
2. Antisense-RNA als Regulationsprinzip der schweren Myosin-Kette (MyHC)

In den ersten beiden Veröffentlichungen (2.1. und 2.2.) wurde die MyHC-Regulation im Myokard der Ratte analysiert. Untersuchungsgegenstand waren die Veränderungen während der Ontogenese von Herzmuskelzellen sowie der Einfluss von unterschiedlichen Kultivierungsbedingungen (Serum, Kalzium, mechanische Belastung) und verschiedener Stimuli (Thyroxin, α 1-adrenerge Rezeptorstimulation).

Da im MyHC-Expressionsmuster der Neonatalphase, in der es zu einem Isoform-Switch von der β - zur α -Isoform kommt, ein signifikanter Unterschied zwischen RNA- und Protein-Level für α -MyHC auffiel, wurde untersucht, ob endogene Antisense-RNA als posttranskriptioneller Faktor sein könnte. Es gelang schliesslich der Nachweis von Antisense-RNA, sowohl für β -MyHC als auch - erstmalig - für α -MyHC (2.2.). Die Quantifizierung ergab eine erhebliche Menge der Antisense-RNA für beide MyHC-Isoformen.

Zur weiteren Charakterisierung der Antisense-Transkripte wurde Northern-blotting (Transkript-Grösse) und eine Promoter-Analyse (Entstehungsmechanismus) durchgeführt (verleiche Veröffentlichung 2.3.). Schliesslich wurde die Regulation von Antisense-RNA unter dem Einfluss von Isoenzym-spezifischen Induktoren von MyHC untersucht. Dabei wurde das aktuell beste Verfahren zur exakten Quantifizierung von RNA, die Real-Time-PCR angewendet (2.4.).

Nach dem Abschluss der Untersuchungen am Rattenmyokard wurden die Experimente auf das humane Herz ausgeweitet. Dazu wurde zunächst Myokard von Patienten mit und ohne Herzerkrankung mittels semiquantitativer RT-PCR auf RNA-Ebene und mittels Western-blotting auf Proteinebene untersucht. (Veröffentlichung 2.5.). Es konnte erstmals die Existenz von endogener β -MyHC Antisense-RNA im menschlichen Myokard nachgewiesen werden. Die hemmende Wirkung der Antisense-RNA auf die Protein-Expression wurde mit einem *in-vitro*-Translation-Assay nachgewiesen (2.6.).

2.1. Luther HP, Hille S, Haase H, Morano I (1997): The influence of mechanical activity, adrenergic stimulation, and calcium on the expression of myosin heavy chains in cultivated neonatal cardiomyocytes. Journal of Cellular Biochemistry 64:458-465

Zunächst sollte geklärt werden, ob kultivierte Kardiomyozyten der neonatalen Ratte, die eine variable Spontanpulsation aufweisen und damit unterschiedlich stark mechanisch belastet werden, geeignet sind, die MyHC-Regulation zu analysieren.

Dazu wurde untersucht, ob und wie sich das MyHC-Expressionsmuster unter Hemmung der spontanen Kontraktion verändert. In getrennten Ansätzen wurden die Herzzellen Kalium-Chlorid, welches durch Hyperpolarisation den systolisch/diastolischen Kalzium-Fluss hemmt, sowie BDM (2,3 butanedione monoxime), welches eine elektromechanische Entkoppelung bewirkt, exponiert und anschliessend das MyHC-Expressionsmuster mittels RT-PCR analysiert. In einem weiteren Ansatz wurden die Zellen durch den α 1-adrenergen Agonisten Phenylephrin stimuliert. Mit Hilfe dieses Protokolls ist es möglich, die Wirkung von drei Faktoren auf die MyHC-Expression zu untersuchen, die bei der Entwicklung der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle spielen: 1) Eine unterschiedlich starke mechanische Belastung der Zellen. 2) eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration bzw. ein verminderter systolisch/diastolischer Kalzium-Gradient sowie 3) eine vermehrte adrenerge Stimulation.

Die Untersuchungen ergaben, dass allein die α 1-adrenerge Stimulation zu einer vermehrten β -MyHC-Transkription führt, nicht aber Veränderung der Kalzium-Konzentration oder eine veränderte mechanische Belastungen, die durch eine unterschiedliche Pulsationsrate verursacht werden.

2.2. Luther HP, Wallukat G, Morwinski R, Haase H, Morano I (1997): *Expression of sense and naturally occurring antisense mRNA of myosin heavy chain in rat heart tissue and cultivated cardiomyocytes. Journal of Molecular and Cellular Cardiology 29:27-35.*

Im nächsten Schritt sollte nun untersucht werden, ob und wie sich das MyHC-Expressionsmuster während unterschiedlich langer Kultivierungszeiträume verändert. Weiterhin sollte der Einfluss von Serum untersucht werden und welche Unterschiede bei neonatalen und adulten Kardiomyozyten bestehen. Dazu wurde das bereits etablierte RT-PCR Protokoll zur relativen Quantifizierung der MyHC-Isogene angewendet.

Die Ergebnisse zeigten, dass es während der Kultivierung von neonatalen Kardiomyozyten zu einer vermehrten α -MyHC Transkription kommt, die denen der Ontogenese entsprechen. Im Gegensatz dazu kommt es durch die Kultivierung von adulten Kardiomyozyten zu einem veränderten Phänotyp mit einer vermehrten Expression von β -MyHC. Die Verwendung von Serum führt sowohl bei neonatalen als auch adulten Kardiomyozyten zu einer α -MyHC-Induktion.

Das RT-PCR Protokoll wurde nun dahingehend abgewandelt, dass möglicherweise vorhandene Antisense-RNA detektiert werden konnte. Dazu wurde in der reversen Transkription-Reaktion ein Primer verwendet, der - statt der üblichen reversen Orientierung - eine forward Orientierung aufwies.

Mit diesem Primer-Design gelang es schliesslich sowohl für α - als auch für β -MyHC Antisense-RNA nachzuweisen. Das Antisense-Transkriptionsmuster war in fetalem, neonatalen und adulten Myokard identisch.

2.3. Luther HP, Haase H, Hohaus A, Beckmann G, Reich J, Morano I (1998): *Characterization of naturally occurring myosin heavy chain antisense mRNA in rat heart. Journal of Cellular Biochemistry 70:110-20*

Um die Funktion der detektierten Antisense-RNA zu bestimmen, sollte nunmehr geklärt werden, in welcher Phase der Ontogenese eine nicht-koordinierte Expression von RNA und Protein vorliegt. Dazu wurde fetales, neonatales und adultes Myokard mittels RT-PCR und Western-Blotting untersucht. Es zeigte sich, dass nur in der Neonatalphase ein signifikant höherer Anteil von α -MyHC auf RNA-Ebene verglichen mit dem Proteinlevel vorlag. Somit konnte die Hypothese formuliert werden, dass natürliche Antisense als posttranskriptioneller Mechanismus die RNA-Translation vermindert und dadurch den Isoform-Switch in dieser Phase reguliert. Die Quantifizierung ergab ein Antisense/sense Verhältnis von 50% für α - und β -MyHC.

Es folgte die Charakterisierung der MyHC-Antisense-RNA. Die Untersuchung mittels Northern-Blotting ergab, dass beide Antisense-Transkripte mit ca. 6000 Basenpaaren eine ähnliche Grösse besitzen wie ihre entsprechenden Sense-mRNAs. Die Untersuchung mit verschiedenen Primer-Paaren ergab jedoch eine für α - und β -MyHC unterschiedliche Ausdehnung innerhalb der Exon-Sequenzen. Die Computer-Analyse ergab eine Polymerase II-Promoterregion für β -MyHC Antisense, eine entsprechende Region innerhalb der α -MyHC cDNA konnte jedoch nicht identifiziert werden.

2.4. Luther HP, Bartsch H, Morano I, Podlowski S, Baumann G (2004): Regulation of endogenous antisense RNA of the α - and β -isoforms of heavy myosin chain (MyHC) in neonatal cardiomyocytes. Journal of Cellular Biochemistry (akzeptiert)

Nachdem die Antisense-RNA für α - und β -MyHC charakterisiert worden waren, sollten in einem nächsten Schritt Regulationsfaktoren identifiziert werden.

Dazu wurden neonatale Kardiomyozyten Stimuli ausgesetzt, die z.T. in den Voruntersuchungen schon charakterisiert wurden und die sich als starke Induktoren für α -MyHC (Thyroxin) und β -MyHC (α 1-adrenerge Stimulation) erwiesen haben. Zur genauen Quantifizierung wurde Real-Time-PCR angewendet. Dieses Verfahren beruht auf dem Einbau eines Farbstoffes (SYBR green) in das PCR-Produkt sowie der online-Messung der Farbstoffkonzentration durch das PCR-Gerät.

Unter Thyroxin kam es zu einer vermehrten Transkription von α -MyHC Antisense sowie zu einer Abnahme von β -MyHC Antisense. Unter Phenylephrine kam es zu einer Zunahme der β -MyHC Antisense. Das Antisense/Sense Verhältnis änderte sich unter jeweiligen Stimulation nicht.

2.5. Ritter O, Luther HP, Haase H, Baltas LG, Baumann G, Schulte HD, Morano I (1999) Expression of atrial myosin light chains but not alpha-myosin heavy chains is correlated in vivo with increased ventricular function in patients with hypertrophic obstructive cardiomyopathy. Journal of Molecular Medicine 77(9):677-85

Nachdem MyHC Antisense-RNA im Rattenmyokard beschrieben worden war, sollte nun untersucht werden, ob im menschlichen Myokard (mit einer gegenüber dem Rattenmyokard bekanntermassen unterschiedlichen MyHC-Expression) eine transkriptionelle Regulation vorliegt. Dazu wurde Myokard von Patienten ohne Herzerkrankung und mit bekannter Herzinsuffizienz mittels RT-PCR und Western-Blot untersucht. Es zeigte sich eine fast ausschliessliche Expression von β -MyHC auf RNA- und Protein-Ebene. Der Vergleich von normalen mit insuffizienten Myokard ergab keine signifikanten Unterschiede in der MyHC-Expression. Es zeigte sich vielmehr ein vermehrtes Auftreten der atrialen leichten Kette (ALC-1) bei Herzinsuffizienz, welches im Bereich der kontraktilen Proteine offensichtlich den Anpassungsmechanismus des menschlichen Myokards auf eine vermehrte mechanische Belastung darstellt.

2.6. Luther HP, Podlowski S, Hetzer R, Baumann G (2001): Analysis of sense and naturally occurring antisense transcripts of myosin heavy chain in the human myocardium. *Journal of Cellular Biochemistry* 80:596-605

Nachdem die MyHC-Expression im menschlichen Herz analysiert worden war, sollte in einem nächsten Schritte - entsprechend den Erkenntnissen, die bei dem Antisense-Nachweis im Rattenmyokard gewonnen wurde - MyHC Antisense-RNA in humanem Myokard nachgewiesen oder ausgeschlossen werden.

Es gelang mittels RT-PCR der Nachweis von Antisense-RNA für β -MyHC, nicht aber für α -MyHC. Die Quantifizierung der β -MyHC Antisense-RNA ergab deutlich niedrigere Level im menschlichen Myokard verglichen mit dem Rattenherzen. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen dem Myokard der Kontrollen und insuffizienten Myokard.

Der Einfluss der Antisense-RNA auf die Proteinexpression wurde mit einem *in-vitro* Translations-Assay untersucht. Mit ihm ist es möglich, den Effekt von artifiziellen Antisense-Nukleotiden, die entsprechend der endogenen Antisense-RNA ausgewählt wurden, auf die Translation von klonierter cDNA an isolierten Ribosomen zu untersuchen. Es zeigte sich ein eindeutig hemmender Effekt der Antisense-Oligonukleotide auf die MyHC-Protein-Translation. Aufgrund der Konzentrationsabhängigkeit der Antisense-Wirkung wurde gefolgert, dass im menschlichen Herzen der Antisense-Level zu gering ist, um die Translation zu beeinflussen.