

---

### 3. Detektion und Charakterisierung von Antisense-RNA des Troponin I (Tnl)

Nachdem Antisense-RNA für MyHC nachgewiesen und charakterisiert worden war, stellte sich nunmehr die Frage, ob dieses Regulationsprinzip auch für andere kardiale Gene von Bedeutung ist. Dabei stellte sich nach Screening-Experimenten die Untersuchung von Tnl als besonders vielversprechend heraus.

Der Nachweis von Antisense-RNA für kardiales Tnl gelang im Myokard sowohl der Ratte als auch des Menschen (3.1.). Mittels Northern-blotting liessen sich für Ratte und Mensch unterschiedliche Grössen der Antisense-Transkripte zeigen. Diese Ergebnisse wurde durch die RT-PCR bestätigt, welche eine unterschiedliche Ausdehnung der Antisense-Transkripte am 3' Ende der cDNA nachweisen konnte. Im *in vitro* Translation-Assay zeigte sich auch hier eine hochsignifikante Translationsminderung bei Verwendung von synthetisierten Antisense-Oligonukleotiden, deren Sequenz gegen das 5' Ende der cDNA gerichtet war. Als eines der wichtigsten Ergebnisse ist der Nachweis einer Duplex-Formationen *in vivo* zwischen Sense- und Antisense-Transkripten mittels eines modifizierten RNA-Protection-Assay zu werten, womit sich die Interaktion zwischen Sense und Antisense-RNA demonstrieren liess (3.1.). Um den Entstehungsmechanismus der Antisense-RNA zu untersuchen, wurden RACE-Experimente (rapid amplification of cDNA ends) durchgeführt. Die Sequenzierung der Transkripte ergab wichtige Hinweise auf eine Antisense-Transkription im Zytoplasma durch eine RNA-abhängige Polymerase. Weiterhin konnten Sense-Antisense-Hybridmoleküle identifiziert werden, die offensichtlich die Folge der Duplexformation zwischen Sense und Antisense RNA sind (3.2.).

**3.1. Podlowski S, Bramlage P, Baumann G, Morano I, Luther HP (2002):  
*Cardiac troponin I sense-antisense RNA duplexes in the myocardium.*  
Journal of Cellular Biochemistry 85:198-207**

Zum Nachweis von Antisense-RNA für TnI wurde RT-PCR und Northern-blotting durchgeführt. Sowohl im Myokard der Ratte als auch des Menschen konnte Antisense-RNA für TnI nachgewiesen werden. Die Semiquantifizierung mittels RT-PCR ergab einen deutlich höheren Anteil im neonatalen Rattenmyokard verglichen mit dem Myokard der adulten Ratte und des Menschen. Die Antisense-Transkripte sind im Ratten-Myokard grösser (800 bp) als im humanen Herz (450 bp). Um die direkte Interaktion zwischen der TnI Antisense und Sense-Transkripten zu demonstrieren, wurde ein modifizierter RNase-Protection-Assay aufgebaut. Tatsächlich gelang es, eine kleine Duplex-RNA-Fraktion darzustellen. Weiterhin wurde der für die MyHC-Untersuchung etablierte *in-vitro* Translations-Assay angewendet, um den Effekt der TnI Antisense auf die Proteinexpression zu charakterisieren. In-vitro bewirkten Antisense-Oligonukleotide eine deutliche Translationsminderung und zwar insbesondere solche Antisense Sequenzen, die gegen das 5'Ende der cDNA gerichtet waren.

**3.2. Bartsch H, Voigtsberger S, Baumann G, Morano I, Luther HP (2004): Detection of a novel sense-antisense RNA-hybrid structure by RACE experiments on endogenous troponin I antisense. RNA 10:1215-24**

Nachdem Antisense-RNA für TnI nachgewiesen und charakterisiert worden war, sollten nun Erkenntnisse zum Ursprung der Antisense-Transkription erlangt werden, um Hinweise auf Funktion und Regulation zu erhalten.

Dazu wurden Untersuchungen mittels RACE (rapid amplification of cDNA ends) zur Amplifizierung und Sequenzierung von Sequenzen am 5`und 3`Ende der Antisense-RNA durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die TnI-Antisense-RNA ausschliesslich Exon-Sequenzen sowie einen Poly U-Schwanz am 5' Ende enthält, jedoch keine Poly A-Sequenz am 3' Ende. Es konnten Sense/Antisense Hybridmoleküle nachgewiesen werden.