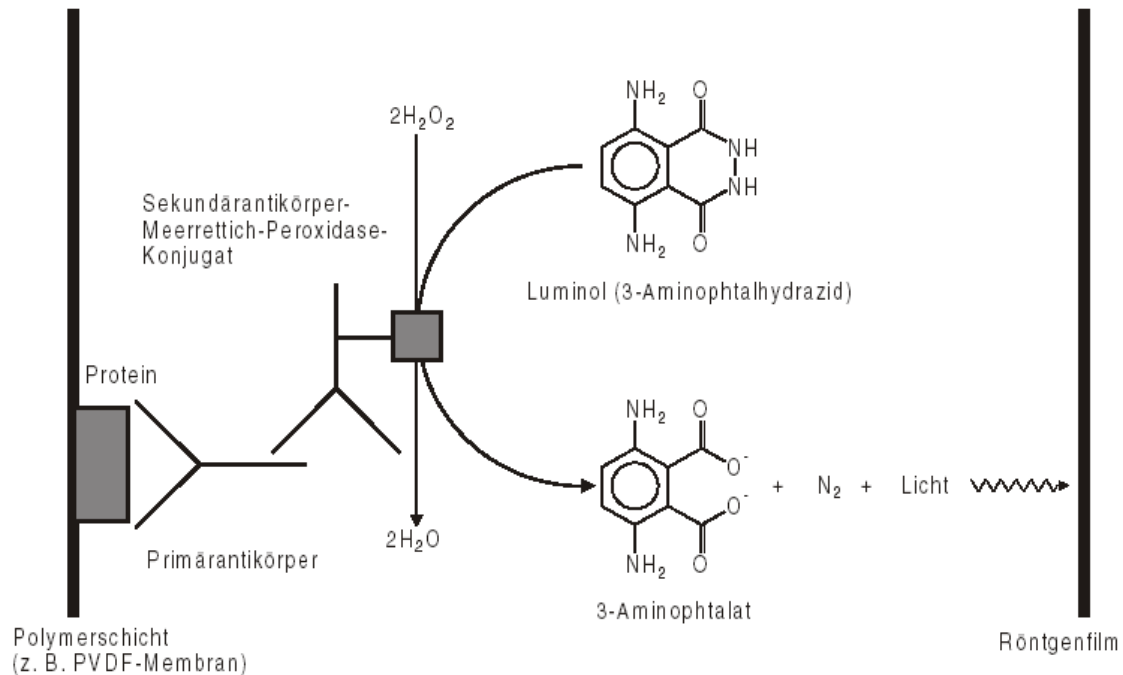


Abbildung 2-3 Schema Western-Blot.

Schematische Darstellung der Detektion des an den primären AK gebundenen sekundären AK auf einer photosensiblen Schicht beim Western Blot. Quelle: Labor H. Fechner

Bei der Durchführung des Blots wurde zur Vorbereitung die PVDF-Blotting-Membran in Methanol und anschließend zusammen mit dem Blottinggitter und Blottingpapier in den Blottingpuffer gelegt (siehe 2.1.5). In einer Schale mit Blottingpuffer wurde der Blot nach folgendem Schema von unten nach oben luftblasenfrei zusammengesetzt: die durchscheinende Seite des Blottinggitters als Unterlage, Blottingschwamm, Blottingpapier, Blottingmembran (PVDF), Trenngel nach Abtrennung des Sammelgels, Blottingpapier, Blottingschwamm, schwarze Seite des Blottinggitters. Im Biorad 300™ erfolgte die Elektrophorese bei 250mA für 70 min. Anschließend wurde die Blottingmembran gespült und mit Ponceau S gefärbt.

Für die Immunreaktion wurde die getrocknete Membran bei RT 10 min in einer Schale mit TBS (siehe 2.1.5) geschwenkt und anschließend mit Blockierlösung (siehe 2.1.3) bei RT in der Schale schwenkend 1h geblockt. Dann wurde mit 3x10min 500ml TBS-T (2.1.5 Puffer) in der Schale bei Raumtemperatur geschwenkt. Der erste Antikörper (verd. mit TBS(AK) + 1% BSA) wurde 1,5 h bei RT im Röhrchen mit der Membran gerollt. Es folgte weiteres Schwenken 2 x 10min in der Schale bei RT mit TBS-T und einer anschließenden Blockierung für 5 min. Nach einer weiteren TBS-T Behandlung für 2x10min wurde die Membran 1 h mit dem sekundären AK (verd. in TBS(AK)+Ovalbumin $E_K0,1\%$) versetzt. Anschließend folgten

2x10min TBS-T und 2x10min TBS jeweils bei RT in der Schale. In der Dunkelkammer wurden 5ml ECL-Lsg 1 mit 5 ml ECL-Lösung 2 (Amersham ECL) zusammengegeben und die Membran für ca. 1 min benetzt. Nach Ablauf der ECL-Lösung wurde die Membran zwischen Polyloxfolien gelegt. Die Belichtung des Films erfolgt mit 3s bis 10 min.

2.2.14 Oxalat-stimulierter $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transport in Membranvesikel des SR

Der von der SERCA2a-katalysierte ATP-abhängige Transport von Ca^{2+} in Membranvesikel des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) myokardialer Zellen wurde als Oxalat-stimulierte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme nach einer von Will und Mitarbeitern beschriebenen Methode gemessen (179). Das in das Lumen des Vesikels transportierte radioaktive $^{45}\text{Ca}^{2+}$ wird dort von passiv aufgenommenen Oxalatanionen gebunden und als schwer lösliches Ca^{2+} -Salz zur Ausfällung gebracht (Abbildung 2-4).

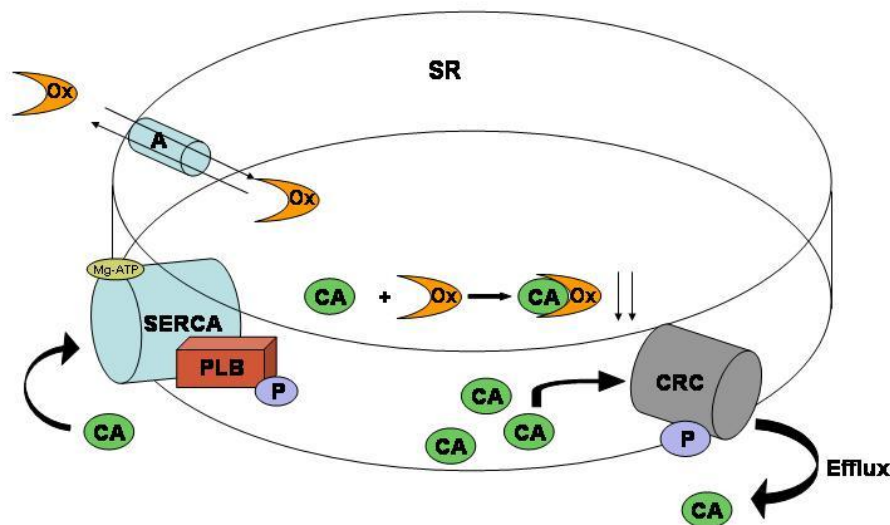


Abbildung 2-4 Oxalat-stimulierter $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transport in Membranvesikel des SR.

Schematische Darstellung zur Oxalat-stimulierten Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in Membranvesikel des SR. SERCA = sarko-(endo)plasmatische Ca^{2+} -ATPase 2a; PLB = Phospholamban P = Phosphorylierung; Mg-ATP= Magnesium-Adenosintriphosphat; Ox = Oxalatanion; SR = sarkoplasmatisches Retikulum; CaOx, präzipitiertes Ca^{2+} -oxalat; CRC = ryanodinsensitiver calcium release channel; A = Anionenaustauscher.

In Homogenaten weisen die Membranvesikel des SR zu 90% eine „Right-Side-Out“-Orientierung auf. Die Ca^{2+} -Transport-ATPase dieser Vesikel kann deshalb unter in vitro Bedingungen ATP-getrieben Ca^{2+} aus dem Ansatzmedium in das Lumen des SR-Vesikels transportieren. Zusätzliche in den Herz-Homogenaten enthaltene Ca^{2+} -ATPase-Aktivitäten

anderen subzellulären Ursprungs wurden durch die gewählten Reaktionsbedingungen ausgeschaltet, sodass bei den Messungen nur der retikuläre SERCA2-katalysierte Ca^{2+} -Transport erfasst wurde (180,181). Für die Messung des Oxalat-stimulierten $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Transportes wurde die sog. Millipore-Vakuum-Filtrationsmethode unter Einsatz von $^{45}\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$ genutzt. Hierbei wurde Homogenat mit einem 200 μl Reaktionsansatz inkubiert, der neben 10 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 10 mM NaN_3 , 0,2 mM EGTA, 5 mM Tris ATP, 6 mM CrP, 10 mM K-Oxalat und 40 mM Imidazol variable Konzentrationen von radioaktiv markiertem $^{45}\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$ enthielt. Die freie $[\text{Ca}^{2+}]$ wird mit Hilfe eines $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ -Puffersystems eingestellt. Durch die SR Ca^{2+} -ATPase werden unter ATP Verbrauch $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aus dem extravesikulären Raum in das Vesikellumen transportiert. Intravesikuläre Ca^{2+} bilden mit Oxalatanionen schwer lösliches $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Oxalat, das bei Überschreiten des Löslichkeitsproduktes innerhalb der Vesikel präzipitiert. Dadurch wird die freie, intravesikuläre Ca^{2+} -Konzentration niedrig gehalten. Das vermindert den transmembranären Ca^{2+} -Konzentrationsgradienten, gegen den die Ca^{2+} -Pumpe Ca^{2+} in den SR-Vesikel transportiert und vermindert den passiven Efflux aus den SR-Vesikeln. Durch diesen Oxalat Effekt wird die in SR-Vesikeln transportierte Ca^{2+} -Menge im Vergleich zur transportierten Ca^{2+} -Menge ohne Oxalat Zusatz ca. 100-fach gesteigert. Dadurch ist eine verlässliche Bestimmung des SR Ca^{2+} -Transports in Herz-Homogenaten ohne aufwendige Präparation von SR-Membranfragmenten möglich.

3 Ergebnisse

3.1 Konstruktion und Kontrolle der Vektoren AdVPKIantisense und AdVPKI-sense

Ziel dieser Arbeit war es, den PKA-PLB Signalweg mithilfe einer AdV-vermittelten Downregulation von PKI α in neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRCM) zugunsten einer erhöhten Aufnahme von Ca²⁺ in das SR zu modulieren. Die Erwartung war, dass eine reduzierte Hemmwirkung auf die PKA zu einer verstärkten Phosphorylierung von PLB führt. Liegt PLB in phosphorylierter Form vor, sinkt die Hemmwirkung auf die SERCA2a, wodurch diese vermehrt Ca²⁺ in das SR pumpt. Letztlich sollte der Anstieg der sarkoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration als Maß für die diastolische Relaxation und Kontraktilität des Myokards nachweislich gesteigert werden. Durch eine AdV-vermittelte Überexpression von PKI α (AdVPKI-sense) sollte dieser Effekt konzentrationsabhängig antagonisiert werden.

Im ersten Schritt erfolgte die Ligation von PKI α cDNA mit dem Adenovirus Expressionvektor pZS2 (siehe 2.1.2). Bei der Herstellung der Vektoren wurde das In Vitro-Ligationssystem verwendet. Dabei erfolgte zunächst die Klonierung des EcoRI-linearisierten PKI α cDNA Gelfragments aus dem TopoXL PCR-Cloning Kit (siehe 2.1.7) in den Adenovirus Expressionsvektor pZS2. Damit das Ligationsprodukt PKI-pZS2 in ausreichender Menge vorlag, wurde es in speziellen E-Coli Zellen (XL2-Blue MRF'Ultra Competent Zellen von Stratagene) transformiert. Die im ampicillin-haltigen Nährboden vermehrten Zellklone wurden für den Nachweis von PKI in pZS2 mit EcoRI enzymatisch geschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Erwartet wurden EcoRI-Fragmente von ca. 300 kb Länge. Diese sind in Abbildung 3-1 dargestellt. Es waren spezifische Banden bei 300 kb für die Zellklone 1, 9, 13 und 18 nachweisbar. Daraus kann gefolgert werden, dass diese Zellklone erfolgreich mit dem Insert PKI-pZS2, transformiert wurden.

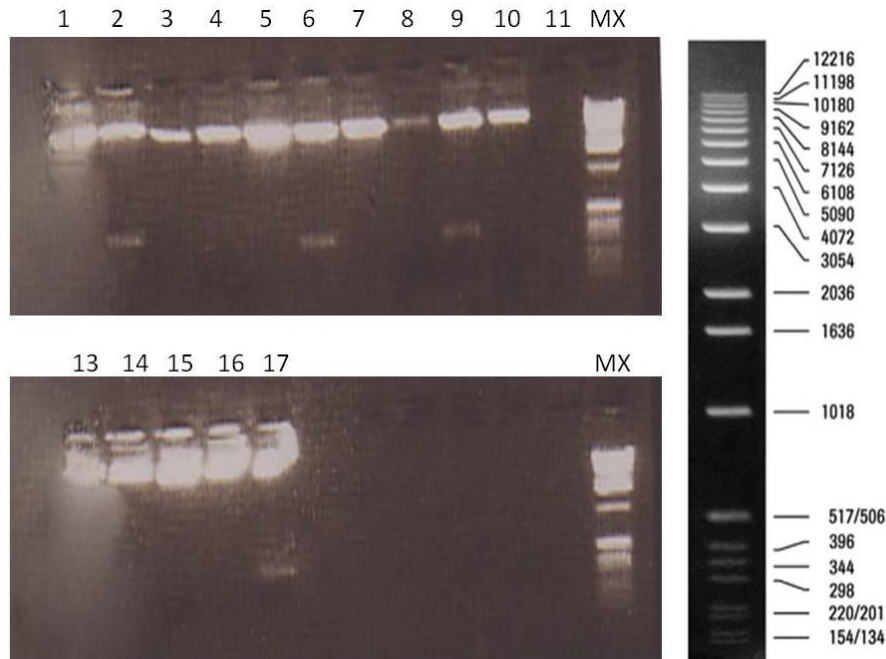


Abbildung 3-1 Nachweis der Transformation von pZS2

Mit einem ca. 300kb großen cDNA Insert nach EcoRI Verdauung durch Agarosegelelektrophorese im Anschluss an die Klonierung des EcoRI linearisierten PKI α Gelfragments aus dem TopoXL PCR-Cloning Kit in den Adenovirus Expressionsvektor pZS2 und Transformation des Ligationsprodukts PKI-pZS2 in ultrakompetente Zellen. Dargestellt sind EcoRI- Fragmente von ca. 300 kb Größe für die Zellklone 1 (Bahn 2), 9 (Bahn 6), 13 (Bahn 9) und 18 (Bahn 17) nach EcoRI Spaltung. Bahn 11= Negativkontrolle; MX = Marker X, Roche. Rechts vergrößerte Darstellung des Marker X

3.2 Nachweis von PKIsense und PKIantisense durch DNA-Sequenzanalyse

Der Nachweis von PKI-pZS2sense cDNA und PKI-pZS2-antisense cDNA erfolgte im Anschluss an den Gelnachweis durch eine DNA-Sequenzanalyse. Dabei wurde die Plasmid DNA aus den Bakterienkulturen präpariert, mit XBAI linearisiert und nach elektrophoretischer Auftrennung aus dem Gel extrahiert. Die Sequenzreaktion wurde mit den spezifischen Primern PKI 1 und 3'UTR zum Nachweis sowohl der Sense- als auch der Antisense-Orientierung durchgeführt. Die aus der Sequenzreaktion mit Sense- und Antisense-Primern gewonnenen Sequenzen der Bakterienklone 9 und 25 sind im Blast-Search (Medline) 98%-99% homolog zu humanem Proteinkinaseinhibitor, wobei Klon 9 das sense-Insert und Klon 25 das antisense-Insert beinhaltet. Der Open Reading Frame von 230 bp entspricht den Literaturangaben von Olsen et al. (182) und ist zu 100% homolog.

KLON 9 PKI-PZS2-SENSE

gb|576965|576965 protein kinase inhibitor [human, neuroblastoma cell line SH-SY-5Y,

mRNA, 2147 nt]
Length = 2147

Score = 644 bits (325), Expect = 0.0
Identities = 342/347 (98%), Gaps = 1/347 (0%)
Strand = Plus / Minus

Query: 9 caaatgcattccagatactcctggagatttgagacatcttcagggtggtogagggtoa 68
|||||
Sbjct: 833 caaatgcattccagatactcctggagatttgagacatcttcagggtggtogagggtoa 774

Stop
Query: 69 agtgggggttagagtttcagattttgctgcttccctgggttcccaactttgtttgt 128
|||||
Sbjct: 773 agtgggggttagagtttcagattttgctgcttccctgggttcccaactttgtttgt 714

Query: 129 agaacttcgtttgtgcattctttcaactctctgtttgtgatataagaactgcaattt 188
|||||
Sbjct: 713 agaacttcgtttgtgcattctttcaactctctgtttgtgatataagaactgcaattt 654

Query: 189 caaggctaattcattgctgttgccacttgacaggaagcagagatgcatgattggatt 248
|||||
Sbjct: 653 caaggctaattcattgctgttgccacttgacaggaagcagagatgcatgattggatt 594

Start
Query: 249 tctctacctgtctctctgaagcaatagaatctgpatatgagtttccacatcagta 308
|||||
Sbjct: 593 tctctacctgtctctctgaagcaatagaatctgpatatgagtttccacatcagta 534

Query: 309 tgtaccacaanatatncaatagcangagctgattggaaccttcttg 355
|||||
Sbjct: 533 tgtaccaca-atatncaatagcangagctgattggaaccttcttg 488

KLON 25 PKI-PZS2-ANTISENSE

gb|576965|576965 protein kinase inhibitor [human, neuroblastoma cell line SH-SY-5Y,

mRNA, 2147 nt]
Length = 2147

Score = 654 bits (330), Expect = 0.0
Identities = 344/346 (99%), Gaps = 2/346 (0%)
Strand = Plus / Plus

Query: 41 gacaagaaggtttccaatcagtcctgctatgtggatattggtagcaatgactgatgtg 100
|||||
Sbjct: 486 gacaagaaggtttccaatcagtcctgctatgtggatattggtagcaatgactgatgtg 545

Query: 101 gaaactacatagcagattttattgcttcagggaagacaggtagaagaatgcaatacat 160
|||||
Sbjct: 546 gaaactacatagcagattttattgcttcagggaagacaggtagaagaatgcaatacat 605

Query: 161 gatatactggtttcctctgcaagtggcaacagcaatgaattagccttgaattagcaggt 220
|||||
Sbjct: 606 gatatactggtttcctctgcaagtggcaacagcaatgaattagccttgaattagcaggt 665

Query: 221 cttgatatacaacaagacagaaggtgaagaagatgcacaacgaagttctacagaacaaagt 280
|||||
Sbjct: 666 cttgatatacaacaagacagaaggtgaagaagatgcacaacgaagttctacagaacaaagt 725

Query: 281 ggggaagccaggggagaagcagcaaaatctgaaagctaacacccccactttgacccctgac 340
|||||
Sbjct: 726 ggggaagccaggggagaagcagcaaaatctgaaagctaacacccccactttgacccctgac 785

Query: 341 cacacactgaaatgtctcaaatctcccaggagtatttggaaatgca 386
|||||
Sbjct: 786 cacacactgaaatgtctcaaatctcccaggagtatttggaaatgca 829

gacaagaaggtttccaatcagtcctgctatgtggatattggtagcaatgactgatgtgaaactacatagcagat
ttattgctcagggaagacaggtagaagaatgcaatacatgatatactggtttcctctgcaagtggcaacagcaat
gaattagccttgaattagcaggtcttgatatacaacaagcagaaggtgaagaagatgcacaacgaagttctacagaa
caaaagtggaagccaggggagaagcagcaaaatctgaaagctaacacccccactttgacccctgacccactgaaaa
tgtctcaaatctcccaggagtatttggaaatgca 386

Abbildung 3-2 Blast Search Ergebnisse (Medline) der cDNA Basensequenzen des Klon 9 PKI-PZS2sense und Klon 25 PKI-PZS2antisense

Präparation der Plasmid DNA aus den Bakterienkulturen und Linearisierung mit XBa1. Sequenzreaktion mit den Primern PKI 1 und 3'UTR zum Nachweis von PKIsense und PKIantisense. Nachweis einer 100% Homologie zu humanem Proteinkinaseinhibitor; Start- und Stopp-Codon sind gekennzeichnet.

3.3 Ligation von RR5-long Arm mit linearisiertem PKI-pZS2sense und PKI-pZS2antisense

Das Adenovirus Typ 5 (Ad5) Genom enthält doppelsträngige lineare DNA mit einer Länge von 35953 bp. Zwischen den Adenovirussequenzen des short Arm (bp 1-445) und long Arm (bp 3334-35953) enthielt das ursprüngliche Virusgenom die E1 Region, die transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Genprodukte wirkte. Da das Ad5 Genom E1 deletiert wurde, ist es replikationsdefizient. Anstelle der E1 Region konnte nun das Transgen, mit je 250ng XbaI linearisiertem PKI-pZS2sense und PKI-pZS2antisense in die Expressionskassette inseriert werden (Abbildung 3-3).

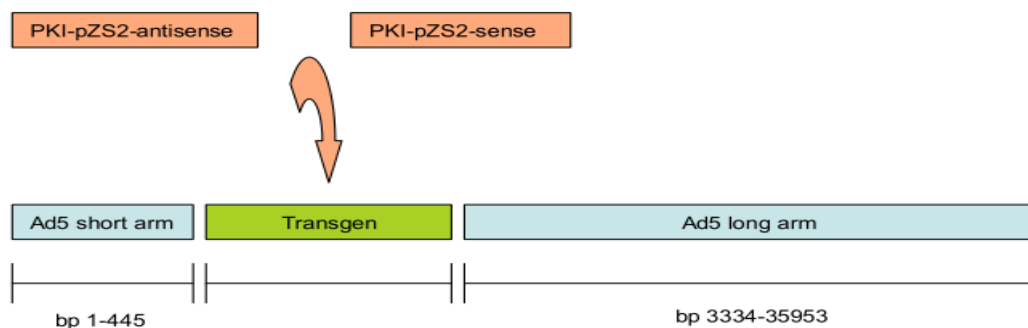


Abbildung 3-3 Ligation von RR5- Long Arm mit linearisiertem PKI-pZS2sense und PKI-pZS2antisense

Schematische Darstellung des Adenovirus Typ 5 (Ad5) Genom mit einer Länge von 35953 bp. Das E1 deletierte Genom ist replikationsunfähig. Die Insertion erfolgte mit je 250ng XbaI linearisiertem PKI-pZS2sense und PKI-pZS2antisense in die Expressionskassette des Adenovirus Typ 5 Genom durch Ligation mit T4 Ligase. Quelle: Eigene Abbildung.

Der qualitative Nachweis der erfolgreichen Ligation/ Insertion von PKI-pZS2sense und PKI-pZS2antisense cDNA in die Expressionskassette des RR5 Genom ist in Abbildung 3-4 dargestellt. Erwartet wurde, dass sich das Ligationsprodukt am langsamsten im elektrischen Feld bewegt, wohingegen RR5-Long Arm etwas schneller und PKI-pZS2 am schnellsten sein müssten. Die Ligationsprodukte RR5-PKI-pZS2sense und RR5-PKI-pZS2antisense liefen im Agarosegel erwartungsgemäß am langsamsten, gefolgt von RR5-long arm und PKI-pZS2.

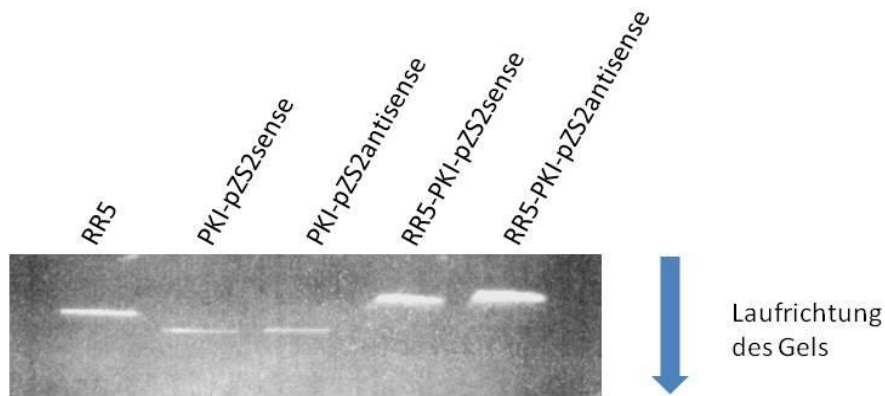


Abbildung 3-4 Ligation von RR5-long arm mit linearisiertem PKI-pZS2sense und PKI-pZS2antisense

Lane 1 (v.l.n.r.): RR5-long arm; 2: PKI-pZS2sense; 3: PKI-pZS2antisense; 4: RR5-PKI-pZS2sense; 5: Ligationsprodukt RR5-PKI-pZS2antisense. Die Insertion erfolgte mit je 250ng XbaI linearisiertem PKI-pZS2sense und PKI-pZS2antisense in die Expressionskassette des Adenovirus Typ 5 Genom durch Ligation mit T4 Ligase. Nach Insertion von PKI-pZS2sense und PKI-pZS2antisense in das Genom wurden die Ligationsprodukte sowie die Substrate elektrophoretisch getrennt. Es erfolgte der qualitative Nachweis der Ligationsprodukte RR5-PKI-pZS2sense und RR5-PKI-pZS2antisense durch die erwartungsgemäß verlangsamte Laufgeschwindigkeit im elektrischen Feld im Vergleich zu Long Arm und PKI-pZS2 alleine.

3.4 Synthese der adenoviralen Vektoren in der komplementierenden Zelllinie 293

HEK293 –Zellen (siehe 2.1.1) sind aufgrund ihres stabil transformierten Genoms mit der E1a und E1b Region des Adenovirus Typ5 in der Lage, die zur Virusvermehrung notwendigen Early Genprodukte zu synthetisieren (183). Die Ligationsprodukte RR5-PKI-pZS2sense und RR5-PKI-pZS2antisense können in dieser Zelllinie komplementiert werden, sodass transgene Viruspartikel mit PKIsense und PKIantisense cDNA entstehen können. Aufgrund ihrer fehlenden E1 Region sind diese Viren jedoch replikationsdefizient (Abbildung 3-5).

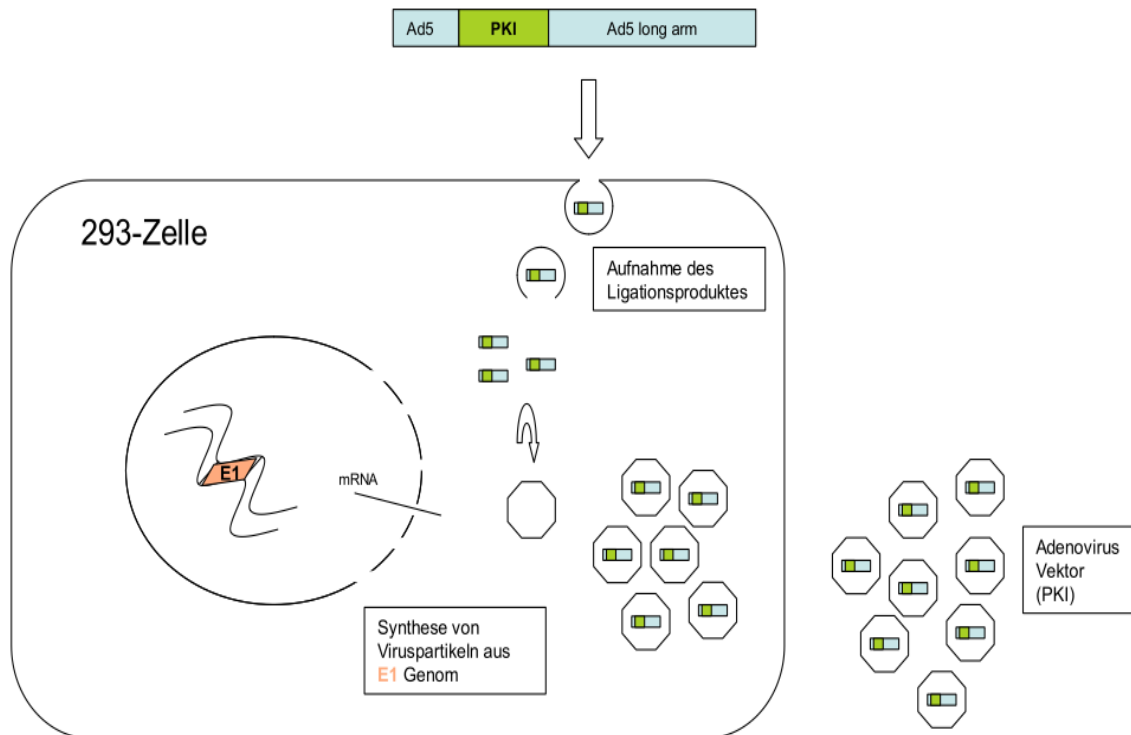


Abbildung 3-5 Schematische Darstellung der Adenovirus-Vektor Komplementierung

Mit inseriertem PKIsense und PKIantisense mittels komplementierender Zelllinie 293. Aufnahme von RR5-PKI-pZS2sense und RR5-PKI-pZS2antisense in die Helferzelllinie durch Calciumphosphatpräzipitation. Die Synthese von Viruspartikeln erfolgt durch Komplementierung aus dem 293-Genom. Da keine Translokation stattfindet, sind die synthetisierten Viruspartikel E1-frei und damit replikationsdefizient.

Die Calciumphosphatpräzipitation der Ligationprodukte pZS2-PKIsense und pZS2-PKIantisense dient der Aufnahme in die Helfer-Zelllinie 293. In einem Gemisch aus Calciumchlorid und Natriumphosphat bindet sich die zu übertragende DNA an ausfallendes Calciumphosphat. Die ausgefallenen Kristalle werden der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Gelingt die Transfektion, entstehen nach ca. 7 bis 14 Tagen kometenschweifartige Lysehöfe (Plaques). Sie entsprechen bereits lysierten 293-Virtszellen. Das Vorkommen dieser lichtmikroskopischen und zum Teil sogar mit dem Auge sichtbaren Strukturen deutet daher auf eine erfolgreiche Transfektion hin. Ein weiteres Indiz für die erfolgreiche Transfektion ist die Fluoreszenz eines GFP-haltigen Kontrollvektors (184). Ist die Transfektion der 293 Zellen gelungen, kann mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie das fluoreszierende Protein in der Zielzelle (GFP) nachgewiesen werden. Abbildung 3-6 zeigt die erfolgreiche Transfektion mittels GFP Kontrollvektor sowie die kometenschweifartigen Lyseherde im Zellrasen der 293 Zellen.

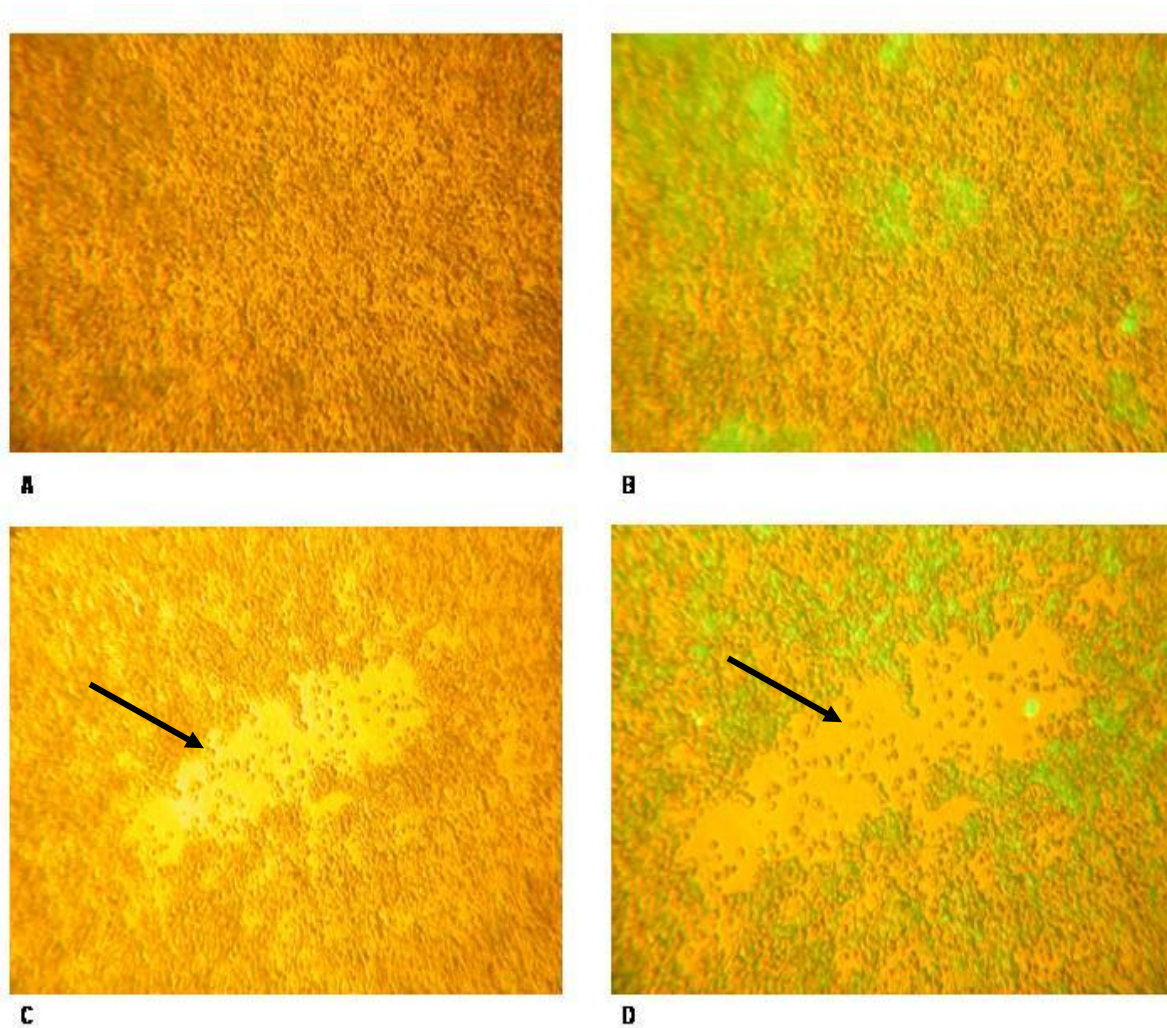


Abbildung 3-6 Darstellung des Zellrasens der Helferzelllinie 293

Nach Ca^{2+} -Phosphat Präzipitation vor Beginn der Lyse und nach Beginn der Lyse am Tag 13. Die Transfektion von 293 Zellen erfolgte mit 250ng RR5-pZS2-PKIsense (Klon9), RR5-pZS2-PKIantisense (Klon25) und GFP cDNA. A: konfluierender Zellrasen nach Ca^{2+} -Phosphatpräzipitation mit RR5-pZS2-PKIsense vor Beginn der Lyse am Tag 7. B: konfluierender Zellrasen nach Ca^{2+} -Phosphat Präzipitation mit GFP vor Beginn der Lyse am Tag 7. C/D: kometenschweifartig lysierte 293-Zellen (Plaques) 10 Tage nach Transfektion mit 250ng pZS2-PKIsense (Klon9) bzw. GFP cDNA. Es haben sich charakteristische, kometenschweifartige Lyseherde mit randständigen, rundkernigen Zellen gebildet. Am Tag 13 löst sich der Zellrasen vollständig auf.

3.5 PCR-Nachweis von PKI α cDNA in den Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense

Um die erfolgreiche Synthese des adenoviralen Vektors durch die Helferzelllinie zu prüfen, war es notwendig das Transgen und die E1-Freiheit des viralen Genoms nachzuweisen. Dabei wurde die virale DNA mittels Sorianolyse (siehe 2.2.9) aus dem Primärlysat gewonnen. Der Nachweis für die Replikationsdefizienz von PKIsense-AdV und PKIantisense-AdV erfolgte durch PCR Nachweis mit den spezifischen Primern 3315 sense und 4600 antisense (siehe 2.1.6). Die korrekte Insertion der PKI cDNA in den Expressionsvektor Ad5PKIs und

Ad5PKIa erfolgte mittels einer PCR unter Verwendung des im CMV-Promotor bindenden Primers CMV480s und des in der 3' untranslatierten Region des bovinen Wachstumshormons bindenden Primers pZS2-3'UTRa (Abbildung 3-7). Sowohl PKIsense als auch PKIantisense wurden aus dem Lysat der synthetisierten Vektoren mit Hilfe der PCR nachgewiesen. In der gleichen PCR, bei der je 1µl Vektor-cDNA der Klone PKI9 und PKI25 verwendet wurden, konnte ferner kein Nachweis für E1 cDNA erbracht werden. Die Vektor-cDNA der Klone 9 und 25 waren also E1-frei. Das Sekundärlysat der 293-Zellen nach Infektion mit je 100µl Totallysat von PKIsense-AdV und PKIantisense-AdV wurde analog zum Primärlysat durch Sorianalyse mit anschließender PCR nachgewiesen.

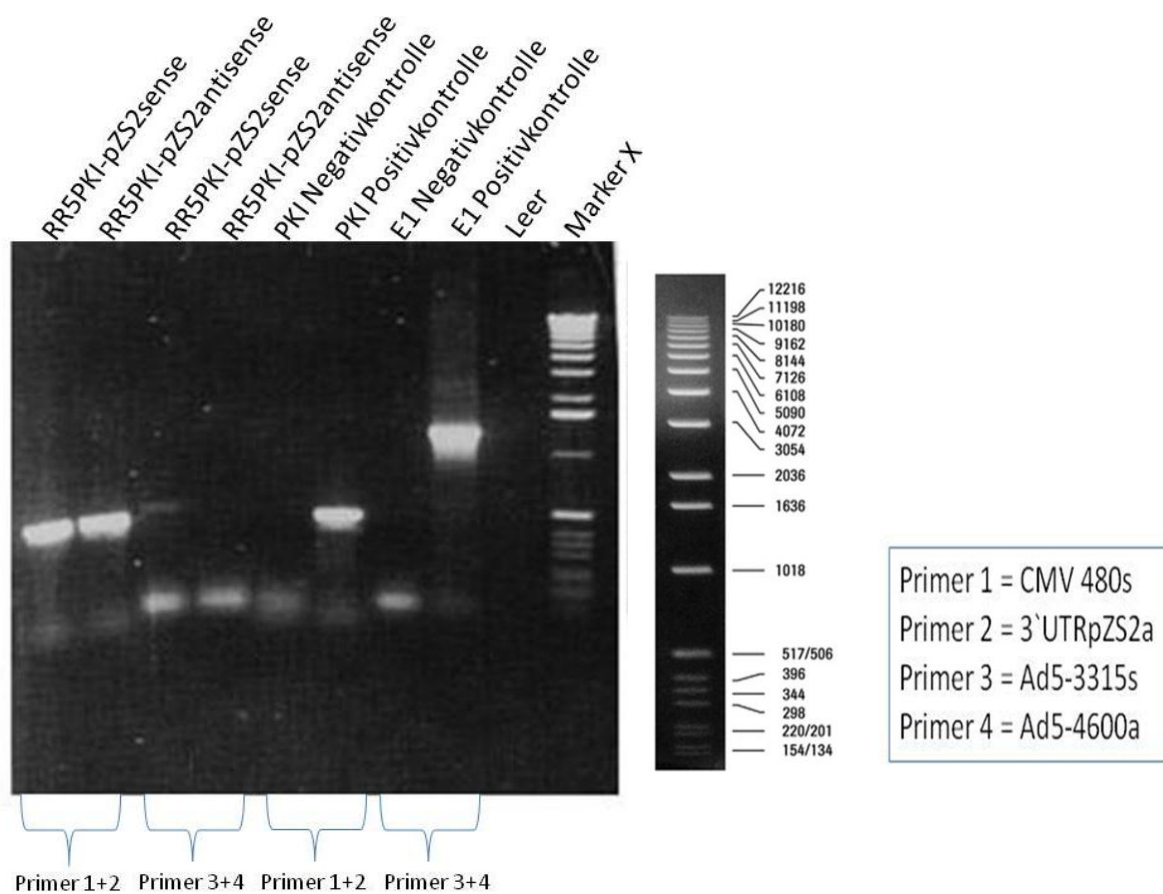


Abbildung 3-7 PCR-Nachweis von PKI cDNA

Aus dem Primärlysat der in der Helfer-Zelllinie 293 synthetisierten Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense und Nachweis der E1-Freiheit. Die Extraktion der Vektor DNA aus dem Primärlysat der transfizierten 293-Zellen erfolgte durch Sorianalyse. Der spezifische Nachweis von Vektor PKI cDNA speziell PKI-pzS2sense (Lane 1) und PKI-pzS2antisense (Lane 2) gelang durch PCR mit den Primern CMV480s und 3'UTRpZS2a. Der spezifische Nachweis des E1-Gens in der Vektor DNA durch die Primer 3315 sense und 4600 antisense für die beiden Vektoren PKI-pzS2sense (Lane 3) und PKI-pzS2antisense (Lane 4) war negativ. Die ca. 600kb große PKI cDNA aus den Vektoren PKI-pzS2sense und PKI-pzS2antisense stimmte mit der Größe der PKI cDNA aus der Positivkontrolle (Lane 6) überein. In der Negativkontrolle (Lane 5) konnte in diesem spezifischen Bereich keine PKI cDNA nachgewiesen werden. Analog hierzu gelang der Nachweis der E1 cDNA Transkripte ca. 1300kb groß in Lane 8, welche wie erwartet nicht in den Lyasen der Vektor DNA nachzuweisen war.

Die Sorianalyse vom Sekundärlysat ergab analog zum Primärlysat einen positiven Nachweis für die Vektor PKIsense-cDNA und Vektor PKIantisense-cDNA. Des Weiteren sind die Lysat der Vektoren AdVPKIsense (RR5PKI-pZS2sense) und AdVPKIantisense (RR5PKI-pZS2antisense) negativ für das adenovirale E1-Gen. Zum Nachweis des intakten Ad-Vektorgenoms und der korrekten Insertion von PKI cDNA in den beiden Adenovektorkonstrukte AdVPKIsense (RR5PKI-pZS2sense) und AdVPKIantisense (RR5PKI-pZS2antisense) wurden jeweils 1 µg AdVPKIsense und 1 µg AdVPKIantisense, sowie RR5-Long Arm mit dem Restriktionsenzym HindIII verdaut. In der Abbildung 3-8 sind die charakteristischen HindIII-Schnittorte des Restriktionsenzymes dargestellt. Das Bandenmuster ist sowohl im Long Arm des RR5 als auch im Genom des AdVPKIantisense sichtbar; beispielhaft ist hier nur der antisense Vektor dargestellt. Im Bereich von 2000bp ist zudem nur im antisense Vektor und nicht im RR5 Long Arm ein spezifischer HindIII Schnittort zu sehen, der die korrekte Insertion der PKI cDNA im Adenovektoren sichtbar macht. Somit wurde das intakte Vektorgenom, als auch die korrekte Insertion von PKIsense und PKIantisense cDNA im AdV-Konstrukt nachgewiesen.

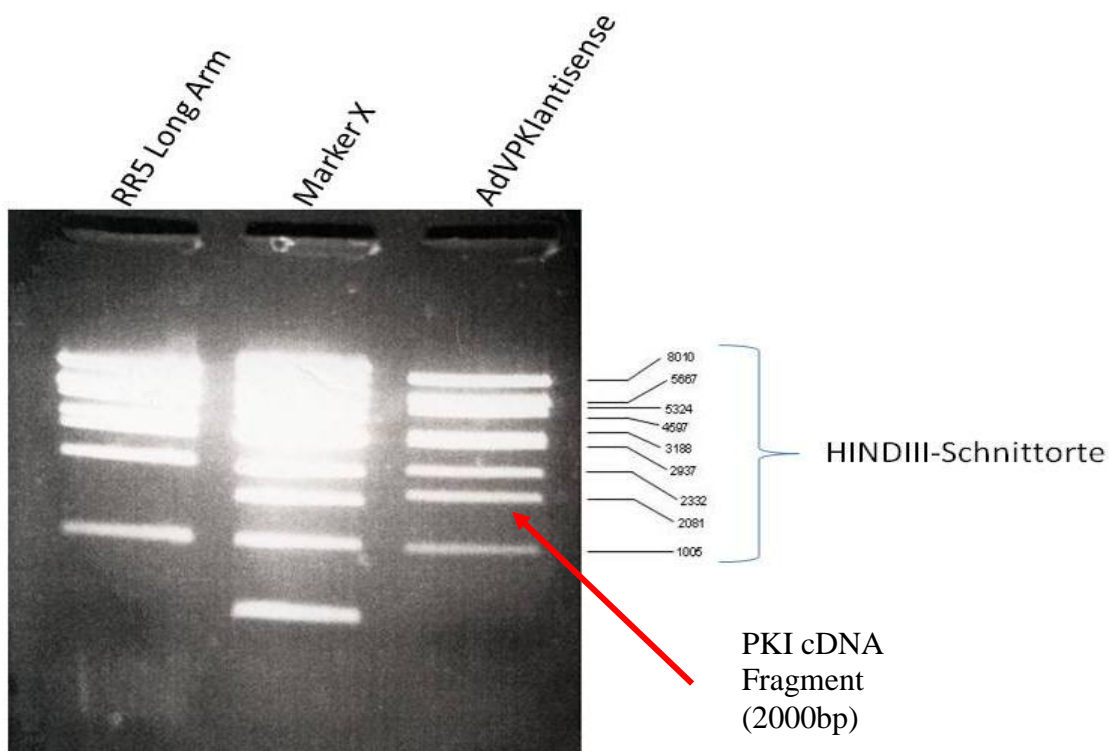


Abbildung 3-8

Gelelektrophorese nach HindIII-Spaltung von Vektor cDNA am Beispiel von AdVPKIantisense und RR5 Long Arm. Die HindIII Spaltung mit den spezifischen Banden (rechts dargestellt) erlaubt anhand des Schnittmustervergleichs den Nachweis der intakten Vektor cDNA im Adenovektorkonstrukt. Im Bereich von 2000bp (Pfeil) ist ein spezifischer Schnittort im Bereich des PKI cDNA Inserts innerhalb des AdVektor-Konstrukts dargestellt. Somit konnte auch die korrekte Insertion von PKI hier am Beispiel des AdVPKIantisense Vektors dargestellt werden.

Zusammenfassend konnte im ersten Schritt dieser Arbeit die erfolgreiche Konstruktion der Vektoren AdVPKIantisense und AdVPKIsense in allen Teilschritten demonstriert werden. Die 100% Homologie zu humanem Proteinkinaseinhibitor, die Intaktheit der Vektoren und die korrekte Insertion der Proteinkinaseinhibitor cDNA in die beiden Vektorkonstrukte konnte ebenso gezeigt werden wie die E1 Freiheit der Vektoren. Nach erfolgreicher Vektorkonstruktion einschließlich des Nachweises der Insertion von PKIsense und PKIantisense cDNA im AdV-Genom und Nachweis der E1 Freiheit, erfolgte in weiteren Schritten die Darstellung der Funktionalität der Vektoren in der kardiomyozytären Ca^{2+} -Homöostase. Die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase in Rattenkardiomyozyten durch die Vektoren AdVPKIantisense und AdVPKIsense sollte über die Überexpression und antisense RNA vermittelte Inhibierung der Proteinkinase α gezeigt werden.

3.6 RNA-Präparation und Northern Blot Analyse

EA.hy 926 (250.000 Zellen/ Well)- und A7R5 (150.000 Zellen/Well) Zellkulturen wurden mit AdVPKIantisense, AdVPKIsense und AdVGFP mit je 100.000 vP/Zelle (Viruspartikeln/Zelle) transduziert. Nach 24 Stunden wurde die RNA aus den Zellkulturen isoliert. Das Ergebnis der RNA-Präparation ist in der Elektrophorese Abbildung 3-9 zu sehen. Es konnte 28S-, 18S- und 5S-RNA für die Vektorpräparationen AdVPKIantisense, AdVPKIsense und AdVGFP nachgewiesen werden.

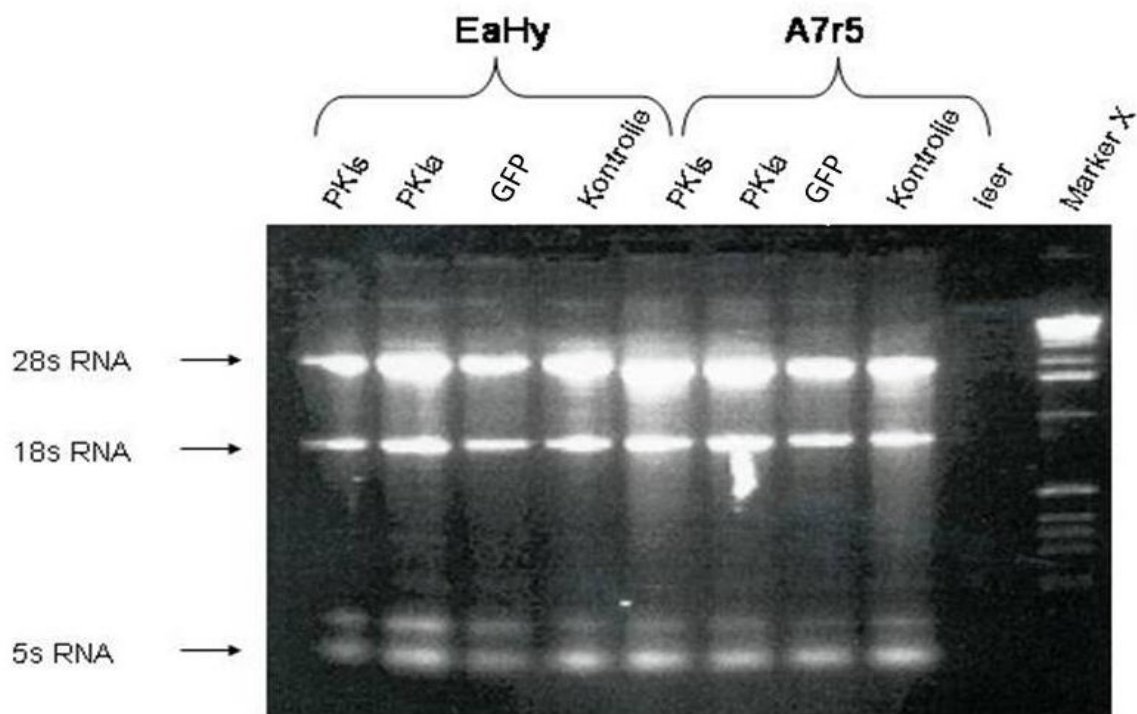


Abbildung 3-9 Ergebnis der RNA Präparation auf Agarosegel

EA.hy 926 (250.000 Zellen/ Well)- und A7R5 (150.000 Zellen/Well) Zellkulturen wurden mit AdVPKIantisense, AdVPKIsense und AdVGFP mit je 100.000 vP/Zelle transduziert. Nach 24 Stunden wurde die RNA extrahiert. Je 1µl AdVPKIsense (Lane1), AdVPKIantisense (Lane2), AdVGFP (Lane3) und AdV-Kontrollvektor (Lane4) des EA.hy-Ansatzes und analog für den A7R5-Asatz (Lane 5-8) aufgetragen. Charakteristische Banden für 28S-, 18S- und 5S-RNA (Pfeile links) sind nachweisbar.

Hergestellt wurde eine PKI spezifische einzelsträngige DNA-Sonde in antisense-Orientierung, die komplementär zur mRNA des PKI-AdV war. Da jedoch die 3`untranslatierte Region des bovine growth Hormons im AdVPKIsense identisch mit der des PKIantisense Adv ist, konnte mit der Sonde sowohl die Sense- als auch die Antisense-PKI mRNA der AdV nachgewiesen

werden. Die Hybridisierungsbanden waren etwa 750 bp groß, was der theoretischen Größe des PKI mRNA Transkripts aus der Vektor PKI cDNA entsprach (Abbildung 3-10).

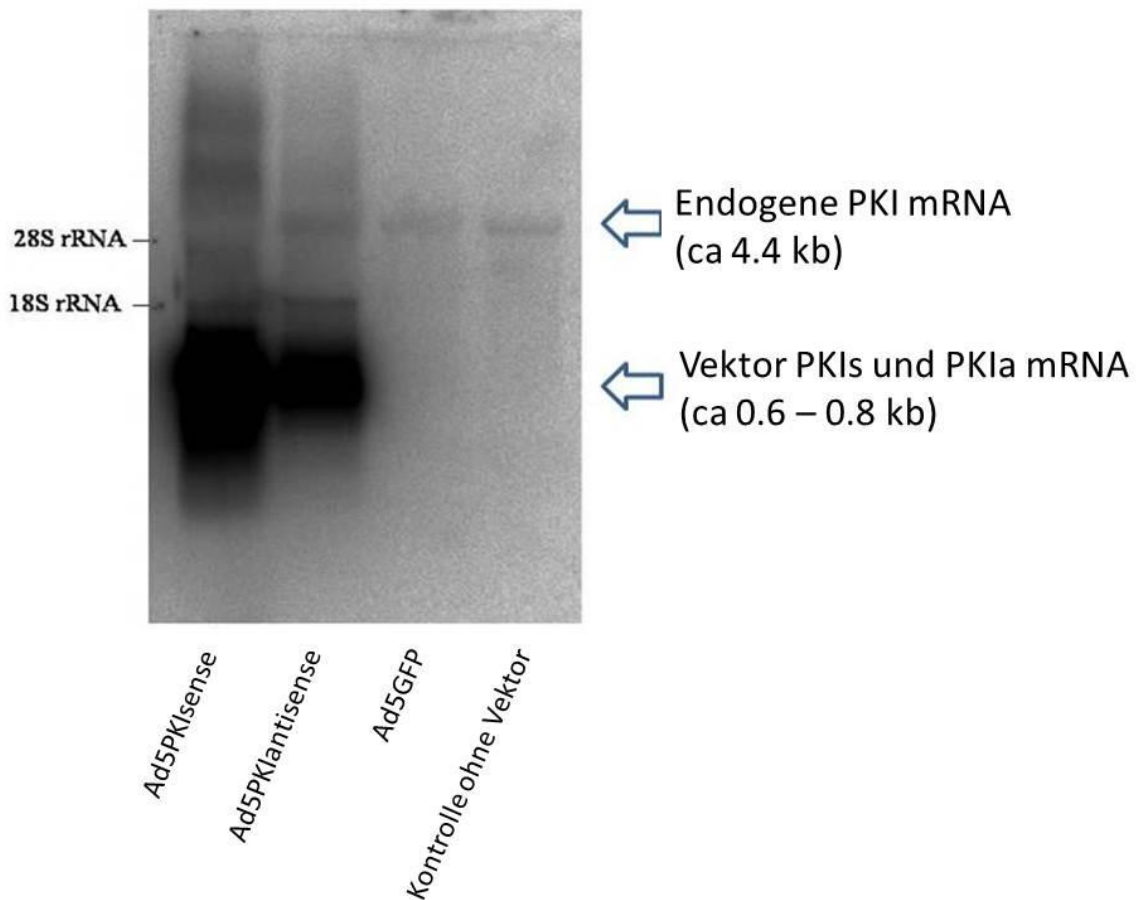


Abbildung 3-10 Nachweis von endogener PKI mRNA und Vektor PKI mRNA durch Northern Blot-Analyse

A7R5 und EA.hy Zellen wurden mit je 100.000 Partikeln/Zelle AdVPKIsense, AdVPKiantisense und AdVGFP transfiziert. 24 Stunden später wurde die RNA präpariert und 8µg auf ein 1% Formaldehyd-Gel übertragen. Nach Hybridisierung mit einer PKI spezifischen ssDNA-Sonde, wurden die Blots 22h autoradiographisch auf einem high intensity screen dargestellt. Die Pfeile zeigen Vektor PKI mRNA (0,6-0,8 kb) und endogene PKI mRNA (4,4 kb).

Weiterhin konnten für die Vektorpräparationen AdVPKiantisense, AdVPKIsense, AdVGFP und Kontrolle in der Northern Blot Analyse spezifische Banden mit einer Größe von ca. 4,4 kb nachgewiesen werden. Dies entsprach der in der Literatur beschriebenen Größe für endogene PKI mRNA (siehe Diskussionsteil der Arbeit). Eine Downregulation der endogenen PKI mRNA durch AdVPKiantisense konnte aufgrund der Überstrahlung durch die 750 bp-Bande und der geringen Konzentration an endogener PKI mRNA nicht zweifelsfrei dargestellt werden. AdVGFP und Kontrolle waren negativ für Vektor-PKI mRNA. Somit konnte vektorspezifische mRNA-Expression in der Zellkultur für die Vektoren AdVPKiantisense und AdVPKIsense nachgewiesen werden. Eine zweifelsfreie Darstellung der Regulation der endogenen PKI auf mRNA Ebene durch den AdVPKiantisense war jedoch wahrscheinlich aufgrund der geringen Konzentrationen an endogenem PKI nicht eindeutig möglich.

3.7 PCR zum Nachweis von endogener und vektorspezifischer PKI α cDNA

Zur Verifizierung des Northern Blot Ergebnisses wurde eine PCR durchgeführt. Ziel war der Nachweis von endogener und vektorspezifischer PKI α cDNA. Der Nachweis endogener PKI Expression erfolgte durch die Primer PKI 60s und PKI 1163a. In der Abbildung 3-11 ist zu erkennen, dass bei regelrechter Negativkontrolle ein positiver Nachweis endogener PKI cDNA bei etwa 550 kb möglich ist. Im Gegensatz dazu sind nur geringe Mengen PKI cDNA bei AdVPKIantisense transfizierten Zellen sichtbar. Wahrscheinlich hybridisiert die intrazellulär transkribierte PKIantisense cDNA mit endogenem Proteinkinaseinhibitor auf mRNA Ebene. AdVPKIantisense wäre somit in der Lage, die endogene Konzentration von PKI α zu reduzieren. Der Nachweis von vektorspezifischer PKI cDNA erfolgte durch die Primer CMV480 und pZS2-3'UTR. Hier konnten positive Nachweise für AdVPKIsense, AdVPKIantisense und für den Kontrollvektor TTP mit einer Größe von etwa 500 kb erbracht werden. Die Negativkontrolle war ebenfalls regelrecht.

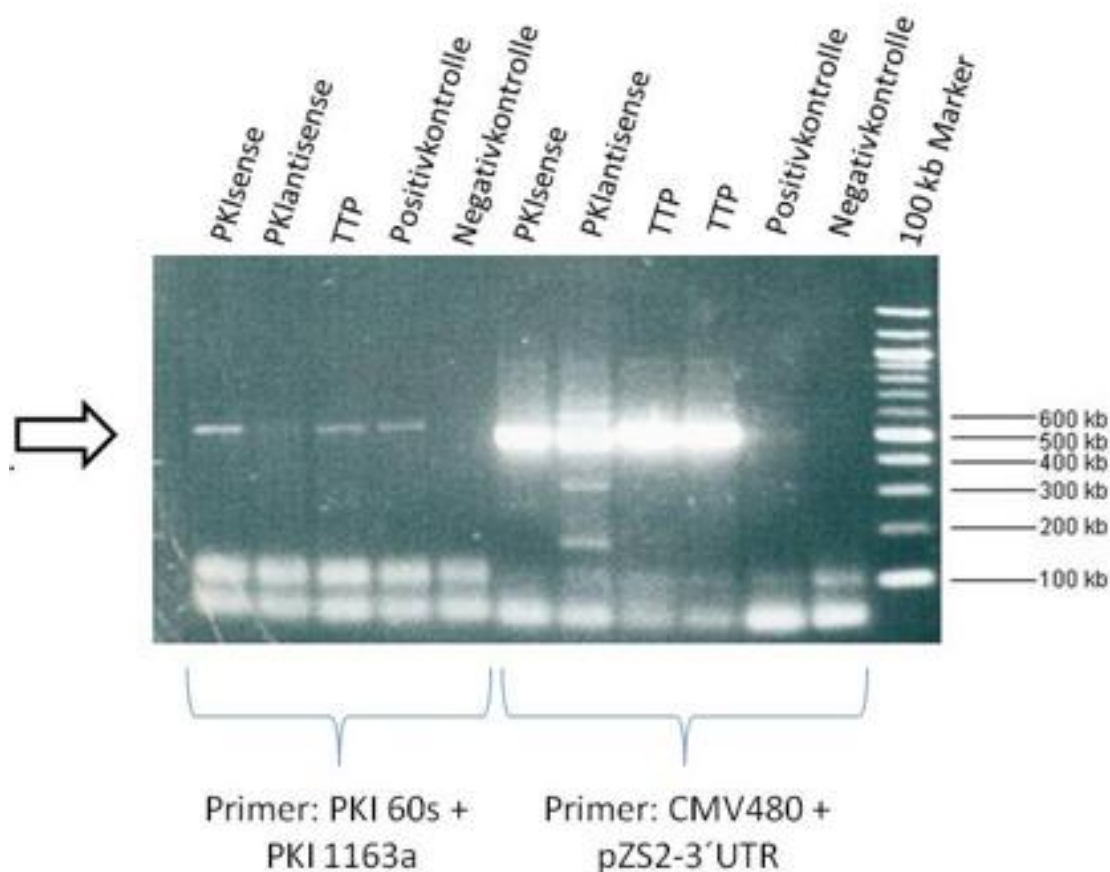


Abbildung 3-11 Nachweis von endogener und vektorspezifischer PKI cDNA

EA.hy Zellen wurden mit je 50.000 Partikeln/Zelle AdVPKIsense, AdVPKIantisense und AdVTTP transfiziert. 24 Stunden später wurde die RNA präpariert und eine cDNA Synthese durchgeführt. Je 1 μ l cDNA von AdVPKIsense, AdVPKIantisense, TTP wurden mit den Primern PKI60s+PKI1163a für den endogenen Nachweis (Lane 1-5) und den Primern CMV480+pZS2-3'UTR (Lane 6-11) für den vektorspezifischen Nachweis amplifiziert. Auf der Bahn 1

deutlicher Nachweis von endogener PKI cDNA bei AdVPKIsense infizierten Zellen. Geringe Konzentration von endogener PKI cDNA beim Antisense Vektor AdVPKIantisense. Kontrollvektor AdVTTP positiv und Negativkontrolle negativ. Auf der Bahn 5-8 Nachweis von vektorspezifischer PKI cDNA mit den Primern CMV480 und pZS2-3'UTRa. Positiver Nachweis von PKI cDNA sowohl in AdVPKIsense, als auch in AdVPKIantisense infizierten Zellen. Größe des Fragmentes etwa 550kb (Pfeil).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Zelllinien A7R5 und EA.hy erfolgreich durch die Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense transfiziert wurden. Die präparierte RNA wurde nach Hybridisierung mit einer PKI spezifischen ssDNA-Sonde geblottet. Es konnte vektorspezifische PKI mrna (0,6-0,8 kb) und endogene PKI mRNA (4,4 kb) im Northern Blot nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis wurde durch eine PCR mit spezifischen Primern für endogen synthetisierten- und vektorspezifischen PKI bestätigt. Darüber hinaus konnten Hinweise für eine Suppression der endogenen PKI Konzentration durch AdVPKIantisense gewonnen werden.

3.8 Modulation von PKI α und PLB nach Transduktion von nRCM mit AdVPKIsense und AdVPKIantisense

Die zentrale Hypothese dieser Arbeit ist die Annahme, dass eine Antisense-vermittelte PKI-Suppression (AdVPKIantisense) über eine verstärkte PLB-Phosphorylierung zu einer gesteigerten sarkoplasmatischen Ca²⁺-Aufnahme führt. Im Folgenden soll gezeigt werden, dass die Phosphorylierung der Zielproteine (PLB) durch die Proteinkinase A über die inhibitorische Aktivität des PKI α (überexprimiert über eine Transduktion der Zielzellen mit AdVPKIsense und/oder Zugabe von β -adrenergen Substanzen wie Isoproterenol) vermindert, oder im Falle des AdVPKIantisense erhöht werden kann. Das Zielprotein welches hier untersucht wird ist das Phospholamban, das als Schlüsselprotein der Ca²⁺-Homöostase angesehen wird. PLB hat in phosphoryliertem Zustand eine geringere Hemmwirkung auf die SERCA 2a und damit eine höhere Ca²⁺-Aufnahme in das SR zur Folge. Das Resultat ist eine gesteigerte Relaxation des Herzmuskels. Neben dem PLB wird durch die Proteinkinase A auch der ryanodinsensitive Ca²⁺-Kanal (RyR) im sarkoplasmatischen Retikulum phosphoryliert. Dies hat einen verstärkten Ausstrom von Ca²⁺ in das Cytosol zur Folge, was eine erhöhte myokardiale Kontraktilität bewirkt.

Die Proteinbestimmung erfolgte in freundlicher Kooperation mit dem molekularbiologischen Labor von Herrn Prof. Dr. Vetter (Pharmakologie Charité CCBF). Es wurden Western Blot-Analysen mit anschließender Immunodetektion von phosphoryliertem PLB durchgeführt. Im Versuchsaufbau wurde folgendes Muster für die Transduktion der Rattenkardiomyozyten gewählt:

20.000 Partikeln/Zelle AdVPKIsense, 10.000 AdVPKIantisense + 20.000 AdVPKIsense, 20.000 AdVPKIantisense + 20.000 AdVPKIsense, Luciferase AdV 20.000, Luciferase 20.000 + AdVPKIantisense 10.000 und Luciferase 20.000 + AdVPKIantisense 20.000. Die Kotransfektion sollte dem Nachweis dienen, die Phosphorylierung von PLB Konzentrations- und Vektorabhängig zu modulieren. Voraussetzungen für den Nachweis der Funktionalität der Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense sind eine hinreichend hohe PKA-Aktivität und eine hinreichend hohe endogene PKI-Aktivität in den nRCM. Bei der Kotransfektion wird der Effekt der Überexpression von PKI durch die gleichzeitige Gabe von AdVPKIantisense entgegengewirkt bzw. aufgehoben.

Die immunologische Detektion von PKI erfolgte mit dem anti-PKI-Antikörper (Rabbit) und anti-PS-16- Antikörper. Dabei war kein PKI (Protein) in neonatalen Rattenkardiomyozyten nachweisbar. Bei Zugabe von AdVPKIsense (10.000 Partikel/Zelle) konnte ein schwaches Signal im Bereich der spezifischen Bande für PKI (ca. 14 kDa) detektiert werden. Folglich ist

festzustellen, dass AdVPKIsense in der Lage ist, PKI in neonatalen Rattenkardiomyozyten zu exprimieren.

Die Detektion von phosphoryliertem PLB durch den anti-PS-16-AK zeigte keinen eindeutigen Nachweis einer Regulierung durch AdVPKIsense- und AdVPKIantisense. Auch durch Zugabe von Isoproterenol zur Stimulation der PKA vermittelten Phosphorylierung von PLB und damit Erhöhung der intramyokardialen PKA-Aktivität war kein Effekt nachzuweisen. Der Unterschied zwischen Isoproterenol-behandelten und nicht Isoproterenol-behandelten nRCM bei Gabe des AdVPKIsense fiel entgegen der Erwartung kleiner aus, da dieser die Aktivität der nun sehr aktiven PKA reduziert. Anschließend erfolgte die immunologische Detektion von phosphoryliertem PLB - ebenfalls mit einem PS-16 Antikörper (Phosphoserin). Die Bestimmung von phosphoryliertem PLB nach obigem Schema erbrachte, dass die PLB-Detektion bei AdVPKIantisense behandelten Rattenkardiomyozyten im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Unterschied zeigte.

AdVPKIsense infizierte Rattenkardiomyozyten zeigten jedoch eine im Vergleich zur Kontrolle deutlich geringere Signalintensität und damit eine geringere Konzentration an phosphoryliertem PLB. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass die aus der Signaltransduktion bekannte Regulierung der PLB-Aktivität durch die Proteinkinase A und dem Proteinkinaseinhibitor α durch die Funktion des AdVPKIsense reduziert wird. Das wäre eine Bestätigung der eingangs formulierten Hypothese. Allerdings traten deutliche Schwankungen innerhalb einer Gruppe mit gleicher AdV-Konzentration auf, sodass die statistische Auswertung keine signifikanten Unterschiede ergab. Aufgrund der Varianz wurde der Versuch wiederholt. Hierbei konnte - eine im Vergleich zu den Voruntersuchungen - deutlich höhere Signifikanz erzielt werden. Auch in diesem Versuch wurden zur immunologischen Detektion PS-16 Antikörper verwendet. Dabei wurde ebenfalls das oben genannte Transduktionsschema mit und ohne Isoproterenol eingesetzt (Abbildung 3-12).

**Basal Ser¹⁶ phosphorylation of phospholamban in neonatal rat cardiomyocytes
after 3 min at 25 °C**

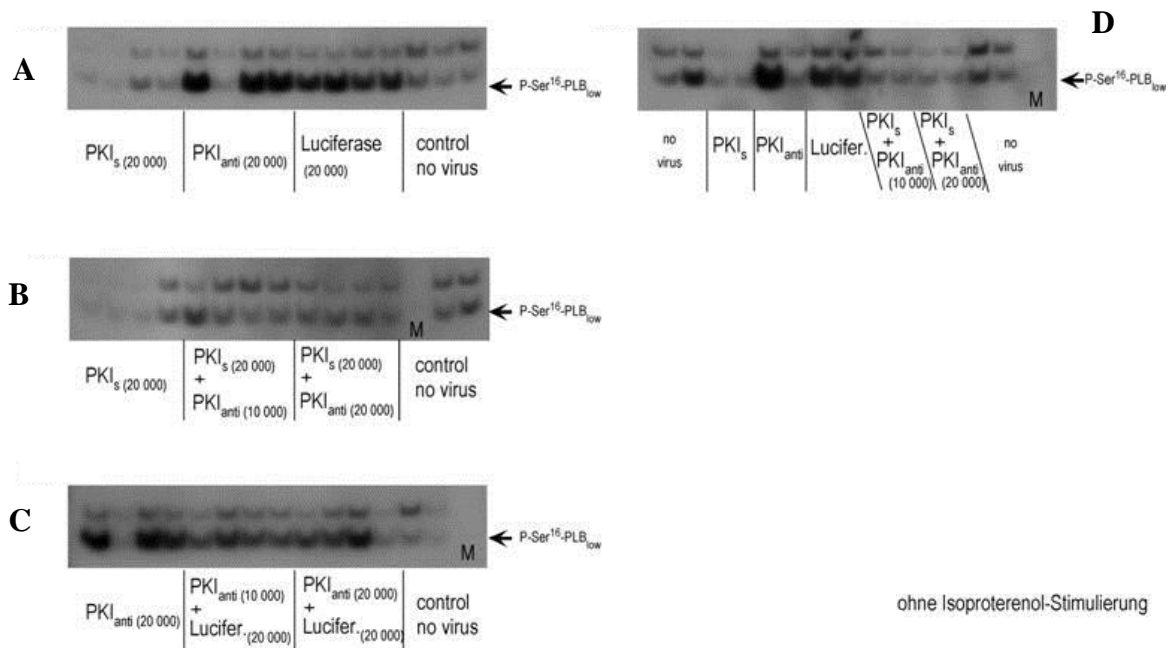


Abbildung 3-12 Immunologische Detektion von phosphoryliertem PLB mit PS-16 Antikörper ohne Isoproterenol

Die Transduktion der neonatalen Rattenkardiomyozyten Kulturen erfolgte mit 20.000 Partikeln/Zelle AdVPKIsense, 10.000 AdVPKIantisense + 20.000 AdVPKIsense, 20.000 AdVPKIantisense + 20.000 AdVPKIsense, Luciferase AdV 20.000, Luciferase 20.000 + AdVPKIantisense 10.000 und Luciferase 20.000 + AdVPKIantisense 20.000. Die immunologische Detektion erfolgte mit PS-16 AK. AdVPKIsense infizierte Rattenkardiomyozyten zeigten eine deutlich geringere Signalintensität (phosphoryliertes PLB) im Vergleich zur Kontrolle (A). AdVPKIantisense infizierte Zellen zeigten hingegen eine deutliche Zunahme der Signalintensität (phosphoryliertes PLB) im Vergleich zur Kontrolle. AdVPKIsense + AdVPKIantisense zeigten eine höhere Signalintensität als AdVPKIsense alleine (B). AdVPKIantisense (20.000) infizierte nRCM zeigten eine höhere Signalintensität als AdVPKIantisense (10.000)+ AdVLuciferase (10.000) Kontrollvektor (C).

Als Ergebnis der immunologischen Detektion mit PS-16 AK wurde eine deutliche und signifikante Abnahme der Signalintensität für phosphoryliertes PLB im Vergleich sowohl zum Kontrollvektor AdVLuciferase als auch zur vektorfreien Kontrolle bei AdVPKIsense-infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten gemessen. AdVPKIantisense transduzierte Zellkulturen zeigten eine deutliche Zunahme des phosphorylierten PLB im Vergleich sowohl zu AdVLuciferase, als auch zur vektorfreien Kontrolle. AdVLuciferase führte zu einer leichten Zunahme des phosphorylierten PLB im Vergleich zur vektorfreien Kontrolle. Die immunologische Detektion bei Isoproterenol-stimulierten nRCM folgende phosphorylierte PLB-Konzentrationen: Bei AdVPKIsense Behandlung ist eine Abnahme des phosphorylierten PLB (pPLB) im Vergleich sowohl zur AdVLuciferase als auch zur vektorfreien Kontrolle sichtbar, eine AdVPKIantisense Behandlung erhöht im Vergleich zur Kontrolle die pPLB

Konzentration in der Zelle, AdVLuciferase erhöht die pPLB Konzentration im Vergleich zur Kontrolle leicht. Des Weiteren war darstellbar, dass mit Zunahme der AdVPKIantisense Konzentration (0, 10.000, 20.000 Partikel/Zelle) in neonatalen Rattenkardiomyozyten die phosphorylierte PLB-Konzentration zunahm (

Abbildung 3-13).

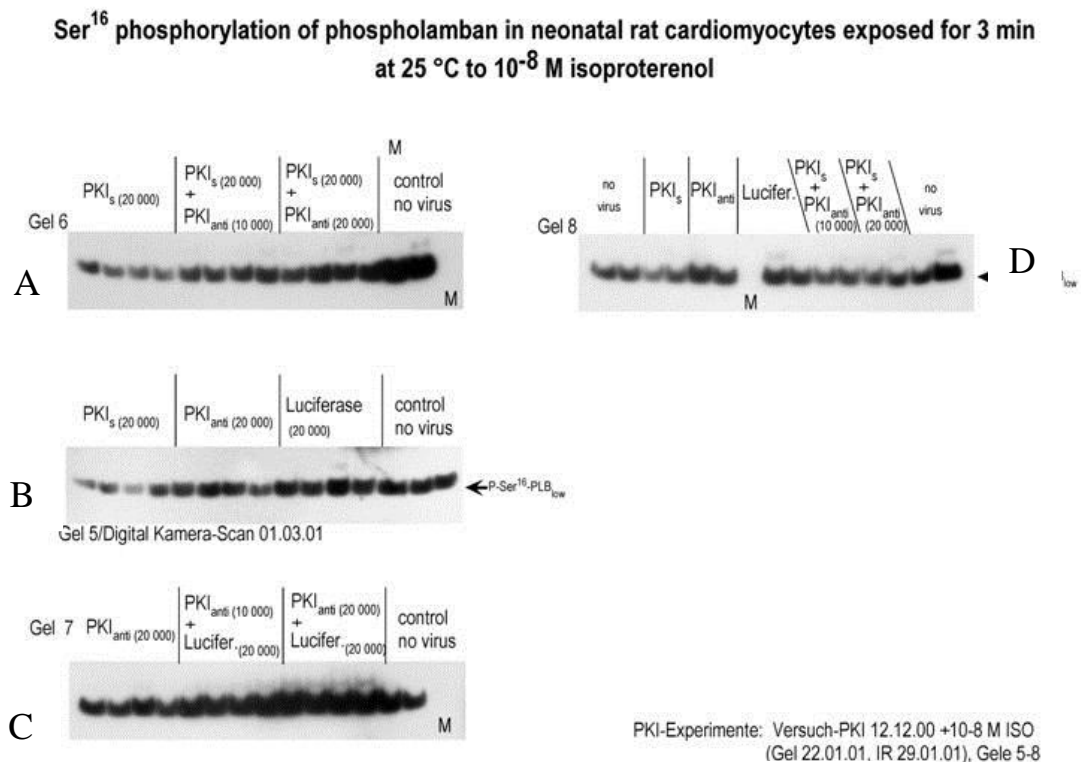


Abbildung 3-13 Immunologische Detektion von phosphoryliertem PLB mit Anti-PS-16 AK + Isoproterenol

Die Transduktion der nRCM erfolgte mit 20.000 Partikeln/Zelle AdVPKIsense, 10.000 AdVPKIantisense + 20.000 AdVPKIsense, 20.000 AdVPKIantisense + 20.000 AdVPKIsense, AdVLuciferase 20.000, AdVLuciferase 20.000 + AdVPKIantisense 10.000 und AdVLuciferase 20.000 + AdVPKIantisense 20.000 unter Isoproterenol-Stimulation. Die immunologische Detektion erfolgte mit Anti-PS-16 AK. AdVPKIsense infizierte nRCM zeigten eine leicht geringere Signalintensität (pPLB) im Vergleich zur Kontrolle (A,B). AdVPKIantisense infizierte Zellen zeigten eine leichte Zunahme der Signalintensität (pPLB) im Vergleich zur Kontrolle (B). Des Weiteren ist eine deutliche Zunahme der Signalintensität von pPLB mit zunehmender Konzentration der AdVPKIantisense Vektoren zu sehen (0, 10.000, 20.000 Partikel/Zelle) (C).

Zusammenfassend kann man zu den Western-Blot Analysen und den immunologischen Detektionen festhalten:

1. PKI α lässt sich durch Anti-PKI-AK im Immunoblot nach Transfektion von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit AdVPKIsense nachweisen.

2. AdVPKI_{sense} reduziert die Konzentration des phosphorylierten PLB gemessen durch immunologische Detektion mittels Anti-PS-16 Antikörper in neonatalen Rattenkardiomyozyten-Kulturen. .
3. AdVPKI_{antisense} erhöht die Konzentration des phosphorylierten PLBs gemessen durch immunologische Detektion mittels Anti-PS-16 Antikörper in neonatalen Rattenkardiomyozyten-Kulturen.
4. Der Effekt des AdVPKI_{sense} lässt sich durch die Aktivität des AdVPKI_{antisense} dynamisch antagonisieren.
5. Isoproterenol stimuliert die Phosphorylierung von PLB unabhängig von den Vektoren AdVPKI_{sense} und AdVPKI_{antisense}, wodurch der Effekt der Vektoren minimiert wird.

3.9 SERCA2a induzierte Ca²⁺-Aufnahme durch AdV-vermittelte Expression von PKI α in nRCM

Mit dem Nachweis der Modulation von phosphoryliertem PLB (pPLB) durch die Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense wurde der grundlegende Nachweis erbracht, dass die Vektoren in der Lage sind die Konzentration des pPLB in nRCM und damit potentiell den Ca²⁺-Stoffwechsel und die Kontraktilität der Herzmuskelzelle über den PKA Signalweg zu beeinflussen. Die Ca²⁺-Aufnahme Messungen stellen dabei einen wichtigen Schritt in der Argumentation der PKA-Signalkaskade dar. Dabei wurde der SERCA2a-katalysierte ATP-abhängige Transport von Ca²⁺ in die Membranvesikel des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) myokardialer Zellen durch Oxalat-stimulierte ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme nach einer von Will und Mitarbeitern beschriebenen Methode gemessen (179) (siehe 2.2.14). Da eine verminderte Aktivität der Proteinkinase A durch vektorspezifische Überexpression von PKI α zu einer verminderten Phosphorylierung von PLB und damit zu einer verminderten Aktivität der SERCA2a führt, wurde in der Messung auch eine geringere Ca²⁺-Aufnahme als im Kontrollvektor erwartet, wohingegen der Antisense-Vektor über o.g. Mechanismus eine verstärkte Ca²⁺-Aufnahme in das SR zur Folge hätte. Die Homogenate der mit je 50.000 Partikeln pro Zelle AdVPKIsense, AdVPKIantisense, AdVPKIsense + AdVPKIantisense, AdVLuciferase und AdVPKIsense + AdVLuciferase transduzierten Kardiomyozyten wurden nach dem Millipore Verfahren einer Oxalat-stimulierten ⁴⁵Ca²⁺-Transportmessung unterzogen. Die Messergebnisse in Abbildung 3-14 zeigen eine statistisch signifikant erhöhte ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme in das SR bei AdVPKIantisense transfizierten Rattenkardiomyozyten. Die erhöhte Ca²⁺-Aufnahme durch AdVPKIantisense lässt sich partiell durch AdVPKIsense antagonisieren (AdVPKIsense + AdVPKIantisense). AdVPKIsense allein zeigte keinen signifikanten Unterschied gegenüber dem AdV_{Luciferase} Kontrollvektor. Eine verminderte ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme bei AdVPKIsense transfizierten Rattenkardiomyozyten im Vergleich zum AdV_{Luciferase} Kontrollvektor ließ sich nicht nachweisen (Abbildung 3-14).

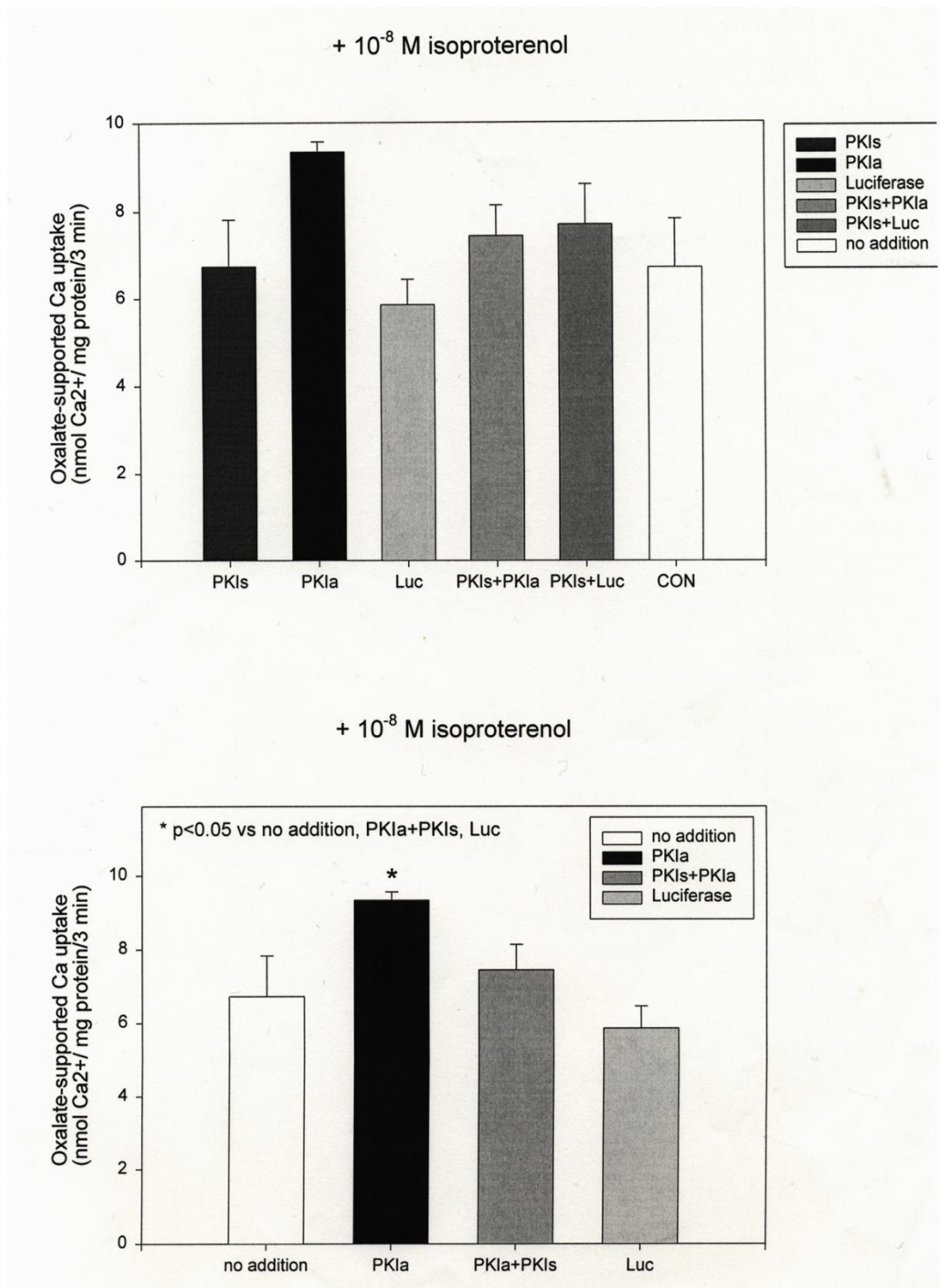


Abbildung 3-14 Oxalat-stimulierte ⁴⁵Ca²⁺-Transportmessung

Modulation des SERCA2a-katalysierten ATP-abhängigen Transports von Ca²⁺ in Membranvesikel des Sarkoplasmatischen Retikulums (SR) myokardialer Zellen der Ratte durch Oxalat-stimulierte ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme. Nach Transduktion der Kardiomyozyten mit je 50.000 Partikeln/Zelle AdVPKIsense, AdVPKIantisense, AdVPKIsense + AdVPKIantisense und AdVLuciferase und Homogenisierung erfolgten die Messungen der Ca²⁺-Aufnahme aus einer Reaktionslösung mit radioaktiv markiertem Calcium (⁴⁵Ca²⁺). Die Abbildung zeigt eine statistisch signifikant erhöhte ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme in das SR bei AdVPKIantisense transfizierten nRCM. Die erhöhte Ca²⁺-Aufnahme durch AdVPKIantisense lässt sich partiell durch AdVPKIsense antagonisieren. AdVPKIsense allein führt nicht zu einer verminderten Ca²⁺-Aufnahme in das SR gegenüber dem Kontrollvektor unter Isoproterenol-Stimulation.

Zusammenfassend lässt sich für die Modulation der Ca^{2+} -Aufnahme feststellen, dass unter Isoproterenol-Stimulation AdVPKIantisense transfizierte nRCM eine gesteigerte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR zeigen. Nach den Ergebnissen der Western-Blot Analysen lässt sich dieser Effekt auf eine verstärkte Phosphorylierung und damit verminderte Hemmwirkung des PLB auf die SERCA2a zurückführen. Dieser Effekt ließ sich durch AdVPKIsense antagonisieren. AdVPKIsense führte allein unter Isoproterenol jedoch nicht zu einer signifikant verminderten Ca^{2+} -Aufnahme.

4 Diskussion

4.1 Primäre und sekundäre Ziele

Charakteristische Merkmale einer Herzinsuffizienz sind eine verminderte Kontraktionskraft, sowie eine verzögerte Relaxation (8,10,185). Sowohl im Tierversuch als auch bei humanen insuffizienten Herzen konnte gezeigt werden, dass eine verzögerte diastolische Relaxation des Herzens Folge einer verminderten Aufnahme des zytosolischen Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) durch die SERCA2a ist (11–13). PLB ist ein potenter Inhibitor der SERCA2a (14,15) und kann durch Phosphorylierung z.B. infolge einer β -adrenergen Stimulation oder durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen seine inhibitorische Wirkung auf die SERCA2a verlieren. Die Folge ist eine erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR, was zu einer beschleunigten Relaxation und letztlich auch zu einer erhöhten Myokardkontraktilität führt (18,27). Obwohl die molekularen Mechanismen der Herzaktion inzwischen gut untersucht sind, basiert die bisherige Therapie der chronischen Herzinsuffizienz auf einer Symptomreduktion. Verbreitet und prognoseverbessernd sind z.B. Diuretika zur Reduktion der Herzlast und zur Behandlung peripherer Ödeme bei einer Rechtsherzinsuffizienz oder die Senkung des Blutdrucks zur Entlastung der linksventrikulären Funktion und Protektion einer globalen Herzdekompensation. In der präklinischen Forschung und zunehmend auch in klinischen Studien der Phase I und II werden auch kausale Therapien und darunter auch gentherapeutische Ansätze erfolgreich eingesetzt.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirksamkeit des hier konstruierten Vektors AdVPKIantisense in neonatalen Rattenkardiomyozyten-Kulturen (nRCM) hinsichtlich seiner Fähigkeit zur Steigerung der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR zu prüfen. Des Weiteren sollte der Nachweis erbracht werden, dass eine erhöhte PKA-Aktivität eine verstärkte Phosphorylierung von PLB und eine Aktivitätssteigerung der SERCA2a zur Folge hat. Als Maß für die SERCA2a Aktivität sollte ferner der Anstieg der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration nachgewiesen werden. Insgesamt sollte damit der erstmalige Nachweis erbracht werden, dass eine AdV-assoziierte Modulation des PKA-Signalweges über die Suppression von PKI α zu einer verstärkten Aufnahme von Ca^{2+} in das SR führen kann und damit potentiell in der Therapie der Herzinsuffizienz eingesetzt werden könnte. Das Sekundärziel war der Nachweis des gegenteiligen Effektes durch eine Überexpression von PKI α mithilfe des Vektors AdVPKI α sense.

Folgende zentrale Hypothesen sollen im Folgenden geprüft und diskutiert werden:

- 1. AdVPKIantisense ist in der Lage PKI α in nRCM zu supprimieren.*
- 2. Die AdV-induzierte Suppression führt über eine PKA vermittelte Phosphorylierung von PLB und Aktivitätssteigerung der SERCA2a in nRCM zur verstärkten Aufnahme von Ca²⁺ in das SR.*
- 3. AdVPKIantisense kann PKI α in nRCM überexprimieren und den Effekt der Suppression durch AdVPKIantisense dosisabhängig aufheben.*

4.2 Adenovektor vermittelte Modulation von PKI α in nRCM

PKI α ist ein potenter Inhibitor der Proteinkinase A, der zum Zweck der Modulation der PKA-Aktivität erfolgreich eingesetzt wurde (103,108). Daten zur AdVektor-induzierten Modulation von PKI α und PLB in nRCM liegen bisher nicht vor. Olsen und Uhler konnten 1991 zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, mit Hilfe eines Plasmid-Vektors (CMV-Neo) PKI in COS Zellen zu exprimieren (186). Des Weiteren konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass durch Überexpression von PKI die Kinaseaktivität von C α und C β (PKA) mit gleicher Effizienz inhibiert wird.

In dieser Arbeit wurden die adenoviralen Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense synthetisiert. Die korrekte Insertion der PKI α cDNA in Sense- und Antisense-Orientierung konnte mittels DNA Sequenzanalyse erfolgreich nachgewiesen werden. Dabei war PKI α im konstruierten Vektor 100% homolog zu humanem PKI α aus der Neuroblastoma Zelllinie. Der open reading frame (ORF) betrug 230 bp, was den Forschungsergebnissen für humanen PKI (182) entspricht. Die Sequenz zeigte außerdem eine 100%ige Homologie zu PKI α vom Skelettmuskel des Kaninchens. Die ORF kodiert für ein 75 Aminosäure-Protein, wobei sich die Inhibitorregion im aminoterminalen Drittel des Proteins befindet. Neben dem PKI Start-Kodon in Position 531-537, bestehen noch weitere Startkodierungen. Das Vorhandensein mehrerer Startkodierungen kann ein Mechanismus für die Regulation von Proteinkonzentrationen sein, wie es z.B. für die translationale Modifikation von Präproinsulin gezeigt wurde (187). Nach erfolgreicher Vektorproduktion in der Helferzelllinie 293, wurden nRCM mit AdVPKIsense und AdVPKIantisense mit 50000 Partikel/Zelle transfiziert. Die Hybridisierung erfolgte mit einer PKI spezifischen ssDNA-Sonde. Der Nachweis von PKI mRNA gelang mit einer spezifischen Bande bei 0,6-0,8 kb. Endogen synthetisierte PKI mRNA konnte bei 4,4 kb dargestellt werden. Die Bande für endogene PKI mRNA befand sich fast auf identischer Höhe mit 28s ribosomaler RNA. Das Signal kann daher nicht zu 100% als spezifisch für PKI mRNA angesehen werden. Da aber kein Hintergrundsignal für die 18s rRNA erkennbar war, kann mit großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um endogene PKI mRNA handelt. In der Literatur finden sich folgende Angaben zur Größe der mRNA des Proteinkinaseinhibitors der PKA:

- mRNA PKI α Skelettmuskel Ratte 4,3kb (116,117)
- mRNA PKI β Testis Ratte 0,7-1,4 kb (112)
- mRNA PKIgamma Maus 1,3 kb (113)
- mRNA PKI Maus 3,8 kb (182)

- mRNA PKI Gehirn human 2,0 kb und 4,0 kb (182)
- mRNA PKI Skelettmuskel human 4,0 kb (186)

PKI β mRNA wurde bisher im Muskelgewebe nicht nachgewiesen. PKI γ (113) besteht aus 75 Aminosäuren und ist zu 35% identisch mit PKI α und 30% zu PKI β 1. Es hat die gleiche inhibitorische Aktivität und das gleiche nuclear export signal wie PKI α . Die 1,3 kb große PKI γ mRNA wird in höchsten Konzentrationen im Herzen, Skelettmuskel und Testes vorgefunden. Die detektierten Banden in der Northern Blot Analyse decken sich mit den in der Literatur beschriebenen Daten (112,113,182,186). Das 0,6– 0,8 kb große Fragment entspricht der Größe von vektorseitig exprimierter PKI mRNA. Endogene PKI Isoformen wie PKI β und PKI γ sind zu bis zu 35% homolog zu PKI α . Sie könnten daher auch die im Northern Blot dargestellte Größe haben. Der fehlende Nachweis dieser Bande im Kontrollvektor ist ausschlaggebend dafür, dass es sich bei der spezifischen Bande (0,6-0,8 kb) im Northern Blot um das vom AdVektor exprimierte PKI α handelt.

Um das Northern Blot Ergebnis zu verifizieren, wurde eine PCR durchgeführt. Ziel war der Nachweis von endogener und vektorspezifischer PKI cDNA. Der Nachweis endogener PKI Expression erfolgte durch die Primer PKI 60s und PKI 1163a, der Nachweis von vektorspezifischer PKI cDNA durch die Primer CMV480 und pZS2-3'UTRa. vektorspezifische cDNA wurde mit einem ca. 500kb großen Fragment nachgewiesen. Endogene PKI cDNA kann zudem mit einer ca. 550 kb großen Bande nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass der endogene PKI-Nachweis durch Zugabe des Antisense Vektors eine deutlich verminderte Konzentration für PKI cDNA zeigte, spricht für die korrekte Detektion von PKI cDNA durch die genannten Primer und deutet darauf hin, dass AdVPKIantisense die endogene PKI mRNA Expression herunterreguliert. Das Vorhandensein vektorspezifischer cDNA in nRCM spricht für eine erfolgreiche Transfektion der Zellen. Zudem ist es die Erklärung für das 0,6-0,8 kb große mRNA-Fragment in der Northern Blot Analyse.

4.3 AdVPKIantisense induzierte Modulation von PLB in nRCM

Nachdem im ersten Schritt dieser Arbeit der Nachweis der vektorspezifischen mRNA-Expression für die adenoviralen Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense erbracht wurde, folgte im zweiten Schritt der Nachweis der AdV-induzierten Phosphorylierung von PLB in nRCM.

Erster Meilenstein hierbei war die Demonstration der Überexpression von vektorseitig exprimiertem PKI α in nRCM durch AdVPKIsense sowie die Suppression von endogen synthetisiertem PKI α durch AdVPKIantisense. Dazu wurden Western-Blot-Analysen mit anschließender Immunodetektion durchgeführt. Dabei erfolgte die Transduktion der nRCM mit steigenden Konzentrationen des Sense- und Antisense-Vektors, um konzentrationsabhängige Effekte darstellen zu können. Die immunologische Detektion von PKI α erfolgte durch einen Antikörper, der in der Lage ist PKI α vom Skelettmuskel des Kaninchens zu erkennen (Anti-PKI-AK). Die Basensequenz von PKI α des Kaninchens und des humanen Skelettmuskels sind zu 100% homolog. Allerdings unterscheidet sich die Aminosäuresequenz des Skelettmuskel-PKI von Ratte und Kaninchen geringfügig voneinander ohne Änderungen in der inhibitorischen Wirksamkeit des PKI. Ein weiterer Antikörper, Anti-PS-16-AK, wurde eingesetzt um die Menge an phosphoryliertem PLB unter Zugabe des Sense- und Antisense-Vektors zu analysieren.

Durch immunologische Detektion von phosphoryliertem PLB durch Phosphoserin-16 Antikörper (Anti-PS-16), konnte der Effekt der Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense auf die Ca²⁺-Aufnahme in das SR geprüft werden. Hazel Lum et al. konnten in ihren Untersuchungen zeigen, dass PKI mit Hilfe eines E1- und E3 defizienten adenoviralen Vektorsystems in Endothelzellen exprimiert werden kann (188). Die Arbeitsgruppe von Ding et al. konnten 2005 sogar zeigen, dass PKI in Kardiomyozyten durch einen adenoviralen Vektor zur Untersuchung der PKA vermittelten Apoptose exprimiert werden kann (125). Aufgrund dessen konnte davon ausgegangen werden, dass es möglich ist PKI α mithilfe eines Vektorkonstrukts in Kardiomyozyten nachzuweisen. Tatsächlich konnte PKI α mithilfe des Anti-PKI-AK im Western Blot nachgewiesen werden. AdVPKIsense transfizierte nRCM zeigten eine Überexpression von PKI α . Da in der Kontrolle mit Anti-PKI-AK aber ohne Vektor keine Bande im Western Bot für PKI α zu sehen war, ist davon auszugehen, dass endogen synthetisierter PKI α nicht oder in nicht detektierbarer Menge in den nRCM vorliegt. Dies unterstützt die These dieser Arbeit, dass eine Überexpression von PKI über die Hemmung der PKA zu einer verminderten Konzentration von phosphoryliertem PLB führt.

Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass eine Zugabe von AdVPKIsense in nRCM zu einer signifikanten Abnahme an phosphoryliertem PLB (pPLB) im Vergleich zur Kontrolle führt. AdVPKIantisense führt zu einer deutlichen Zunahme von pPLB im Vergleich zum Kontrollvektor. Ein bedeutendes Ergebnis dieser Arbeit war zudem, dass sich der Effekt des AdVPKIsense konzentrationsabhängig durch AdVPKIantisense antagonisieren ließ. Die Konzentration an pPLB ließ sich durch AdVPKIantisense alleine aufgrund der geringen endogenen PKI Konzentration nicht deutlich darstellbar erhöhen. Die endogene – also nicht vektorseitig beeinflusste - Konzentration von PKI α in nRCM ist sehr gering, bzw. kaum detektierbar. Da AdVPKIantisense jedoch eine detektierbare Menge an PKI mRNA braucht um seine Aktivität „darstellbar“ zu machen, fällt der darstellbare Effekt des AdVPKIantisense erwartungsgemäß gering aus.

Collins et al. konnten im Herzmuskel neben PKI α auch die endogene Expression von PKI γ nachweisen (113). Eine Hemmung der PKA Aktivität im Herzmuskel durch PKI γ hätte zur Folge, dass trotz Reduktion der endogenen PKI α Aktivität durch AdVPKIantisense, PLB abhängig von dem hemmenden Einfluss des PKI γ weiterhin an einer verstärkten Phosphorylierung gehindert werden könnte. Der Einfluss von AdVPKIantisense wäre damit entscheidend abhängig von der PKI γ Aktivität. Bei Überexpression von PKI α wäre der Einfluss des PKI γ durch den Sense-Vektor vermutlich nicht so stark, da eine hohe vektorseitig produzierte intramyokardiale PKI α Konzentration eine weitgehende Hemmung der PKA-Aktivität zur Folge hätte. Der oben beschriebene schwankende Nachweis von pPLB nach Transduktion der nRCM, insbesondere mit AdVPKIantisense, wäre daher nicht nur von der Aktivität des PKI α sondern auch von der Aktivität des PKI γ beeinflusst. Die direkte inhibitorische Aktivität sowohl von PKI α als auch PKI γ auf die Proteinkinase A sowie die Aktivität der PKA selbst wurden in dieser Arbeit nicht untersucht. Um die endogene PKI-Aktivität in nRCM komplett zu unterbinden wäre eine parallele Inhibition von PKI α als auch PKI γ notwendig. Zusammenfassend ist PKI α wahrscheinlich nicht der alleinige Modulator der PKA-Aktivität und damit unter anderem auch Modulator für PLB im Myokard. Vor diesem Hintergrund ist es möglich die schwankenden Konzentrationen der detektierten pPLB als Folge der unterschiedlichen PKI γ -Aktivitäten in den unterschiedlichen Versuchsreihen zu erklären. Aufgrund fehlender Untersuchungen hierzu, kann diese Vermutung nicht wissenschaftlich belegt werden.

Weitere Einflussfaktoren, die im Zusammenhang mit den teilweise schwankenden Ergebnissen im Western Blot stehen könnten, sind methodisch bedingt. Die Proteinextraktion und die Proteinmessungen für PKI waren in diesem Versuch teilweise nicht konsistent. Eine

mögliche Ursache hierfür könnte die in der Literatur beschriebene geringe Transfektionseffizienz mit PKI sein, die dafür verantwortlich gemacht wird, dass vektorseitig exprimierter Proteinkinaseinhibitor durch überschüssige PKA-C-Untereinheit nicht transfizierter Zellen während der Homogenatpräparation gebunden wird (189). Diesem Problem könnte durch Erhitzen der Homogenate transfizierter Zellen und damit Inaktivierung von PKA-C und anschließender Präinkubation des hitzeinaktivierten Extraktes mit nicht hitzeinaktivierten Homogenaten nicht transfizierter Zellen (enthalten PKA) begegnet werden, was jedoch in dieser Arbeit aufgrund prozeduraler Hürden nicht durchgeführt wurde. In dem dort vorgeschlagenen Prozedere wird dem Reaktionsgemisch cAMP zur Dissoziation des PKA-C vom Holoenzymkomplex der PKA, sowie Mg^{2+} und ATP als Kosubstrate für die Bindung von PKI an PKA-C zugegeben. Erst durch diese Modifikationen war die Versuchsdurchführung einschließlich Proteinbestimmung erfolgreich möglich. Der vorgeschlagene Goldstandard für die Extraktion des Proteinkinaseinhibitors aus einem Zellhomogenat wird von verschiedenen Arbeitsgruppen beschrieben und erfolgreich angewandt (107,189,190). Die Hitzedenaturierung mit anschließender TCA Behandlung ist jedoch nicht die einzige zum Erfolg führende Methode für die PKI-Extraktion. Die Arbeiten von Weber und Rosen 1977, sowie von Hashizume and DeGroot aus 1979 zeigen, dass auch nicht denaturierende Prozeduren PKI-Aktivität zeigen können, ohne eine vollständige Extraktion des Proteins zu erhalten. Interessant dabei ist, dass der Anteil der PKI β -1 Isoform zur PKI β -2 Isoform höher ist als bei denaturierenden Prozessen (107). Das bedeutet, dass die Methodik der Proteinextraktion aus Gewebekulturen Einfluss auf die Aktivität und Verteilung des PKI hat.

In dieser Arbeit wurden nicht denaturierende Verfahren der Proteinextraktion verwendet. Hierbei ist anzumerken, dass die Zellkulturen mit Trypsin behandelt werden mussten. In der Literatur ist PKI als trypsinlabil bekannt. Daher ist davon auszugehen, dass die Konzentration an PKI durch diese Prozeduren bereits verringert wurde. Die im Anschluss folgende Proteinextraktion durch Solubilisierung und Konzentrationsbestimmung nach Lowry waren aufgrund der Sensibilität des PKI auf äußere Störfaktoren aufwändig. Bei der Proteinextraktion wurde mehrfach TCA verwendet. Dabei ist die Geschwindigkeit der TCA-Zugabe zum Zellextrakt der entscheidende Schritt zum Erhalt einer maximalen Menge an PKI. Eine langsame Zugabe führt zu einer Abnahme der Proteinkonzentration. Eine unterschiedlich schnelle Zugabe von TCA würde eine unterschiedlich hohe Proteinkonzentration und damit eine Varianz der Messergebnisse zur Folge haben. Neben der Trypsinisierung der Zellkulturen, fehlender Inaktivierung der katalytischen Untereinheit der

PKA und fehlender cAMP Zugabe, könnte dies ein weiterer Faktor für die zunächst hohe Varianz der Extinktionsmessungen sein. Die Zugabe des Solubilisierungspuffers (EDTA, SDS, Phosphorsäure und Mercaptoethanol) führt häufig nicht zur vollständigen Lösung des zuvor zentrifugierten Proteins. Folglich würden Abweichungen in der gemessenen Extinktion und damit errechneten und aufgetragenen Proteinmenge im Western-Blot entstehen. Durch Dreifachmessungen wurde dieser Fehler minimiert. Aufgrund der Schwankungen in der Extinktion innerhalb einer Probe, wurden die oben genannten Schritte häufig wiederholt.

Schwankungen des pH-Wertes können Einfluss auf die Messergebnisse haben. PKI liegt in Abhängigkeit der Menge an PKA-C entweder an PKA-C, an Teile des Zytoskeletts oder in freier Form vor. Einflussfaktoren auf die Menge an freiem PKA-C und damit auch PKI sind ferner cAMP, ATP, Magnesium, die regulatorische Untereinheit (R) der PKA und AKAP der Zelle. Durch die fehlende Hitzebehandlung kann der Einfluss von PKA-C nicht eliminiert werden, wodurch die Konzentration an freiem PKI zunächst einmal gesenkt wird. Allerdings könnte die Bindung mit PKA-C in einem pH-abhängigen Gleichgewicht stehen, was eine pH-abhängige Dissoziation von PKA-C-PKI bedeuten würde. Die hohe Affinität von PKI zu PKA-C und das Vorhandensein von Komplexbildnern in der Reaktionslösung führen dazu, dass größere Proteinkomplexe im Reaktionsgemisch entstehen können, die schwer löslich wären und damit die Konzentration freier gelöster Proteine verringern würden. Solche Proteinkomplexe könnten auch die unterschiedlichen Messergebnisse innerhalb einer Probe erklären. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die prinzipiell störanfällige Solubilisierung und Proteinmessung nach Lowry durch die Eigenschaften des Proteinkinaseinhibitors als trypsinlabiler und hitzestabiler hochaffiner Inhibitor von PKA-C zu den Schwankungen in den Messergebnissen geführt haben könnten.

Abschließend können folgende Faktoren beschrieben werden, die die Detektion von PKI erschwert haben und in weiteren Versuchen Berücksichtigung finden sollten:

- Der Einfluss von PKI γ auf die Phosphorylierung von PLB.
- Die Trypsinbehandlung der Kardiomyozyten während der Inkubation und Präparation.
- Die Zeitabhängigkeit der Zugabe von TCA bei der Solubilisierung.
- Die fehlende Hitzedenaturierung und damit ein Überschuss von PKA-C im Homogenat, wodurch PKI gebunden und durch den AK vermutlich schwerer detektierbar wird.

- Die Abhängigkeit der endogenen PKI Aktivität von Zellaktivität, Alter und hormonaler Stimulation.

In Zellkulturen von frisch isolierten neonatalen Kardiomyozyten war PKI immunzytochemisch ausschließlich an Tag 0 nachweisbar. In Verlaufsexperimenten bis 164 Stunden nach Isolierung konnte PKI immunhistochemisch nicht mehr nachgewiesen werden. Eine Stimulierung der Kardiomyozyten mit Endothelin-1 hatte keinen Einfluss auf die PKI-Expression. Eine mögliche Erklärung ist, dass PKI translational down reguliert wird, sodass es nicht mehr nachweisbar ist. Ob eine erhöhte Aktivität von PKA-C auch zwangsläufig zu einem Anstieg der PKI-Expression und Aktivität führt, kann jedoch derzeit nicht beantwortet werden. Das liegt zum Teil auch an der durch andere Arbeitsgruppen beschriebenen methodischen Problematik, PKI verlässlich aus den Homogenaten zu extrahieren. Dies gilt natürlich insbesondere für physiologisch in niedrigen Konzentrationen synthetisierten, endogenen PKI.

Die Aktivität von PKA-C und PKI wird *in vivo* durch weitere Variablen beeinflusst. Die Stimulation der β -adrenergen Signalkaskade, und folglich die Dissoziation des Holoenzymkomplex durch die Bindung des second messengers cAMP, führt zur Freisetzung von PKA-C und damit zu einer erhöhten Aktivität von PKI. PKI transloziert - neben seiner Funktion als Inhibitor der PKA, PKA-C aus dem Zellkern (121). Durch Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren im Nukleus wird die Transkription von einer Vielzahl an Zielproteinen beeinflusst, dessen physiologische Funktion noch weitgehend ungeklärt ist. PKA-C könnte z.B. transkriptional im Sinne eines negativen Feedbacks down reguliert werden. Dadurch würde mittelfristig die hormonale Antwort abgeschwächt werden. Je nachdem zu welchem Zeitpunkt die mit Isoproterenol behandelten Kardiomyozyten präpariert sind, unterscheiden sich möglicherweise die Konzentration an PKA-C und PKI. Tendenziell wäre die Konzentration von PKI aber erhöht. Somit ist die Wahrscheinlichkeit hoch mit Isoproterenol-Stimulation eine erhöhte endogene PKI-Konzentration zu erreichen. Diese wäre allerdings auch erhöht, wenn eine Hitzedenaturierung durchgeführt worden wäre oder die Behandlung der Kardiomyozyten ohne Trypsin erfolgt wäre.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass AdVPKIsense in der Lage ist PKI α in nRCM zu exprimieren. Die Untersuchungen konnten belegen, dass vektorassoziiert exprimierter PKI α die Aktivität des PLB durch Phosphorylierung zu regulieren vermag. AdVPKIsense führte dabei zu einer Überexpression von PKI α in nRCM und zu einer verminderten PLB Phosphorylierung. AdVPKIantisense hatte eine verminderte Hemmung der PKA-Aktivität zu

einer nachweislich gesteigerten PLB-Phosphorylierung. Letztlich konnte trotz der methodischen Hürden ein signifikanter Unterschied der PLB-Aktivität zwischen den beiden Vektoren AdVPKI_{sense} und AdVPKI_{antisense} nachgewiesen werden.

4.4 Die Modulation des PKA-PLB-SERCA2a Signalweges durch AdVPKIantisense und AdVPKIsense

Die Ca^{2+} -getriggerte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR der Herzmuskelzelle in der Kontraktionsphase erfolgt über den Ryanodin Rezeptor und die auswärts gerichteten Ca^{2+} -Kanäle des SR (siehe 1.3). Die Relaxation erfolgt über den aktiven Transport von Ca^{2+} - in das SR, wobei die SERCA2a, welche Ca^{2+} - in das SR zurückpumpt, eine entscheidende Funktion einnimmt. SERCA2a hat somit Einfluss auf die Relaxation aber auch auf die Ca^{2+} -Konzentration des SR (191). PLB ist der Hauptregulator der SERCA2a, da es in nicht phosphorylierter Form als Inhibitor der SERCA2a die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR und damit die zur Verfügung stehende Menge an Ca^{2+} - für die nächste Kontraktion reduzieren kann. Die Phosphorylierung von PLB über den cAMP Signalweg verhindert die Hemmwirkung. In insuffizienten Herzen wird dieser Effekt noch durch eine reduzierte SERCA2a Aktivität verstärkt (76). Eine komplette Deletion von PLB erhöht die Kontraktilität des Herzmuskels unter normalen und pathologischen Bedingungen (192). Die Behandlung der Herzinsuffizienz über den PLB-SERCA Signalweg erscheint vor diesem Hintergrund eine pathophysiologisch bedeutende Rolle zu spielen.

Verschiedene Untersuchungen wurden bisher zur Modulation des PLB-SERCA Signalweges durchgeführt. Die Transduktion von SERCA2 in Ratten mit Herzinsuffizienz (149,193), die Verwendung von PLB-sh RNA oder die Überexpression einer PLB-Mutante in isolierten neonatalen Ratten- oder Kaninchen Kardiomyozyten sind einige hier zu nennende Beispiele (19,26,194). Haghghi et al. gelang 2003 der Nachweis einer PLB Mutation bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie. Die Untersuchungen verdeutlichen die Wichtigkeit des PLB als Regulator in der Herzaktivität sowie die Notwendigkeit eines gewissenhaften Umgangs beim Einsatz von PLB-Mutanten als langfristige therapeutische Maßnahme (195). Des Weiteren konnte in einer Untersuchung von Dieterle et al. gezeigt werden, dass ein Antikörper gegen PLB, der über ein Vektorsystem auf herzinsuffiziente Hamster übertragen und exprimiert wurde, eine Verbesserung der Herzinsuffizienz zur Folge hatte (196). Die Sicherheit und Effizienz von Gentherapieexperimenten mit PLB konnte in vielen Untersuchungen demonstriert werden (20,26,197). Trotz der vielfältigen präklinischen und auch bereits klinischen Untersuchungen der Phase II mit PLB (siehe hierzu auch Kapitel 1.5.2 und 1.5.3), wird weiterhin nach erfolgversprechenden molekularen Zielen gesucht, um kausale Therapien für die Behandlung der Herzinsuffizienz zu etablieren. Vor diesem Hintergrund war die Hypothese der Modulation β -adrenergen Signalwegs und der PLB-Phosphorylierung, insbesondere durch den Vektor AdVPKIantisense, von hohem wissenschaftlichem Interesse.

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass AdVPKIsense signifikant die Konzentration von pPLB reduziert. Hingegen erhöht die Transfektion der nRCM mit AdVPKIantisense signifikant die Konzentration von pPLB. Der Effekt des AdVPKIsense lässt sich durch die Aktivität des AdVPKIantisense konzentrationsabhängig antagonisieren. Ferner konnte gezeigt werden, dass Isoproterenol die Phosphorylierung von PLB unabhängig von den Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense stimuliert, wodurch der Effekt der Vektoren minimiert wird.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind unter Berücksichtigung der vielen Einflussfaktoren *in vivo*, wie z.B. der hormonalen Aktivität in gesunden und pathologisch veränderten Herzen (u.a. β -adrenerge Stimulation, Herzinsuffizienz, Myopathien) im Hinblick auf die Verwendbarkeit in klinischen Untersuchungen mit Vorsicht zu bewerten. Dennoch stellt die Modulation des PKI-PLB-SERCA2a Signalweges durch die Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense eine neue Möglichkeit in der Analyse pathophysiologischer Zusammenhänge der Herzaktion im gesunden und kranken Myokard dar. Die Modulation der Proteinkinase A durch Suppression und Überexpression von PKI α zur Regulation der PLB und SERCA2a Aktivität ist ein wichtiges, jedoch weiter zu untersuchendes, „molekulares Ziel“ in der Therapie der Herzinsuffizienz. Diese Untersuchung reiht sich damit insbesondere in die wissenschaftlichen Untersuchungen des β -adrenergen Teils der myokardialen Ca²⁺-Homöostase ein (24,43,145–148).

4.5 Die Regulation der Ca²⁺-Aufnahme in das SR durch Suppression und Überexpression von PKI α

Die SERCA2a ist das entscheidende Transportprotein zur Aufnahme von Ca²⁺ in das SR. PLB inhibiert die SERCA2a und wird selbst durch Phosphorylierung über die PKA, aber auch durch die Ca²⁺-Calmodulin und die Ca²⁺-phospholipid-abhängige Proteinkinase (CalPK) inaktiviert. Die Mobilisierung von Ca²⁺ erfolgt aus intrazellulären Speichern durch Aktivierung von Ca²⁺-Freisetzungskanälen (CRC = Ca²⁺ release channel) des SR (92). Die CRC für die Herz- sowie Skelettmuskulatur wurden als Ryanodinrezeptor (RyR) identifiziert. Nicht nur PLB, sondern auch der RyR unterliegt der Regulation durch die Proteinkinase A und Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Protein Kinase II (CalPK). Im Herzmuskel wird der RyR durch Phosphorylierung dieser Kinasen aktiviert (96). Das Gleichgewicht wird dabei nicht nur durch Wiederaufnahme des Ca²⁺ in das SR, sondern auch durch Bindung von Ca²⁺ an das Calmodulin (Ca²⁺-Calmodulin-Komplex) und durch die Phosphataseaktivität von Phosphatase Typ 1 (PP1) und 2a (PP2a), erreicht (101). Dieser Komplex hemmt konzentrationsabhängig den Ryanodinrezeptor und sorgt damit im Sinne eines negativen Feedbacks für eine Reduktion des Ca²⁺-Ausstromes aus dem SR. Eine effektive Regulierung des Ca²⁺-Ausstromes aus dem SR durch den oben beschriebenen Mechanismus ist für die Relaxation des Herzmuskels von entscheidender pathophysiologischer Bedeutung.

Die Proteinkinase A ist eine der wesentlichen Regulatoren der Kontraktion und Relaxation im Herzmuskel. Zum einen aktiviert sie die SERCA2a über die Phosphorylierung von PLB und beschleunigt damit die Ca²⁺-Aufnahme und Relaxation des Herzmuskels. Auf der anderen Seite führt sie über die erhöhte Bereitstellung von Ca²⁺ im SR, sowie über die Aktivierung von RyR zu einem erhöhten Ca²⁺-Ausstrom aus dem SR und damit zu einer erhöhten Kontraktionskraft.

In den hier durchgeführten Messungen wurde der SERCA2a-katalysierte ATP-abhängige Transport von Ca²⁺ in die Membranvesikel des SR myokardialer Zellen durch Oxalat-stimulierte ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme nach einer von Will und Mitarbeitern beschriebenen Methode evaluiert (179). Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass eine erhöhte ⁴⁵Ca²⁺-Aufnahme in das SR bei Downregulation von PKI α in nRCM vorliegt. Die erhöhte Ca²⁺-Aufnahme bei PKI α -Downregulation ließ sich partiell durch Überexpression von PKI α antagonisieren. Dies deckt sich mit den Western-Blot Ergebnissen, wo dieser konzentrationsabhängige Effekt ebenfalls nachweisbar war. Eine Überexpression durch AdVPKIsense allein hatte keinen signifikanten Effekt gegenüber dem Kontrollvektor. Eine

verminderte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme bei Überexpression von PKI α in nRCM im Vergleich zum Kontrollvektor ließ sich nicht nachweisen.

Der Effekt einer Überexpression des PKI α ist stark abhängig von der PKA-Aktivität. Bei hoher PKA-Aktivität, z.B. durch Isoproterenol-Stimulation, könnte die Überexpression von PKI α eine größere Rolle spielen. Die Ergebnisse bestätigen die zuvor erbrachten Ergebnisse der Proteinanalysen mit dem Anti-PLB-AK. Allerdings konnte hier, im Gegensatz zur Proteinanalyse, die Abnahme der Ca^{2+} -Aufnahme in das SR durch den PKIsense Vektor nur partiell nachgewiesen werden. Indirekt kann der verstärkende Effekt des AdVPKIantisense Vektors auf die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR durch AdVPKIsense partiell antagonisiert werden, was die Effektivität dieses Vektors unterstützt. Dennoch bleibt die Frage, warum der AdVPKIsense Vektor alleine die Ca^{2+} -Aufnahme nicht ausreichend zu verhindern vermag.

Betrachtet man die Ergebnisse aus der Proteinanalyse, so kann man festhalten, dass AdVPKIsense zu einer verminderten PLB Phosphorylierung führt. Dies führt aber offensichtlich nicht immer zu einer verstärkten Aufnahme von Ca^{2+} in das SR. Eine mögliche Ursache könnte in der Regulation der SERCA2a-Aktivität durch Ca^{2+} -Calmodulin und Ca^{2+} -phospholipid-abhängige-Proteinkinasen liegen, die neben der PKA ebenfalls die Phosphorylierung von SERCA2a katalysieren. Letztlich konnte diese Beobachtung im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden, da hierzu weitere Untersuchungen notwendig sind.

4.6 Der Stellenwert der AdV-PKI modulierten Signaltransduktion

In einer Vielzahl von Untersuchungen zur Aufklärung des Mechanismus der Herzaktion und der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz haben sich AdV als unverzichtbares effizientes Werkzeug für analytische Untersuchungen herauskristallisiert (siehe Kapitel 1.5.2). Sie stellen aber nicht nur ein effektives Werkzeug, sondern auch eine potentielle Therapieoption für bisher nicht heilbare Krankheiten dar. So werden derzeit Phase II Untersuchungen am Menschen durchgeführt, um die Effektivität von verschiedenen AdV und AAV Konstrukten zu evaluieren (siehe 1.5.3). AdV sind für gentherapeutische Untersuchungen kardiovaskulärer Erkrankungen geeignet und werden in vielen präklinischen und klinischen Untersuchungen bereits seit zwei Jahrzehnten eingesetzt. Verschiedene Arbeitsgruppen konnten die Effektivität des AdV-vermittelten Gentransfers in der Modulation der Kontraktilität des Herzmuskels zeigen (19,149,192–194).

Die Arbeitsgruppe von Dieterle et al. konnte beispielsweise demonstrieren, dass ein Antikörper gegen PLB, der über ein Vektorsystem auf herzinsuffiziente Hamster übertragen und exprimiert wurde, eine Regression der Herzinsuffizienz dieser Tiere zur Folge hatte (196). Ein weiteres Beispiel stellt die AdV-vermittelte PLB-Antisense Expression zur Steigerung der Kontraktilität durch die Arbeitsgruppe von Fechner et al. dar (19). Die Arbeitsgruppe von Poller und Fechner et al. konnte erfolgreich die Suppression des myokardialen Phospholamban über AdV-shRNA darstellen (26).

In der hier vorliegenden Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass durch AdV-vermittelte Suppression von PKI α die Ca²⁺-Aufnahme in das SR neonataler Rattenkardiomyozyten gesteigert werden kann. Die zentrale Rolle der SERCA2a und des Regulatorproteins PLB sind hierbei unumstritten und wurden durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt. Die Bedeutung der Proteinkinase A in der β -adrenergen Signalkaskade und in der Modulation der PLB-SERCA2a Interaktion, wurde in dieser Arbeit ebenfalls unter Beweis gestellt. Es konnte gezeigt werden, dass durch eine AdV-vermittelte Überexpression und Suppression eines hochpotenten Inhibitors der Proteinkinase A die Phosphorylierung von PLB und die Ca²⁺-Aufnahme in das SR signifikant reguliert werden kann.

Bekannt ist, dass eine Phosphorylierung des PLB durch die PKA erfolgen kann und in der Physiologie der Herzmuskelzelle die Hormonantwort über die cAMP Signalkaskade vermittelt. Somit stellt die PKA einen „third messenger“ für die Kontraktilität der Herzmuskelzelle dar. Aufgrund der Bedeutung dieses Mechanismus für die Herzfunktion ist zu vermuten, dass es weitere „third messenger“ gibt, die im Falle einer Mutation dieses

Enzymes dessen Funktion ersetzen. Tatsächlich wird PLB durch mindestens ein weiteres Enzym phosphoryliert, nämlich CalPK.

Durch diese Arbeit konnte belegt werden, dass prinzipiell die Möglichkeit besteht, die Ca^{2+} -Homöostase über den PKI modulierten PKA-PLB Signalweg zu beeinflussen und die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR durch PKI-Suppression zu steigern. Zum Einsatz des Systems *in vivo* sind jedoch wahrscheinlich Vektorsysteme mit multiplen Angriffspunkten (PKI α , PKI γ) notwendig, da es multiple Möglichkeiten der Modulation sowohl auf Ebene der PKA, als auch auf Ebene des PLB gibt und der Effekt einer „Monotherapie“ daher wahrscheinlich eher kurzfristigen Charakter hätte oder vergleichsweise gering ausfallen würde. Weiterhin ist die physiologische Funktion von PKI α nicht vollständig aufgeklärt (121). Negative Effekte auf die Transkription von Zielproteinen, z.B. im Rahmen eines therapeutischen Einsatzes, können nach derzeitigem Stand nicht ausgeschlossen werden. Als Beispiel sei hier die Interaktion von PKI und Raf (in Fibroblasten) mit Beeinflussung des MAPK Signaltransduktionswegs erwähnt (67).

Ein generelles Problem adenoviraler Vektoren im therapeutischen Ansatz beim Menschen ist die Kontrolle der Vektoren *in vivo*. Eine effektive Möglichkeit der intrakorporalen Vektorregulation zur Modulation der Transgenwirkung wäre daher hilfreich. Ein weiteres generelles Problem bei den sogenannten Ca^{2+} -Mobilizern und somit auch bei einem potentiellen Einsatz von PKA-Modulatoren, ist die Arrhythmogenität sowie die Förderung der Apoptose durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Erhöhung (198). Substanzen, die die Affinität von Ca^{2+} zu Troponin C erhöhen, werden Ca^{2+} -Sensitizer genannt und sind in Bezug auf die toxische Wirkung einer intrazellulären „ Ca^{2+} -Überdosierung“ zu bevorzugen (199).

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass diese Arbeit die Modulation des PKA-PKI-Signalweges durch den Proteinkinaseinhibitor α als analytisches und potentiell therapeutisches Werkzeug in der Regulation der myokardialen Ca^{2+} -Homöostase identifiziert. Die Arbeit konnte den Einfluss der beiden konstruierten Vektoren AdVPKI_{sense} und AdVPKI_{antisense} auf die Phosphorylierung des PLB und auf die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR demonstrieren und damit einen potentiellen Weg in der Behandlung der Herzinsuffizienz aufzeigen.

4.7 Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigt die *in vitro* Machbarkeit eines neuen molekularen Ziels in der Therapie der Herzinsuffizienz. Die Modulation der β -adrenergen Signalkaskade in neonatalen Rattenkardiomyozyten über eine PKA/PKI-vermittelte Phosphorylierung von Phospholamban kann das Verständnis der (Patho-)Physiologie des Herzens und das Spektrum der Therapie der Herzinsuffizienz erweitern.

Die Erfolge der medikamentösen Therapie der chronischen Herzinsuffizienz sind begrenzt. Aufgrund des demografischen Wandels sind zudem zunehmende ältere und hochaltrige Menschen von der Herzinsuffizienz betroffen. Die Notwendigkeit der effizienten Behandlung wird daher immer größer. Neben der klinischen Forschung, wird auch die präklinische Forschung sehr stark durch unterschiedlichste nationale und EU-weite Programme gefördert und hat das Ziel sowohl das Verständnis molekularer Mechanismen, als auch neue potentielle Ansätze in der Behandlung der Herzinsuffizienz zu entwickeln (177). Trotz der jüngsten Erfolge in der Anwendung gentherapeutischer Ansätze bei kardiovaskulären Erkrankungen in klinischen Studien der Phase I und II/III, gibt es derzeit weltweit kein zugelassenes gentherapeutisch wirksames Medikament in der Behandlung der Herzinsuffizienz. Für die Behandlung der Herzinsuffizienz ist eine an die Krankheitsgenese und den Patienten angepasste Therapie notwendig. Die Effektivität und Sicherheit wird daher ganz stark davon abhängen, ob die für den individuellen Patienten zugeschnittene Therapie gefunden werden kann. Die Diagnose und Therapie der chronischen Herzinsuffizienz wird sich viel mehr an der (molekularen) Pathogenese orientieren und nicht nur die Symptome behandeln. Das Verständnis über die molekularen Mechanismen wird durch diese und viele weitere Arbeiten erweitert und stellt nur einen kleinen Baustein im Gesamtverständnis dar. Die β -adrenerge Signalkaskade und die Ca^{2+} -Homöostase stellen aktuell die wichtigsten myokardialen Ziele für gentherapeutische Ansätze in der Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz dar (200–202). Die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase während der elektromechanischen Kopplung wird im Wesentlichen über den Ryanodin-Rezeptor (RyR), die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase SERCA2a, dem Regulatorprotein Phospholamban (PLB) und dem sarkolemmalen Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (NCX) vermittelt. Weitere regulierend wirksame Faktoren sind die Protein Phosphatase 1 (PP1), Phosphatase-Inhibitoren, Inhibitor Protein 1/2 (IP-1/2), Parvalbumin und S100A1 (203–210). Als bedeutsam bei der Entstehung und bei dem Progress der Herzinsuffizienz haben sich Modulatoren des β -adrenergen Rezeptors, wie z.B. β -Rezeptor-Antagonisten, herausgestellt. Sie sind bei der Behandlung der Herzinsuffizienz grundsätzlich von Vorteil (211). Die involvierten Rezeptoren und Proteine umfassen unter anderem die β -

Rezeptoren (β_1 -/ β_2) (212,213), die Adenylatcyclase (214), die Proteinkinase A (PKA) und die Calmodulin-Kinase II (CalPK) (215). In den vergangenen Jahren sind einige vielversprechende molekulare Ziele in klinischen Studien untersucht worden (siehe 1.5.3 und 1.5.4). Dazu gehört die erst kürzlich veröffentlichte Studie CUPID, bei der AAV-SERCA2a zur Transduktion von Kardiomyozyten bei Patienten mit Herzinsuffizienz NYHA III/IV benutzt wurde (165). Die hohen Erwartungen aus der Grundlagenforschung können nur in seltenen Fällen in die Routineversorgung kommen, da die meisten Ansätze im Zuassungsprozess eine zu hohe Toxizität aufweisen und/oder eine zu geringe Wirkung. Die Zahl schwerer Nebenwirkungen gentherapeutisch wirksamer Medikamente unterscheidet sich nicht grundlegend von der anderer Therapieverfahren, ist aber aufgrund der Aufmerksamkeit in der Presse präserter. Schwere „unerwünschte Ereignisse“, wie der Tod einer 36-jährigen Probandin mit Rheumatoider Arthritis oder die Leukämiefälle bei 4 von 10 erfolgreich behandelten Patienten mit X-SCID (216), erfordern aber nicht nur ein besseres Monitoring unerwünschter Ereignisse, sondern auch eine Weiterentwicklung der verwendeten Vektorkonstruktionen hinsichtlich höherer Sicherheit und besserer Verträglichkeit (176). Derzeit scheinen vergleichsweise sichere Gentherapieansätze mithilfe Adeno-assoziiierter Vektoren wie z.B. AAV-SERCA2a möglich zu sein (165). Forschungsbedarf sieht daher die Deutsche Forschungsgemeinschaft in folgenden Punkten (177):

- Verbesserung von Effizienz und Sicherheit der Gentransfer-Vektoren
- Optimierung der Spezifität der verwendeten Viren für definierte Zielzellen zum Einsatz in der in vivo-Gentherapie
- Untersuchung des Verbleibs genmodifizierter Zellen im Patienten
- Erforschung der molekularen Ursachen von Nebenwirkungen.

5 Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist die zweithäufigste Aufnahmediagnose im Krankenhaus und die häufigste Todesursache in Deutschland (1,2). Die mangelnde Fähigkeit des Herzens, das vom Körper benötigte Blutvolumen innerhalb der erforderlichen Zeit aufzubringen, wird auf eine reduzierte Kontraktionskraft und eine verzögerte Relaxation des Herzens zurückgeführt (11–13). Sowohl im Tierversuch als auch bei humanen insuffizienten Herzen konnte gezeigt werden, dass eine verzögerte diastolische Relaxation des Herzens Folge einer verminderten Aufnahme des zytosolischen Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) durch die sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) ist (11–13). Phospholamban (PLB) ist ein potenter Inhibitor der SERCA2a (14,15) und kann durch Phosphorylierung z.B. infolge einer β -adrenergen Stimulation oder durch erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrationen seine inhibitorische Wirkung auf die SERCA2a verlieren. Die Folge ist eine erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR, was zu einer beschleunigten Relaxation und letztlich auch zu einer erhöhten Myokardkontraktilität führt (18,27). Olsen und Uhler konnten 1991 zeigen, dass es prinzipiell möglich ist, mit Hilfe eines Plasmid-Vektors (CMV-Neo) PKI α in COS Zellen zu exprimieren (186). Weiterhin zeigte die Arbeitsgruppe, dass durch Überexpression von PKI α die Kinaseaktivität der katalytischen Untereinheiten der PKA, C α und C β , mit gleicher Effizienz inhibiert werden kann. Ziel dieser Arbeit war es, durch Inhibierung der PKI α -Expression in neonatalen Rattenkardiomyozyten (nRCM) die Hemmwirkung auf die PKA zu reduzieren und somit die Phosphorylierung von PLB zu steigern. Infolge sollte der Anstieg der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration als Maß für die diastolische Relaxation und Kontraktilität des Myokards gesteigert werden.

Es wurden zwei adenovirale Vektoren, AdVPKIsense und AdVPKIantisense, aus dem E1-deletierten Adenovirus 5 Genom mit einem Insert aus PKI α cDNA in sense und antisense Orientierung konstruiert. nRCM wurden mit AdVPKIsense und AdVPKIantisense je 50000 Partikel/Zelle transfiziert. Zum Nachweis der vektorspezifischen PKI mRNA Expression wurde ein Northern Blot mit einer PKI spezifischen ssDNA-Sonde durchgeführt. Der Proteinnachweis erfolgte im Anschluss an die Konzentrationsbestimmung nach Lowry mittels Western Blot. Durch Verwendung des Anti-PS16 Antikörpers konnte die PLB Konzentration bestimmt werden. Der Anti-PKI-AK diente der Detektion von PKI α . Zur Bestimmung der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration wurde der SERCA2a-katalysierte ATP-abhängige Transport von Ca^{2+} in die Membranvesikel des SR der nRCM durch Oxalat-stimulierte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme gemessen (179).

Die korrekte Insertion der PKI α cDNA in Sense- und Antisense-Orientierung konnte mittels DNA Sequenzanalyse nachgewiesen werden. Dabei war PKI α im konstruierten Vektor 100% homolog zu humanem PKI α aus der Neuroblastoma Zelllinie. Der open reading frame betrug 230 bp (182). PKI mRNA konnte mit einer Signalanreicherung bei 0,6-0,8 kb im Northern Blot detektiert werden. Außerdem gelang der Nachweis von endogen synthetisierter PKI mRNA bei 4,4 kb. Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Transfektion von nRCM mit AdVPKIsense zu einer signifikanten Abnahme an phosphoryliertem PLB (pPLB) im Vergleich zur Kontrolle führte. AdVPKIantisense transfizierte nRCM zeigten eine erhöhte Konzentration von pPLB im Vergleich zum Kontrollvektor. Von besonderer Bedeutung war auch die Tatsache, dass sich der Effekt des AdVPKIsense konzentrationsabhängig durch AdVPKIantisense antagonisieren ließ. Ferner konnte gezeigt werden, dass Isoproterenol die Phosphorylierung von PLB unabhängig von den Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense stimuliert, wodurch der Effekt der Vektoren minimiert wurde. Schließlich konnte erstmalig demonstriert werden, dass eine AdV-vermittelte Suppression von PKI α bei AdVPKIantisense transfizierten nRCM eine erhöhte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in das SR zur Folge hat. Die erhöhte Ca^{2+} -Aufnahme bei PKI α -Suppression ließ sich durch Überexpression von PKI α antagonisieren.

Die Ergebnisse verdeutlichen, dass es möglich ist, die PLB-abhängige Ca^{2+} -Aufnahme in das SR über den PKI-PKA Signalweg zu regulieren und durch die adenoviralen Vektoren AdVPKIsense und AdVPKIantisense konzentrationsabhängig moduliert werden kann. Die AdV-vermittelte Suppression von PKI stellt ein weiteres vielversprechendes molekulares Ziel in der β -adrenergen Signalkaskade dar. Weiterführende Untersuchungen zu den Auswirkungen einer PKI-Downregulation auf subzelluläre Prozesse, sowie in vivo-Untersuchungen sind notwendig, um diesen neuen Ansatz als potentiell therapeutische Option bei der Behandlung der Herzinsuffizienz zu verifizieren.

6 Literaturverzeichnis

1. DESTATIS. Diagnosedaten der Patienten und Patientinnen in Krankenhäusern." Statistisches Bundesamt Fachserie. 2006;12(21):25.
2. DESTATIS. Sterbefälle 2005. 2007;Statistisches Jahrbuch:242–4.
3. Wencker D, Chandra M, Nguyen K, Miao W, Garantziotis S, Factor SM, et al. A mechanistic role for cardiac myocyte apoptosis in heart failure. *J. Clin. Invest* [Internet]. 2003 May [cited 2011 Mar 9];111(10):1497–504. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12750399>
4. Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ. Res* [Internet]. 2003 Feb 7 [cited 2011 Mar 1];92(2):139–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12574141>
5. Danial N. Cell Death Critical Control Points. *Cell* [Internet]. 2004 Jan [cited 2011 Feb 27];116(2):205–19. Available from: <http://www.cell.com/retrieve/pii/S0092867404000467>
6. Leri A, Claudio PP, Li Q, Wang X, Reiss K, Wang S, et al. Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local renin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell. *J. Clin. Invest* [Internet]. 1998 Apr 1 [cited 2011 Mar 1];101(7):1326–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525975>
7. Foo RS-Y, Mani K, Kitsis RN. Death begets failure in the heart. *J. Clin. Invest* [Internet]. 2005 Mar [cited 2011 Feb 27];115(3):565–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15765138>
8. Gwathmey JK, Hajjar RJ. Relation between steady-state force and intracellular $[Ca^{2+}]$ in intact human myocardium. Index of myofibrillar responsiveness to Ca^{2+} . *Circulation* [Internet]. 1990 Oct [cited 2011 Feb 27];82(4):1266–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2205417>
9. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Meyer M, Pieske B, Holtz J, et al. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res* [Internet]. 1994 Sep [cited 2011 Feb 27];75(3):434–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8062417>
10. Mulieri LA, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen PD, Alpert NR. Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* [Internet]. 1992 May [cited 2011 Mar 1];85(5):1743–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1572031>
11. de la Bastie D, Levitsky D, Rappaport L, Mercadier J, Marotte F, Wisnewsky C, et al. Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca^{2+} -ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ Res* [Internet]. 1990 Feb 1 [cited 2011 Feb 27];66(2):554–64. Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/66/2/554>

12. Mercadier JJ, Lompré AM, Duc P, Boheler KR, Fraysse JB, Wisnewsky C, et al. Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure. *J. Clin. Invest* [Internet]. 1990 Jan [cited 2011 Mar 1];85(1):305–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2136864>
13. Arai M, Alpert N, MacLennan D, Barton P, Periasamy M. Alterations in sarcoplasmic reticulum gene expression in human heart failure. A possible mechanism for alterations in systolic and diastolic properties of the failing myocardium. *Circ Res* [Internet]. 1993 Feb 1 [cited 2011 Feb 27];72(2):463–9. Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/72/2/463>
14. Kim HW, Steenaart NA, Ferguson DG, Kranias EG. Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca²⁺(+)-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1990 Jan 25 [cited 2011 Feb 27];265(3):1702–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2136856>
15. Tada M, Kirchberger MA, Repke DI, Katz AM. The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1974 Oct 10 [cited 2011 Mar 9];249(19):6174–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4371608>
16. Kim CS, Matsumori A, Goldberg L, Doye AA, McCoy Q, Gwathmey JK. Effects of pranidipine, a calcium channel antagonist, in an avian model of heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* [Internet]. 1999 Sep [cited 2011 Mar 10];13(5):455–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10547227>
17. He H, Giordano FJ, Hilal-Dandan R, Choi DJ, Rockman HA, McDonough PM, et al. Overexpression of the rat sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene in the heart of transgenic mice accelerates calcium transients and cardiac relaxation. *J. Clin. Invest* [Internet]. 1997 Jul 15 [cited 2011 Mar 10];100(2):380–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218515>
18. Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, et al. Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ. Res* [Internet]. 1994 Sep [cited 2011 Mar 1];75(3):401–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8062415>
19. Eizema K, Fechner H, Bezstarosti K, Schneider-Rasp S, van der Laarse A, Wang H, et al. Adenovirus-based phospholamban antisense expression as a novel approach to improve cardiac contractile dysfunction: comparison of a constitutive viral versus an endothelin-1-responsive cardiac promoter. *Circulation* [Internet]. 2000 May 9 [cited 2011 Jul 24];101(18):2193–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10801761>
20. Hoshijima M, Ikeda Y, Iwanaga Y, Minamisawa S, Date M-o, Gu Y, et al. Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat Med* [Internet]. 2002 [cited 2010 Apr 18];8(8):864–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nm739>

21. Clarke DM, Loo TW, Inesi G, MacLennan DH. Location of high affinity Ca²⁺-binding sites within the predicted transmembrane domain of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase. *Nature* [Internet]. 1989 Jun 8 [cited 2011 Mar 10];339(6224):476–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2524669>
22. Takahashi T, Tang T, Lai NC, Roth DM, Rebolledo B, Saito M, et al. Increased cardiac adenylyl cyclase expression is associated with increased survival after myocardial infarction. *Circulation* [Internet]. 2006 Aug 1 [cited 2011 Mar 9];114(5):388–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16864723>
23. Rebolledo B, Lai NC, Gao MH, Takahashi T, Roth DM, Baird SM, et al. Adenylylcyclase Gene Transfer Increases Function of the Failing Heart. *Human Gene Therapy* [Internet]. 2006;17(10):1043–8. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/hum.2006.17.1043?cookieSet=1&journalCode=hum>
24. Maurice JP, Hata JA, Shah AS, White DC, McDonald PH, Dolber PC, et al. Enhancement of cardiac function after adenoviral-mediated in vivo intracoronary beta₂-adrenergic receptor gene delivery. *J. Clin. Invest* [Internet]. 1999 Jul [cited 2011 Jul 24];104(1):21–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10393695>
25. Sakata S, Lebeche D, Sakata Y, Sakata N, Chemaly ER, Liang L, et al. Transcoronary gene transfer of SERCA2a increases coronary blood flow and decreases cardiomyocyte size in a type 2 diabetic rat model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* [Internet]. 2007 Feb [cited 2011 Jul 24];292(2):H1204–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17012346>
26. Suckau L, Fechner H, Chemaly E, Krohn S, Hadri L, Kocksammer J, et al. Long-Term Cardiac-Targeted RNA Interference for the Treatment of Heart Failure Restores Cardiac Function and Reduces Pathological Hypertrophy. *Circulation* [Internet]. 2009 Mar 10;119(9):1241–52. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/119/9/1241>
27. Kadambi VJ, Ponniah S, Harrer JM, Hoit BD, Dorn GW, Walsh RA, et al. Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J. Clin. Invest* [Internet]. 1996 Jan 15 [cited 2011 Feb 27];97(2):533–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8567978>
28. Takahashi T, Allen PD, Lacro RV, Marks AR, Dennis AR, Schoen FJ, et al. Expression of dihydropyridine receptor (Ca²⁺ channel) and calsequestrin genes in the myocardium of patients with end-stage heart failure. *J. Clin. Invest* [Internet]. 1992 Sep [cited 2011 Mar 9];90(3):927–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1326001>
29. Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, et al. Gene expression of the cardiac Na⁽⁺⁾-Ca²⁺ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ. Res* [Internet]. 1994 Sep [cited 2011 Mar 9];75(3):443–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8062418>

30. Meyer M, Schillinger W, Pieske B, Holubarsch C, Heilmann C, Posival H, et al. Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation* [Internet]. 1995 Aug 15 [cited 2011 Mar 1];92(4):778–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7641356>
31. Movsesian MA, Karimi M, Green K, Jones LR. Ca(2+)-transporting ATPase, phospholamban, and calsequestrin levels in nonfailing and failing human myocardium. *Circulation* [Internet]. 1994 Aug [cited 2011 Mar 10];90(2):653–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8044934>
32. Linck B, Bokn k P, Eschenhagen T, M ller FU, Neumann J, Nose M, et al. Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR-Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc. Res* [Internet]. 1996 Apr [cited 2011 Mar 1];31(4):625–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8689655>
33. Schwinger RH, Böhm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, et al. Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca²⁺ uptake and Ca(2+)-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* [Internet]. 1995 Dec 1 [cited 2011 Mar 9];92(11):3220–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7586307>
34. Tsien RW. Cyclic AMP and contractile activity in heart. *Adv Cyclic Nucleotide Res* [Internet]. 1977 [cited 2011 Mar 9];8:363–420. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21550>
35. Sutherland EW, Rall TW. The Relation of Adenosine-3', 5'-Phosphate and Phosphorylase to the Actions of Catecholamines and other Hormones. *Pharmacological Reviews* [Internet]. 1960;12(3):265–99. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/12/3/265.short>
36. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L. *Biochemistry: International Edition* [Internet]. Palgrave Macmillan; 2006. Available from: <http://www.amazon.de/dp/071676766X>
37. Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu. Rev. Biochem* [Internet]. 1979 [cited 2011 Feb 27];48:923–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/38740>
38. Roesler WJ, Vandenbark GR, Hanson RW. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1988 Jul 5 [cited 2011 Mar 9];263(19):9063–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2837474>
39. Boynton AL, Whitfield JF, Kleine LP. Ca²⁺/Phospholipid-dependent protein kinase activity correlates to the ability of transformed liver cells to proliferate in Ca²⁺-deficient medium. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 1983 Aug 30 [cited 2011 Feb 27];115(1):383–90. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-4F03B28-20/2/374ff62a53cbe73fb1f4991321f102bd>

40. Liu AY. Differentiation-specific increase of cAMP-dependent protein kinase in the 3T3-L1 cells. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1982 Jan 10 [cited 2011 Mar 1];257(1):298–306. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6273430>
41. Tash JS, Kakar SS, Means AR. Flagellar motility requires the cAMP-dependent phosphorylation of a heat-stable NP-40-soluble 56 kd protein, axokinin. *Cell* [Internet]. 1984 Sep [cited 2011 Mar 9];38(2):551–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088085>
42. Li M, West JW, Numann R, Murphy BJ, Scheuer T, Catterall WA. Convergent regulation of sodium channels by protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase. *Science* [Internet]. 1993 Sep 10 [cited 2011 Mar 1];261(5127):1439–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8396273>
43. Lai NC, Tang T, Gao MH, Saito M, Takahashi T, Roth DM, et al. Activation of Cardiac Adenylyl Cyclase Expression Increases Function of the Failing Ischemic Heart in Mice. *J Am Coll Cardiol* [Internet]. 2008 Apr;51(15):1490–7. Available from: <http://content.onlinejacc.org/cgi/content/abstract/51/15/1490>
44. Reimann EM, Walsh DA, Krebs EG. Purification and properties of rabbit skeletal muscle adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1971 Apr 10 [cited 2011 Mar 1];246(7):1986–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4324558>
45. Corbin JD, Keely SL, Park CR. The distribution and dissociation of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in adipose, cardiac, and other tissues. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1975 Jan 10 [cited 2011 Feb 27];250(1):218–25. Available from: <http://www.jbc.org/content/250/1/218.abstract>
46. Lee DC, Carmichael DF, Krebs EG, McKnight GS. Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1983 Jun 1 [cited 2011 Mar 1];80(12):3608–12. Available from: <http://www.pnas.org/content/80/12/3608.abstract>
47. Sandberg M, Taskén K, Oyen O, Hansson V, Jahnsen T. Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for a type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase from human testis. *Biochem. Biophys. Res. Commun* [Internet]. 1987 Dec 31 [cited 2011 Mar 9];149(3):939–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3426618>
48. Clegg CH, Cadd GG, McKnight GS. Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1988 Jun 1 [cited 2011 Feb 27];85(11):3703–7. Available from: <http://www.pnas.org/content/85/11/3703.abstract>
49. Solberg R, Taskén K, Keiserud A, Jahnsen T. Molecular cloning, cDNA structure and tissue-specific expression of the human regulatory subunit RI beta of cAMP-dependent protein kinases. *Biochem. Biophys. Res. Commun* [Internet]. 1991 Apr 15 [cited 2011 Mar 9];176(1):166–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1708242>

50. Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. *Front. Biosci* [Internet]. 2000 Aug 1 [cited 2011 Mar 9];5:D678–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10922298>
51. Cadd G. Distinct patterns of cAMP-dependent protein kinase gene expression in mouse brain. *Neuron* [Internet]. 1989 Jul [cited 2011 Feb 27];3(1):71–9. Available from: <http://www.cell.com/neuron/retrieve/pii/0896627389901165>
52. Cummings DE, Brandon EP, Planas JV, Motamed K, Idzerda RL, McKnight GS. Genetically lean mice result from targeted disruption of the RII[beta] subunit of protein kinase A. *Nature* [Internet]. 1996 [cited 2011 Feb 27];382(6592):622–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/382622a0>
53. Taskén K, Kvale D, Hansson V, Jahnsen T. Protein kinase C activation selectively increases mRNA levels for one of the regulatory subunits (RI[alpha]) of cAMP-dependent protein kinases in HT-29 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 1990 Oct 30 [cited 2010 Apr 25];172(2):409–14. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-4F031HH-302/2/2f9c363fe72064c348617a833bdb774f>
54. Scott JD, Stofko RE, McDonald JR, Comer JD, Vitalis EA, Mangili JA. Type II regulatory subunit dimerization determines the subcellular localization of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1990 Dec 15 [cited 2011 Mar 9];265(35):21561–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2147685>
55. Leiser M, Rubin CS, Erlichman J. Differential binding of the regulatory subunits (RII) of cAMP-dependent protein kinase II from bovine brain and muscle to RII-binding proteins. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1986 Feb 5 [cited 2011 Mar 1];261(4):1904–8. Available from: <http://www.jbc.org/content/261/4/1904.abstract>
56. Lygren B, Taskén K. The potential use of AKAP18delta as a drug target in heart failure patients. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2008 Aug [cited 2011 Mar 1];8(8):1099–108. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18613762>
57. Lygren B, Carlson CR, Santamaria K, Lissandron V, McSorley T, Litzenberg J, et al. AKAP complex regulates Ca²⁺ re-uptake into heart sarcoplasmic reticulum. *EMBO Rep* [Internet]. 2007 Nov [cited 2011 Mar 1];8(11):1061–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17901878>
58. Cheng X, Ma Y, Moore M, Hemmings BA, Taylor SS. Phosphorylation and activation of cAMP-dependent protein kinase by phosphoinositide-dependent protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1998 [cited 2011 Feb 27];95(17):9849–54. Available from: <http://www.pnas.org/content/95/17/9849.abstract>
59. Yonemoto W, McGlone ML, Grant B, Taylor SS. Autophosphorylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in *Escherichia coli*. *Protein Eng* [Internet]. 1997 Aug [cited 2011 Mar 9];10(8):915–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9415441>

60. Ono K, Fozzard HA. Phosphorylation restores activity of L-type calcium channels after rundown in inside-out patches from rabbit cardiac cells. *J. Physiol. (Lond.)* [Internet]. 1992 Aug [cited 2011 Mar 1];454:673–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1335510>
61. Hain J, Onoue H, Mayrleitner M, Fleischer S, Schindler H. Phosphorylation modulates the function of the calcium release channel of sarcoplasmic reticulum from cardiac muscle. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1995 Feb 3 [cited 2011 Feb 27];270(5):2074–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7836435>
62. England PJ. Studies on the phosphorylation of the inhibitory subunit of troponin during modification of contraction in perfused rat heart. *Biochem J.* 1976 Nov 15;160(2):295–304.
63. Tsien RW, Bean BP, Hess P, Lansman JB, Nilius B, Nowycky MC. Mechanisms of calcium channel modulation by beta-adrenergic agents and dihydropyridine calcium agonists. *J. Mol. Cell. Cardiol* [Internet]. 1986 Jul [cited 2011 Mar 10];18(7):691–710. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2427730>
64. Zhang R, Zhao J, Potter JD. Phosphorylation of Both Serine Residues in Cardiac Troponin I Is Required to Decrease the Ca Affinity of Cardiac Troponin C. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1995 Dec 22 [cited 2010 Apr 18];270(51):30773–80. Available from: <http://www.jbc.org/content/270/51/30773.abstract>
65. Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell* [Internet]. 1989 Nov 17 [cited 2011 Feb 27];59(4):675–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2573431>
66. Houslay MD. “Crosstalk”: a pivotal role for protein kinase C in modulating relationships between signal transduction pathways. *Eur. J. Biochem* [Internet]. 1991 Jan 1 [cited 2011 Feb 27];195(1):9–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1846812>
67. Cook SJ, McCormick F. Inhibition by cAMP of Ras-dependent activation of Raf. *Science* [Internet]. 1993 Nov 12 [cited 2011 Mar 10];262(5136):1069–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7694367>
68. Gómez AM, Valdivia HH, Cheng H, Lederer MR, Santana LF, Cannell MB, et al. Defective excitation-contraction coupling in experimental cardiac hypertrophy and heart failure. *Science* [Internet]. 1997 May 2 [cited 2011 Feb 27];276(5313):800–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9115206>
69. Li GR, Yang B, Feng J, Bosch RF, Carrier M, Nattel S. Transmembrane I_{Ca} contributes to rate-dependent changes of action potentials in human ventricular myocytes. *Am. J. Physiol* [Internet]. 1999 Jan [cited 2011 Mar 1];276(1 Pt 2):H98–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887022>
70. Sipido KR, Stankovicova T, Flameng W, Vanhaecke J, Verdonck F. Frequency dependence of Ca²⁺ release from the sarcoplasmic reticulum in human ventricular myocytes from end-stage heart failure. *Cardiovasc. Res* [Internet]. 1998 Feb [cited 2011 Mar 9];37(2):478–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614502>

71. Pieske B, Maier LS, Bers DM, Hasenfuss G. Ca²⁺ handling and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ content in isolated failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res* [Internet]. 1999 Jul 9 [cited 2011 Mar 1];85(1):38–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10400909>
72. Mattiello JA, Margulies KB, Jeevanandam V, Houser SR. Contribution of reverse-mode sodium-calcium exchange to contractions in failing human left ventricular myocytes. *Cardiovasc. Res* [Internet]. 1998 Feb [cited 2011 Mar 1];37(2):424–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9614497>
73. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM. Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *The Journal of Physiology* [Internet]. 1994 Apr 15 [cited 2011 Feb 27];476(2):279–93. Available from: <http://jpp.physoc.org/content/476/2/279.abstract>
74. Brillantes AM, Allen P, Takahashi T, Izumo S, Marks AR. Differences in cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) expression in myocardium from patients with end-stage heart failure caused by ischemic versus dilated cardiomyopathy. *Circ. Res* [Internet]. 1992 Jul [cited 2011 Feb 27];71(1):18–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1318794>
75. Schmidt U, Hajjar RJ, Kim CS, Lebeche D, Doye AA, Gwathmey JK. Human heart failure: cAMP stimulation of SR Ca(2+)-ATPase activity and phosphorylation level of phospholamban. *Am. J. Physiol* [Internet]. 1999 Aug [cited 2011 Mar 9];277(2 Pt 2):H474–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444471>
76. Schwinger RH, Munch G, Bolck B, Karczewski P, Krause EG, Erdmann E. Reduced Ca(2+)-sensitivity of SERCA 2a in failing human myocardium due to reduced serin-16 phospholamban phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:479–91.
77. Schillinger W, Meyer M, Kuwajima C, Mikoshiba K, Just H, Hasenfuss G. Unaltered ryanodine receptor protein levels in ischemic cardiomyopathy. *Mol. Cell. Biochem* [Internet]. 1996 Aug [cited 2011 Mar 9];160-161:297–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8901486>
78. Go LO, Moschella MC, Watras J, Handa KK, Fyfe BS, Marks AR. Differential regulation of two types of intracellular calcium release channels during end-stage heart failure. *J. Clin. Invest* [Internet]. 1995 Feb [cited 2011 Feb 27];95(2):888–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7860772>
79. Mewes T, Ravens U. L-type calcium currents of human myocytes from ventricle of non-failing and failing hearts and from atrium. *J. Mol. Cell. Cardiol* [Internet]. 1994 Oct [cited 2011 Mar 1];26(10):1307–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7869391>
80. Feldman A, Weinberg E, Ray P, Lorell B. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res* [Internet]. 1993 Jul 1 [cited 2011 Feb 27];73(1):184–92. Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/73/1/184>

81. Schmidt U, Hajjar RJ, Helm PA, Kim CS, Doye AA, Gwathmey JK. Contribution of abnormal sarcoplasmic reticulum ATPase activity to systolic and diastolic dysfunction in human heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol* [Internet]. 1998 Oct [cited 2011 Mar 9];30(10):1929–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9799647>
82. Movsesian MA, Bristow MR, Krall J. Ca²⁺ uptake by cardiac sarcoplasmic reticulum from patients with idiopathic dilated cardiomyopathy. *Circ. Res* [Internet]. 1989 Oct [cited 2011 Mar 1];65(4):1141–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2551528>
83. Flesch M, Schwinger RHG, Schiffer F, Frank K, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F, et al. Evidence for Functional Relevance of an Enhanced Expression of the Na⁺-Ca²⁺ Exchanger in Failing Human Myocardium. *Circulation* [Internet]. 1996 Sep 1 [cited 2011 Feb 27];94(5):992–1002. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/94/5/992>
84. Komuro I, Wenninger KE, Philipson KD, Izumo S. Molecular cloning and characterization of the human cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 1992 May 15 [cited 2011 Feb 27];89(10):4769–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1374913>
85. Hartzell HC. Regulation of cardiac ion channels by catecholamines, acetylcholine and second messenger systems. *Prog. Biophys. Mol. Biol* [Internet]. 1988 [cited 2011 Feb 27];52(3):165–247. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2477870>
86. Brodde O-E, Michel MC, Zerkowski H-R. Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovascular Research* [Internet]. 1995 Oct 1 [cited 2011 Feb 27];30(4):570–84. Available from: <http://cardiovascres.oxfordjournals.org/content/30/4/570.short>
87. Hicks MJ, Shigekawa M, Katz AM. Mechanism by which cyclic adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase stimulates calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Circ. Res* [Internet]. 1979 Mar [cited 2011 Feb 27];44(3):384–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/216505>
88. Kirchberger MA, Tada M, Katz AM. Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1974 Oct 10 [cited 2011 Feb 27];249(19):6166–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4371435>
89. Kranias EG. Regulation of calcium transport by protein phosphatase activity associated with cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1985 Sep 15 [cited 2011 Feb 27];260(20):11006–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2993298>
90. Fabiato A. Time and calcium dependence of activation and inactivation of calcium-induced release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of a skinned canine cardiac Purkinje cell. *The Journal of General Physiology* [Internet]. 1985 Feb 1 [cited 2011 Feb 27];85(2):247–89. Available from: <http://jgp.rupress.org/content/85/2/247.abstract>

91. Rüegg JC. Effects of new inotropic agents on Ca⁺⁺ sensitivity of contractile proteins. *Circulation* [Internet]. 1986 Mar [cited 2011 Mar 9];73(3 Pt 2):III78–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2935329>
92. Fleischer S, Inui M. Biochemistry and biophysics of excitation-contraction coupling. *Annu Rev Biophys Biophys Chem*. 1989;18:333–64.
93. Hymel L, Inui M, Fleischer S, Schindler H. Purified ryanodine receptor of skeletal muscle sarcoplasmic reticulum forms Ca²⁺-activated oligomeric Ca²⁺ channels in planar bilayers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 1988 Jan [cited 2011 Feb 27];85(2):441–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2448775>
94. Inui M, Saito A, Fleischer S. Isolation of the ryanodine receptor from cardiac sarcoplasmic reticulum and identity with the feet structures. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1987 Nov 15 [cited 2011 Feb 27];262(32):15637–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3680217>
95. Lai FA, Anderson K, Rousseau E, Liu Q-Y, Meissner G. Evidence for a Ca²⁺ channel within the ryanodine receptor complex from cardiac sarcoplasmic reticulum. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 1988 Feb 29 [cited 2011 Mar 1];151(1):441–9. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-4DYN48C-2BJ/2/330de97c7ef2195d192a4b70caf96b22>
96. Witcher DR, Kovacs RJ, Schulman H, Cefali DC, Jones LR. Unique phosphorylation site on the cardiac ryanodine receptor regulates calcium channel activity. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1991 Jun 15 [cited 2011 Mar 9];266(17):11144–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1645727>
97. Yoshida A, Takahashi M, Imagawa T, Shigekawa M, Takisawa H, Nakamura T. Phosphorylation of ryanodine receptors in rat myocytes during beta-adrenergic stimulation. *J. Biochem* [Internet]. 1992 Feb [cited 2011 Mar 9];111(2):186–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1349013>
98. Cox JA. Sequential events in calmodulin on binding with calcium and interaction with target enzymes. *Fed. Proc* [Internet]. 1984 Dec [cited 2011 Feb 27];43(15):3000–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6500074>
99. Klee CB, Vanaman TC. Calmodulin. *Adv. Protein Chem* [Internet]. 1982 [cited 2011 Feb 27];35:213–321. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6762067>
100. Meissner G. Evidence of a role for calmodulin in the regulation of calcium release from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. *Biochemistry* [Internet]. 1986 Jan 14 [cited 2011 Mar 1];25(1):244–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3754148>
101. Ikeda Y, Hoshijima M, Chien KR. Toward Biologically Targeted Therapy of Calcium Cycling Defects in Heart Failure. *Physiology* [Internet]. 2008 Feb 1;23(1):6–16. Available from: <http://www.physiologyonline.org/content/23/1/6.abstract>

102. Macdougall LK, Jones LR, Cohen P. Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *European Journal of Biochemistry* [Internet]. 1991;196(3):725–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1432-1033.1991.tb15871.x>
103. Posner JB, Hammermeister KE, Bratvold GE, Krebs EG. The Assay of Adenosine-3',5'-Phosphate in Skeletal Muscle. *Biochemistry* [Internet]. 1964 Aug [cited 2011 Mar 1];3:1040–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14220662>
104. Scott JD, Fischer EH, Takio K, Demaille JG, Krebs EG. Amino acid sequence of the heat-stable inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase from rabbit skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 1985 Sep [cited 2011 Mar 9];82(17):5732–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3898070>
105. Demaille JG, Peters KA, Fischer EH. Isolation and properties of the rabbit skeletal muscle protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate dependent protein kinases. *Biochemistry* [Internet]. 1977 Jul 1 [cited 2011 Feb 27];16(14):3080–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/bi00633a006>
106. Demaille JG, Ferraz C, Fischer EH. The protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases the NH₂-terminal portion of the peptide chain contains the inhibitory site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* [Internet]. 1979 Aug 22 [cited 2011 Feb 27];586(2):374–83. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6T1W-47NVR31-KG/2/cf0aab25776e4aa108bc57e36cca93e5>
107. Whitehouse S, McPherson JM, Walsh DA. Characterization of multiple charge isomers of the inhibitor protein of the cyclic AMP-dependent protein kinase from bovine heart and rabbit skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys*. 1980;203:734–43.
108. Cheng HC, Kemp BE, Pearson RB, Smith AJ, Misconi L, Van Patten SM, et al. A potent synthetic peptide inhibitor of the cAMP-dependent protein kinase. *Journal of Biological Chemistry* [Internet]. 1986 Jan 25 [cited 2011 Feb 27];261(3):989–92. Available from: <http://www.jbc.org/content/261/3/989.abstract>
109. Walsh MP. The Ayerst Award Lecture 1990. Calcium-dependent mechanisms of regulation of smooth muscle contraction. *Biochem. Cell Biol* [Internet]. 1991 Dec [cited 2011 Mar 13];69(12):771–800. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1818584>
110. Hauer JA, Taylor SS, Johnson DA. Binding-dependent disorder-order transition in PKI alpha: a fluorescence anisotropy study. *Biochemistry* [Internet]. 1999 May 25 [cited 2011 Feb 27];38(21):6774–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10346898>
111. Olsen SR, Uhler MD. Affinity purification of the C alpha and C beta isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1989 Nov 5 [cited 2011 Mar 1];264(31):18662–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2553718>

112. Van Patten SM, Ng DC, Th'ng JP, Angelos KL, Smith AJ, Walsh DA. Molecular cloning of a rat testis form of the inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 1991 Jun 15 [cited 2011 Mar 9];88(12):5383–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2052616>
113. Collins SP, Uhler MD. Characterization of PKIgamma, a novel isoform of the protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1997 Jul 18 [cited 2011 Jul 24];272(29):18169–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218452>
114. Scarpetta MA, Uhler MD. Evidence for two additional isoforms of the endogenous protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase in mouse. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1993 May 25 [cited 2011 Mar 9];268(15):10927–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684369>
115. Van Patten SM, Howard P, Walsh DA, Maurer RA. The alpha- and beta-isoforms of the inhibitor protein of the 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase: characteristics and tissue- and developmental-specific expression. *Mol. Endocrinol* [Internet]. 1992 Dec [cited 2011 Mar 9];6(12):2114–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1491692>
116. Beale EG, Dedman JR, Means AR. Isolation and regulation of the protein kinase inhibitor and the calcium-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase regulator in the Sertoli cell-enriched testis. *Endocrinology* [Internet]. 1977 Nov [cited 2011 Jul 24];101(5):1621–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/199423>
117. Beale EG, Dedman JR, Means AR. Isolation and characterization of a protein from rat testis which inhibits cyclic AMP-dependent protein kinase and phosphodiesterase. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1977 Sep 25 [cited 2011 Jul 24];252(18):6322–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/197087>
118. Roskoski R, Frederick CE. Subcellular distribution of a heat-stable protein inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase in rat brain. *J. Neurochem* [Internet]. 1977 Mar [cited 2011 Mar 9];28(3):543–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/192852>
119. Kwast-Welfeld J, Kaniuga Z. A protein kinase inhibitory modulator in liver of developing chick. *International Journal of Biochemistry* [Internet]. 1978 [cited 2011 Mar 1];9(5):331–7. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B73GR-47FWSNT-14H/2/5d0eb3581285eb29ddc84daef230d12a>
120. Tash JS, Welsh MJ, Means AR. Regulation of protein kinase inhibitor by follicle-stimulating hormone in Sertoli cells in vitro. *Endocrinology* [Internet]. 1981 Feb [cited 2011 Mar 9];108(2):427–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6256152>
121. Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell* [Internet]. 1995 Aug 11 [cited 2011 Mar 13];82(3):463–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7634336>

122. Wen W, Harootunian AT, Adams SR, Feramisco J, Tsien RY, Meinkoth JL, et al. Heat-stable inhibitors of cAMP-dependent protein kinase carry a nuclear export signal. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1994 Dec 23 [cited 2011 Mar 9];269(51):32214–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7798221>
123. Van Patten SM, Heisermann GJ, Cheng HC, Walsh DA. Tyrosine kinase catalyzed phosphorylation and inactivation of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1987 Mar 5 [cited 2011 Mar 9];262(7):3398–403. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2434500>
124. Ding B, Abe J, Wei H, Xu H, Che W, Aizawa T, et al. A positive feedback loop of phosphodiesterase 3 (PDE3) and inducible cAMP early repressor (ICER) leads to cardiomyocyte apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:14771–6.
125. Ding B, Abe J-ichi, Wei H, Huang Q, Walsh RA, Molina CA, et al. Functional Role of Phosphodiesterase 3 in Cardiomyocyte Apoptosis: Implication in Heart Failure. *Circulation* [Internet]. 2005 May 17 [cited 2011 Feb 27];111(19):2469–76. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/111/19/2469>
126. Tash JS, Welsh MJ, Means AR. Protein inhibitor of cAMP-dependent protein kinase: production and characterization of antibodies and intracellular localization. *Cell* [Internet]. 1980 Aug [cited 2011 Mar 9];21(1):57–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6250718>
127. Browne CL, Bird ML, Bower W. Effect of inhibition of the catalytic activity of cyclic amp-dependent protein kinase on mitosis in PtK1 cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* [Internet]. 1987 [cited 2011 Feb 27];7(3):248–57. Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cm.970070307/abstract>
128. Costa M. Endogenous protein kinase inhibitor levels regulate changes in specific activity of protein kinase in quiescent cells stimulated to proliferate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* [Internet]. 1977 Oct 24 [cited 2011 Feb 27];78(4):1311–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/B6WBK-4DNHXSH-P9/2/2fbf5ccb84982fca7a652819e36bd027>
129. Rudack-Garcia D, Henry HL. Effect of vitamin D status on cyclic AMP-dependent protein kinase activity and its heat-stable inhibitor in chick kidney. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1981 Nov 10 [cited 2011 Mar 9];256(21):10781–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6270131>
130. Tenenhouse HS, Henry HL. Protein kinase activity and protein kinase inhibitor in mouse kidney: effect of the X-linked Hyp mutation and vitamin D status. *Endocrinology* [Internet]. 1985 Nov [cited 2011 Mar 9];117(5):1719–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2994997>
131. Henry HL, Al-Abdaly FA, Noland TA. Cyclic AMP dependent protein kinase and its endogenous inhibitor protein: tissue distribution and effect of vitamin D status in the chick. *Comp. Biochem. Physiol., B* [Internet]. 1983 [cited 2011 Feb 27];74(4):715–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6305597>

132. Szmigielski A. Modulation of the activity of endogenous protein kinase inhibitors in rat heart by the beta adrenergic receptor. *Arch Int Pharmacodyn Ther* [Internet]. 1981 Jan [cited 2011 Mar 9];249(1):64–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6261707>
133. Tash JS, Dedman JR, Means AR. Protein kinase inhibitor in sertoli cell-enriched rat testis. Specific regulation by follicle-stimulating hormone. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1979 Feb 25 [cited 2011 Mar 9];254(4):1241–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/216688>
134. Drain P. cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron* [Internet]. 1991 Jan [cited 2011 Feb 27];6(1):71–82. Available from: <http://www.cell.com/neuron/retrieve/pii/089662739190123H>
135. Worgall S, Wolff G, Falck-Pedersen E, Crystal RG. Innate immune mechanisms dominate elimination of adenoviral vectors following in vivo administration. *Hum. Gene Ther* [Internet]. 1997 Jan 1 [cited 2011 Mar 9];8(1):37–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8989993>
136. Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Eizema K, Pauschinger M, et al. Expression of coxsackie adenovirus receptor and alphav-integrin does not correlate with adenovector targeting in vivo indicating anatomical vector barriers. *Gene Ther* [Internet]. 1999 Sep [cited 2011 Feb 27];6(9):1520–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10490761>
137. Fechner H, Noutsias M, Tschoepe C, Hinze K, Wang X, Escher F, et al. Induction of coxsackievirus-adenovirus-receptor expression during myocardial tissue formation and remodeling: identification of a cell-to-cell contact-dependent regulatory mechanism. *Circulation* [Internet]. 2003 Feb 18 [cited 2011 Jul 24];107(6):876–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12591759>
138. Fechner H, Pinkert S, Wang X, Sipo I, Suckau L, Kurreck J, et al. Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor. *Gene Ther* [Internet]. 2007 Jun [cited 2011 Jul 24];14(12):960–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17377597>
139. Ding L, Dong L, Chen X, Zhang L, Xu X, Ferro A, et al. Increased expression of integrin-linked kinase attenuates left ventricular remodeling and improves cardiac function after myocardial infarction. *Circulation* [Internet]. 2009 Sep 1 [cited 2011 Jul 24];120(9):764–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19687354>
140. Samuel SM, Akita Y, Paul D, Thirunavukkarasu M, Zhan L, Sudhakaran PR, et al. Coadministration of adenoviral vascular endothelial growth factor and angiopoietin-1 enhances vascularization and reduces ventricular remodeling in the infarcted myocardium of type 1 diabetic rats. *Diabetes* [Internet]. 2010 Jan [cited 2011 Jul 24];59(1):51–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19794062>
141. Hasenfuss G, Reinecke H, Studer R, Pieske B, Meyer M, Drexler H, et al. Calcium cycling proteins and force-frequency relationship in heart failure. *Basic Res. Cardiol* [Internet]. 1996 [cited 2011 Jul 24];91 Suppl 2:17–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8957539>

142. Reinecke H, Studer R, Vetter R, Holtz J, Drexler H. Cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchange activity in patients with end-stage heart failure. *Cardiovasc. Res* [Internet]. 1996 Jan [cited 2011 Jul 24];31(1):48–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8849588>
143. Studer R, Reinecke H, Müller B, Holtz J, Just H, Drexler H. Increased angiotensin-I converting enzyme gene expression in the failing human heart. Quantification by competitive RNA polymerase chain reaction. *J. Clin. Invest* [Internet]. 1994 Jul [cited 2011 Jul 24];94(1):301–10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8040271>
144. Kawase Y, Hajjar RJ. The cardiac sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase: a potent target for cardiovascular diseases. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* [Internet]. 2008 Sep [cited 2011 Jul 24];5(9):554–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18665137>
145. Rengo G, Lymeropoulos A, Zincarelli C, Donniacuo M, Soltys S, Rabinowitz JE, et al. Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation* [Internet]. 2009 Jan 6 [cited 2011 Jul 24];119(1):89–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19103992>
146. Shah AS, Lilly RE, Kypson AP, Tai O, Hata JA, Phippen A, et al. Intracoronary adenovirus-mediated delivery and overexpression of the beta(2)-adrenergic receptor in the heart : prospects for molecular ventricular assistance. *Circulation* [Internet]. 2000 Feb 1 [cited 2011 Jul 24];101(4):408–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10653833>
147. Shah AS, White DC, Emani S, Kypson AP, Lilly RE, Wilson K, et al. In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. *Circulation* [Internet]. 2001 Mar 6 [cited 2011 Jul 24];103(9):1311–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238278>
148. Lai NC, Roth DM, Gao MH, Tang T, Dalton N, Lai YY, et al. Intracoronary adenovirus encoding adenylyl cyclase VI increases left ventricular function in heart failure. *Circulation* [Internet]. 2004 Jul 20 [cited 2011 Jul 24];110(3):330–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15249510>
149. del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathmey JK, et al. Improvement in Survival and Cardiac Metabolism After Gene Transfer of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in a Rat Model of Heart Failure. *Circulation* [Internet]. 2001 Sep 18 [cited 2011 Feb 27];104(12):1424–9. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/104/12/1424>
150. Sakata S, Lebeche D, Sakata N, Sakata Y, Chemaly ER, Liang LF, et al. Targeted gene transfer increases contractility and decreases oxygen cost of contractility in normal rat hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* [Internet]. 2007 May [cited 2011 Jul 24];292(5):H2356–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17220178>

151. Sakata S, Lebeche D, Sakata N, Sakata Y, Chemaly ER, Liang LF, et al. Restoration of mechanical and energetic function in failing aortic-banded rat hearts by gene transfer of calcium cycling proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol* [Internet]. 2007 Apr [cited 2011 Jul 24];42(4):852–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17300800>
152. del Monte F, Lebeche D, Guerrero JL, Tsuji T, Doye AA, Gwathmey JK, et al. Abrogation of ventricular arrhythmias in a model of ischemia and reperfusion by targeting myocardial calcium cycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 2004 Apr 13 [cited 2011 Jul 24];101(15):5622–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15044708>
153. Lipskaia L, del Monte F, Capiod T, Yacoubi S, Hadri L, Hours M, et al. Sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene transfer reduces vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat. *Circ. Res* [Internet]. 2005 Sep 2 [cited 2011 Jul 24];97(5):488–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16081870>
154. Isner JM, Pieczek A, Schainfeld R, Blair R, Haley L, Asahara T, et al. Clinical evidence of angiogenesis after arterial gene transfer of phVEGF165 in patient with ischaemic limb. *Lancet* [Internet]. 1996 Aug 10 [cited 2011 Feb 27];348(9024):370–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8709735>
155. Baumgartner I, Pieczek A, Manor O, Blair R, Kearney M, Walsh K, et al. Constitutive Expression of phVEGF165 After Intramuscular Gene Transfer Promotes Collateral Vessel Development in Patients With Critical Limb Ischemia. *Circulation* [Internet]. 1998 Mar 31 [cited 2011 Feb 27];97(12):1114–23. Available from: <http://circ.ahajournals.org/cgi/content/abstract/97/12/1114>
156. Shyu K-G, Chang H, Wang B-W, Kuan P. Intramuscular vascular endothelial growth factor gene therapy in patients with chronic critical leg ischemia. *Am. J. Med* [Internet]. 2003 Feb 1 [cited 2011 Mar 9];114(2):85–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12586226>
157. Markkanen JE, Rissanen TT, Kivelä A, Ylä-Herttuala S. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart--gene therapy. *Cardiovasc. Res* [Internet]. 2005 Feb 15 [cited 2011 Mar 1];65(3):656–64. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15664392>
158. Mann MJ, Whittemore AD, Donaldson MC, Belkin M, Conte MS, Polak JF, et al. Ex-vivo gene therapy of human vascular bypass grafts with E2F decoy: the PREVENT single-centre, randomised, controlled trial. *Lancet* [Internet]. 1999 Oct 30 [cited 2011 Mar 1];354(9189):1493–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10551494>
159. Ylä-Herttuala S, Markkanen JE, Rissanen TT. Gene therapy for ischemic cardiovascular diseases: some lessons learned from the first clinical trials. *Trends Cardiovasc. Med* [Internet]. 2004 Nov [cited 2011 Mar 9];14(8):295–300. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596105>

160. Agha-Mohammadi S, Lotze MT. Regulatable systems: applications in gene therapy and replicating viruses. *J. Clin. Invest.* [Internet]. 2000 May [cited 2011 Feb 27];105(9):1177–83. Available from: <http://www.jci.org/articles/view/10027/version/1>
161. Weber W, Fussenegger M. Artificial mammalian gene regulation networks-novel approaches for gene therapy and bioengineering. *J. Biotechnol* [Internet]. 2002 Sep 25 [cited 2011 Mar 9];98(2-3):161–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12141985>
162. Easton JB, Houghton PJ. Therapeutic potential of target of rapamycin inhibitors. *Expert Opin. Ther. Targets* [Internet]. 2004 Dec [cited 2011 Feb 27];8(6):551–64. Available from: <http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1517/14728222.8.6.551>
163. Pachori AS, Melo LG, Hart ML, Noiseux N, Zhang L, Morello F, et al. Hypoxia-regulated therapeutic gene as a preemptive treatment strategy against ischemia/reperfusion tissue injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 2004 Aug 17 [cited 2011 Mar 1];101(33):12282–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15302924>
164. Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. 2011 [cited 2012 Jan 2]; Available from: <http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>
165. Jessup M, Greenberg B, Mancini D, Cappola T, Pauly DF, Jaski B, et al. Calcium Upregulation by Percutaneous Administration of Gene Therapy in Cardiac Disease (CUPID): A Phase 2 Trial of Intracoronary Gene Therapy of Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Patients With Advanced Heart Failure. *Circulation* [Internet]. 2011 Jul 19 [cited 2011 Jul 24];124(3):304–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709064>
166. Barr E, Carroll J, Kalynych AM, Tripathy SK, Kozarsky K, Wilson JM, et al. Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication-defective adenovirus. *Gene Ther* [Internet]. 1994 Jan [cited 2011 Feb 27];1(1):51–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7584060>
167. Guzman RJ, Lemarchand P, Crystal RG, Epstein SE, Finkel T. Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ. Res* [Internet]. 1993 Dec [cited 2011 Feb 27];73(6):1202–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8222091>
168. Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, Rivera J, Buttrick PM, Wittenberg BA, et al. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 1993 Dec 15 [cited 2011 Feb 27];90(24):11498–502. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8265580>
169. Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* [Internet]. 1996 May 1 [cited 2011 Mar 9];219(1):220–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8623532>

170. Murray CJ, Lopez AD. Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* [Internet]. 1997 May 24 [cited 2011 Jan 16];349(9064):1498–504. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9167458>
171. Liu MA. DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunological Reviews* [Internet]. 2011;239(1):62–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00980.x>
172. Monahan PE, Samulski RJ. AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther* [Internet]. 2000 Jan [cited 2011 Jul 24];7(1):24–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10680012>
173. Jiang H, Pierce GF, Ozelo MC, de Paula EV, Vargas JA, Smith P, et al. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol. Ther* [Internet]. 2006 Sep [cited 2011 Jul 24];14(3):452–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16822719>
174. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, Glader B, Ragni M, Rasko JJ, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat. Med* [Internet]. 2006 Mar [cited 2011 Jul 24];12(3):342–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16474400>
175. Mingozzi F, Meulenberg JJ, Hui DJ, Basner-Tschakarjan E, Hasbrouck NC, Edmonson SA, et al. AAV-1-mediated gene transfer to skeletal muscle in humans results in dose-dependent activation of capsid-specific T cells. *Blood* [Internet]. 2009 Sep 3 [cited 2011 Jul 24];114(10):2077–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19506302>
176. Frank KM, Hogarth DK, Miller JL, Mandal S, Mease PJ, Samulski RJ, et al. Investigation of the cause of death in a gene-therapy trial. *N. Engl. J. Med* [Internet]. 2009 Jul 9 [cited 2011 Jul 24];361(2):161–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19587341>
177. Genforschung S fr G der. Entwicklung der Genterapie: Stellungnahme der Senatskommission fr Grundsatzfragen der Genforschung Mitteilung 5. John Wiley & Sons; 2007. 92 p.
178. Edgell CJ, McDonald CC, Graham JB. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 1983 Jun [cited 2011 Aug 10];80(12):3734–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6407019>
179. Will H, Küttner I, Vetter R, Will-Shahab L, Kemsies C. Early presence of phospholamban in developing a chick heart. *FEBS Lett* [Internet]. 1983 May 8 [cited 2011 Mar 9];155(2):326–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6852244>
180. Solaro RJ, Briggs FN. Estimating the Functional Capabilities of Sarcoplasmic Reticulum in Cardiac Muscle [Internet]. 1974; Available from: <http://circres.ahajournals.org/cgi/content/abstract/34/4/531>

181. Vetter R, Will H. Sarcolemmal Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium uptake in developing chick heart. *J. Mol. Cell. Cardiol* [Internet]. 1986 Dec [cited 2011 Mar 9];18(12):1267–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3029391>
182. Olsen SR, Uhler MD. Isolation and characterization of cDNA clones for an inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1991 Jun 15 [cited 2011 Mar 1];266(17):11158–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1710219>
183. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J. Gen. Virol* [Internet]. 1977 Jul [cited 2011 Feb 27];36(1):59–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/886304>
184. Tsien RY. The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem* [Internet]. 1998 [cited 2011 Mar 9];67:509–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759496>
185. Schwinger RH, Böhm M, Müller-Ehmsen J, Uhlmann R, Schmidt U, Stäblein A, et al. Effect of inotropic stimulation on the negative force-frequency relationship in the failing human heart. *Circulation* [Internet]. 1993 Nov [cited 2011 Mar 9];88(5 Pt 1):2267–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8222121>
186. Olsen SR, Uhler MD. Inhibition of protein kinase-A by overexpression of the cloned human protein kinase inhibitor. *Mol. Endocrinol* [Internet]. 1991 Sep [cited 2011 Mar 1];5(9):1246–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1770951>
187. Kozak M. Selection of initiation sites by eucaryotic ribosomes: effect of inserting AUG triplets upstream from the coding sequence for preproinsulin. *Nucleic Acids Res.* 1984;12:3873–93.
188. Lum H, Jaffe HA, Schulz IT, Masood A, RayChaudhury A, Green RD. Expression of PKA inhibitor (PKI) gene abolishes cAMP-mediated protection to endothelial barrier dysfunction. *Am. J. Physiol* [Internet]. 1999 Sep [cited 2011 Mar 1];277(3 Pt 1):C580–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484345>
189. Walsh DA, Ashby CD, Gonzalez C, Calkins D, Fischer EH, Krebs EG. Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases. *J. Biol. Chem* [Internet]. 1971 Apr 10 [cited 2011 Mar 9];246(7):1977–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4324557>
190. Peters KA, Demaille JG, Fischer EH. Adenosine 3':5'-monophosphate dependent protein kinase from bovine heart. Characterization of the catalytic subunit. *Biochemistry* [Internet]. 1977 Dec 27 [cited 2011 Mar 1];16(26):5691–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/201274>
191. Frank KF, Bölck B, Erdmann E, Schwinger RHG. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase modulates cardiac contraction and relaxation. *Cardiovasc. Res* [Internet]. 2003 Jan [cited 2011 Feb 27];57(1):20–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504810>

192. Minamisawa S, Hoshijima M, Chu G, Ward CA, Frank K, Gu Y, et al. Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell*. 1999;99:313–22.
193. Miyamoto MI, del Monte F, Schmidt U, DiSalvo TS, Kang ZB, Matsui T, et al. Adenoviral gene transfer of SERCA2a improves left-ventricular function in aortic-banded rats in transition to heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:793–8.
194. He H, Meyer M, Martin JL, McDonough PM, Ho P, Lou X, et al. Effects of mutant and antisense RNA of phospholamban on SR Ca(2+)-ATPase activity and cardiac myocyte contractility. *Circulation* [Internet]. 1999 Aug 31 [cited 2011 Feb 27];100(9):974–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10468529>
195. Haghghi K, Kolokathis F, Pater L, Lynch RA, Asahi M, Gramolini AO, et al. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest*. 2003;111:869–76.
196. Dieterle T, Meyer M, Gu Y, Belke DD, Swanson E, Iwatate M, et al. Gene transfer of a phospholamban-targeted antibody improves calcium handling and cardiac function in heart failure. *Cardiovasc. Res* [Internet]. 2005 Sep 1 [cited 2011 Jul 24];67(4):678–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15927173>
197. Iwanaga Y, Hoshijima M, Gu Y, Iwatate M, Dieterle T, Ikeda Y, et al. Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. *J. Clin. Invest* [Internet]. 2004 Mar [cited 2011 Feb 27];113(5):727–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14991071>
198. Endoh M, Yanagisawa T, Taira N, Blinks JR. Effects of new inotropic agents on cyclic nucleotide metabolism and calcium transients in canine ventricular muscle. *Circulation*. 1986;73:III117–33.
199. Blinks JR, Endoh M. Modification of myofibrillar responsiveness to Ca⁺⁺ as an inotropic mechanism. *Circulation*. 1986;73:III85–98.
200. Pleger ST, Boucher M, Most P, Koch WJ. Targeting myocardial beta-adrenergic receptor signaling and calcium cycling for heart failure gene therapy. *J. Card. Fail* [Internet]. 2007 Jun [cited 2011 Jul 24];13(5):401–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17602988>
201. Rengo G, Lympelopoulos A, Leosco D, Koch WJ. GRK2 as a novel gene therapy target in heart failure. *J. Mol. Cell. Cardiol* [Internet]. 2011 May [cited 2011 Jul 24];50(5):785–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20800067>
202. Njeim MT, Hajjar RJ. Gene therapy for heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* [Internet]. 2010 Sep [cited 2011 Jul 24];103(8-9):477–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21074127>
203. Ceulemans H, Bollen M. Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol. Rev* [Internet]. 2004 Jan [cited 2011 Jul 24];84(1):1–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715909>

204. Carr AN, Schmidt AG, Suzuki Y, del Monte F, Sato Y, Lanner C, et al. Type 1 phosphatase, a negative regulator of cardiac function. *Mol. Cell. Biol* [Internet]. 2002 Jun [cited 2011 Jul 24];22(12):4124–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12024026>
205. Gergs U, Boknik P, Buchwalow I, Fabritz L, Matus M, Justus I, et al. Overexpression of the catalytic subunit of protein phosphatase 2A impairs cardiac function. *J. Biol. Chem* [Internet]. 2004 Sep 24 [cited 2011 Jul 24];279(39):40827–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15247211>
206. Pathak A, del Monte F, Zhao W, Schultz J-E, Lorenz JN, Bodi I, et al. Enhancement of cardiac function and suppression of heart failure progression by inhibition of protein phosphatase 1. *Circ. Res* [Internet]. 2005 Apr 15 [cited 2011 Jul 24];96(7):756–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15746443>
207. Yamada M, Ikeda Y, Yano M, Yoshimura K, Nishino S, Aoyama H, et al. Inhibition of protein phosphatase 1 by inhibitor-2 gene delivery ameliorates heart failure progression in genetic cardiomyopathy. *FASEB J* [Internet]. 2006 Jun [cited 2011 Jul 24];20(8):1197–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16627625>
208. Eberhard M, Erne P. Calcium and magnesium binding to rat parvalbumin. *Eur. J. Biochem* [Internet]. 1994 May 15 [cited 2011 Jul 24];222(1):21–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8200345>
209. Pleger ST, Most P, Boucher M, Soltys S, Chuprun JK, Pleger W, et al. Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation* [Internet]. 2007 May 15 [cited 2011 Jul 24];115(19):2506–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17470693>
210. Most P, Bernotat J, Ehlermann P, Pleger ST, Reppel M, Börries M, et al. S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* [Internet]. 2001 Nov 20 [cited 2011 Jul 24];98(24):13889–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11717446>
211. Hunt SA, Abraham WT, Chin MH, Feldman AM, Francis GS, Ganiats TG, et al. 2009 focused update incorporated into the ACC/AHA 2005 Guidelines for the Diagnosis and Management of Heart Failure in Adults: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the International Society for Heart and Lung Transplantation. *Circulation* [Internet]. 2009 Apr 14 [cited 2011 Jul 24];119(14):e391–479. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19324966>
212. Brodde OE. Beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the human heart: properties, function, and alterations in chronic heart failure. *Pharmacol. Rev* [Internet]. 1991 Jun [cited 2011 Jul 24];43(2):203–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1677200>
213. Rockman HA, Koch WJ, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane-spanning receptors and heart function. *Nature* [Internet]. 2002 Jan 10 [cited 2011 Jul 24];415(6868):206–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11805844>

214. Gao MH, Lai NC, Roth DM, Zhou J, Zhu J, Anzai T, et al. Adenylyl cyclase increases responsiveness to catecholamine stimulation in transgenic mice. *Circulation* [Internet]. 1999 Mar 30 [cited 2011 Jul 24];99(12):1618–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10096940>
215. Anderson ME. Calmodulin kinase signaling in heart: an intriguing candidate target for therapy of myocardial dysfunction and arrhythmias. *Pharmacol. Ther* [Internet]. 2005 Apr [cited 2011 Jul 24];106(1):39–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15781121>
216. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, et al. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* [Internet]. 2003 Jan 16 [cited 2012 Jan 4];348(3):255–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12529469>

7 Abkürzungen

AC	Adenylatzyklase
ACVI	Adenylatzyklase VI
AdV	Adenovektor/en
AKAP	A kinase anchoring protein
βARK	β-Rezeptor-Kinase
CalPK	Ca ²⁺ -phospholipid-abhängige Proteinkinase
CRC	Ca ²⁺ release channel
CREB	cAMP response element binding protein
G _{Sα}	α-Untereinheit des G-Proteins
Iso	Isoproterenol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
nRCM	neonatale Rattenkardiomyozyten
ORF	Open Reading Frame
PDK1	Phosphoinositidabhängige Proteinkinase 1
PP1/2	Phosphatase Typ 1/2
PKA	Proteinkinase A
PKA-C	katalytische Untereinheit der PKA
PKA-R	regulatorische Untereinheit der PKA
PKIα	Proteinkinaseinhibitor α
PLB	Phospholamban
pPLB	phosphoryliertes Phospholamban
rAAV	rekombinante Adeno-assoziierte Viren
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
SERCA2a	sarkoplasmatische Ca ²⁺ - ATPase

8 Curriculum Vitae

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Publikationen

- 2003 M.Gövercin, J.Stieler, U.Pelzer, A.Hilbig, L.Roll, H. Riess, H. Oettle; Fortgeschrittenes Pankreaskarzinom: Stellenwert der parenteralen Ernährung; Journal Onkologie 05/2003.
- 2004 Hilbig, J. Stieler, U. Pelzer, J. Okenga, R. Hintze, L. Roll, M. Gövercin, M. Arning, H. Riess, and H. Oettle. Phase II study of gemcitabine, cisplatin, folinic acid (FA) and infusional 5-fluorouracil (5-FU) in patients with inoperable esophageal cancer (IEC) J Clin Oncol. 2004 22: 4238.
- 2004 J. M. Stieler, A. Hilbig, U. Pelzer, L. Roll, A. Helm, M. Gövercin, H. Riess, and H. Oettle Gemcitabine, oxaliplatin, 5-FU and folinic acid as an outpatient first-line therapy in patients with inoperable esophageal cancer: A phase I study J Clin Oncol. 2004 22: 4250.
- 2007 M. Gövercin, R. Willmann, G. Lanfermann, T. Kraft, S. Mix, E. Steinhagen-Thiessen: Assisting age related capabilities by ambient technology to prevent functional decline. Assisted Living Systems - Models, Architectures and Engineering Approaches 2007. Dagstuhl Seminar Proceedings 2008: 7462
- 2008 R. Haux, JE Appell, HJ Appelrath, S. Boll, M. Eichelberg, U. Fachinger, M. Gövercin, A. Hein, W. Heuten, V. Hohmann, R. Huber, M. Hülken-Giesler Niedersächsischer Forschungsverbund Gestaltung altersgerechter Lebenswelten (GAL) – Informations- und Kommunikationstechnik zur Gewinnung und Aufrechterhaltung von Lebensqualität, Gesundheit und Selbstständigkeit. Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie 2008 41: I/19
- 2008 M.Gövercin. Fit mit Videospiele: Hilft Training vor dem Bildschirm? Visite | 25.11.2008 20:15 Uhr
- 2008 J. Spehr, M. Gövercin, S. Winkelbach, E. Steinhagen-Thiessen and F. Wahl. Long-Term Evaluation of a Visual Fall Detection System in a Real Home Environment. Gemeinsamer Kongress der DGG / ÖGGG und der DGGG / SGG, Potsdam, Germany Dezember 2008.

- 2008 M. Gövercin, R. Willmann, T. Kraft, G. Lanfermann, E. Steinhagen-Thiessen Usability of a sensor based home stroke rehabilitation system for the upper limb. *Gerontechnology*: 7 115, 2008
- 2008 Gövercin M., Spehr F., Winkelbach S., Steinhagen-Thiessen E. & Wahl F.: Visual fall detection system in home environments. *Gerontechnology*: 7 114, 2008.
- 2008 J. Spehr, I. Moutongo Missala, M. Gövercin, S. Winkelbach, E. Steinhagen-Thiessen und F. Wahl Usability of a visual activity monitoring system Proceedings of 61st Annual Scientific Meeting of the Gerontological Society of America, National Harbor, Maryland, November 2008.
- 2008 J. Spehr, M. Gövercin, S. Winkelbach, E. Steinhagen-Thiessen and F. Wahl Visual Fall Detection in Home Environments 6th Int. Conference of the Int. Soc. for Gerontechnology, Pisa, Italy, June 2008.
- 2008 M. Marschollek, M. Goevercin, KH. Wolf, B. Song M. Gietzelt, R. Haux, E. Steinhagen-Thiessen. A performance comparison of accelerometry-based step detection algorithms on a large, non-laboratory sample of healthy and mobility-impaired persons. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.* 2008; 2008: 1319-22.
- 2008 Gövercin, M. Sensor based home stroke rehabilitation. 61st Annual Scientific Meeting of the Gerontological Society of America, National Harbor, Maryland, November 2008.
- 2009 Hellrung, N, R. Haux, M. Gövercin, E. Steinhagen-Thiessen, A. Hein, R. Kluthe, C. Schultz, W. Thoben. PAGE – Eine Plattform zur Integration IT-basierter Gesundheitsdienstleistungen in Gesundheitsnetzwerke. AAL-Konferenz Proceedings 01/2009
- 2009 Gövercin, M. Sensor Based Hip Rehabilitation In Practice, IAGG World Congress on Gerontology and Geriatrics, Paris 07/2009
- 2010 Gövercin M., Missala I., Marschollek M. & Steinhagen-Thiessen E.: Virtual Rehabilitation and Telerehabilitation for the Upper Limb. *Geropsych* 23 (2) 79-90, 2010

- 2010 Pelzer U., Arnold D., Gövercin M., Stieler J., Doerken B., Riess H. & Oettle H.: Parenteral nutrition support for patients with pancreatic cancer. Results of a phase II study. BMC Cancer: 10 86, 2010
- 2010 Zens M., Gövercin M. & Steinhagen-Thiessen E.: [Assistance systems for the elderly: the SmartSenior project] Bundesgesundheitsblatt: 53(5) 474-8, 2010
- 2010 Frenken T, Gövercin M, Mersmann S, Hein A.: Precise assessment of self-selected gait velocity in domestic environments. Pervasive Computing Technologies for Healthcare (PervasiveHealth), 2010 4th International Conference.
- 2010 Hülksen-Giesler M, Gövercin M, Költzsch, Y et al.: Bedarfserhebung zur Entwicklung assistiver Technologien für pflegebedürftige und sturzgefährdete Patienten –pflegewissenschaftliche Implikationen. AAL-Konferenz 2010
- 2010 Uhrhan T, Gövercin M, Schaefer M. [The effect of medications on the risk of falling in elderly patients]. Med Monatsschr Pharm. 2010 Nov;33(11):418-26; quiz 427-8
- 2010 Gövercin M, Költzsch Y, Meis M, Wegel S, Gietzelt M, Spehr J, Winkelbach S, Marscholke M, Steinhagen-Thiessen E. Inform Health Soc Care. 2010 Sep-Dec;35(3-4):177-87
- 2010 Haux R, Gövercin M et al.: The Lower Saxony research network design of environments for ageing: towards interdisciplinary research on information and communication technologies in ageing societies. Inform Health Soc Care. 2010 Sep-Dec;35(3-4):92-103
- 2011 Ehmen H, Haesner M, Dorn M, Gövercin M, et al: Comparison of four different mobile devices for measuring heart rate and ECG with respect to aspects of usability and acceptance by older people. Applied Ergonomics, 2011 Sep 29

10 Erklärung

„Ich, Mehmet Gövercin, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Rolle des Proteinkinaseinhibitors α in der Modulation der Phospholamban-abhängigen Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum

Unterschrift

11 Widmung

Für meine Frau Ivonne und unsere beiden Söhne Ilyas und Levin.