

**„RNA Interferenz vermittelte Gentherapie bei Herzinsuffizienz
mittels Phospholamban-shRNA exprimierender Adenoviraler –
und AAV – Vektoren“**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Diplom Biologe Lennart Suckau

aus Quedlinburg

Berlin 2008

1. Gutachter: Prof. Dr. Volker A. Erdmann
Institut für Chemie / Biochemie
Freie Universität Berlin

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Wolfgang Poller
Klinik für Kardiologie und Pulmologie
Charité - Universitätsmedizin, Campus Benjamin Franklin

Disputation am 26.02.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	VI
1. Einleitung.....	1
1.1 Definition und Epidemiologie der Herzinsuffizienz.....	1
1.2 Die kardiale Calcium - Homöostase	3
1.3 Phospholamban als Regulatorprotein der Ca ²⁺ - ATPase - SERCA.....	5
1.4 RNA Interferenz.....	8
1.4.1 Prozessierung doppelsträngiger RNAs durch Dicer zu siRNAs.....	9
1.4.2 Überführung der siRNA in den RISC-Komplex und Degradierung der Ziel mRNA.....	10
1.4.3 Micro RNA vermitteltes Gen - Silencing	12
1.4.4 Design und Anwendung von siRNAs	15
1.5 Virale Gentherapie	16
1.5.1 Aufbau und Genomorganisation von Adenoviren	17
1.5.2 Adenovirale Vektoren	19
1.5.3 Modifikation der Ca ²⁺ - Homöostase im Herzen mit adenoviralen Vektoren.....	21
1.5.4 Adeno Assoziierte Viren.....	23
1.5.4.1 Rekombinante AAV als Gentherapievektoren.....	25
1.6 Zielstellung der Arbeit	28
2. Material und Methoden.....	30
2.1 Material	30
2.1.1 Bakterienstämme.....	30
2.1.2 Bakterien - Medien	31
2.1.3 Basis - Plasmide.....	31
2.1.4 Zelllinien	31
2.1.5 Enzyme	32
2.1.6 Oligonukleotide.....	32
2.1.7 Kits - Kommerzielle Test Systeme	33
2.1.8 Geräte.....	33
2.2 Arbeiten mit Bakterien.....	35
2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien	35
2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien	35
2.2.3 Kryokonservierung von Bakterienkulturen.....	35
2.3 DNA - Techniken.....	36
2.3.1 DNA - Isolation aus Bakterien.....	36
2.3.2 Isolation eukaryontischer DNA	36

2.3.3	Isolation von rAAV - DNA.....	36
2.3.4	DNA - Extraktion mit Phenol - Chloroform.....	36
2.3.5	DNA - Fällung.....	37
2.3.6	DNA - Gelelektrophorese.....	37
2.3.7	DNA - Extraktion aus Agarosegel.....	38
2.3.8	Klonierung von DNA.....	38
2.3.8.1	Restriktionsverdau von DNA.....	38
2.3.8.2	Desphosphorylierung von 5' - Phosphatgruppen.....	38
2.3.9	Ligation von DNA - Fragmenten.....	39
2.3.10	Herstellung von <i>blunt-end</i> DNA - Molekülen.....	39
2.4	RNA - Techniken.....	39
2.4.1	Isolation von Gesamt - RNA.....	39
2.4.1.1	Isolation von Gesamt - RNA mit TRIzol® Reagent.....	39
2.4.1.2	Isolation von <i>small</i> - RNA mit dem mirVana™ - Kit.....	40
2.4.2	Auftrennung von RNA.....	40
2.5	Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration.....	41
2.5.1	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	41
2.5.2	Elektrophoretische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung.....	41
2.6	PCR Techniken.....	41
2.6.1	Polymerase - Kettenreaktion.....	41
2.6.2	Reverse Transkriptase PCR.....	43
2.6.3	Quantitative Real Time PCR.....	43
2.7	Sequenzierung von DNA.....	47
2.8	Plasmid - Konstruktion.....	47
2.9	Zellbiologische Methoden.....	55
2.9.1	Zell - Passagierung.....	55
2.9.2	Reaktivierung konservierter Kulturen.....	55
2.9.3	Calcium - Phosphat - Transfektion.....	55
2.9.4	Herstellung von primären neonatalen Rattenkardiomyozyten.....	56
2.9.5	Zellzahl - Bestimmung.....	58
2.9.6	Herstellung von Homogenaten aus PNRK.....	58
2.9.7	Oxalat - stimulierte Ca ²⁺ - Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum.....	58
2.9.8	Protein Kinase A stimulierte Ca ²⁺ - Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum.....	62
2.10	Proteinbestimmung in Kardiomyozyten.....	62
2.11	Konstruktion und Produktion adenoviraler Vektoren.....	64
2.11.1	Generierung des RR5 - Long - Arm.....	64
2.11.2	Generierung und Propagation adenoviraler Vektoren.....	64
2.11.2.1	Ligation und Vorkultur.....	64

2.11.2.2 Adenovirus - Präparation	66
2.11.2.3 Adenovirus - Reinigung durch Ultrazentrifugation	67
2.11.2.4 Entfernung des CsCl - Salzes	67
2.11.3 Titer - Bestimmung der rekombinanten Adenoviren	67
2.11.3.1 Bestimmung der adenoviralen Partikelkonzentration	67
2.11.3.2 Plaque Assay zur Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelkonzentration	68
2.12 Konstruktion und Produktion rekombinanter AAV - Vektoren	68
2.12.1 Transfektion	68
2.12.2 Ernte der rAAV - produzierenden Zellen	70
2.12.3 Zellaufschluss	70
2.12.4 rAAV - Fällung aus Überstand	70
2.12.5 Iodixanol - Gradient	71
2.12.6 Bestimmung des genomischen Titters durch Slot - Blot	71
2.13 Adeno - bzw. AAV - Vektor vermittelter Gentransfer	72
2.14 Transfer von Nukleinsäuren und radioaktive Hybridisierung	72
2.14.1 DNA - Transfer mittels Southern - Blot	72
2.14.2 RNA - Transfer mittels Northern - Blot	73
2.14.3 Radioaktive Markierung von DNA - Fragmenten	73
2.14.4 Aufreinigung radioaktiv markierter DNA - Sonden	73
2.14.5 Radioaktive Prähybridisierung und Hybridisierung	74
2.14.6 Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte	74
2.14.7 Waschen radioaktiv markierter Blots	74
2.15 Tiermodelle	75
2.15.1 Abdominale Aortenligatur bei der Ratte	75
2.15.2 Transthorakale Echokardiografie	76
2.15.3 Viraler Gentransfer <i>in vivo</i>	76
2.15.4 Hämodynamikmessung	77
2.16 Statistische Evaluierung	78
3. Ergebnisse	79
3.1 Konstruktion und Charakterisierung von pAdshPLN _r	79
3.1.1 Funktionelle Charakterisierung von AdshPLN _r auf mRNA Ebene	79
3.1.2 Funktionelle Charakterisierung von AdshPLN _r auf Protein Ebene	82
3.1.3 PLN - abhängiger Ca ²⁺ - Transport	84
3.1.3.1 Ca ²⁺ - Transport in das Sarkoplasmatische Retikulum von PNRK	84
3.1.3.2 PKA stimulierter Ca ²⁺ - Transport	86
3.2 Konstruktion von PLN-shRNA exprimierenden scAAV-shPLN - Vektoren	87
3.2.1 Charakterisierung der scAAV - Vektoren in PNRK	87

3.2.1.1	Nachweis der PLN-shRNA.....	89
3.2.1.2	Einfluss des CMV - Promotors auf die PLN-shRNA Expression	90
3.2.1.3	Analyse der Genomstruktur der scAAV-shRNA-PLN _r Vektoren.....	91
3.3	PLN-shRNA exprimierende scAAV - Vektoren im herzinsuffizienten Rattenmodell	94
3.3.1	Versuchsaufbau für PLN-shRNA vermittelte Modulation der Ca ²⁺ - Homöostase im Ratten - Herzinsuffizienzmodell.....	94
3.3.2	Hämodynamische Charakterisierung.....	95
3.3.3	Echokardiografische Charakterisierung.....	98
3.3.4	Morphologische Charakterisierung.....	100
3.3.5	Nachweis von PLN-shRNA im Herzen	101
3.4	Unspezifische Effekte von RNAi - Vektoren	103
4.	Diskussion	106
4.1	Funktionelle Charakterisierung von AdshPLN _r	107
4.1.1	PLN - Downregulation und Ca ²⁺ - Transportaktivität	108
4.2	Funktionelle Charakterisierung von PLN-shRNA exprimierenden scAAV-shPLN - Vektoren	110
4.2.1	Einfluss der Genomstruktur auf die shRNA-PLN _r - Expression	111
4.2.2	Einfluss des CMV - Promotors auf die PLN-shRNA - Expression.....	112
4.2.3	Inhibitorische Wirkung von GFP auf die PLN-shRNA - Expression.....	113
4.2.4	Konkatemerisierung bei scAAV-shPLN _r	114
4.3	Anwendung von shRNA exprimierenden Vektoren im herzinsuffizienten Rattenmodell	115
4.3.1	PLN-shRNA erhöht Überlebensrate bei Tieren mit Herzinsuffizienz.....	116
4.3.2	Normalisierung der Hämodynamik nach viralem PLN-shRNA - Vektortransfer	116
4.3.3	Signifikante Verbesserung der echokardiografischen Parameter nach viralem PLN-shRNA - Vektortransfer.....	117
4.3.4	Erfolgreiche morphologische Validierung nach viralem Gentransfer.....	118
4.3.5	Nachweis von PLN-shRNA im transduzierten Rattenherzen.....	118
4.4	Einfluss der Vektor-exprimierten PLN-shRNA auf die Expression von herzspezifischen miRNAs.....	119
5.	Zusammenfassung.....	123
6.	Summary.....	125
7.	Ausblick	127
8.	Literaturverzeichnis	128

9. Publikationsverzeichnis.....	152
9.1 Originalarbeiten	152
10. Anhang.....	154
10.1 Plasmidkarten.....	154
11. Lebenslauf.....	156
Danksagung	
Erklärung	

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.bidest	zweifach destilliertes Wasser
ad	Addieren (auffüllen)
Ad	Adenovirus
Arg	Arginin
bgH	„bovine growth hormone“
bp	Basenpaar
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	„complementary desoxyribonucleic acid“
CAR	Coxsacki Adenovirus Rezeptor
CMV	Cytomegalovirus
Cys	Cystein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FKS	Fetales Kälberserum
GAPDH	Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
ITR	„inverted terminal repeat“
kb	Kilobase
kDa	Kilo-Dalton
Luc	Luziferase
µl	Mikroliter
µM	Mikro-Mol
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Milli-Mol

MOI	„multiplicity of infection“
mRNA	„messenger RNA“
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
orf	„open reading frame“
P	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFU	„plaque forming units“
pH	potentia Hydrogenii
Poly A	Polyadenylierungssignal
P/S	Penicillin/ Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPM	„rotation per minute“
RT	Raumtemperatur
s, sek	Sekunde
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TA, TAB	„Trans Aortic Banding“
TBP	„TATA-box-binding protein“
U	„unit“
ÜN	Über Nacht
V	Volt
Vol	Volumenanteil

1. Einleitung

1.1 Definition und Epidemiologie der Herzinsuffizienz

Der klinische Phänotyp der Herzinsuffizienz (*Heart Failure*, HF) ist durch die Unfähigkeit des Herzens, das für die peripheren Organe des Körpers benötigte Blutvolumen bedarfsgerecht zu befördern, gekennzeichnet. Hervorgerufen wird dies durch eine verminderte kardiale Pumpleistung (Hoppe et al., 2005; Remme and Swedberg, 2001). Die manifestierte Herzinsuffizienz stellt ein komplexes klinisches Syndrom dar, welches mit typischen Symptomen, wie denen der Belastungsdyspnoe, *Asthma cardiale* oder Flüssigkeitsretention bis hin zum kardiogenen Schock einhergehen kann (Hunt et al., 2005).

Die Europäische Gesellschaft für Kardiologie (ESC) differenziert in ihrem aktuellen Leitfaden zwischen einer akuten und einer chronischen Form der Herzinsuffizienz. Dabei beschreibt die akute Form neben dem *de novo* Auftreten auch die akute Dekompensation der chronischen Herzinsuffizienz, welche durch Lungenstauung einschließlich Lungenödeme charakterisiert ist (Swedberg et al., 2005). Hingegen definiert sich die chronische Herzinsuffizienz (CHF) in der Unfähigkeit des Herzens, das vom Organismus benötigte Blutvolumen bei normalem enddiastolischem Ventrikeldruck zu fördern (Bauriedel et al., 2005). Ähnlich formulierte es auch die Weltgesundheitsorganisation (WHO), die die Herzinsuffizienz als die verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung beschreibt (McMurray, 1996). Trotz Definition ist die CHF weniger als eigenständige Krankheit zu verstehen sondern vielmehr als ein klinisches Symptom unterschiedlicher Ätiologien.

Die Herzinsuffizienz stellte mit einem Anteil von mehr als 47.000 Todesfällen (5,7 %) aller Sterbefälle in Deutschland im Jahre 2006 die dritthäufigste Todesursache dar. Zusammen mit Herzerkrankungen anderer Genese bildeten die kardiovaskulären Erkrankungen somit die Haupttodesursache in Deutschland (**Abb. 1.1**). Betrachtet man die Herzinsuffizienz nur bei Frauen für den gleichen Zeitraum, so erreichen diese sogar einen Anteil von 7,4 % der Sterbefälle und sind damit zweimal häufiger gefährdet als Männer, den Folgen der Herzinsuffizienz zu erliegen (Statistisches Bundesamt, Todesursachen, 2006). Die Mortalität fünf Jahre nach Diagnosestellung liegt bei 50 % (de la Fuente *et al.*, 2007). Diese hohe Prävalenz und die große Zahl von 15 Millionen weltweit an Herzinsuffizienz erkrankten Patienten (Eriksson, 1995) macht die Problematik der heutigen Gesundheitsmedizin deutlich und unterstreicht die Notwendigkeit nach erfolgreichen Therapiemöglichkeiten.

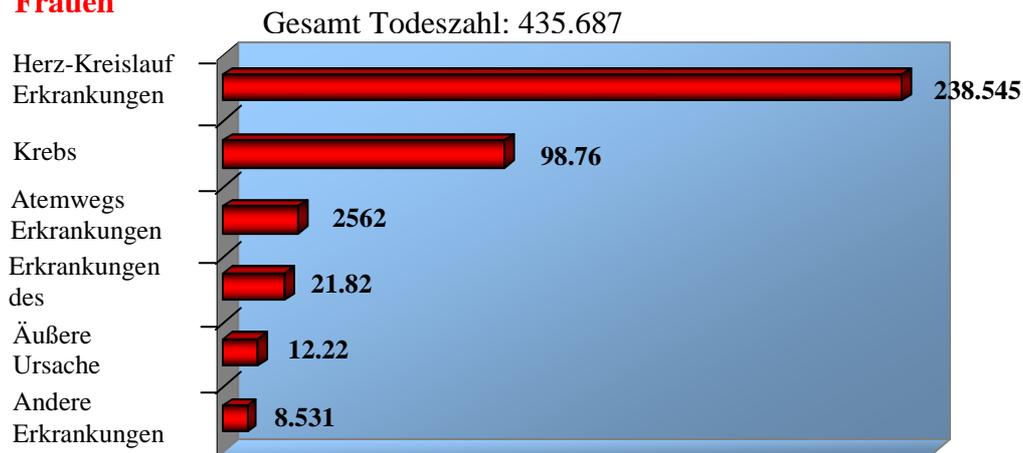
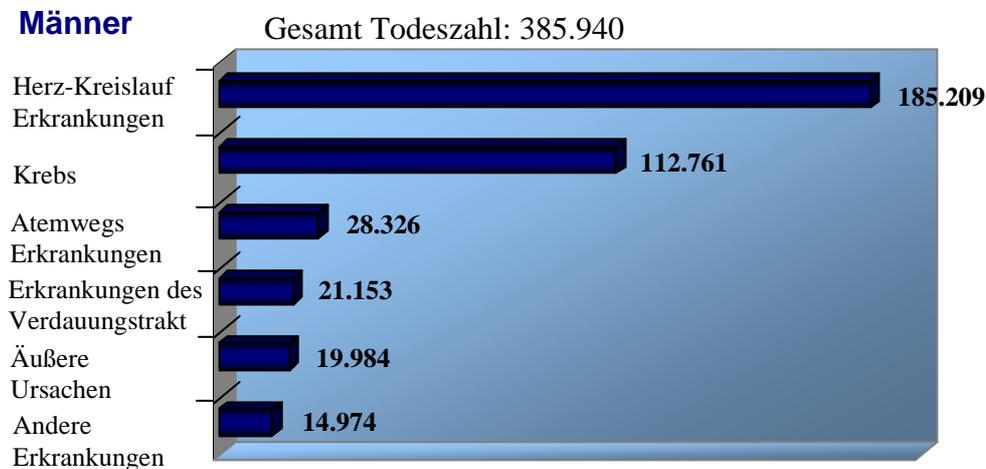
Frauen**Männer**

Abbildung 1.1: Todesfälle Männer und Frauen bezogen auf die Gesamtpopulation 2006 in Deutschland. (erstellt nach Daten des statistischen Bundesamts, Todesursachen, 2006)

Die Hauptursachen der Herzinsuffizienz sind im wesentlichen die koronare Herzerkrankung, Kardiomyopathien, die arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus sowie die kardiale Hypertrophie (Kannel, 2000).

Gegenwärtig beschränken sich die Therapien auf symptombezogene Behandlungen, bei der eine medikamentöse Vor- und Nachlastsenkung sowie eine Steigerung der Inotropie angestrebt werden. So konnte die Mortalität und die Morbidität durch den Einsatz von β -Blockern, ACE-Hemmern und Angiotensin-Antagonisten zwar nachweislich gesenkt (Ramasubbu et al., 2007; Cleland et al., 2002; Packer et al., 2002), aber die Progredienz der Herzinsuffizienz bisher nicht verhindert werden (Dzau, 1992; Anversa et al., 1986). Lediglich die Herztransplantation kann durch den Ersatz eines intakten Organs die Ursache der Pathologie umgehend beseitigen. Allerdings ist diese Form der Therapie durch die geringe Anzahl an Spenderherzen stark limitiert, was die weitere Suche nach

erfolgreichen Therapiemöglichkeiten bei der Behandlung der Herzinsuffizienz unabdingbar macht.

1.2 Die kardiale Calcium - Homöostase

Die durch Herzinsuffizienz hervorgerufenen Veränderungen führen unter anderem zu phänotypischen Modifikationen in den hypertrophierten Myozyten, die neben dem kontraktilem Apparat, das Zytoskelett, auch die Signaltransduktion und die Calcium (Ca) Homöostase betreffen (Kaye et al., 2008; Beuckelmann et al., 1992; Morgan, 1991).

So konnte herausgefunden werden, dass eine Ursache für die Ausbildung einer dilatativen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz durch eine dominante Mutation (Arg → Cys) im Phospholamban (PLN), einem Regulatorprotein der Sarkoendoplasmatischen Retikulum Ca^{2+} - ATPase (SERCA2a) verursacht wird (Schmitt et al., 2003). Die dadurch verminderte Rückbindung von zytosolischem Ca^{2+} in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) durch die SERCA2a offenbart eine mögliche Kausalität bei der Ca - Homöostase in pathologisch herzinsuffizienten Kardiomyozyten (Kubo et al., 2001; Hasenfuss et al., 1994; Arai et al., 1994).

Ein Herzzyklus wird im wesentlichen durch die systolische Kontraktion und der diastolischen Relaxation bestimmt. Die bedeutende Rolle der intrazellulären Calciumkonzentration bei der Herzmuskelkontraktion hatte Ringer bereits 1882 entdeckt (Ringer, 1882). Der durch Calcium-Kationen vermittelte Prozess von Erregung und darauffolgender mechanischer Arbeit wird als elektromechanische Kopplung beschrieben. Durch elektrische Erregung kommt es zur Depolarisation der Zellmembran, was einen Ca^{2+} - Einstrom über die transversalen L - Typ (long-lasting) - Ca^{2+} - Kanäle des SR (**Abb. 1.2**) in das Zytosol zur Folge hat (Beuckelmann and Wier, 1988). Diese spannungsabhängigen Ca^{2+} - Kanäle erlauben aber nur einen „ Ca^{2+} - Funken“ (Cheng et al., 1993), der alleine aber nicht ausreicht, um eine Aktivierung der Myofilamente zu induzieren. Die L - Typ Kanäle sind aber in unmittelbarer Nähe von sackartigen Kammern des sarkoplasmatischen Retikulums, den sogenannten terminalen Cisternen lokalisiert, was eine Diffusion der Ca^{2+} - Ionen zu den Ryanodin Rezeptoren zulässt. Dadurch kommt es zu einem massiven Ca^{2+} - Einstrom vom SR in das Zytosol (Bers, 2002), wobei die intrazelluläre Ca^{2+} - Konzentration von 0,1 auf 1 μM ansteigt. Die Höhe dieses Calciumtransienten bestimmt das Ausmaß der sich anschließenden Kontraktion durch Bindung der Ca^{2+} - Ionen an Troponin C, der den Querbrückenzyklus zwischen

Myosinköpfen und den Aktinfilamenten ermöglicht (Bers et al., 1996; Fabiato and Fabiato, 1975).

Den Abschluss eines vollständigen Kontraktionszyklusses bildet die Relaxation, welche durch eine rasche Reduktion des Ca^{2+} aus dem Zytosol erfolgt (Gianni et al., 2005). An diesem Prozess sind zwei Moleküle involviert, zum einen SERCA und zum anderen der $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher. Beide Moleküle werden durch ihre verschiedenen Affinitäten zu Ca^{2+} charakterisiert, wobei SERCA eine sehr hohe Bindungsaffinität aufweist (Gianni et al., 2005; Shannon and Bers, 2004). SERCA pumpt entgegen dem intrazellulären Gradienten das zytosolische Calcium unter ATP - Verbrauch zurück in das SR, so dass für die nächste Kontraktion ausreichend freies Calcium zur Verfügung steht (Bassani et al., 1994; Carafoli, 1987). Während der Relaxationsphase werden kleinere Mengen an freiem intrazellulärem Calcium über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher, die sarkolemme Ca-ATPase und weitere Ca^{2+} -Kanäle in den Extrazellulärraum transportiert. Diese sorgen für den Erhalt des Konzentrationstransienten zwischen Intra- und Extrazellulärraum (Sheu and Fozzard, 1982).

Allem voran wird die elektromechanische Kopplung schließlich durch die Stimulation kardialer β -adrenerger Rezeptoren reguliert. Hierbei kommt es zunächst zu einer vermehrten Bildung von zyklischem AMP (cAMP), welches aus der Synthese von ATP durch das Enzym Adenylcyclase entsteht (Iyengar, 1993; Sutherland, 1970). Dies führt zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und somit zur Phosphorylierung von mehreren funktionellen Proteinen der Herzmuskelzelle, wie dem Dihydropyridin Rezeptor (DHP), dem Ryanodin Rezeptor (RyR) und Phospholamban (PLN). Dabei trägt die PKA-katalysierte Phosphorylierung von Ca^{2+} -regulierenden Proteinen wesentlich an der Steuerung der elektromechanischen Kopplung bei (Colyer, 1993; Kirchberger et al., 1974). In diesem Zusammenhang ist die Phosphorylierung des Modulatorproteins PLN von besonderer Bedeutung, da durch die Phosphorylierung der inhibitorische Einfluss auf SERCA2a aufgehoben wird und somit die Ca^{2+} -Transportaktivität steigt.

In **Abbildung 1.2** sind die eben beschriebenen Prozesse der kardialen Ca^{2+} -Regulation schematisch dargestellt.

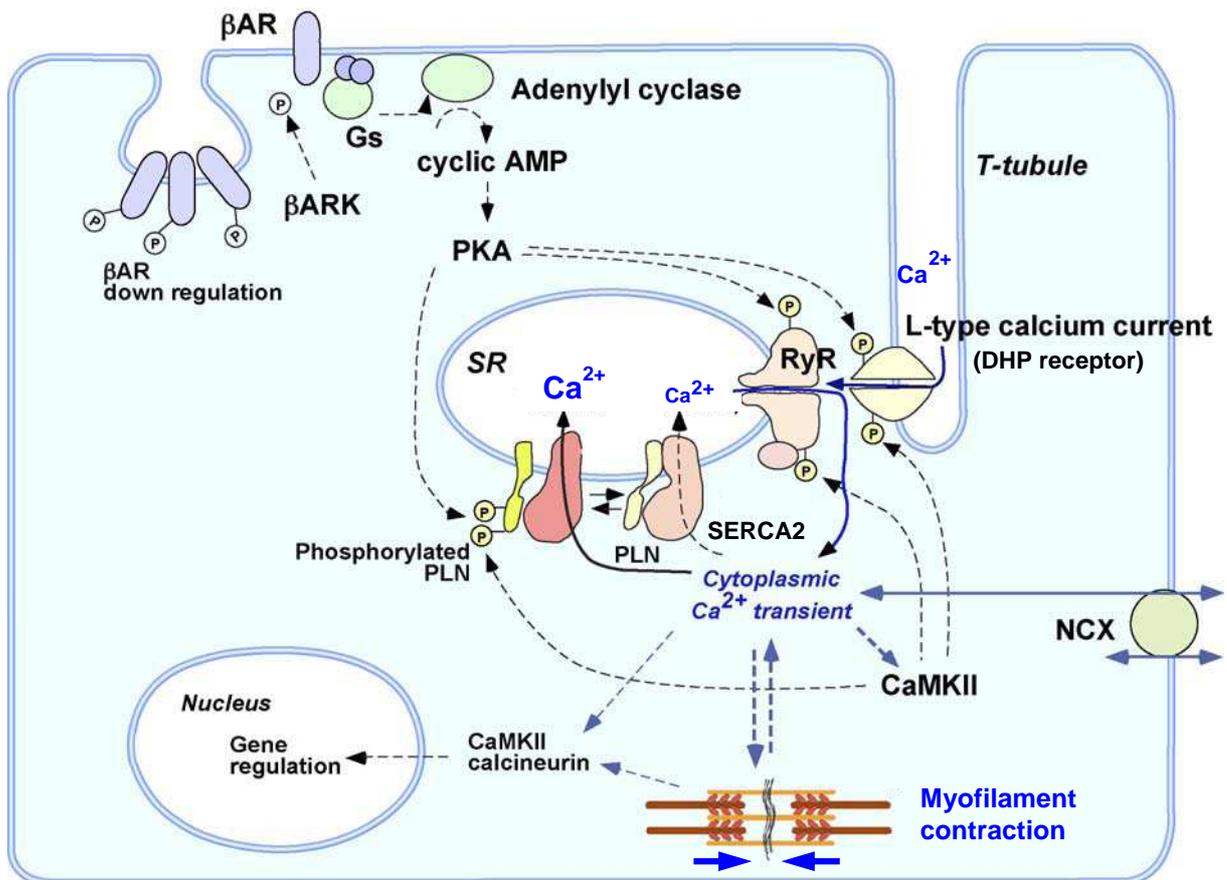


Abbildung 1.2: Ca²⁺ - Regulation des kardialen sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Agonisten des β - adrenergen Rezeptors (βAR) aktivieren die Proteinkinase A (PKA), welche für die Phosphorylierung der 3 Hauptsubstrate verantwortlich ist: den L - Type Ca²⁺ - Kanal oder Dihydropyridin Rezeptor (DHP), den Ryanodin Rezeptor (RyR) und Phospholamban (PLN). All diese Substrate verstärken das Ca²⁺ - Handling und führen zu einer Kontraktion der Myofilamente, wobei die Phosphorylierung von PLN eine Hauptkomponente darzustellen scheint. Ausführliche Erklärung siehe Text. NCX - Natrium - Calcium Austauscher, T-tubule - transverser Tubulus, CaMKII - Calcium / Calmodulin - abhängige Kinase II, SERCA - sarco-endoplasmatische Retikulum ATPase (Modifiziert nach Hoshijima; 2005).

1.3 Phospholamban als Regulatorprotein der Ca²⁺ - ATPase - SERCA

SERCA bildet die zentrale Determinante muskulärer Kontraktilität (Minamisawa et al., 1999; Lompre et al., 1994; Bers and Bridge, 1989; Carafoli, 1987), wobei die Relaxationsgeschwindigkeit durch die Aktivität der SERCA bestimmt wird (Bluhm et al., 2000).

Von dem SERCA Molekül sind bisher fünf Isoformen identifiziert worden, wobei SERCA2a die am häufigsten vorkommende Variante der Ca²⁺ - ATPase im Herzen darstellt (Gianni et al., 2005). Das Ausmaß der Aktivität von SERCA2a wird durch die Inhibierung von dephosphoryliertem PLN reguliert. Erstmals konnte in der Gruppe von Katz Mitte der 70er Jahre gezeigt werden, dass die Phosphorylierung durch die cAMP abhängige Protein Kinase überwiegend an einem kleinen Protein der SR-Membran erfolgt

(Tada et al., 1975a; Tada et al., 1975b; Tada et al., 1974). Aufgrund der Rolle als Hauptsubstrat der cAMP abhängigen Protein Kinase in den Vesikeln des kardialen SR, bezeichnete *Tada et al* das Protein als Phospholamban, was soviel bedeutet, wie „Phosphat Rezeptor“ (Tada et al., 1983). Kurze Zeit später fand man heraus, dass die Aktivität von SERCA durch PLN reguliert wird, indem es im phosphorylierten Zustand die Ca^{2+} - Affinität von SERCA erhöht (Kim et al., 1990). Später konnte der Beweis erbracht werden, dass SERCA nicht direkt durch phosphoryliertes PLN stimuliert wird, sondern dass dephosphoryliertes PLN die SERCA - Aktivität inhibiert und eine Phosphorylierung diese Inhibition wieder aufhebt (Simmernan and Jones, 1998).

PLN ist ein 25 kDa kleines Homopentamer des SR, was durch eine regulatorische, hydrophile Domäne und einer hydrophoben Transmembranregion charakterisiert wird. Die durch PLN abhängige Inhibition von SERCA2a wird durch eine fein abgestimmte Phosphorylierung der regulatorischen Domäne von PLN gesteuert. Diese erfolgt an drei Aminosäureresten (Ser^{10} , Ser^{16} und Thr^{17}) durch drei verschiedene Proteinkinasen (Protein Kinase C, cAMP abhängige Protein Kinase und Ca^{2+} - Calmodulin Protein Kinase). Die Phosphorylierung an jedem der drei Aminosäureresten führt zu einem Anstieg der SERCA2a - Aktivität durch das Ablösen von PLN von der SR - Ca^{2+} - ATPase. Allerdings resultiert nur die Phosphorylierung von Ser^{16} in einer maximalen Zunahme der Aktivität des Ca^{2+} - Transporters (Gianni et al., 2005).

Die Phosphorylierung von PLN *in situ* und die einhergehende Zunahme der Ca^{2+} - Level im SR führten zu der Annahme, dass diese mitverantwortlich sind für eine verstärkte myokardiale Relaxation ($-\text{dP}/\text{dt}$) während einer adrenergen Stimulation des Herzens (Mundina de et al., 1987; Lindemann et al., 1983; Kranias and Solaro, 1982). Bisher war die genaue Rolle von PLN bei der kontraktile Reaktion des Herzens durch adrenerge Agonisten nicht eindeutig geklärt, zumal andere kardiale Schlüssel-Regulatorproteine ebenfalls *in vivo* phosphoryliert wurden. Diese Phosphoproteine umfassen unter anderem Troponin I (TnI) und das C-Protein in den Myofibrillen (Garvey et al., 1988) sowie ein 15 kD großes sarkolemmales Protein (Presti et al., 1985). Allerdings ist über die physiologische Signifikanz der Phosphorylierung des C-Proteins wenig bekannt. Hingegen führt die Phosphorylierung von TnI zu einer Abnahme der Ca^{2+} Sensitivität der myofibrilären Mg^{2+} - ATPase und somit zu einer Beeinflussung der Relaxation (Garvey et al., 1988). Bei der Phosphorylierung des 15 kD sarkolemmalen Proteins geht man davon aus, dass es in die Regulation des transsarkolemmalen Ca^{2+} - Fluss involviert ist (Lindemann, 1986; Presti et al., 1985). Schließlich stellte man fest,

dass die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von PLN gegenüber TnI und dem 15 kD Protein wesentlich schneller erfolgte (Talosí et al., 1993; Garvey et al., 1988; Lindemann and Watanabe, 1985), weshalb PLN wohl die bedeutendste Rolle unter den Phosphoproteinen bei der kardialen Relaxation durch β -adrenerge Stimulation einnimmt (Luo et al., 1994). Um diese Vermutung und die Frage nach der Bedeutung von PLN bei der Regulation der myokardialen Kontraktilität beantworten zu können, reichten die herkömmlichen *in vitro* Modelle nicht mehr aus, weshalb neue Untersuchungsmodelle etabliert werden mussten. So gelang es der Gruppe um Kranias, eine PLN - „Knock-out“ (KO) Maus zu generieren, welche für das PLN - Gen deletiert ist (Luo et al., 1994). Die Deletion führt zu keinen phänotypischen Veränderungen. Auch die Herzfrequenzen, Herz- und Körpergewicht und der Blutdruck gleichen denen homozygoter Wildtypiere. Signifikante Unterschiede gibt es jedoch bei den intraventrikulären Druckfunktionen und den Kontraktions- und Relaxationsparametern (TPP, RT $\frac{1}{2}$). Diese Veränderungen der kardialen Kontraktion sowie der Relaxation reflektieren sich in einem Anstieg der Ca $^{2+}$ - Affinität der SERCA2a.

Eine Verstärkung dieser kardiologischen Veränderungen durch Isoproterenol (Catecholamin) konnte bei PLN - KO - Tieren nicht erreicht werden, dagegen führte die β -adrenerge Stimulation bei Wildtypmäusen zu den gleichen kardiologischen Auswirkungen, wie bei PLN defizienten Mäusen ohne Stimulation (Luo et al., 1994). Diese Beobachtungen bestätigen PLN als einen Repressor linksventrikulärer kontraktiler Parameter, so dass Veränderungen in der Konzentration von PLN Auswirkungen auf die myokardiale Kontraktion erwarten lassen. Entscheidend hierbei ist offensichtlich das stöchiometrische Verhältnis von PLN zur SR Ca $^{2+}$ - ATPase, welches wiederum die Ca $^{2+}$ - Affinität der SERCA - Pumpe bestimmt und so ein potentielles Ziel zur Verbesserung der diastolischen Funktion des insuffizienten Herzens darstellt (Koss et al., 1997). Da bisherige Untersuchungen verschiedener Ratios von PLN/SERCA (1:1; 2:1 und 0.2:1) wenig Aufschluss gegeben haben (Colyer and Wang, 1991; Louis et al., 1987; Tada et al., 1983), stellte sich die Frage, ob alle Ca $^{2+}$ - Pumpen der SR Membran unter der reversiblen Regulation von PLN lagen oder ob es eventuell auch nichtregulierte Ca $^{2+}$ - Pumpen gab (Kadambi et al., 1996). Würde dies der Fall sein, so könnte eine Überexpression von PLN zu einer Inhibierung dieser Pumpen führen, was in einer Verringerung der Kontraktionsfunktion in Abhängigkeit von der Ca $^{2+}$ - Kinetik resultiert.

Für die Überexpression von PLN wurde ein weiteres Tiermodell von der Arbeitsgruppe um Kranias generiert. Dieses transgene Mausmodell exprimierte die doppelte Menge an

PLN - Protein im Herzen gegenüber einer Wildtypkontrolle. Die Auswirkungen eines zweiten PLN - Moleküls waren dramatisch. So resultierte die Überexpression in einer Inhibierung des Ca^{2+} - Transports, in einer Abnahme der systolischen Ca^{2+} - Level und kontraktile Parameter in ventrikulären Myozyten sowie in einer Unterdrückung der linksventrikulären Funktion. Somit konnte gezeigt werden, dass eine Fraktion der Ca^{2+} - Pumpen des kardialen SR nicht unter der Kontrolle von PLN steht (Kadambi et al., 1996). Auf Grundlage der gewonnenen Erkenntnisse aus den *in vivo* PLN - Modellen und der zunehmenden Bedeutung von PLN im Zusammenhang mit Herzinsuffizienz legten immer mehr Arbeitsgruppen ihren Fokus auf die funktionelle Aufklärung von der Interaktion zwischen PLN und SERCA. So deckte *Toyofuku et al* in einer Mutagenesestudie auf, dass ganz bestimmte Aminosäuren der cytoplasmatischen Domäne von PLN für die inhibitorische Wirkung auf SERCA verantwortlich sind (Toyofuku et al., 1994). Darüber hinaus können bestimmte PLN - Mutationen zu schweren Herzinsuffizienzen führen (Haghighi et al., 2006; Haghighi et al., 2003; Schmitt et al., 2003).

Ähnlich dem PLN-KO Modell von *Luo et al* (Luo et al., 1994) erzielten *Eizema et al* und *He et al* mittels PLN antisens (as) RNA - Strategie ebenfalls ein PLN Silencing, was zu einer erhöhten SERCA - Aktivität führte (Eizema et al., 2000; He et al., 1999).

Basierend auf diesen Untersuchungen und dem damit erhaltenen besseren Verständnis über die Interaktion von SERCA und PLN, sowie deren Bedeutung für die Regulation der kardialen Ca^{2+} - Homöostase ergab sich damit die Möglichkeit, einen direkten Einfluss auf die kardiale Kontraktion zu nehmen.

1.4 RNA Interferenz

RNA Interferenz (RNAi) beschreibt einen hoch konservierten Mechanismus für posttranskriptionelles Gen - Silencing in Eukaryonten (siehe **Abb. 1.4**), bei denen die Expression eines Zielgens durch eine *small interfering* RNA (siRNA) inhibiert wird (Chomczynski and Sacchi, 2006; Fire et al., 1998). Dabei handelt es sich um einen zellulären Verteidigungsmechanismus, der durch eine Virusinfektion aktiviert werden kann. Die bei der viralen Replikation gebildeten doppelsträngigen Intermediate werden zunächst erkannt und anschließend abgebaut und gewähren somit einen effektiven Schutz vor RNA - Viren (Voinnet, 2001). RNAi wird aber auch bei der Transkription repetitiver Sequenzen wie z.B. Transposons induziert, da hier durch die Hybridisierung überlappender Transkripte doppelsträngige RNA - Moleküle entstehen. Auf diese Weise

wird das Springen der mobilen genetischen Elemente unterdrückt und so die Stabilität des Genoms gesichert (Tabara et al., 1999).

Das Phänomen der RNAi wurde erstmalig Ende der 90er Jahre für den Nematodenwurm *Caenorhabditis elegans* von Fire et al beschrieben. Dabei bewirkte die parallele Injektion von sense und antisense RNA in *C. elegans* ein deutlich effizienteres Gen - Silencing aufgrund der Doppelstrangbildung als die Applikation vergleichsweise großer Mengen an Einzelstrang RNA-Molekülen (Fire et al., 1998). Diesen inhibitorischen Effekt konnte man auch noch in den Folgegenerationen beobachten (Sambrook et al., 1989).

Für diese fundamentale Entdeckung erhielten Andrew Z. Fire und Craig C. Mello im Dezember 2006 den Nobelpreis für Medizin. 2001 hatten Elbashir et al herausgefunden, dass mit 21 nt langen doppelsträngigen siRNA-Molekülen Gensilencing auch in humanen Zelllinien möglich ist (Elbashir et al., 2001a). Damit war der Weg frei, Genfunktionen in menschlichen Zellen näher zu untersuchen und die Möglichkeit neue gentherapeutische Verfahren zu entwickeln.

1.4.1 Prozessierung doppelsträngiger RNAs durch Dicer zu siRNAs

Der Prozess des posttranskriptionellen Gen - Silencings wird in eine Initiations- und eine Effektorphase unterteilt (Bernstein et al., 2001). Zunächst entstehen in der Initiationsphase aus einer doppelsträngigen (ds) RNA durch eine ATP - abhängige Ribonuklease *III* (Dicer) (Ketting et al., 2001; Bernstein et al., 2001) kurze 21 bis 23 nt lange dsRNA Moleküle mit 5' - Phosphat und 2 nt langen 3' - Überhängen (Carmell and Hannon, 2004). Diese Effektormoleküle werden als *small interfering* (si) RNAs bezeichnet.

Dicer bildet einen Komplex aus zwei RNase *III* Motiven (Mian, 1997; Rotondo and Fire, 1996), einer DExH-RNA-Helikase/ ATPase Domäne [Asp (D) - Glu (E) - X-His (H)], einer Domäne mit unbekannter Funktion DUF283 (domain of unknown function) und einer dsRNA Bindungsdomäne DSRM (dsRNA - binding motif) (Carmell and Hannon, 2004; Aravind and Koonin, 2001). Die meisten Dicer-Ribonukleasen besitzen außerdem ein PAZ-Motiv (Piwi, Argonaute und Zwillie Protein) (Cerutti et al., 2000), welches das Ende der langen dsRNA erkennt und diese ca. 20 bp davon entfernt, katalytisch spaltet (Zhang et al., 2004; Zhang et al., 2002).

1.4.2 Überführung der siRNA in den RISC-Komplex und Degradierung der Ziel mRNA

Die komplexierte Einheit aus Dicer und siRNA wird nun durch das *transactivating response RNA - binding* Protein (TRBP) weiter zum *RNA - induced silencing complex* (RISC) transferiert (Haase et al., 2005; Chendrimada et al., 2005). Neben TRBP in Säugetieren gibt es noch weitere speziesspezifische dsRNA Bindungsproteine, die mit Dicer assoziieren können, wie z.B. RDE-4 aus *C.elegans* oder R2D2 aus *D.melanogaster* (siehe **Tab. 1.1**). Wie weit sie bereits an der Prozessierung zu siRNAs beteiligt sind, ist noch nicht eindeutig geklärt, sicher ist bisher nur, dass sie für die Überführung der siRNA in den RISC-Komplex essentiell sind (Tomari and Zamore, 2005).

Tabelle 1.1: Proteine, die am Prozess der RNA Interferenz beteiligt sind

Proteine	Spezies			
	Pflanzen	Drosophila melanogaster	Caenorhabditis elegans	Vertebraten
Ribonukleasen Typ III	DCL1	Dcr1	Dcr1	Dicer
	DCL2	Dcr2	Drosha	Drosha
	DCL3	Drosha		
	DCL4			
Argonaut Proteine	Ago1	Ago1	Alg1	Ago1
	Ago2	Ago2	Alg2	Ago2
		Aubergine	RDE1	Ago3
		Piwi	RDE4	Ago4
			PPW1	
			PPW2	
Helikasen	SDE3	Armitage	SMG2	Gemin3
		Spindle-E	MUT14	
			DRH1/DRH2	
RDRP	RDR1		RRF1	
	RDR2		RRF3	
	SGS2/SDE1		EGO1	
dsRNA Bindungsproteine	Hyl1	R2D2	RDE4	TRBP
	DRB4	Pasha		DGCR8
Weitere Proteine		Loquacious		
	HEN1	FXR	RDE3	Exportin5
	SGS3	VIG	MUT7	TSN
	HASTY	Tudor-SN	MUT8	Gemin4
	SDE4/Pol IV		VIG1	
			ERi1	
			SID1	
		TSN1		

(**Ago**: Argonaut; **Dcr**: Dicer; **DCL**: Dicer like protein; **DGCR8**: DiGeorge Syndrome critical region gene 8; **DRB**: dsRNA Bindungsprotein; **FXR**: Fragiles-X-mental Retardations-Protein; **MUT**: Mutante; **PPW**: PAZ/Piwi-Protein; **RDR** bzw. **RDRP**: RNA dependent RNA-Polymerase; **SID**: systemic RNAi deficient; **TRBP**: TAR RNA Bindungsprotein; **TSN**: Tudor-Staphylococcus Nuklease; **VIG**: „vasa intronic gene“)

Im RISC - Komplex erfolgt die Inkorporation der siRNA aufgrund von thermodynamischen Unterschieden in den beiden RNA Strängen, wobei der RNA Strang mit der schwächeren Bindungsenergie am 5' - Ende, präferentiell der antisense Strang, in den RISC Komplex integriert wird (Schwarz et al., 2003; Martinez et al., 2002; Schwarz et al., 2002). Dieser Führungsstrang („*guide-strand*“) steuert den RISC-Komplex zur Ziel - RNA. Der verbliebene „*passenger-strand*“, meist der sense Strang, wird aus dem Komplex entfernt und abgebaut.

Anhand von *in vitro* Studien aus Drosophila Extrakten wird derzeit folgender Mechanismus für den Zusammenschluss von RISC und siRNA und der anschließenden Zerschneidung der Ziel - mRNA angenommen (siehe **Abb. 1.3**):

Zunächst lagern sich Dcr2 (Dicer) und R2D2 (dsRNA Bindungsprotein) zu einem Heterodimer zusammen, welcher die siRNA bindet. R2D2 bindet dabei das thermodynamisch stabilere Ende der siRNA und Dcr2 das weniger stabilere Ende. Ein Phosphatrest am 5'-Ende der siRNA verstärkt zusätzlich die Bindung von R2D2. Zusammen bildet die siRNA und das Dcr2/R2D2 - Heterodimer den RISC Loading Komplex (RLC). Durch Protein-Protein Interaktion lagert sich das Argonaut Protein Ago2, die Kernkomponente von RISC, an den RLC (Tahbaz et al., 2004). Anschließend rekrutiert Ago2 die doppelsträngige siRNA und trennt das Heterodimer wieder ab. Das Argonaut Protein verfügt über zwei konservierte Domänen, PAZ (Piwi/Argonaute/Zwille) und Piwi, wobei Piwi das 5' - phosphorylierte Ende des „*guide strand*“ bindet und PAZ das 3' -Ende. Die Endonuklease-Aktivität von Ago2 bewirkt die Zerschneidung des „*passenger strand*“. Der verbliebene „*guide strand*“ und Ago2 bilden nun den reifen, aktivierten RISC-Komplex (Aronin, 2006; Matranga et al., 2005; Rand et al., 2005). Über eine exakte Sequenzerkennung zur antisense komplementären mRNA erfolgt die Bindung und die anschließende Hydrolyse der gebundenen mRNA durch die zum RISC Komplex gehörende Slicer Nuklease 11 bis 12 nt downstream vom 3' - Ende (Chiu and Rana, 2002; Livak and Schmittgen, 2001). Mit dem Abbau der Ziel mRNA ist die durch den Zusammenbau des RISC - Komplexes eingeleitete Effektorphase abgeschlossen.

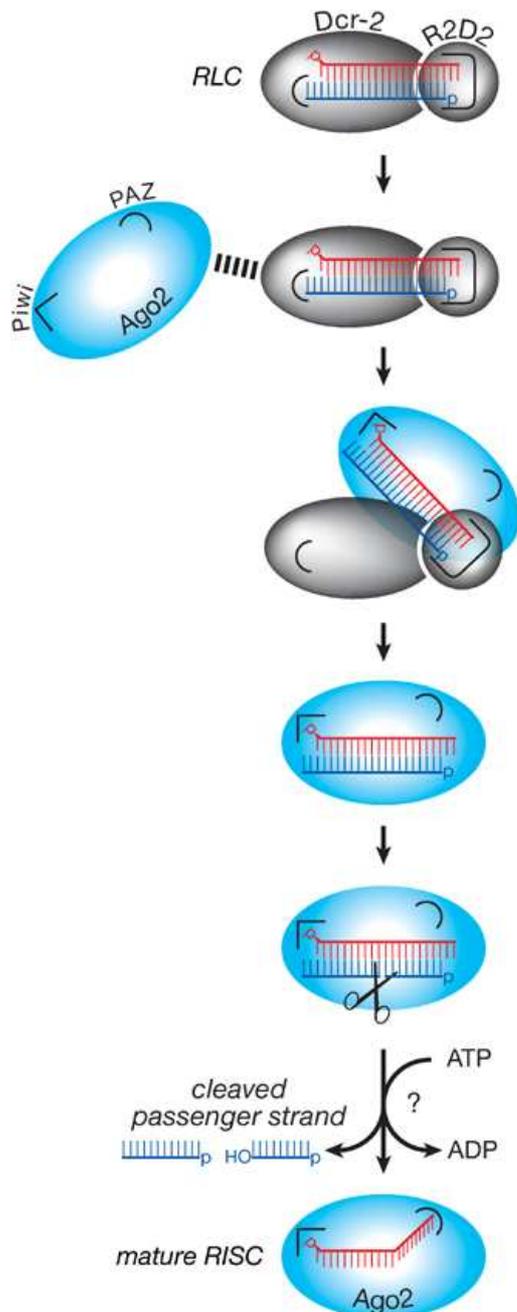


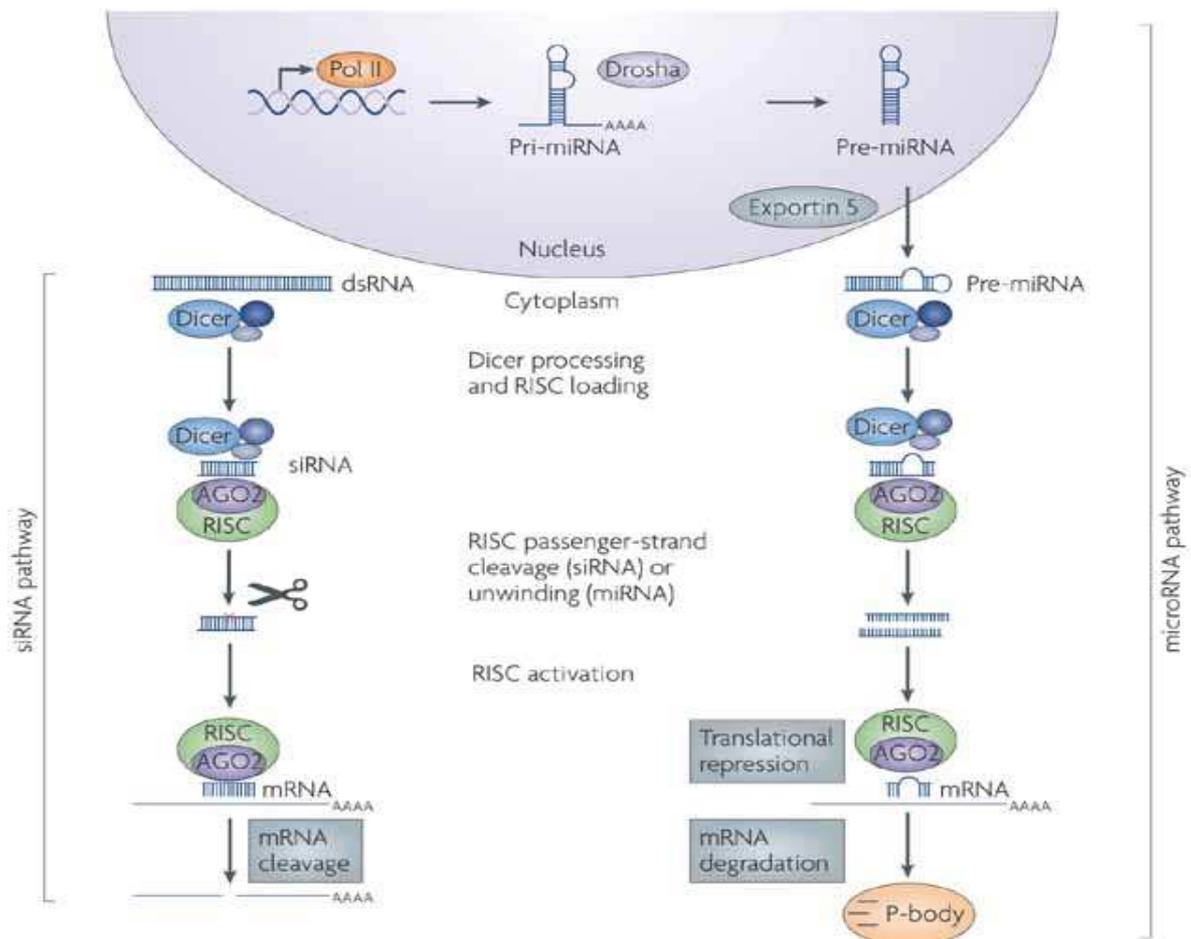
Abbildung 1.3: Komplexbildung von siRNA und RISC. Dies ist ein RNAi-Modell basierend auf den aktuellsten *in vitro* Studien in *Drosophila* aber es ist anzunehmen, dass die Vorgänge in Säugern ähnlich ablaufen. Es werden nur die Hauptkomponenten vom RISC Loading complex (RLC) und RISC dargestellt. RLC besteht aus einem Dcr2/ R2D2 - Heterodimer, welche die siRNA mit Dinukleotid 3'-Überhängen gebunden hat. Durch Protein-Protein Interaktion lagert sich Ago2 an RLC und rekrutiert die doppelsträngige siRNA. Daraufhin lösen sich Dcr2 und R2D2 von Ago2 ab. Die Ago2 Endonukleaseaktivität zerschneidet den „passenger strand“ (blau). Der verbleibende „guide strand“ (rot) bildet mit Ago2 den reifen, aktiven RISC - Komplex, welcher nun an die sequenzspezifische Ziel mRNA binden kann (Aronin, 2006).

1.4.3 Micro RNA vermitteltes Gen - Silencing

Die Entdeckung von *let-7* und *lin-4* in *C.elegans* führte zu einer neuen Klasse von kleinen, endogenen, nicht-kodierenden RNAs, den sogenannten micro-RNAs (miRNAs) (Lagos-Quintana et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Diese hoch konservierten RNAs sind wesentlich an der Regulation der Genexpression beteiligt und steuern somit maßgebliche zelluläre Funktionen im Körper einschließlich Proteinbiosynthese, Zelldifferenzierung und Zelltod

(<http://www.ispub.com/ostia/index.php?xmlFilePath=journals/ijgp/vol2n2/rnai.xml>). Die Regulation kann dabei auf verschiedenen posttranskriptionellen Wegen erfolgen, entweder durch eine spezifische Inhibierung der Translation, der Zerschneidung einer Ziel mRNA oder durch DNA-Methylierung (Kusenda et al., 2006). Bisher konnten allein für den Menschen über 330 miRNA Gene bestätigt werden. Laut der Online Datenbank miRBase (Griffiths-Jones et al., 2006) werden derzeit über 4.000 miRNA Gene durch Computermodelle vorhergesagt. Man geht davon aus, dass mindestens ein Drittel aller menschlichen Gene durch miRNAs reguliert werden und sie an der Manifestation zahlreicher schwerwiegender Erkrankungen, wie Krebs, metabolische Erkrankungen oder Infektionskrankheiten involviert sind (He and Hannon, 2004).

Die molekularen Anforderungen und der Mechanismus, wie miRNAs die Genexpression regulieren, konnte kürzlich aufgeklärt werden, jedoch ist die individuelle Funktion bisher noch völlig unbekannt (Bartel, 2004). Interessanterweise beruhen die Biogenese und der Wirkmechanismus von miRNAs auf Komponenten der RNAi - Maschinerie, wobei es jedoch wesentliche Unterschiede im Vergleich zu siRNAs gibt (siehe **Abb. 1.4**). So sind miRNAs in der Evolution generell konserviert und der Genlocus, der für die miRNA kodiert, ist unabhängig vom Zielgen (Bartel, 2004). Der miRNA - Pathway beginnt im Zellkern mit der Bildung eines polycistronischen Primär-Transkripts (pri-miRNA) durch die RNA-Polymerase II, welches außerdem über eine cap - Struktur und einem Poly-A-Schwanz verfügt (Cai et al., 2004). Nach der Transkription spaltet ein kleiner nukleärer Enzymkomplex, „Microprocessor“ genannt, bestehend aus einem RNase III Enzym (Drosha) und einem dsRNA Bindeprotein (DGCR8), das Primär-Transkript in ein ca. 65 nt langes pre-miRNA Intermediat mit einer Haarnadelstruktur mit 5' PO₄ und einem 2 nt langen 3' - Überhang (Gregory et al., 2004). Anschließend wird die pre-miRNA aktiv über Ran-GTP und Exportin 5 aus dem Zellkern in das Cytoplasma transportiert (Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Dort entfernt Dicer die terminale Haarnadelstruktur. Das dabei entstandene ca. 20 bp lange, doppelsträngige RNA-Molekül mit 2 nt 3' Überhängen wird von dem Ago2-RISC Komplex inkorporiert (Hutvagner and Zamore, 2002). Die reife-miRNA („*guide strand*“) erkennt die Zielsequenz im 3'UTR Bereich der mRNA (Stark et al., 2003), an dem sich der mi-RISC Komplex anlagert und führt zur translationalen Inhibierung. Eine weitere aber noch nicht vollständig verstandene Möglichkeit des Gen - Silencings erfolgt durch die Überführung der mRNA zusammen mit dem mi-RISC Komplex in Prozessierungs - Körper (P-bodies), wo es zur Degradierung der mRNA kommt (de et al., 2007; Liu et al., 2005).



Nature Reviews | Drug Discovery

Abbildung 1.4: RNAi Mechanismus von miRNA im Vergleich zu siRNA in Säugerzellen. Ausführliche Beschreibung siehe 1.4.2. und 1.4.4. Die Kaskade der miRNA Prozessierung beginnt mit der Transkription endogen kodierter primärer miRNA Transkripte (pri-miRNAs) durch eine RNA Polymerase II (Pol II). Diese pri-miRNA wird durch Drosha zu einer Vorläufer miRNA (pre-miRNA) prozessiert und anschließend über Exportin 5 ins Cytoplasma transportiert. Dort wird die pre-miRNA an den Dicer-Komplex gebunden und die Haarnadelstruktur entfernt. Die doppelsträngige pre-miRNA wird an den Ago2-RISC Komplex übergeben. Der „passenger strand“ wird entwunden und abgebaut, während der „guide strand“ an die 3'UTR der Ziel mRNA bindet und entweder zu einer Repression der Translation führt oder zu einer Degradierung der mRNA in P-bodies (Prozessierungs-Körper) (de et al., 2007).

Nachdem herausgefunden wurde, dass miRNAs für kurze endogene *hairpin* RNAs kodieren, wo der *sense* und der *antisense* Strang durch eine kurze Haarnadelstruktur (Loop) miteinander verbunden sind, übernahm Paddison *et al* diesen Mechanismus. Er konnte zeigen, dass sowohl exogen synthetisierte transfizierte als auch endogen exprimierte shRNAs in humanen Zellen zu einem sequenzspezifischen Gensilencing führten (Paddison *et al.*, 2002). Die damit verbundenen neuen Erkenntnisse ermöglichten die Weiterentwicklung der bisherigen siRNAs bzw. erlaubten die Entwicklung neuartiger kurzer RNA - Moleküle zur Steuerung des Gen - Silencings.

1.4.4 Design und Anwendung von siRNAs

Das durch siRNA hervorgerufene posttranskriptionelle Gensilencing stellt in der Pflanzen - und Tierwelt einen hoch konservierten Vorgang dar. Jedoch zeigten sich bei der Wechselwirkung von doppelsträngiger RNA mit komplementärer mRNA gewisse Schwierigkeiten bei der Anwendung in Säugerzellen. Bei einer Länge der doppelsträngigen RNA von mehr als 30 bp wurde eine Interferonantwort induziert, die umgehend zu einem Translationsstop und einer damit einhergehenden Apoptoseinitiation in der betroffenen Zelle führte. Dies wurde hervorgerufen durch die Phosphorylierung des Proteins *EIF2 α* durch die dsRNA abhängige aktivierte Proteinkinase PKR (Gil and Esteban, 2000; Williams, 1997). Erst durch Arbeiten der Gruppe um Tuschl wurde es möglich, durch den Einsatz von kürzeren, chemisch synthetisierten siRNAs mit einer Länge von 21 - 23 nt eine sequenz-spezifische Inhibierung eines Zielgens zu bewirken, ohne dabei eine Immunantwort auszulösen (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b).

Die von Tuschl synthetisch generierten siRNAs gleichen in ihrer Struktur den Produkten des Ribonuklease *III* Enzyms *DICER* mit einem Überhang von 2 nt am 3' - Ende und einer Phosphatgruppe am 5' - Ende. Aufgrund dieser Daten und anderer empirisch gewonnener Erkenntnisse wurden für das Design solcher doppelsträngiger siRNAs Empfehlungen etabliert, basierend auf den strukturellen Eigenschaften. Folglich sollte die siRNA zwischen 21 und 23 nt lang sein, am 3' - Ende ein 2 nt Überhang aufweisen (Elbashir et al., 2001b) und über einen Guanin/ Cytosin - Gehalt von unter 50 % verfügen (Elbashir et al., 2002). Mittlerweile wurden die sequenzspezifischen Anforderungen für eine effiziente siRNA auf vier Struktureigenschaften konkretisiert. Demnach sollen am 5'- Ende des Antisense (as) Strangs ein Adenin / Uracil (A/U) bp sowie am 5'- Ende des sense (s) Strangs ein Guanin / Cytosin (G/C) bp vorliegen. Weiterhin sollte das letzte Drittel des 5'- as - Strangs über mindestens fünf A/U bp verfügen. Generell sollten mehr als 9 G/C bp in Folge vermieden werden (Ui-Tei et al., 2004). Homologien der siRNA Sequenz zu anderen Genen, als zur Ziel mRNA sollten vermieden werden, um unspezifischen Nebeneffekten vorzubeugen.

Zur Anwendung der RNAi durch Transfektion der siRNA in humanen Zellen kam es erstmals 2001 (Elbashir et al., 2001a). Bereits ein Jahr später gab es die ersten *in vivo* Untersuchungen bei der Maus. Hier wurde ein Luziferase (*luc*) exprimierendes Plasmid zusammen mit einer synthetischen siRNA gegen *luc* in die Schwanzvene der Maus injiziert. Nach 24 Stunden konnte in verschiedenen Organen eine Suppression der *luc* - Expression von bis zu 90 % festgestellt werden. Das gab den Startschuss für die

Anwendung der RNA Interferenz *in vivo* und in den darauffolgenden Jahren wurde an Mäusen und Ratten gezeigt, dass durch intravenöse (Hassan et al., 2005; Morrissey et al., 2005; Soutschek et al., 2004; Song et al., 2003) und intraperitoneale (Verma et al., 2003; Sorensen et al., 2003) Applikation von siRNAs ein systematisches Gensilencing in verschiedenen Organen möglich ist.

1.5 Virale Gentherapie

Gentherapie wird nach der Deutschen Forschungsgemeinschaft definiert als das Einbringen von Genen in Gewebe oder Zellen mit dem Ziel, durch die Expression und Funktion dieser Gene therapeutischen oder präventiven Nutzen zu erlangen (www.dfg.de). Zunächst wurde die Gentherapie bei monogenen Erkrankungen eingesetzt, durch den Austausch eines defekten Gens oder das Ersetzen eines fehlenden Gens (Blaese, 1991). Die erste zugelassene klinische Gentherapiestudie im Jahre 1990 sollte den Mangel des Enzyms Adenosindesaminase (ADA - SCID), hervorgerufen durch eine autosomal - rezessive vererbte Immunschwäche, wieder aufheben (Blaese et al., 1995b).

Mittlerweile beschränkt sich die Gentherapie nicht mehr nur auf monogene Erkrankungen (8,2 %) sondern der Großteil der heute durchgeführten Gentherapiestudien widmet sich der Krebsbehandlung (66,5 %). In **Abbildung 1.5** sind die aktuell durchgeführten klinischen Gentherapiestudien für die einzelnen Erkrankungen dargestellt. Mit 9 % nehmen die kardiovaskulären Erkrankungen die zweitgrößte Gruppe der derzeitigen klinischen Studien ein und unterstreichen die Notwendigkeit neuer, erfolgreicher Therapieansätze (Gene Medicine, 2008).

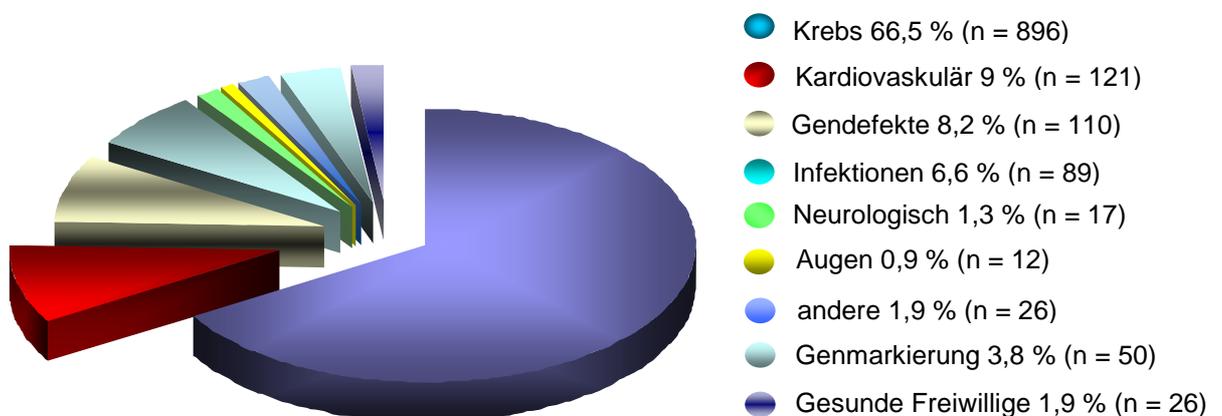


Abbildung 1.5: Übersicht über derzeit durchgeführte klinische Gentherapiestudien und deren Anwendungsbereiche. (modifiziert nach: www.wiley.co.uk/genmed/clinical; The Journal of Gene Medicine, 2008)

Der Transfer des Gens in das Gewebe erfolgt mit Hilfe von Vektoren, daher ist die Wahl geeigneter Vektoren für die Wirksamkeit einer Gentherapie von entscheidender Bedeutung. So richtet sich die Auswahl zum Beispiel danach, ob der Gentransfer *in vitro* in einer Zellkultur stattfindet oder *in vivo* in einem Patienten, da diese Verfahren unterschiedliche Anforderungen an die Sicherheit und die Gewebespezifität des Vektors stellen. Daher ist die Entwicklung verbesserter Vektoren für die Gentherapie weiterhin eine zentrale Aufgabe. So sollten Vektoren für die Gentherapie im Wesentlichen folgende Kriterien erfüllen (www.dfg.de):

- Sie müssen bestimmte Zellen des Menschen effizient modifizieren können.
- Sie müssen eine ausreichend starke und ausreichend langfristige Genexpression gewährleisten können.
- Sie müssen ein möglichst geringes Risikoprofil im Hinblick auf den gewünschten Behandlungsansatz aufweisen.

1.5.1 Aufbau und Genomorganisation von Adenoviren

Adenoviren (Ad) gehören zu der Familie der Adenoviridae, die sich in 4 Gattungen untergliedert (Davison et al., 2003). Als Verursacher respiratorischer Erkrankungen beim Menschen wurden sie erstmals im Jahre 1953 aus adenoidem Gewebe isoliert (ROWE et al., 1953). Das in dieser Arbeit verwendete humane Adenovirus (Ad) vom Serotyp 5 gehört zur Subgruppe C (Shenk T, 2001; Ginsberg, 1999). Es zählt zu der Gattung der Mastadenoviridae (Adenoviren von Säugetieren). Von den humanen Ad sind bis heute über 51 verschiedene Serotypen beschrieben, die entsprechend ihrer Hämagglutinationseigenschaften in 6 Subgruppen (A bis F) eingeteilt werden (Russell, 2000; Chow et al., 1977).

Wie in **Abbildung 1.6** zu sehen ist, handelt es sich bei Ad um hüllenlose, ikosaedrische Partikel mit einem Durchmesser von 70 - 100 nm (Nemerow and Stewart, 1999). Sie beinhalten neben der ca. 36 kb großen linearen, doppelsträngigen (ds) DNA 4 Strukturproteine (V, VII, μ und das terminale Protein) die zusammen die Corestruktur bilden (Stewart et al., 1991). Dieses ist von einem aus 252 Kapsomeren bestehendem Kapsid umgeben, welches aus Pento- und Hexon-Proteinen besteht. Die 12 Ecken des Kapsids bilden die Pentonbasis (Pentamer von pIII) mit dem darin verankertem Fiberprotein (Trimer von pIV). Die 20 Seitenflächen werden aus je 12 Hexonen (Trimer

von pII) gebildet, die mit ihren hervorstehenden Schlaufen die Hauptepitope für neutralisierende Antikörper (AK) darstellen (Shenk T, 1996).

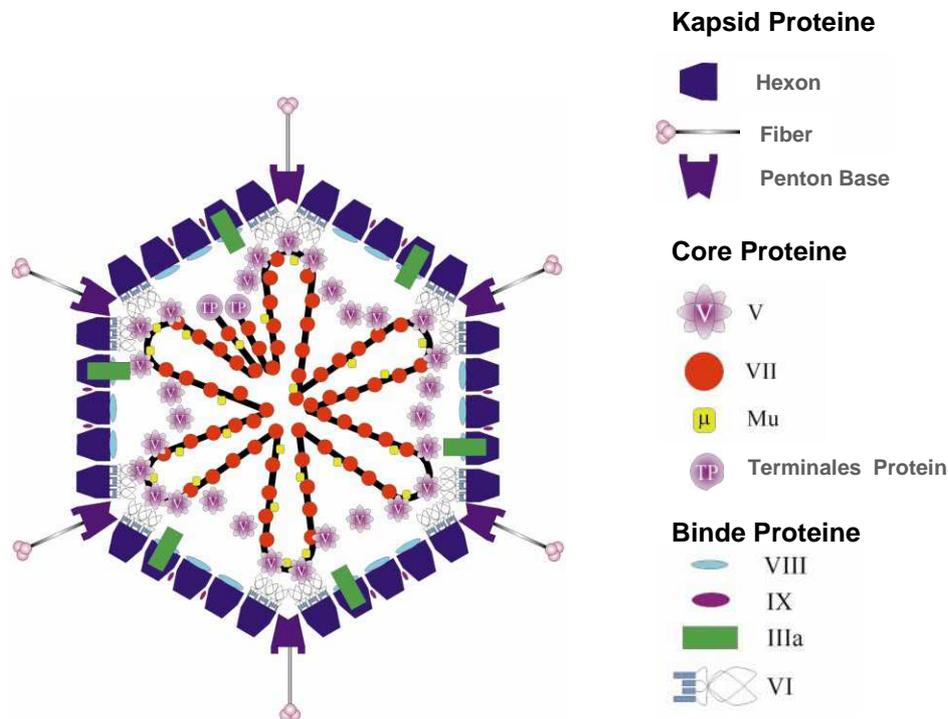


Abbildung 1.6: Schematischer Aufbau des humanen Adenovirus Typ 5. (modifiziert nach *Russel et al.*, 2000)

Das Adenovirus bindet über das Fiberprotein an den Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) (Tomko et al., 1997; Bergelson et al., 1997) seiner Zielzelle und wird durch Endozytose mit Hilfe von α - Integrinen aufgenommen (Fabry et al., 2005; Nemerow and Stewart, 1999; Mathias et al., 1994). Durch Bindung des an die virale DNA gekoppelten terminalen Proteins an die Kernmatrix der Zielzelle erfolgt die unmittelbare Initiation der Replikation (Angeletti and Engler, 1998). Die adenovirale Replikation dauert 24 bis 36 Stunden und entspricht einer streng regulierten Kaskade von Abläufen, die sich in die frühe und die späte Phase unterteilt. In der frühen Phase werden die *early genes* (E1 - E4) bereits nach sechs bis neun Stunden exprimiert (Zhang, 1999). Dagegen erfolgt die Transkription der *late genes* (L1 - L5) durch wirtseigene RNA - Polymerasen erst in der späten Phase. Die verschiedenen Transkripte der einzelnen Gene gehen durch alternatives *splicing* hervor (Berk and Sharp, 1978; Berget and Sharp, 1977). Eine Übersicht über das adenovirale Genom und seiner Spleißprodukte ist in der **Abbildung 1.7** wiedergegeben.

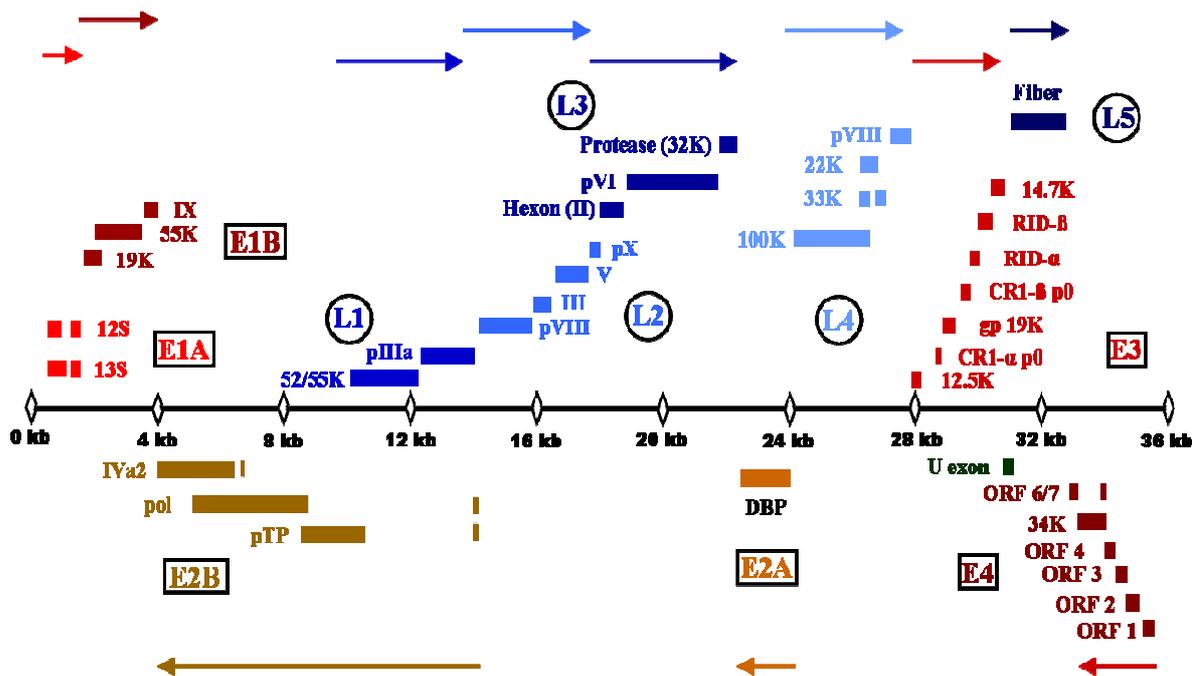


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung des Adenovirusgenoms und seiner Transkriptionseinheiten. Die offenen Leserahmen sind durch Balken dargestellt. Die Farben kodieren für die jeweilige Expressionsgruppe. Die Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung [modifiziert nach (Davison et al., 2003)].

1.5.2 Adenovirale Vektoren

Betrachtet man den Lebenszyklus von Adenoviren, so stellt man fest, dass diese nicht in das Wirtsgenom integrieren sondern als episomale Elemente im Zellkern der Zielzelle replizieren und nach kurzer Zeit durch die Immunantwort des Körpers eliminiert werden (Ameis, 2000). Hinzu kommt, dass rekombinante Adenoviren höhere Transduktionsraten als Retroviren erreichen und sie in höheren Konzentrationen produziert werden können (Blaese et al., 1995a). Adenoviren eignen sich somit für den Einsatz als gentherapeutischen Vektor. Allerdings führen adenovirale Infektionen zu einer unmittelbaren Immunantwort durch zytotoxische T - und B - Zellaktivierung (Eck et al., 1996; Yang et al., 1994a), welche mit der Produktion neutralisierender Antikörper einhergeht (Schulick et al., 1997; Gilgenkrantz et al., 1995). Für die Inhibierung dieser Immunantwort wurden adenovirale Vektoren entsprechend modifiziert und weiterentwickelt (Russell, 2000; Gorziglia et al., 1999; Quinones et al., 1996; Engelhardt et al., 1994). Die 1. Generation von rekombinanten adenoviralen Vektoren verfügte über eine Deletion der E1A - und der E1B - Region oder auch der E3 - Region, welche so eine Aufnahmekapazität von 7 bis 8 kb für gentherapeutische DNA ermöglichten (Russell, 2000; Romano et al., 1999; Yang et al., 1994a; Yang et al., 1994b). Bei Adenoviren der 2. Generation wurde zusätzlich eine

Mutation in das E2A Gen eingefügt, was zu einer geringeren Immunantwort und einer längeren rekombinanten Genexpression führte (Lusky et al., 1998; Engelhardt et al., 1994; Yang et al., 1994b). In der weiteren Entwicklung von adenoviralen Vektoren deletierte man das komplette Virusgenom bis auf die ITRs und bezeichnete diese 3. Generation von rekombinanten adenoviralen Vektoren demzufolge als „gutless“ - Vektoren. Allerdings sind sie nun auf sogenannte Helferviren und komplementäre Zelllinien angewiesen, die die fehlenden viralen Gene in trans zur Verfügung stellen (Hitt and Graham, 2000; Steinwaerder et al., 1999; Morsy et al., 1998; Dedieu et al., 1997; Yeh et al., 1996). Diese neue Generation von Adenoviren konnte die Expression *in vivo* dramatisch erhöhen und die Immunantwort der Wirtszelle auf ein Minimum reduzieren (Morsy et al., 1998). So bietet die Amplifikation hoher Virustiter von 10^{12} bis 10^{13} pfu/ml einen enormen Vorteil gegenüber anderen Gentransfervektoren, wie z.B. Retroviren. Dies spiegelt sich auch in der derzeitigen klinischen Anwendung wieder. Gegenwärtig werden weltweit rund ein viertel aller klinischen Gentherapiestudien mit adenoviralen Vektoren durchgeführt, dicht gefolgt von Retroviren mit 22,3 %. Der nicht-virale Gentransfer erfolgt zum größten Teil durch Plasmide oder nackter DNA mit 17,8 % und durch Lipofektion (7,4 %) (www.wiley.co.uk/genmed/clinical; Gene Medicine, 2008).

In der **Tabelle 1.2** sind die wichtigsten Eigenschaften der verschiedenen Generationen von adenoviralen Vektoren hinsichtlich ihrer Eigenschaften vergleichend zu anderen viralen Vektoren (retroviralen - und AAV - Vektoren) dargestellt.

Tabelle 1.2: Eigenschaften viraler Vektoren*

	Retrovirale Vektoren		Adenovirale Vektoren			Adeno-assoziierte virale Vektoren	
	<i>Onko-Retrovirus</i>	<i>Lentivirus</i>	<i>1./2. Generation</i>	<i>gutless</i>	<i>onkolytisch</i>	<i>monomeric</i>	<i>self complementary</i>
Zielzelle	proliferierende Zellen	ruhende und proliferierende Zellen	ruhende und proliferierende Zellen	ruhende und proliferierende Zellen	Tumorzellen	ruhende und proliferierende Zellen	ruhende und proliferierende Zellen
Immunantwort	sehr schwach	sehr schwach	stark	schwach	stark	schwach	schwach
Genomintegration	ja	ja	nein	nein	nein	selten	selten
Beginn der Transgenexpression	schnell	schnell	schnell	schnell	schnell	langsam	schnell
Replikation	nein	nein	nein	nein	ja	nein	nein
Stärke der Transgenexpression	hoch	hoch	sehr hoch	sehr hoch	sehr hoch	hoch	hoch
Dauer der Transgenexpression	langzeit	langzeit	kurz/länger	langzeit	kurz	langzeit	langzeit
Maximale Transgengröße	≈ 7kb	≈ 7kb	≈ 3-9 kb	bis zu 35 kb	< 4 kb	≈ 4 kb	≈ 2 kb
Virusäurer (Vektorpartikel/ml)	≈ 10 ⁶	≈ 10 ⁶	10 ¹² - 10 ¹³	10 ¹² - 10 ¹⁵	10 ¹² - 10 ¹³	10 ¹² - 10 ¹³	10 ¹² - 10 ¹³
Potentiell Risiko	Insertionelle Mutagenese	Insertionelle Mutagenese	zytotoxisch	zytotoxisch	zytotoxisch	zytotoxisch	zytotoxisch

*Fechner, Kurreck 2008, Vector mediated and viral delivery of short hairpin RNAs s. 267-295, ed. J. Kurreck, in RSC Biomolecular Sciences "Therapeutic Oligonucleotides", Royal Society of Chemistry, Cambridge UK.

1.5.3 Modifikation der Ca²⁺ - Homöostase im Herzen mit adenoviralen Vektoren

Für den kardialen Gentransfer wurden initial sogenannte Markergene wie GFP (green fluorescent protein), β -Galactosidase oder *LacZ* verwendet, da sie sich mit verhältnismäßig geringem Aufwand nachweisen lassen (Champion et al., 2003; Del et al., 2002; French et al., 1994). Es stellte sich heraus, dass der adenovirale Gentransfer gegenüber direkter DNA-Injektion oder Transfektionsmethoden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deutlich effizienter ist und weitaus höhere Expressionslevel erreicht (Kass-Eisler et al., 1993; Guzman et al., 1993).

In zahlreichen Tiermodellen mit Herzerkrankungen als auch bei humaner Herzinsuffizienz, assoziiert mit einer gestörten Ca²⁺ - Kinetik, wurde eine Abnahme der SERCA2a - Aktivität festgestellt (Hasenfuss et al., 1994; Arai et al., 1994; Gwathmey et al., 1990; Gwathmey et al., 1987). Allerdings lieferten verschiedene andere Studien kontroverse Angaben über die Expression der zentralen Modulatoren der Ca-Homöostase von SERCA2a und PLN im menschlichen insuffizienten Herzen (Gianni et al., 2005; Bluhm et al., 2000; Luo et al., 1994; Bers and Bridge, 1989; Carafoli, 1987). Dennoch scheint das relative Verhältnis von SERCA2a und PLN sowohl *in vitro* als auch bei

humaner Herzinsuffizienz ein bedeutendes Charakteristikum darzustellen (Meyer et al., 1995; Kiss et al., 1995). Einen möglichen Ansatz zur weiteren Klärung dieses Sachverhalts zeigte *Hajjar et al* indem er einen replikationsdefizienten Adenovirus zur Überexpression von SERCA2a in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten verwendete. Sie erzielten dadurch eine erhöhte SERCA2a Expression, was eine verstärkte SR Ca^{2+} - ATPase Aktivität und eine Verkürzung des intrazellulären Ca^{2+} - Transienten zur Folge hatte (Hajjar et al., 1997a). In einem weiteren Experiment transduzierten Hajjar und Mitarbeiter neonatalen Rattenkardiomyozyten einen PLN exprimierenden adenoviralen Vektor, um Aufschluss darüber zu bekommen, ob der Grund für das veränderte Ca^{2+} - Handling bei myopathischen Herzen durch eine Zunahme der PLN Konzentration im Verhältnis zu SERCA2a verursacht wurde (Hajjar et al., 1997b). Sie fanden heraus, dass eine Überexpression von PLN wahrscheinlich die Sensitivität der SR Ca^{2+} - Pumpe zum Ca^{2+} reduziert, es jedoch zu keiner Veränderung der maximalen Ca^{2+} - ATPase Aktivität kommt. Diese Ergebnisse stimmten mit den Beobachtungen von *Odermatt et al* und *Kadambi et al* überein. *Odermatt et al* hatte festgestellt, das V_{\max} der SERCA2a durch Interaktion mit PLN und deren Phosphorylierung nicht verändert wurde (Odermatt et al., 1996). Zu einem ähnlichen Resultat kamen Kadambi et al. Sie zeigten in Mäusen, dass die Überexpression von PLN zwar die Affinität der SERCA2a senkt aber die maximale Geschwindigkeit der SR Ca^{2+} Zunahme unverändert blieb. Die Folge der verminderten Ca^{2+} - Affinität führte zu einer Veränderung der kontraktilen Parameter bei isolierten Kardiomyozyten und zu einer reduzierten linksventrikulären systolischen Funktion *in vivo* (Odermatt et al., 1996; Kadambi et al., 1996).

Einen anderen Weg wählten *Eizema et al* Sie nutzten das adenovirale Vektorsystems, um neonatale Rattenkardiomyozyten zu transduzieren aber nicht um ein Transgen über zu exprimieren sondern im Gegenteil, sie transferierten eine spezifische antisense (as) RNA gegen PLN, um dessen Translation zu inhibieren. Die durch einen CMV (*Cytomegalie Virus*) - Promotor gesteuerte asPLN Expression, bewirkte eine ca. 70 % ige Down-regulation der endogenen PLN mRNA nach 48 h und sogar eine über 75 % ige Inhibierung des PLN Proteins nach 72 h. Das Gen - Silencing äußerte sich in einer erhöhten Ca^{2+} - Affinität der SERCA2a und einer deutlichen Verkürzung zur Wiederherstellung des Ca^{2+} - Transienten in intakten Zellen (Eizema et al., 2000). Diese Beobachtungen gingen einher mit den Ergebnissen von *He et al*, welcher einen adenoviralen Vektor mit einer dominant - negativen PLN Mutante in Kaninchen Kardiomyozyten transduzierte (He et al., 1999).

Die Gruppe um Meyer *et al* nutzte ebenfalls die Vorzüge adenoviraler Vektoren. Sie transduzierten Ratten Antikörper, die gegen den cytoplasmatischen Teil des PLN (PLN-Ab) gerichtet waren. Diese rekombinanten einzelkettigen Antikörper wurden aus der schweren und leichten variablen IgY - Kette aus Affen hergestellt. Die *in vivo* exprimierten PLN-Ab führten zu einer erhöhten SERCA - Aktivität, die die Kontraktilität sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen verbesserte (Meyer *et al.*, 2004).

1.5.4 Adeno Assoziierte Viren

Die Adeno-assoziierten Viren (AAV) gehören zu der Familie der Parvoviridae und bilden die kleinsten und strukturell am einfachsten aufgebauten DNA - Viren (Muzyczka, 2001). Ursprünglich wurden AAVs als Kontamination in Adenoviruspräparationen entdeckt. Für die eigenständige Replikation sind AAVs aber auf Helferviren, wie Adeno- oder Herpesviren angewiesen (Buller *et al.*, 1981; ATCHISON *et al.*, 1965). Stehen diese nicht zur Verfügung, kommt es zu einer latenten Infektion, bei der das virale Genom stabil in das Chromosom 19 der Wirtszelle integriert wird (Samulski *et al.*, 1991; Kotin *et al.*, 1990; Cheung *et al.*, 1980).

Das Genom des AAV besteht aus einer 4,7 kb großen einzelsträngigen DNA, welche von einem hüllenlosen ikosaedrischen Kapsid von 22 nm Durchmesser umgeben wird (Srivastava *et al.*, 1983). Dieses setzt sich aus den drei Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 zusammen, welche vom Strukturgen (Cap) kodiert werden und durch alternatives Spleißen gebildet werden (Goncalves, 2005). Außerdem kodiert das Genom für vier verschiedene regulatorische Proteine (Rep), wobei es von zwei 145 bp langen *inverted terminal repeats* (ITRs) flankiert wird, die aufgrund von komplementären Basenpaaren charakteristische T - förmige Haar-nadelstrukturen ausbilden (Srivastava *et al.*, 1983; Lusby and Berns, 1982). In ihnen sind neben den terminalen Schnittstellen (*terminal resolution sites*), an denen das Genom während der DNA - Replikation geschnitten wird, auch zwei *Rep binding elements* lokalisiert, an die sequenzspezifisch die großen Rep Proteine Rep 78 und Rep 68 binden können (Chiorini *et al.*, 1994; McCarty *et al.*, 1994; Im and Muzyczka, 1990). Die Genomstruktur von AAV 2, welche dem aller anderen bisher bekannten Serotypen sehr ähnlich ist, wird in **Abbildung 1.8** veranschaulicht.

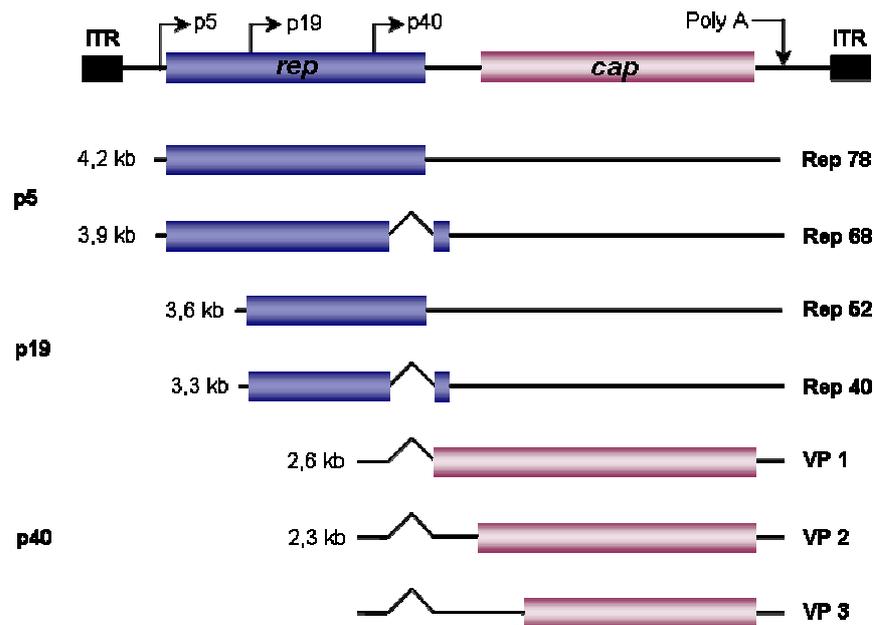


Abbildung 1.8: Genomorganisation von AAV. Dargestellt ist das Genom von AAV-2 und seiner genetischen Elemente. Die Genomstrukturen der anderen AAV - Serotypen ist ähnlich. Abgebildet sind die 3 Promotoren (p5, 19 und 40), eine gemeinsames Polyadenylierungssignal, die offenen Leserahmen für die Rep und Cap Proteine sowie die flankierenden ITRs. Darunter sind die möglichen Transkripte und deren Proteinprodukte angegeben [modifiziert nach (Merten et al., 2005)].

Die ITRs wirken als *cis* - Elemente bei der DNA - Replikation sowie bei der Regulation der Genexpression und sie sind für die Verpackung in virale Kapside erforderlich (Beaton et al., 1989; McLaughlin et al., 1988; Senapaty et al., 1984). Die kleineren Proteine Rep 52 und Rep 40 sind an der Bildung der plus- und minus - polarisierten Einzelstränge und deren Verpackung beteiligt (King et al., 2001; Dubielzig et al., 1999; Chejanovsky and Carter, 1989). Das Prinzip der AAV - DNA Replikation ist in der **Abbildung 1.9** wiedergegeben.

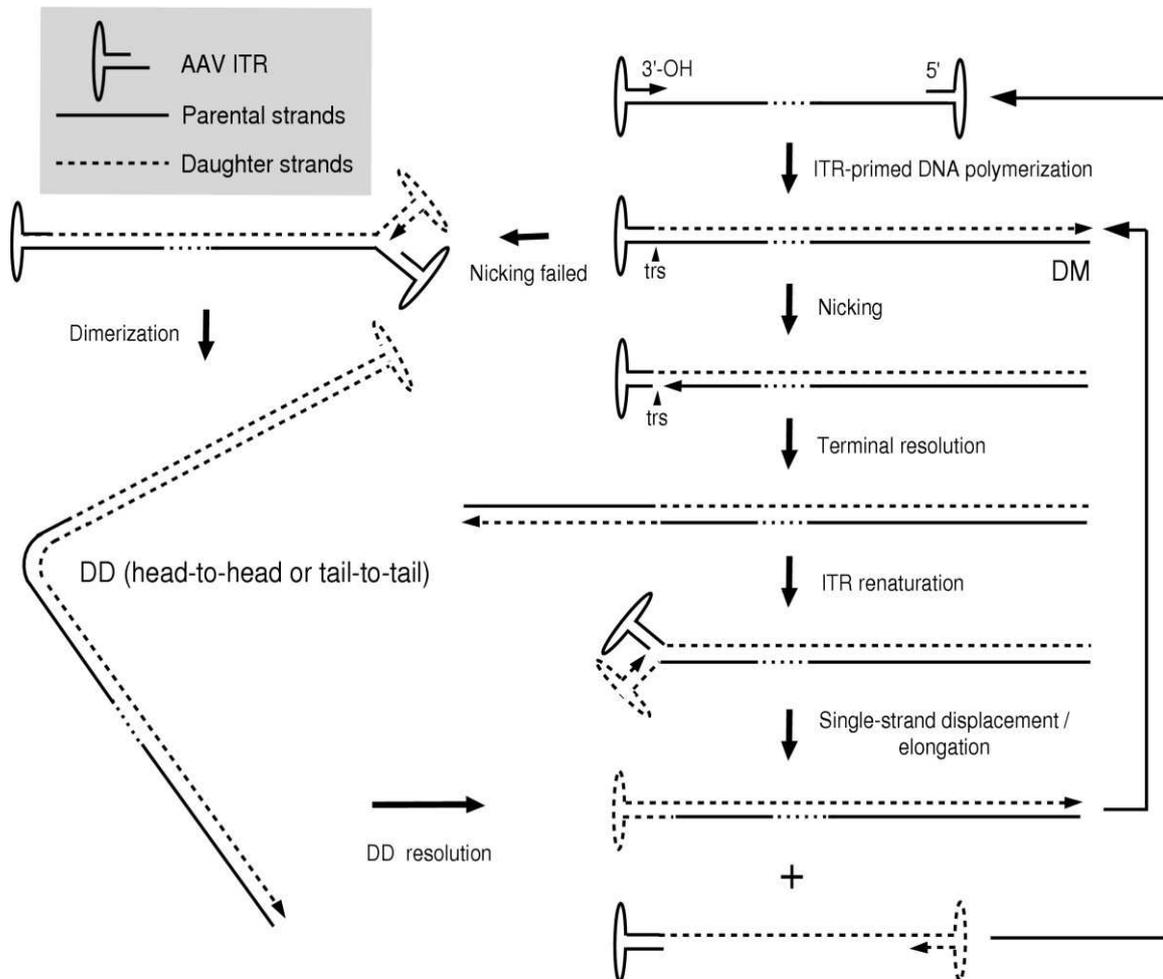


Abbildung 1.9: Schematische Darstellung der AAV - DNA Replikation. Die AAV - DNA Replikation beginnt mit der DNA Polymerisation am 3' - Primer der ITR, wodurch lineare Doppelstrangmoleküle mit einem kovalent geschlossenem Ende hervorgehen. Diese werden gegenüber vom ursprünglichem 3' - Ende an der *terminal resolution site* (trs) vom Elternstrang (parental) getrennt. Das dabei neu entstandene 3' - Ende mit einer Hydroxylgruppe (OH) bildet das Substrat für die DNA - Polymerase, welche anschließend die ITR auffaltet und kopiert. Die neu gebildeten palindromischen Enden formen sich wieder zu Haarnadelstrukturen und das doppelsträngige Molekül wird in zwei einzelsträngige Virusgenome aufgetrennt, welche nun in die Kapside verpackt werden können. Wenn Fehler beim Abtrennen des parental Stranges an der trs passieren (linke Seite), kommt es zur Bildung von linearen doppelsträngigen Dimeren, die aber später wieder zu Monomeren prozessiert werden (Goncalves, 2005).

1.5.4.1 Rekombinante AAV als Gentherapievektoren

Rekombinante AAV (rAAV) Vektoren sind in der Lage sowohl sich teilende als auch nicht-teilende Zellen zu transduzieren (Loiler et al., 2003; Fisher et al., 1997) und sie ermöglichen eine Langzeitexpression im Herzen (Kaspar et al., 2005) ohne eine Immunantwort der Wirtszelle auszulösen (Conrad et al., 2005; Bennett, 2003; Hernandez et al., 1999). Somit bieten rAAV Vektoren eine gute Alternative gegenüber anderen Vektorsystemen (vgl. **Tab. 1.2**) zum gentherapeutischen Einsatz bei kardiovaskulären Fragestellungen.

In der Regel sind bei rAAVs alle viralen Gene deletiert, wodurch 96 % des viralen Genoms entfernt werden und der Platz somit für das Transgen zur Verfügung steht. Für die Replikation und die Verpackung werden nur die ITRs benötigt, wenn Rep und Cap durch ein Helferplasmid zur Verfügung gestellt werden (Samulski et al., 1999; McLaughlin et al., 1988). Trotz einer Durchseuchungsrate von 80 % der Bevölkerung für den Serotyp 2 (AAV-2) konnte bisher keine Pathogenität für den Menschen festgestellt werden, welche auf das AAV zurückzuführen wäre (Goncalves, 2005). Rekombinante AAV wirken im Gegensatz zu den meisten anderen viralen Vektoren nicht zytotoxisch und die durch sie hervorgerufene zelluläre Immunantwort fällt deutlich geringfügiger aus (Goncalves, 2005; Chirmule et al., 1999). Ursache dafür ist das Fehlen der viralen Gene und die Unfähigkeit einer effizienten Transduktion Antigen - präsentierender Zellen (Jooss et al., 1998). Allerdings spielt die Beschaffenheit des Transgens und die Art und Weise des rAAV Gentransfers eine wesentliche Rolle für die Stärke der zellulären wie auch humoralen Immunantwort (Monahan and Samulski, 2000).

Neben der Langzeitexpression von AAVs, wie Xiao und Samulski in Muskelzellen einer Maus demonstrieren konnten (Xiao et al., 1996), ist ein weiterer entscheidender Vorteil von rAAV, dass sie sowohl teilende als auch ruhende, terminal differenzierte Zellen transduzieren können (Carter and Samulski, 2000). Hinzu kommt die Fähigkeit, dass verschiedene AAV - Serotypen, unterschiedliche Rezeptoren und Korezeptoren nutzen und somit einen gewebsspezifischen Tropismus ausbilden (Grimm and Kay, 2003), z.B. der vor kurzem erstmals beschriebene AAV9 - Vektorserotyp mit dem nahezu 100 % des Herzens transduziert werden konnten (Inagaki et al., 2006; Pacak et al., 2006).

Die bisher durchgeführten präklinischen Studien mit AAV - Vektoren verliefen in verschiedenen Tiermodellen sehr erfolgversprechend (De et al., 2004; Wang et al., 2002; Acland et al., 2001; Xiao et al., 1996). Mittlerweile werden AAV - Vektoren in ersten humanen Studien unter anderem zur Behandlung von Parkinsonpatienten und Hämophilie B eingesetzt (Kaplitt et al., 2007; Manno et al., 2003).

Jedoch besteht in der Anwendung von AAV - Vektoren für die Gentherapie eine gewisse Limitierung, da nach der Aufnahme des Vektors in die Zelle, erst die Umwandlung der einzelsträngigen Virus DNA in einen replikationsfähigen Doppelstrang erfolgen muss. Dabei ist die Doppelstrangsynthese auf Replikationsfaktoren der Wirtszelle angewiesen (Ferrari et al., 1996). Diese zeitliche Einschränkung kann mit Hilfe von rekombinanten, selbstkomplementierenden AAV - Vektoren (scAAV), welche doppelsträngigen, endogenen AAV - Replikationsintermediaten entsprechen, umgangen werden (McCarty et

al., 2001). Hierbei werden zwei zueinander komplementäre DNA - Stränge mit einer maximalen Länge von 2,3 kb durch eine ITR zu einem Einzelstrang miteinander verbunden. Aufgrund der Basenhomologien erfolgt unmittelbar nach dem Uncoating im Zellkern der Zielzellen, die Faltung zu einem Doppelstrang, welcher die umgehende Transgenexpression ermöglicht. Durch eine Deletion in der *terminal resolution site* der mittleren von den drei ITRs wird verhindert, dass der lange Einzelstrang wieder in zwei kurze DNA - Moleküle geschnitten wird (Goncalves, 2005). (siehe **Abbildung 1.10**)

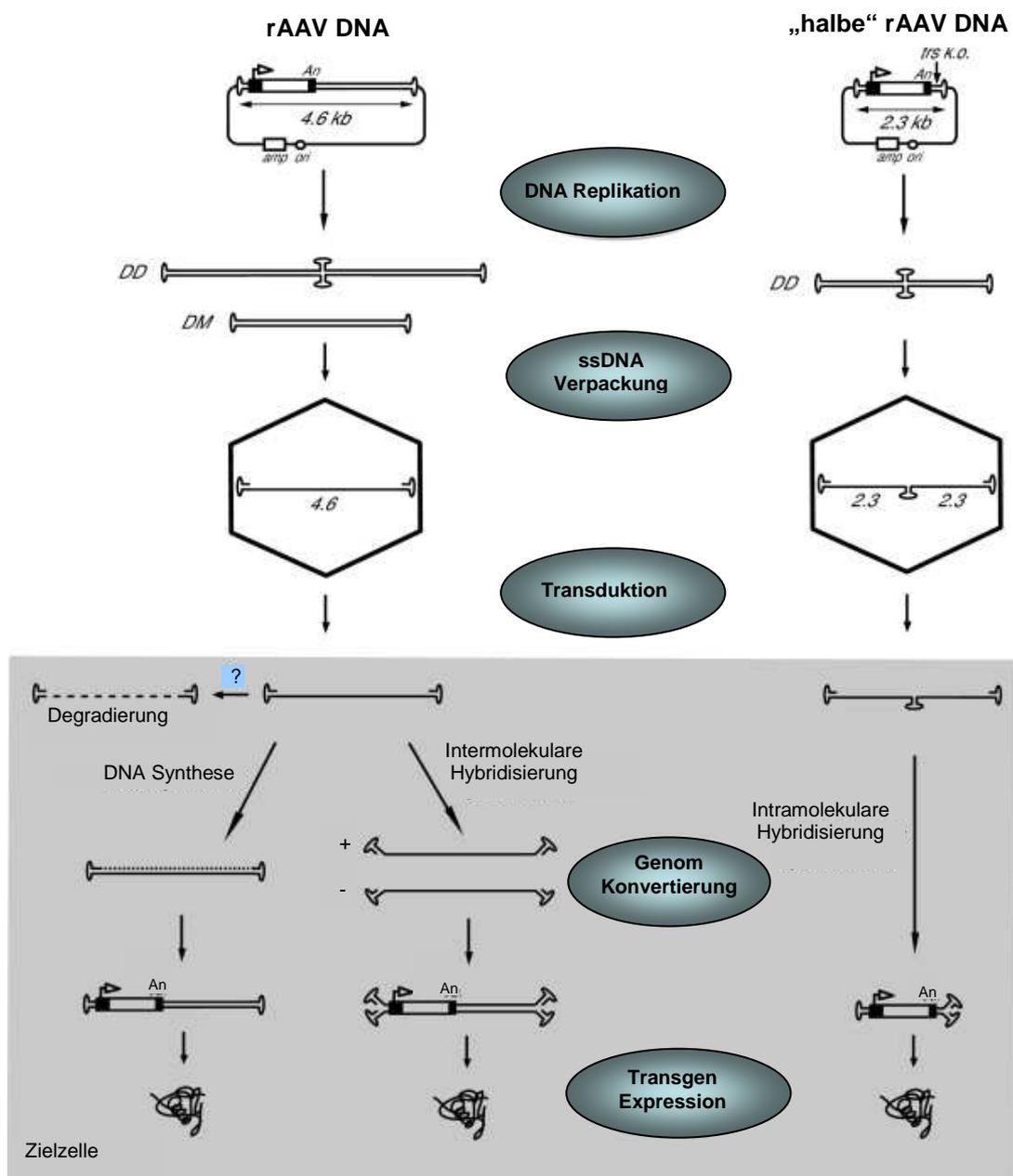


Abbildung 1.10: Generierung von herkömmlichen rekombinanten AAV (rAAV) und selbstkomplementierenden AAV (scAAV) im Vergleich. **Links:** Gängiges Replikationsmodell. Aus einem

doppelsträngigem Monomer (DM) - bzw. - Dimer (DD) - Intermediat erfolgt die Bildung des rAAV - Genoms beider Polaritäten. Im Zellkern kann das virale Einzelstrang Genom degradiert oder zum Doppelstrang synthetisiert werden (abhängig von der Wirtszell spezifischen DNA - Synthese oder durch Intermolekulare Hybridisierung). **Rechts:** Bildung von scAAV aus einem ursprünglich nur halb so großen rAAV Genom gegenüber der Wildtyp AAV - DNA. Diese werden als doppelsträngige Dimere repliziert mit einer deletierten *terminal resolution site* (trs) der axialen ITR. Als Einzelstrang im Kapsid verpackt, erfolgt durch intramolekulare Hybridisierung, aufgrund des komplementären Charakters, die Faltung zu einem Doppelstrang. Unmittelbar daran schließt sich die Transgen Expression unabhängig von der Wirtszell DNA - Synthese (Abbildung modifiziert nach Goncalves, 2005).

McCarty *et al* konnte in *in vivo* Experimenten bei der Maus die deutliche Überlegenheit der selbstkomplementären AAV gegenüber einzelsträngigen rAAV in Bezug auf die Gentransfereffizienz demonstrieren. Die Transgenexpression bei scAAV war nicht nur schneller, sondern auch weitaus effizienter. Mit einem Verhältnis von 5,9 : 1 genomischer Partikel zu infektiösen Partikeln, erreichten die scAAV - Vektoren in HeLa - Zellen eine 5 bis 140 fache höhere Effizienz als herkömmliche rAAVs. Diese Transduktionseffizienz konnte weder durch eine Ko-Infektion mit Adenoviren gesteigert werden, noch konnte sie durch Blockierung der DNA-Synthese der Wirtszelle mit Hilfe von Hydroxyurea inhibiert werden. Das deutet darauf hin, dass die Doppelstrangsynthese der Targetzelle keine Limitierung für die Transgenexpression von scAAV generierten Vektoren darstellt (McCarty *et al.*, 2001).

1.6 Zielstellung der Arbeit

Der Herzinsuffizienz liegen unterschiedliche Ätiologien zu Grunde, die häufig mit einer Dysfunktion der Ca^{2+} - Homöostase des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) der Herzmuskelzelle einhergehen. Derzeit beschränken sich die Therapien auf symptombezogene Behandlungen, die zwar nachweislich die Mortalität und die Morbidität senken aber die anhaltende Progredienz der Herzinsuffizienz bisher nicht aufhalten konnten. PLN ist ein Inhibitor der SERCA2a und somit zentraler Faktor bei der Regulation der SERCA2a - Aktivität. Durch PLN - Suppression kann eine Verbesserung der Ca^{2+} - Homöostase erzielt werden. Bisherige therapeutische Ansätze befassten sich mit dem Silencing von PLN mittels PLN *antisense* Strategien oder dem Einbringen von transdominanten negativen PLN -Mutanten, um so eine Verbesserung der Rückbindung des zytosolischen Ca^{2+} in das SR zu bewirken. Die hier erzielte Inhibierung von PLN in Kardiomyozyten führte zwar zu einer Erhöhung der Ca^{2+} - Affinität der SERCA2a und somit zu einer deutlichen Verkürzung des Ca^{2+} - Transienten, jedoch währte dieser Effekt nur wenige Tage bzw. zeigte nur eine geringe Effizienz.

Aufgrund dieser Limitierungen bisheriger Strategien war es das Ziel dieser Arbeit, basierend auf der Entwicklung der RNAi als Technologie zum sequenzspezifischen Silencen von Genen, ein neues gentherapeutisches Konzept zur Inhibierung von PLN zu entwickeln, um dadurch die Wirksamkeit vorhandener anti-PLN Ansätze zu steigern.

Dazu sollte die Effizienz und Spezifität einer PLN spezifischen shRNA initial *in vitro* mittels adenoviraler Vektoren in neonatalen Rattenkardiomyozyten charakterisiert werden. Mit dem Ziel eines hochspezifischen und effizienten Gentransfers in das Herz *in vivo* sollten zusätzlich kardiotope PLN-shRNA exprimierende AAV - Vektorkonstrukte generiert werden. Diese wurden unter anderem mit Markergen - Expressionskassetten ausgestattet und deren Einfluss auf die PLN-shRNA-Expression analysiert. Nach erfolgreicher Charakterisierung der Vektoren *in vitro* hinsichtlich ihrer Transduktions-, Silencingeffizienz und Expressionsstärke der shRNA sowie der Langzeitwirkung, sollte der erfolgsversprechenste PLN-shRNA exprimierende AAV - Vektor als auch der PLN-shRNA adenovirale Vektor im Rahmen einer kardialen Gentherapie *in vivo* an einem herzinsuffizienten Rattenmodell angewendet werden. Dabei sollte untersucht werden, ob die PLN-shRNA *in vivo* funktionell ist. Zur näheren Charakterisierung sollten dafür neben der Hämodynamikmessung, die echokardiographische sowie die morphologische Evaluierung der Herzparameter dienen. Abschließend sollten mögliche Nebenwirkungen der RNA Interferenz auf intrazelluläre Regulationsmechanismen (Pathways), wie zum Beispiel dem microRNA - Pathway, untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Tabelle 2.1: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp	Referenz
<i>E. coli</i> Sure	<i>(McrA-)D(mcrCB-hsdSMR-mrr)171endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1lac recB recJ sbcC umuC Tn5(Kanr) uvrC [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)]</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F end A1, hsdR17, (rK, mK⁺), supE44, thi-1, gyrA96, relA1, Δ (argF-lacZya) U169, f80dlacZ ΔM15, λ-</i>	(Vieira and Messing, 1982)
<i>E.coli</i> XL-10 Gold	<i>TetR Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZ ΔM15Tn10 (TetR) Amy CamR]</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
<i>E.coli</i> Top 10	<i>F lacIq Tn10 (TetR) mcrA (mrr-hsdRMS -mcrBC) F80 lacZM15 lacX74 recA1 deoR araD139 (araleu) 7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.2 Bakterien - Medien

Tabelle 2.2: Verwendete Bakterien - Medien

Medium	Hersteller
LB-Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Basis - Plasmide

Tabelle 2.3: Verwendete Basis - Plasmide

Plasmid	Selektionsmarker	Hersteller
pAAV-MCS	Amp ^r	Stratagene, La Jolla, CA, USA
PCR 4Blunt-TOPO	Amp ^r , Kan ^r	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
pDP6rs	/	Dirk Grimm
pHelper	Amp ^r	Stratagene, La Jolla, CA, USA
pTRE2	Amp ^r	Clontech, Mountain View, USA
pTRE-tight	Amp ^r	Clontech, Mountain View, USA
pZS2	Amp ^r	Zeg Sheng, Dallas, USA

2.1.4 Zelllinien

Tabelle 2.4: Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Beschreibung	Kultivierungsmedium
HEK 293	humane embryonale Nierenzellen	DMEM (Gibco BRL)*
HEK 293T	humane embryonale Nierenzellen (exprimieren das SV40 T-Antigen stabil)	DMEM (Gibco BRL)*
HeLa	humane Zervix-Karzinomzellen	DMEM (Gibco BRL)*
PNRK	Primäre Neonatale Rattenkardio-myozyten	CMRL 1415-ATM (Biochrom AG)**

* Wenn nicht anders erwähnt, wurden alle Zellkulturmedien mit 10 % FKS (CCPro, Neustadt, Deutschland) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) versetzt.

** Medium wurde mit 10 % FKS (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) und 2 mM Fluorodeoxyuridine (Sigma Aldrich Chemie, Steinheim, Deutschland) versetzt.

2.1.5 Enzyme

Tabelle 2.5: Verwendete Enzyme

Enzym*	Hersteller
CIP	Roche, Mannheim, Deutschland
DNA-Ligase	New England Biolab (NEB), Ipswich, USA
Proteinase K	Boehringer Mannheim, Deutschland
Pwo-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Restriktionsenzyme	NEB, Ipswich, USA
Taq-Polymerase	Applied Biosystems, Foster City, USA
Trypsin	Biochrom AG, Deutschland
T4- DNA-Polymerase	NEB, Ipswich, USA
T4-Polynukleotid Kinase	NEB, Ipswich, USA

*Alle Enzyme wurden mit den mitgelieferten Puffern entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

2.1.6 Oligonukleotide

Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide

Bezeichnung	Sequenz
Ad5 4600 A	5' - gaa tgc atg gaa aat ctt gg - 3'
Ad5-324s <i>Bgl</i> II	5' - tct aga tct ttt gtg tta ctc ata gcg cg - 3'
Ad5-3315s	5' - tga cat gac cat gaa gat ct - 3'
BA-1371s	5' - aag gat tcc tat gtg ggc g - 3'
BA-2307as	5' - ctc ctt aat gtc acg cac ga - 3'
BgH- <i>Not</i> Is	5' - tgt gcg gcc gct gcc ttc tag ttg cca gcc a - 3'
Plas-223s	5' - cta ttg aaa tgc ccc agc aag c - 3'
Plas-600a	5' - aat ctcata cta caa tgtcag aag - 3'
pZS2-3'UTRa	5' - tgg ctg gca act aga agg c - 3'
HIFA-53- <i>Pme</i> I a	5' - tag ggt tta aac cca ggg ttt tcc cag tca -3'
HIFA-533- <i>Spe</i> I s	5' - atg gac tag tcc aga gaa tta ccc tca c-taa - 3'
shPLN17-f	5' - cgg cgt acc tta ctc get c - 3'
shPLN17-RT as	5' - gtc gta tcc agt gca ggg tcc gag gta ttc gca ctg gat acg aca tag cc - 3'
U6s	5' - gcg tcc ttt cca caa gat ata - 3'
U6a	5' - cag tgg aaa gac gcg cag gc - 3'

U6-1s-*Bgl* II

5' - gag aga tct atg aat tcc cca gtg gaa ag -3'

2.1.7 Kits - Kommerzielle Test Systeme

Tabelle 2.7: Kits für die Molekularbiologie

Kit Name	Hersteller
Agilent RNA 6000 Nano Kit	Agilent, Santa Clara, USA
<i>mir</i> VANA™ miRNA Isolations Kit	Applied Biosystems/Ambion, Austin, USA
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
High Capacity® cDNA Archive Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
SYBR® Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
NT-GFP Fusion® TOPO TA Expression Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Zero Blunt® TOPO® PCR Cloning Kit for Sequencing	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	Peqlab, Erlangen, Deutschland
QIAquick GelExtraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Transfektion - Kalzium-Phosphat-Kit	Stratagene, La Jolla, CA, USA
EndoFree Plasmid Maxi, Mega Kits	Qiagen, Hilden, Deutschland

2.1.8 Geräte

Tabelle 2.8: Geräte

Bezeichnung	Hersteller
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Wellesley, USA
Agarosegel-Kammer Hoefer® HE 33	Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Affymetrix GeneChip System Confocal Scanner 3000	Affymetrix, Santa Clara, USA
Axiovert 25 Mikroskop	Zeiss, Jena, Deutschland
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Bio-Rad Calibrated GS-800 Scanner	Bio-Rad, München, Deutschland
Bioscan QC 2000	Bioscan, Washington, USA
Brutschrank Modell 5420	Labotect, Göttingen, Deutschland
DNA Thermal Cycler	Perkin Elmer Cetus, Wellesley, USA

Bezeichnung	Hersteller
Elektrophoreseeinheit PP3000	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Feinwaage BL 310	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Gene Amp [®] PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, USA
Genesys 6 UV-Spektrometer	Thermo Electron, Waltham, USA
GE Vivid-7 Ultrasound Gerät	General Electric, Norwegen
Heizplatte IKAMAG [®] RH	Janke & Kunkel IKA - Labortechnik, Staufen, Deutschland
Hybridisierungs-ofen Compact Line OV 4	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Immunfluoreszenzmikroskop Olympus IX 50	Olympus, Tokio, Japan
Kamera Coolpix 990	Nikon, Tokio, Japan
Liquid Szintillation Analyzer TRI-CARB 2200CA	Packard BioScience GmbH, Dreieich, Deutschland
Lumat LB 9501	Berthold Technologies GmbH, Bad Wildbad, Deutschland
Millar-Tip-Katheter [®]	MILLAR Instruments, TX, USA
NanoDrop [®] ND-1000 Spectrophotometer	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter HI 8314 membrane pHmeter	HANNA instruments, Woonsocket, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland und Gilson, Middleton, USA
Phosphoimager Fuji Film BAS-1500	Fuji Photo Film, Frankfurt, Germany
QC 2000	Bioscan, Washington, USA
Sequence Detection System 7900 HT	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Transilluminator BioDoc Analyze	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
TRIO-Thermoblock	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
Tube-Topper-Heaters	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Ultra-Zentrifuge Centrikon T_2050	Kontron Instruments, Zürich, Schweiz
UV Stratalinker [®] 1800	Stratagene, LaJolla, 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

2.2 Arbeiten mit Bakterien

2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Für die Transformation von Bakterien wurden kompetente Zellen hergestellt. Tiefgefrorene Zellen wurden aus -80 °C entnommen und mit einer Impföse auf Agar-Platten ausgestrichen. Anschließend wurden die Platten bei 37 °C über Nacht inkubiert. Mit einer Einzelkolonie von der Agar-Platte wurden 5 ml LB-Medium in einem 15 ml Falcon-Röhrchen angeimpft und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Im nächsten Schritt wurden mit 500 μl aus dieser Kultur, 500 ml LB-Medium in einem Kulturkolben beimpft und bei 37 °C schüttelnd bis zu einer OD_{600} von 0,5 expandiert. Anschließend wurde der Kulturansatz auf 50 ml Zentrifugen-Röhrchen verteilt, für 10 min auf Eis belassen und bei 4 °C zentrifugiert (4.000 RPM, 5 min). Das Zellpellet wurde in 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und weitere 15 min auf Eis inkubiert, bevor es anschließend für 5 min zentrifugiert wurde (4 °C , 5.000 RPM). Das Pellet wurde in 2 ml kalter 50 mM CaCl_2 -Lösung resuspendiert und für zwei Stunden auf Eis gestellt. Danach wurde die Bakterienkultur mit 20 % Glycerin versetzt, in vorgekühlte 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert (50 - 100 μl Volumen) und bei -80 °C gelagert. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Zentrifuge AvantiTMJ-25 (Beckman Coulter, Fullerton, USA).

2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

Für die Transformation kompetenter Zellen wurden 50 bis 100 μl Zell-Aliquote auf Eis aufgetaut, mit 10 bis 25 μl Ligationsprodukt versetzt und für 10 bis 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 30 bis 60 s (je nach Bakterienstamm) bei 42 °C im Wasserbad wurde der Ansatz für zwei weitere Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde die Zellsuspension in 250 μl (*E. coli* Top 10) bzw. 900 μl (andere Stämme) LB-Medium aufgenommen und in 1,5 ml Reaktionsgefäßen 30 bis 60 min bei 37 °C schüttelnd vorinkubiert. Das Bakterien-zellgemisch wurde durch kurzes zentrifugieren konzentriert oder in geeigneter Verdünnung anschließend auf Agar-Platten mit Selektionsmedium ausplattiert, um dann für 18 bis 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank zu inkubieren.

2.2.3 Kryokonservierung von Bakterienkulturen

Für die Konservierung von Bakterienzellen wurden diese über Nacht bei 37 °C in 3 ml LB-Medium unter selektiven Bedingungen angezogen. Danach wurde 1 ml aus der Übernacht-Kultur in ein steriles Eppendorf-Cryo-Röhrchen (Eppendorf, Deutschland) überführt, mit Glycerin versetzt (Endkonzentration 20 %) und bei -80 °C gelagert.

2.3 DNA - Techniken

2.3.1 DNA - Isolation aus Bakterien

Für die Isolation von DNA im kleinen Maßstab wurde der „peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I“ und für die Isolation im großen Maßstab, die Kits „EndoFree Plasmid Maxi bzw. Mega“ verwendet. Die Aufreinigung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.3.2 Isolation eukaryontischer DNA

Die Isolation genomischer DNA aus Zellen erfolgte mittels E.Z.N.A. Tissue DNA Kit II (PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Zuvor wurde das Kulturmedium von den Zellen abgesaugt und mit dem vom Hersteller mitgelieferten Lyse-Puffer lysiert.

2.3.3 Isolation von rAAV - DNA

Für die Isolation von rekombinanter AAV - DNA wurde die AAV - Vektor Fraktion aus der Isolierung mit dem Jodixanolgradienten (**Kap. 2.12.5**) verwendet. Als erstes erfolgte ein Proteinverdau.

Tabelle 2.9: Reaktionsansatz Proteinverdau

Reagenzien	Volumen (500 µl)	Endkonzentration
rAAV-Präparation	50 µl	
0,5 M EDTA	10 µl	10 mM
10 % SDS	50 µl	1 %
Proteinase K* ¹	5 µl	20 µg
TBS-Puffer* ²	385 µl	

*¹ **Proteinase K** (Sigma): 5 mg/ ml in sterilem Wasser, Lagerung bei - 20 °C

*² **TBS-Puffer:** 10 mM Tris-HCl (pH 7,4); 2 mM CaCl₂; 2 mM MgCl₂; 150 mM NaCl; pH 8,0; autoklaviert

Dieser Verdau wurde für 1 Stunde bei 37 °C inkubiert, anschließend die rekombinante Vektor - DNA mit Phenol - Chloroform extrahiert (**Kap. 2.3.4**) und in 50 µl RNase - freiem Wasser (DEPC - Wasser, USB Corporation Cleveland, USA) gelöst.

2.3.4 DNA - Extraktion mit Phenol - Chloroform

Die DNA - haltigen Zell- bzw. Viruslysate wurden mit einem Volumenteil (Vol) einer Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol - Lösung (24:25:1) versetzt und eine Minute

geschüttelt. Die Nukleinsäuren verbleiben aufgrund ihres hydrophilen Charakters in der oberen wässrigen Phase gelöst, während sich enthaltene Proteine in der Interphase anordnen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 12.000 x g (Eppendorf, Deutschland) wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit einem Volumen (Vol) Chloroform:Isoamyl-Alkohol (24:1) versetzt. Das DNA - Gemisch wurde geschüttelt und anschließend erneut zentrifugiert. Danach wurde die obere wässrige Phase abgenommen und die darin enthaltene DNA mit Ethanol gefällt (**Kap. 2.3.5**).

2.3.5 DNA - Fällung

Das DNA - Gemisch wurde mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat - Lösung und mit 2 Vol absoluten Ethanol versetzt und durchmischt. Der Ansatz wurde mindestens 30 min oder über Nacht bei - 20 °C inkubiert und anschließend bei 12.000 g (Eppendorf, Deutschland) für 15 min zentrifugiert. Das erhaltene DNA - Pellet wurde mit 400 µl 70 % igem Ethanol gewaschen und erneut bei 12.000 g (Eppendorf, Deutschland) für 5 min zentrifugiert. Nach Lufttrocknung für 5 - 10 min bei RT wurde die DNA in 30 µl sterilem Wasser gelöst.

2.3.6 DNA - Gelelektrophorese

DNA - Fragmente wurden durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt. Die Gelkonzentration wurde abhängig von den zu trennenden Fragmentgrößen gewählt (**Tab. 2.10**). Als Längenmarker wurden je nach der Größe der zu trennenden DNA verschiedene DNA - Leitern (1kb - DNA - Leiter, Peqlab, Erlangen, Deutschland), für Fragmente größer als 1 kb und DNA - Leiter Mix (Peqlab, Erlangen, Deutschland) für Fragmente kleiner als 1 kb, verwendet.

Zur Herstellung des Gels wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1 x TAE - Puffer* gelöst und bis zum Schmelzen in einer Mikrowelle (Bosch, Deutschland) erhitzt. Diese Lösung wurde auf ca. 60 °C abgekühlt, eine Ethidiumbromid - Lösung (Sigma) zugegeben (Endkonzentration von 0,005 %) und in die Gelkammer (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Schweden) gegossen. Nach vollständiger Verfestigung wurden die Käme entnommen und das Gel in die Elektrophorese - Apparatur (Pharmacia Biosciences, Uppsala, Schweden) gestellt, die DNA - Proben mit DNA - Lade - Puffer (PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland) vermischt (10:1), aufgetragen und die Trennung bei 140 Volt, 200 mA in 1 x TAE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde die DNA im Transilluminator (Biometra) visualisiert.

* **50 x TAE-Puffer:** 2 M Tris-HCl, 0,5 M NaCl, 50 mM EDTA, pH 8,0

Tabelle 2.10: Agarosegel - Konzentration in Abhängigkeit von Fragmentgrößen

DNA - Fragmentgröße	Agarose - Konzentration
< 0,5 kb	1,2 %
0,5 bis 10 kb	1 %
> 10 kb	0,8 %

2.3.7 DNA - Extraktion aus Agarosegel

Die DNA - Extraktion aus Agarosegelen erfolgte mit dem QIAquick GelExtraction Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers. Die DNA - Proben wurden zuvor elektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt (**Kap. 2.3.6**) und das gewünschte Fragment mit einem Skalpell herausgeschnitten.

2.3.8 Klonierung von DNA

2.3.8.1 Restriktionsverdau von DNA

Die Restriktionsenzyme wurden in den jeweils mitgelieferten Reaktionspuffern nach Angaben des Herstellers (NEB, Frankfurt, Deutschland) eingesetzt. Für einen Restriktionsansatz von 1 µg DNA in 20 µl Reaktionsvolumen wurde 1 U Enzym verwendet. Die Ansätze wurden für 1 - 24 h bei 25 °C oder 37 °C inkubiert.

2.3.8.2 Desphosphorylierung von 5' - Phosphatgruppen

Um eine Religation von Plasmiden bzw. Vektoren bei der Klonierung zu verhindern, wurden die DNA 5' - Phosphatester hydrolysiert. Der Restriktionsansatz wurde zuerst für 20 min bei 70 °C inkubiert, um überschüssiges Restriktionsenzym zu inaktivieren. Pro 1 µg DNA wurde 1 µl (1 U) alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (**CIP**, *calf intestine alkaline phosphatase*) und CIP-Puffer (10 x, 0,5 M Tris/HCl, pH 8,5; 1 mM EDTA) zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Die Inhibierung der CIP wiederum erfolgte durch Zugabe von EDTA (Endkonzentration: 5 mM) und gleichzeitigem Erwärmen bei 75 °C für 20 min. Zur Reinigung der dephosphorylierten DNA - Produkte wurden diese elektrophoretisch auf einem Agarosegel aufgetrennt (**Kap. 2.3.6**) und anschließend extrahiert (**Kap. 2.3.7**).

2.3.9 Ligation von DNA - Fragmenten

Für die Ligation von DNA - Fragmenten wurde T4 - Ligase (NEB, Frankfurt, Deutschland) mit den mitgelieferten Pufferlösungen nach Angaben des Herstellers verwendet. Das Verhältnis von eingesetztem Plasmidvektor und DNA-Fragment entsprach 1:1 bis 1:5. Folgender Reaktionsansatz wurde gewählt:

Tabelle 2.11: Reaktionsansatz für Ligation

Lösungen	Volumen
DNA - Fragment	6 µl (50 - 500 ng)
Linearisierte Vektor - DNA	2-4 µl (50 - 100 ng)
10 x Puffer	2 µl
T4 DNA - Ligase	1-2 µl (0,5 - 1U)
Aqua dest.	ad 20 µl

Die Ligation erfolgte für 1 h bei RT oder über Nacht bei 16 °C. Der Ligationsansatz mit Adenovirus DNA bestand aus 1 µg adenoviralem *Xba* I-long arm, 500 ng linearisiertem Vektorplasmid, 1 U DNA - Ligase (Stratagene, USA) und 4 µl dazugehörigem Puffer. Die Ligation wurde über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

2.3.10 Herstellung von *blunt-end* DNA - Molekülen

Für die Ligation von DNA - Fragmenten mit nicht - kompatiblen Enden war es notwendig *blunt-end* sogenannte glatte Enden zu generieren. Dafür wurden die 3' - überhängenden Enden abgebaut und die 5' - überhängenden Enden aufgefüllt. Zu diesem Zweck wurde eine T4 - DNA - Polymerase (NEB, Frankfurt, Deutschland), welche eine 3' - 5' - Exonuklease - und 5' - 3' - Polymeraseaktivität besitzt, eingesetzt. Zum Restriktionsansatz (2.3.8.1) wurden Desoxyribonukleotide (dNTPs) (je 100 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) zugegeben und die Reaktion mit 1 U T4 - DNA - Polymerase bei 12 °C für 20 min fortgeführt. Anschließend wurde die T4 - Polymerase für 20 min bei 65 °C inaktiviert.

2.4 RNA - Techniken

2.4.1 Isolation von Gesamt - RNA

2.4.1.1 Isolation von Gesamt - RNA mit TRIzol[®] Reagent

Die Isolation der Gesamt - RNA erfolgte nach dem Prinzip der sogenannten Einschritt-methode nach Chomczynski und Sacchi (Chomczynski and Sacchi, 2006). Dafür wurde die monophasische Lösung TRIzol[®] (Invitrogen Life Technologies, UK) verwendet,

welche Phenol und Guanidinisothiocyanat (GTC) enthält. Durch das chaotrope GTC werden die Wasserstoffbrückenbindungen aufgelöst und so Gewebebestandteile lysiert, Proteine denaturiert und RNAsen inaktiviert. Das enthaltene Phenol im sauren Milieu bewirkt, dass denaturierte Proteine und kleinere DNA - Fragmente aus dem Lysat entfernt werden.

Zur Isolierung von Gesamt - RNA aus eukaryontischen Zellen wurde das Medium aus der Kulturplatte entfernt und TRIzol[®] - Lösung auf die Zellen gegeben. Durch mehrfaches Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen gelöst und durchmischt. Das Zelllysat wurde in Reaktionsgefäße überführt und weiter nach dem Protokoll verfahren. Zur Isolierung aus humanen endomyokardialen Biopsien (EMB) wurden diese mit einem Pistill (VWR, Darmstadt, Deutschland) in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit TRIzol[®] - Lösung homogenisiert.

Die RNA wurde in 30 µl RNase - freiem Wasser (DEPC-Wasser, USB Corporation Cleveland, USA) gelöst, 10 min bei 60 °C inkubiert und anschließend weiterverwendet oder bei – 80 °C gelagert.

2.4.1.2 Isolation von *small* - RNA mit dem mirVana[™] - Kit

Für die Isolation von besonders kleinen RNAs (miRNA, tnRNA) bzw. sehr reiner Gesamt-RNA aus Gewebe oder Zellkulturen wurde das Protokoll für den mirVana[™] - Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Die RNA wurde mit 100 µl vorgewärmten Nuklease-freiem Wasser (95 °C) von dem Säulenfilter gelöst und bei – 80 °C gelagert.

2.4.2 Auftrennung von RNA

Die RNAs wurden elektrophoretisch in Formaldehyd - Agarosegelen voneinander getrennt. Dazu wurden 5 bis 20 µg Gesamt - RNA in 5 µl RNA - Ladepuffer^{*1} gelöst, 5 min bei 65 °C erhitzt und auf Eis abgekühlt. Die Auftrennung der RNA erfolgte mit MOPS - Laufpuffer^{*2} für ca. 1,5 h bei 140 V. Die Qualität der RNA wurde unter UV - Licht überprüft. Anschließend wurde die aufgetrennte RNA auf eine Nylonmembran übertragen (**Kap. 2.14.2**).

Für die Herstellung des Formaldehyd - Agarosegels wurden 1 % Agarose in 16/17 Vol 1 x MOPS - Puffer aufgekocht und auf 60 °C abgekühlt. Danach wurde 1/17 Vol 38 % Formaldehyd zugegeben und die Lösung in eine Gelkammer gegossen und bei RT ausgehärtet.

*1 **10 x RNA - Ladepuffer:** 720 µl Formamid, 80 µl gesättigte Bromphenolblau - Lösung, 180 µl 38 % ige Formaldehyd - Lösung (Sigma), 160 µl 10 x MOPS - Puffer, 1,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ ml), ad 1.500 µl A. bidest.

*2 **10 x MOPS - Puffer:** 50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA, 200 mM MOPS, pH 7,0

2.5 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

2.5.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurde mit Hilfe des NanoDrop ND-1000 bestimmt. Die Absorption der Nukleinsäuren wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen und nach der Formel: **Nukleinsäurekonzentration** (µg/ml) = **Faktor x A260**, berechnet, wobei der Faktor bei Doppelstrang - DNA 50 µg/ml, bei Einzelstrang - RNA oder -DNA 40 µg/ml ist. Diese Angaben beziehen sich auf DNA - freie RNA bzw. auf RNA - freie DNA. Mögliche Verunreinigungen von Phenolresten oder Proteinen können bei 280 nm detektiert werden, weshalb die Reinheit der Präparation aus dem Quotienten von A260/A280 ermittelt wurde. Qualitativ reine RNA weist nach *Sambrook et al* (Chomczynski and Sacchi, 2006; Sambrook et al., 1989) einen Quotienten von 2,0 auf.

2.5.2 Elektrophoretische Konzentrations- und Reinheitsbestimmung

Bei der Bestimmung der DNA - Konzentration mit Hilfe der Gelelektrophorese wurde ein Aliquot der DNA - Probe auf ein Agarosegel aufgetragen. Zum Vergleich wurde eine DNA-Referenz-Probe mit definierter Konzentration verwendet. Nach der Elektrophorese wurde die Konzentration der DNA - Probe mit der DNA - Referenzprobe verglichen und abgeschätzt. Eine weitere Möglichkeit die RNA - Qualität zu kontrollieren, bietet der RNA 6000 Nano Assay (Agilent, USA). Bei dieser LabChipTM - Technologie wurde ein Aliquot der zu untersuchenden RNA auf einen Mikrochip geladen und in einem Bioanalyser (Agilent) elektrophoretisch aufgetrennt. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.6 PCR Techniken

2.6.1 Polymerase - Kettenreaktion

Die Polymerase - Kettenreaktion (PCR) diente zur Amplifikation und zum Nachweis spezifischer DNA - Fragmente. In Abhängigkeit von Primer - Länge, Basenzusammensetzung, Länge und Struktur der zu amplifizierenden DNA - Matrix wurden die PCR-

Reaktionen mit unterschiedlichen DNA - Polymerasen und unter verschiedenen PCR-Bedingungen nach den Angaben der Hersteller durchgeführt. Generell wurde Taq - Polymerase (Applied Biosystems, CA, USA) für die PCR - Reaktionen verwendet. Für sequenzexakte DNA - Amplifikate wurden Pwo - (*Pyrococcus woesei*) bzw. Pfu - (*Pyrococcus furiosus*) Polymerase (Applied Biosystems, CA, USA) eingesetzt. Beide sind thermostabile DNA - Polymerasen, die gegenüber der Taq - Polymerase eine ca. 10 fach höhere Genauigkeit aufweisen. Die hohe Genauigkeit beruht auf einer Proof - Reading Funktion bedingt durch die 3'-5'- Exonukleaseaktivität. Darüber hinaus erzeugen sie *blunt-end* Fragmente, da sie an den 5'- Enden keine überhängenden Adenosylreste anfügen.

Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen sind in den **Tabellen 2.12** und **2.13** angegeben. Die Extinktionszeit und das Primer - Annealing richten sich nach der jeweiligen Fragmentlänge und den Primerschmelztemperaturen. Die PCR erfolgte im Gene Amp Thermocycler 9700 (PE Applied Biosystems, CA, USA).

Tabelle 2.12: Zusammensetzung eines PCR - Reaktionsansatzes

Reagenzien	25 µl - Reaktionsvolumen
10 x Polymerasepuffer	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Forward - Primer (100 µM)	0,25 µl
Reverse - Primer (100 µM)	0,25 µl
DNA - Template *	x µl
DNA - Polymerase (5U/ µl)	0,25 µl
A. bidest.	Ad 25 µl

* 0,2 - 0,5 µg DNA

Tabelle 2.13: PCR - Reaktionsbedingungen

Reaktionsschritt (40 Zyklen)	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95 °C	5 min
Denaturierung	95 °C	45 s
Primer - Annealing	55 °C - 65 °C	30 s
DNA - Synthese	72 °C	30 s - 2 min
Finale Extension	72 °C	5 min
Kühlung	4 °C	∞

2.6.2 Reverse Transkriptase PCR

Für die Quantifizierung spezifischer mRNAs in der Gesamt - RNA wurde die Reverse Transkriptase PCR (RT-PCR) verwendet. Bei der RT-PCR wird mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einer RNA abhängige DNA - Polymerase, RNA in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und durch anschließende Amplifikation mittels PCR (**Kap. 2.6.1**) mit spezifischen Primern nachgewiesen oder quantifiziert (**Kap. 2.6.3**) (Myers and Gelfand, 1991). Hierfür wurde der High - Capacity cDNA Archieve Kit nach Angaben des Herstellers verwendet (**Tab. 2.14**). Die Reaktion wurde, wie in **Tabelle 2.17** beschrieben, durchgeführt.

Tabelle 2.14: Zusammensetzung eines RT-PCR - Reaktionsansatzes

Reagenzien	100 µl - Reaktionsvolumen
10 x RT-Puffer	10,0 µl
25 x dNTP Mix	4,0 µl
10 x Random Primer	10,0 µl
MultiScribe RT (50 U/ µl)	5,0 µl
RNase freies A. bidest.	21,0 µl
RNA - Template *	50,0 µl

*200 ng bis 2 µg gesamt - RNA

2.6.3 Quantitative Real Time PCR

Die Real Time RT-PCR ist eine Methode, bei der die Amplifikation der Targetsequenz und seine Quantifizierung simultan in einem Reaktionsgefäß ablaufen. Die Quantifizierung erfolgt durch Fluoreszenz - Messungen am Ende bzw. während eines PCR - Zyklusses, wobei die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR - Produkte zunimmt. Als Fluoreszenz-farbstoff diente für einen Teil der Untersuchungen SYBR[®] Green (Applied Biosystems, CA, USA), welcher mit der DNA interkaliert. Die Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes sowie die Reaktionsbedingungen sind in der **Tabelle 2.15** bzw. **2.17** angegeben.

Tabelle 2.15: Zusammensetzung Real Time RT-PCR mit SYBR[®]Green

Reagenzien	20 µl - Reaktionsvolumen
SYBR [®] Green PCR Master Mix (2x)	10,0 µl
Forward - Primer (100 µM)	0,25 µl
Reverse - Primer (100 µM)	0,25 µl
cDNA - Template *	x µl
RNase freies A. bidest.	ad 20,0 µl

* 10 bis 100 ng cDNA

Eine weitere Möglichkeit für den quantitativen Nachweis von PCR - Produkten stellt die TaqMan[™] - PCR dar, ein automatisierter PCR - Assay, bei dem das gebildete PCR - Amplifikat nach jedem Zyklus über ein Fluoreszenzsignal übermittelndes System detektiert wird (Higuchi et al., 1993; Higuchi et al., 1992). Die Detektion erfolgte durch eine fluoreszenzmarkierte, gen - spezifische Sonde unter Ausnutzung der 5'-3'-Exonuklease - Aktivität der Taq DNA - Polymerase (Holland et al., 1991). Im ersten Schritt kommt es zu einer sequenzspezifischen Anlagerung der PCR - Primer und der fluorogenen Sonde an den Matrizenstrang (**Abb. 2.1a**). Die Sonde besteht aus einem Oligonukleotid, dessen 5'- Ende mit einem Reporter - Farbstoff (Fluoreszein - Derivat) markiert ist. Durch Anregung einer spezifischen Wellenlänge (488 nm) wird die Fluoreszenz des Reporter - Farbstoffs aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher (Rhoadamin - Derivat) am 3'-Ende durch einen Fluoreszenz - Energietransfer (FET) unterdrückt (**Abb. 2.1b**). Während der Extensionsphase verdrängt die Taq - Polymerase die fluorogene Sonde, wobei diese gleichzeitig durch die 5'-3' - Exonukleaseaktivität hydrolysiert wird (**Abb. 2.1c**). Dabei kommt es zur Aufhebung des FET's zwischen Reporter und Quencher, wodurch ein Fluoreszenzsignal erzeugt wird (**Abb. 2.1d**).

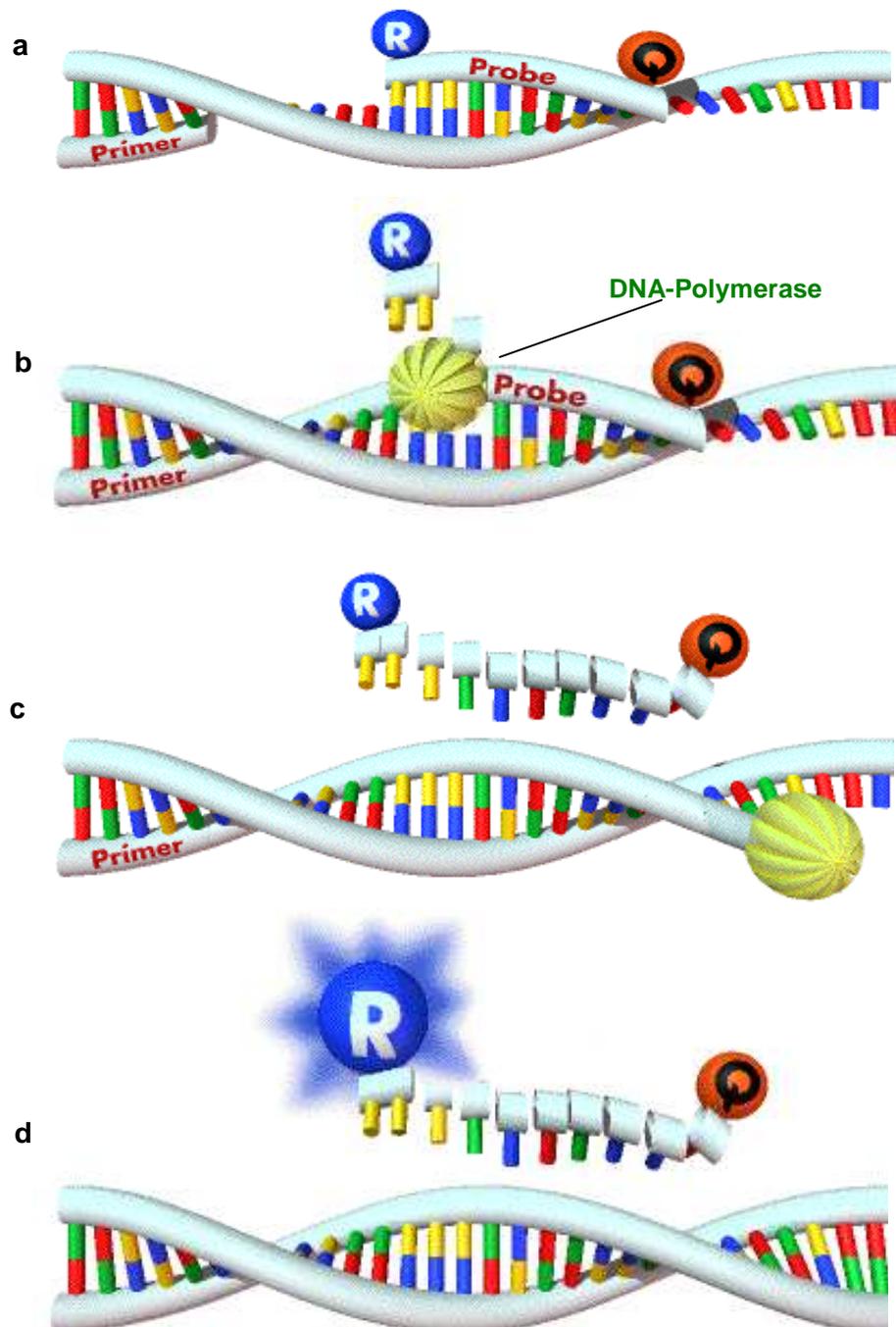


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der TaqMan™ - PCR. **a)** Sequenzspezifische Anlagerung des *Forward* - Primers und der Sonde. **b)** Primer - Extension und Beginn der Sondenhydrolyse. **c)** PCR - Amplifikat wird vollständig synthetisiert und Sondenhydrolyse beendet. **d)** Aufhebung des Fluoreszenz - Energietransfers (FET) und Freisetzung eines Fluoreszenzsignals vom Reporter. Genaue Beschreibung siehe Text (Abbildung modifiziert nach T.A. Schild, Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). R = Reporter, Q = Quencher.

Die TaqMan™ - PCR wurde nach Angaben des Herstellers (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) in Optical 96-well Platten durchgeführt (**Tab. 2.16** und **2.17**). Die folgenden TaqMan™ - *Gene Expression Assays* wurden dafür verwendet: **GAPDH-Rn01775763_g1** (Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase) und **PLN-Rn01434045_m1** (Phospholamban) (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland).

Tabelle 2.16: Zusammensetzung eines TaqMan™ - PCR-Reaktionsansatzes

Reagenzien	20 µl - Reaktionsvolumen
TaqMan™ Gene Expression Assay (20x)	1,0 µl
TaqMan™ Fast Universal PCR Master Mix (2x), No UNG	10,0 µl
cDNA + H ₂ O*	9,0 µl

* 10 bis 100 ng cDNA + RNase freies Wasser

Tabelle 2.17: Reaktionsbedingungen der TaqMan™ - PCR

Reaktionsschritte (40 Zyklen)	Temperatur	Zeit
AmpliTaq Gold - Enzymaktivierung	95 °C	10 min
Denaturierungstemperatur	95 °C	15 s
Annealingtemperatur/ Synthese	60 °C	1 min
Kühlung	4 °C	∞

Beide quantitativen Real-Time PCR - Methoden wurden an dem Sequence Detection System 7900 HT (Applied Biosystems, CA, USA) durchgeführt. Die Auswertung der RT-PCRs erfolgte mit Hilfe des Programms ABI Prism® 7000 SDS Software (Applied Biosystems, CA, USA) und der $\Delta\Delta\text{CT}$ - Methode (Livak and Schmittgen, 2001). Der „*Threshold Cycle*“ (CT-Wert) gibt die Zykluszahl wieder, bei der die Reporter - Fluoreszenz einen bestimmten Schwellenwert oberhalb der Grundlinie überschreitet. Der CT - Wert wurde über die Funktion auto - CT erfasst. Zur Normalisierung der zu untersuchenden Gene wurde GAPDH als „*Housekeeping*“ - Gen (konstitutive Kontrolle) verwendet. Der CT - Wert wurde wie folgt berechnet: $\Delta\text{CT} = \text{CT} (\text{Kandidatengen}) - \text{CT} (\text{konstitutive Kontrolle})$. Als nächstes wurde der $\Delta\Delta\text{CT}$ bestimmt [$\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{CT} (\text{Zielgen}) - \Delta\text{CT} (\text{Kontrolle})$]. Zum Schluss wurde die relative Transkripthäufigkeit ermittelt (relative Transkripthäufigkeit = $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$).

2.7 Sequenzierung von DNA

Für die Sequenzierung wurden 0,2 µg bis 1 µg DNA verwendet, 1 µl Puffer (Applied Biosystems, CA, USA) und 1 µl Sequenzierungsprimer (10 µM) zugegeben und mit A. bidest auf 8 µl aufgefüllt. Nach 4 min bei 98 °C im Gene Amp Thermocycler 9700, wurden 2 µl Big Dye Prä-Mix (PE Applied Biosystems, CA, USA) zugefügt und die PCR über 25 Zyklen unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Tabelle 2.18: Reaktionsbedingungen für Sequenz - PCR

Reaktionsschritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	96 °C	10 s
Annealing	50 °C	5 s
Extension	60 °C	4 min
Kühlung	4 °C	∞

Im Anschluss an die PCR - Reaktion wurde die DNA für die Sequenzierung aufgearbeitet. Zum PCR - Ansatz wurden 90 µl A. bidest, 10 µl 3M Natriumazetat - Lösung (pH 4,8) und 250 µl absoluter Ethanol (Mallinckrodt Baker) zugegeben und 15 min bei 14.000 RPM zentrifugiert (Eppendorf, Deutschland). Das DNA - Pellet wurde mit 400 µl 70 % igem Ethanol gewaschen und anschließend bei 56 °C für 5 min getrocknet. Die DNA wurde in 30 µl A. bidest gelöst. Die Sequenzierung und Auswertung erfolgten mit Hilfe des Gene Analyzer ABI 310 Kapillar - Sequenzerautomaten (PE Applied Biosystems, CA, USA) unter Verwendung der ABI DNA Sequencing Analysis Software.

2.8 Plasmid - Konstruktion

Zur Konstruktion des Plasmids **pAdshPLN_r** wurden mit Hilfe einer PCR, mit den Primerpaaren HIFA-53-*Pme* I-s/ HIFA-533-*Spe* I-a die Expressionskassette für den U6-Promotor und die PLN-shRNA17 aus dem Plasmid **pSL-PLN17** (zur Verfügung gestellt von J. Kurreck) amplifiziert. Das PCR - Produkt wurde mit *Spe* I verdaut und mit einer T4-Polymerase aufgefüllt (**Kap 2.3.10**) und anschließend in den pCR4Blunt-TOPO - Vektor kloniert. Die Expressionskassette wurde erneut mit *Spe* I/*Not* I geschnitten und über die gleichen Restriktionsschnittstellen in das Plasmid **pAd.ME** (Sipo et al., 2006) inseriert. Dieses Plasmid wurde erneut mit *Sac* I und *Nhe* I verdaut. Die überhängenden Enden wurden aufgefüllt und das Plasmid religiert. Das neu entstandene adenovirale Shuttleplasmid wurde als **pAdshPLN_r** bezeichnet (das Klonierungsschema ist in **Abbildung 2.2** angegeben).

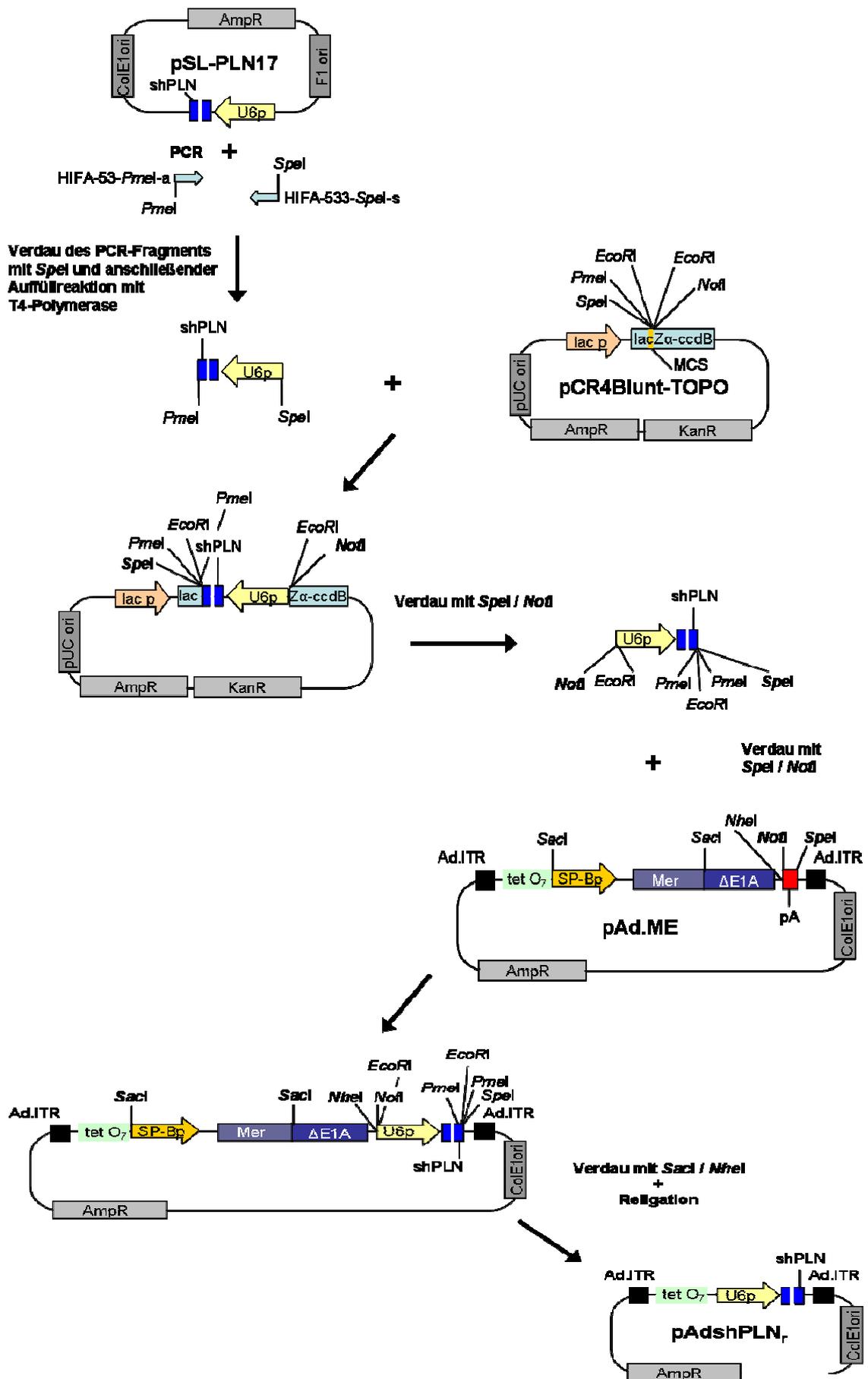


Abbildung 2.2: Klonierungsschema für pAdshPLN_r. Genaue Erklärung siehe Text. ITR = *Inverted Terminal Repeat*, U6p = U6 - Promotor, pA = poly A-Stopsignal, lac p = lac Promotor.

Als Kontroll - Plasmid diente **pAdshCAR4_m** (Fechner et al., 2007). Für die Generierung von **pAdshCAR4_m** wurde das Shuttle - Plasmid **pAdshPLN_r** mit *Pme* I geschnitten und religiert, wobei eine *Eco* RI - Schnittstelle eliminiert wurde (siehe **Abbildung 2.3**). Anschließend wurde das Plasmid mit *Eco* RI verdaut und wieder religiert, wodurch ein *Spe* I - Schnittort entfernt wurde, was essentiell war, um später Adenoviren generieren zu können. In dieses Kontroll - Plasmid wurde eine shRNA gegen den Maus Coxsackivirus-Adenovirus-Rezeptor über die *Bam*HI / *Hind* III - Schnittstellen hinein kloniert. Das fertige Kontroll - Plasmid wurde als **pAdshCAR4_m** bezeichnet. Die Richtigkeit der Inserts wurde mittels Sequenzierung mit dem Primerpaar Ad5-324s*Bgl* II / pZS2-3'UTRa überprüft.

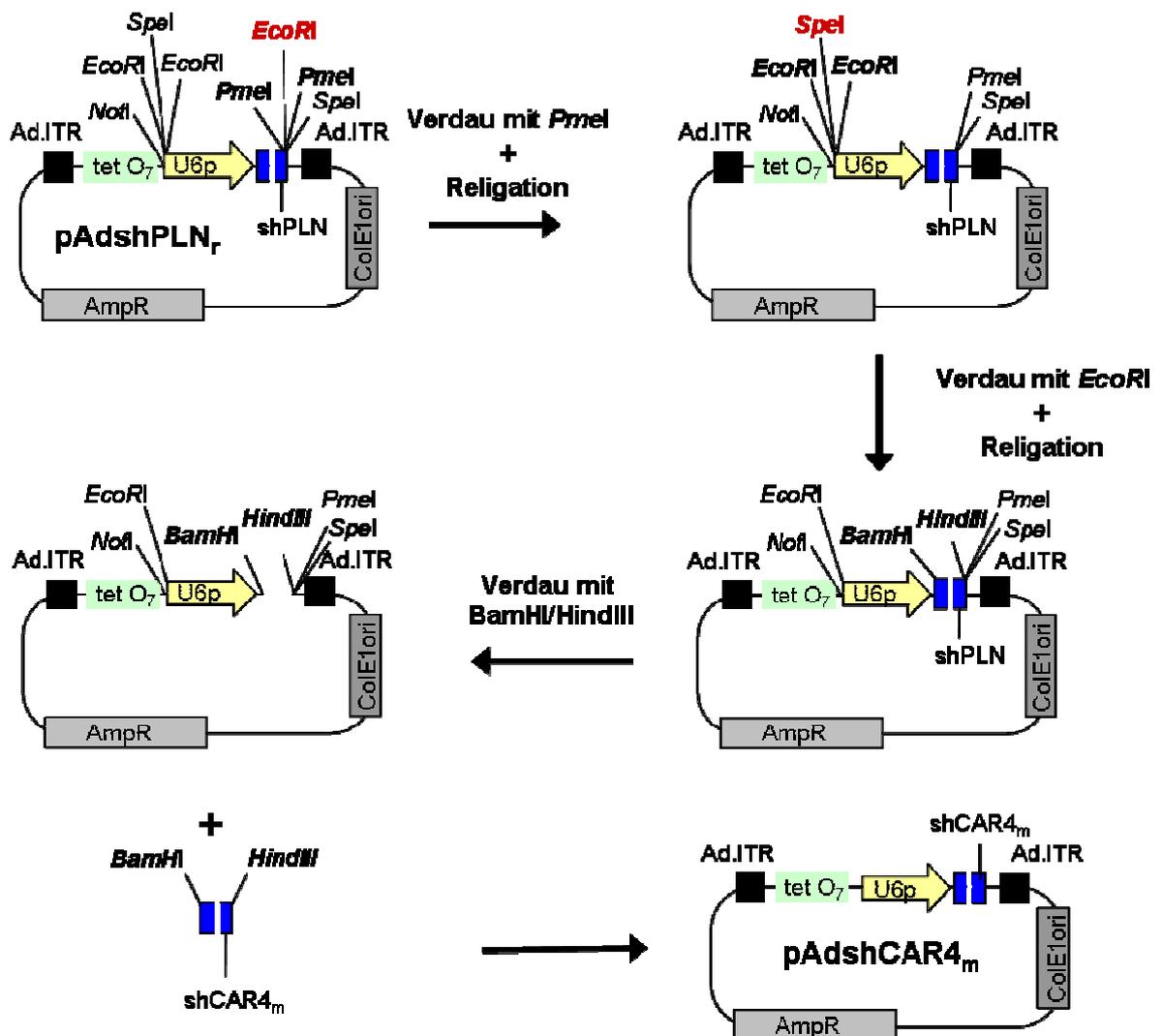


Abbildung 2.3: Klonierungsschema für **pAdshCAR4_m**. Genaue Erklärung siehe Text. ITR = *Inverted Terminal Repeat*, U6p = U6 - Promotor, pA = poly A-Stopsignal, CAR = Coxsacki Adenovirus Rezeptor, rot markierte Restriktionssites gehen beim Verdau verloren.

Für die Generierung dimerischer AAV - Vektoren wurde das Ausgangsplasmid **pdAAV-GFP-R2** (Fechner *et al.*, *in press*) verwendet (siehe **Abbildung 2.5**). Dieses enthält *upstream* der 3' ITR eine Mutation, die in einer partiellen Deletion der *Terminal Resolution Site* (trs) bzw. einer kompletten Deletion der D-Sequenz resultiert (**Abbildung 2.4**), wodurch die AAV-Vektor-DNA als dimerische DNA in das virale Kapsid verpackt wird (McCarty *et al.*, 2003).

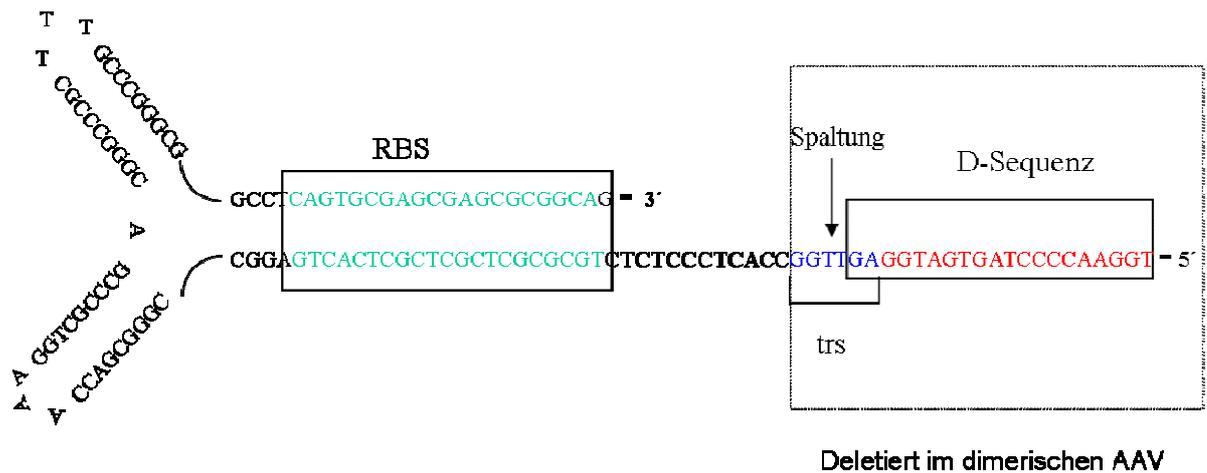


Abbildung 2.4: Struktur des 3'- AAV2 ITR (Minus Strang). RBS = Ribosomen Bindestelle, trs = *terminal resolution site*. [Stratagene, La Jolla, CA, USA; (Chiorini *et al.*, 1999)].

Für die Herstellung der einzelnen dimerischen AAV - Vektoren zur Expression von PLN-shRNA, wurde wie folgt vorgegangen (Plasmidkarten siehe Anhang):

pdAAV-CMV-GFP-shPLN: Das adenovirale Plasmid **pAdshPLN_r** wurde mit *Eco RI/Hind III* geschnitten, wie auch **pdAAV-CMV-GFP-R2**. Dabei wurden sowohl die Expressionskassetten mit dem U6 - Promotor und shPLN als auch bGH pA-R2-U6p heraus-getrennt. Anschließend wurden shPLN zusammen mit dem U6 - Promotor in **pdAAV-CMV-GFP** hinein kloniert. Durch einen erneuten Verdau von **pdAAV-CMV-GFP-R2** diesmal nur mit *Hind III* wurde das bGH pA erhalten und über *Hind III* in **pdAAV-CMV-GFP-shPLN** inseriert. Dabei ist das neue Plasmid mit der Bezeichnung **pdAAV-CMV-GFP-shPLN** entstanden (**Abbildung 2.5**).

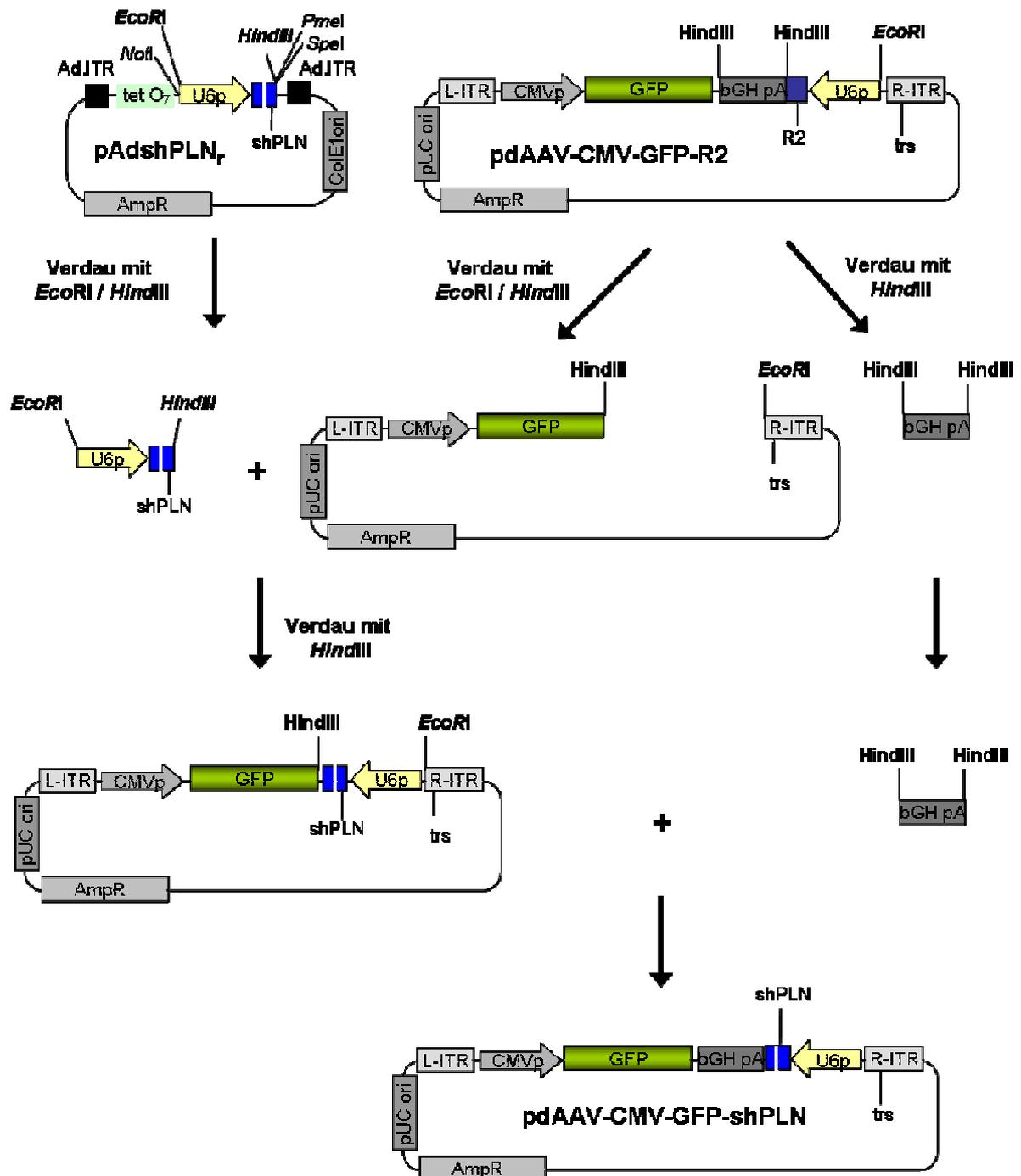


Abbildung 2.5: Klonierungsschema für pdAAV-CMV-GFP-shPLN. Genaue Erklärung siehe Text. ITR = *Inverted Terminal Repeat*, CMVp = Cytomegalievirus Promotor, U6p = U6 - Promotor, bGHpA = *bovines Growth Hormon poly A-Signal*, GFP = Green Fluorescent Protein.

pdAAV-CMV- β -shPLN: Das CMV- β -Aktin Fragment wurde mit *Cla I/Not I* aus pAAV-R2R4 (Fechner et al., in press) herausgeschnitten und in pdAAV-CMV-GFP-shPLN kloniert, in dem zuvor mit einem *Cla I/Not I* Verdau der CMV - Promotor und die GFP-cDNA entfernt wurden (Abbildung 2.6). Das fertige Plasmid bestand nun unter anderem

aus einem CMV - Promotor, einer nichtkodierenden β -Intron - Sequenz, einer bgH - poly A - Sequenz, sowie den in inverser Orientierung inserierten U6 - Promotor mit der PLN-shRNA.

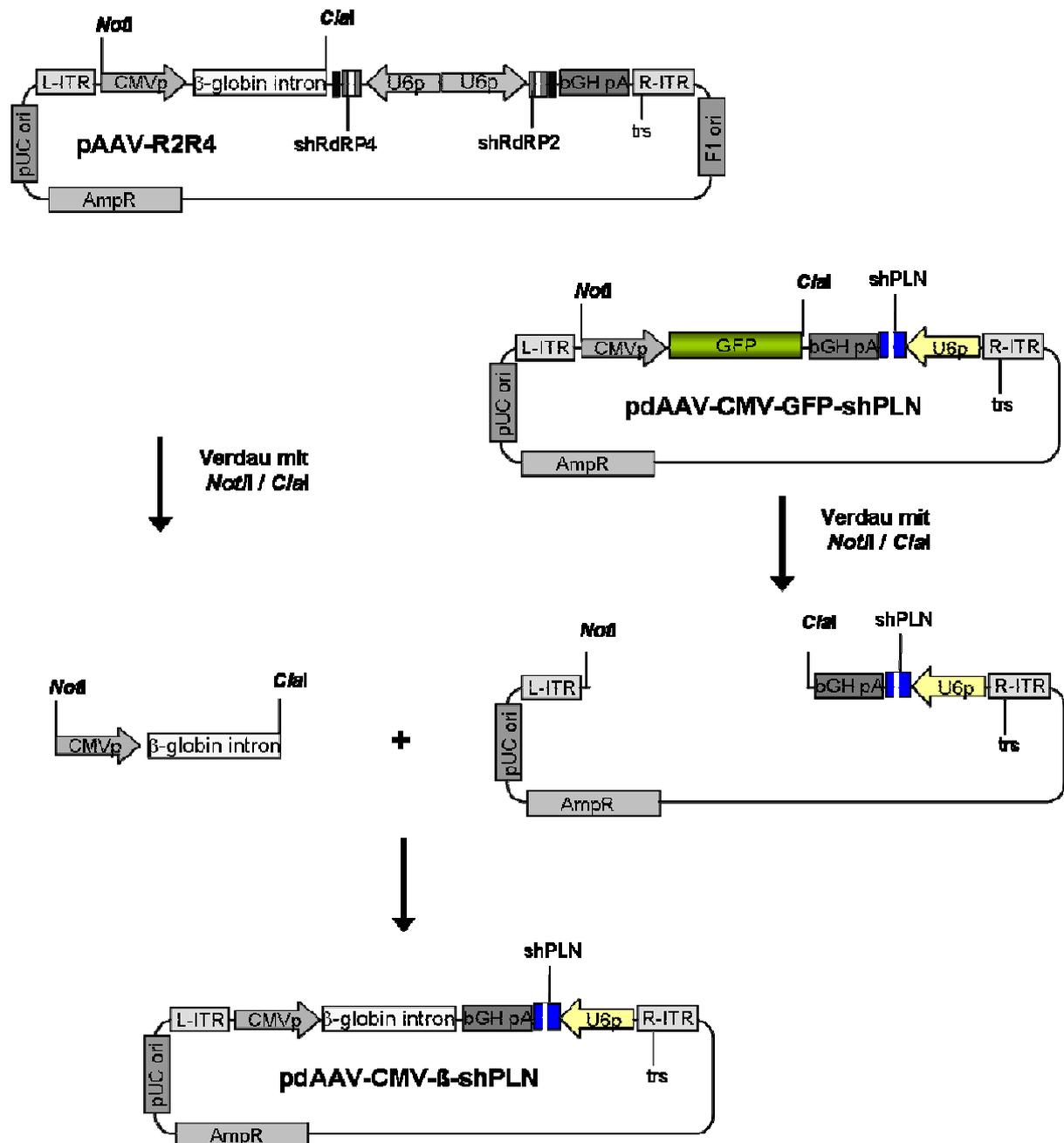


Abbildung 2.6: Klonierungsschema für pdAAV-CMV- β -shPLN. Genaue Erklärung siehe Text. ITR = *Inverted Terminal Repeat*, CMVp = Cytomegalievirus Promotor, U6p = U6 - Promotor, bgHpA = *bovine Growth Hormone* poly A-Signal.

pdAAV-shPLN: Durch einen singulären Verdau mit *Not* I von **pdAAV-CMV-GFP-shPLN** und einer anschließenden Religation wurde der CMV - Promotor und die GFP - cDNA gewonnen und **pdAAV-shPLN** via *Not* I - Religation generiert (**Abbildung 2.7**).

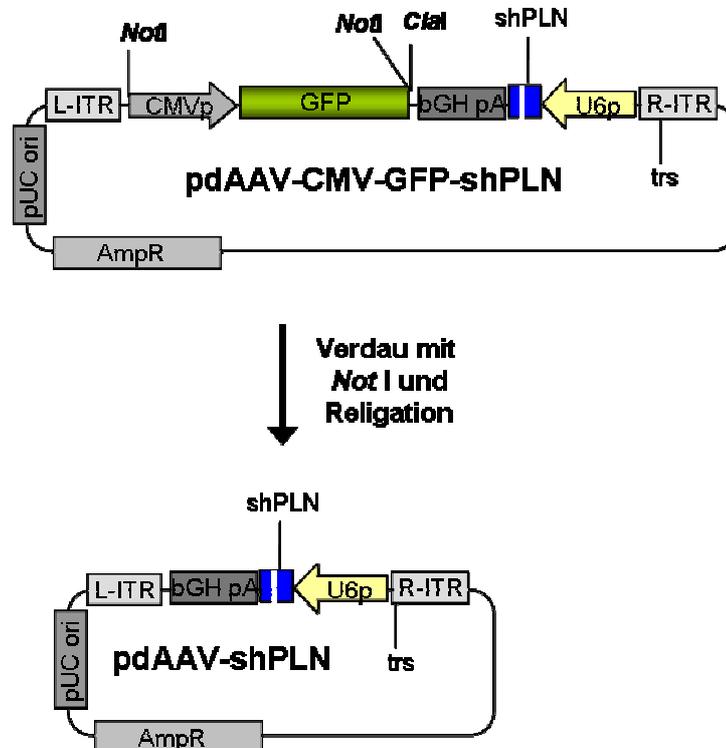


Abbildung 2.7: Klonierungsschema für pdAAV-shPLN. Genaue Erklärung siehe Text. ITR = *Inverted Terminal Repeat*, U6p = U6 - Promotor, bGHpA = *bovine Growth Hormone* poly A-Signal.

pdAAV-GFP-shPLN: Der CMV Promotor wurde durch ein Doppelverdau mit *Mlu* I/*Sac* I aus **pdAAV-CMV-GFP-shPLN** herausgeschnitten, anschließend wurden die Schnittstellen mit T4 - Polymerase aufgefüllt und religiert (**Abbildung 2.8**).

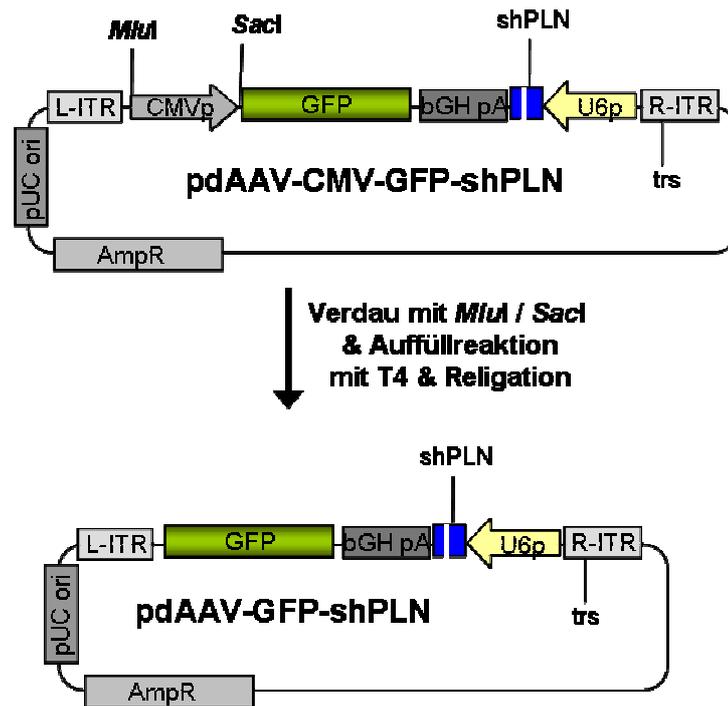


Abbildung 2.8: Klonierungsschema für pdAAV-GFP-shPLN. Genaue Erklärung siehe Text. ITR = *Inverted Terminal Repeat*, GFP = Green Fluorescent Protein, U6p = U6 - Promotor, bGHpA = *bovine Growth Hormone poly A-Signal*.

pdAAV- β -shPLN: Um den CMV - Promotor zu entfernen, wurde ein Doppelverdau mit *Not I* / *Sac I* an **pdAAV-CMV- β -shPLN** vorgenommen und nach T4 - Polymerase-auffüllung das Plasmid religiert (**Abbildung 2.9**).

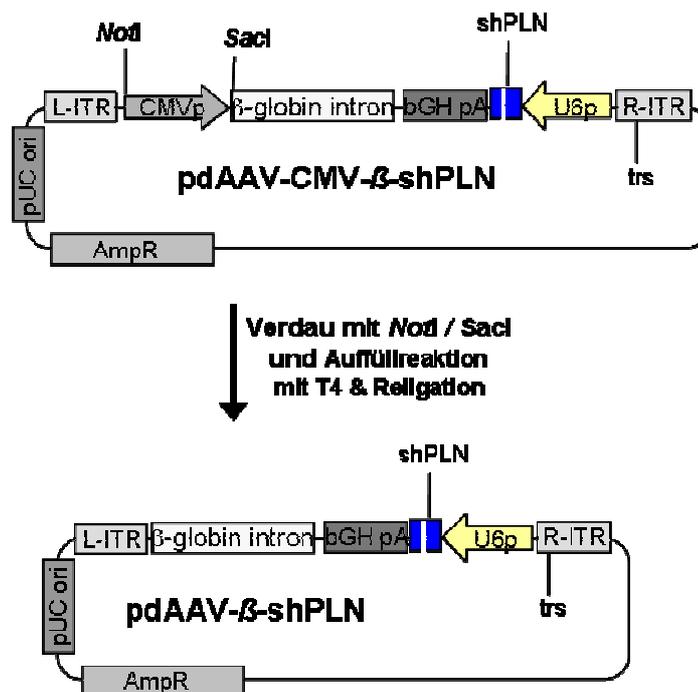


Abbildung 2.9: Klonierungsschema für pdAAV- β -shPLN. Genaue Erklärung siehe Text. ITR = *Inverted Terminal Repeat*, U6p = U6 - Promotor, bGHpA = *bovine Growth Hormone poly A-Signal*.

2.9 Zellbiologische Methoden

2.9.1 Zell - Passagierung

Die adhären wachsenden Zellen wurden bei 80 - 100 % Konfluenz durch Trypsinierung vom Kulturboden abgelöst. Dazu wurden die Zellen mit PBS (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) gewaschen (5 ml pro 25 cm³- bzw. 10 ml pro 75 cm³ - Kulturflasche) und mit 2 ml Trypsin -Lösung (Sigma) 2 bis 3 min bei 37 °C inkubiert. Die Trypsinierung wurde dann mit 5 Vol FKS - haltigem Kulturmedium gestoppt und die Zellen durch vorsichtiges Auf- und Ab-pipettieren vereinzelt. Zum Passagieren der Zellen wurden diese im Verhältnis 1:3 bis 1:10 auf neue Zellkulturgefäße verteilt. Für experimentelle Ansätze wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer - Zählkammer (**Kap. 2.9.5**) bestimmt. Anschließend wurden die Zellen entsprechend der gewünschten Zellzahl in neue Kulturgefäße ausgesät.

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ gehalten. Die Passagierung der Zellen erfolgte alle 3-5 Tage.

2.9.2 Reaktivierung konservierter Kulturen

Die frisch aufgetauten Zellen wurden in ein 15 ml - Röhrchen mit 10 ml zellspezifischem 4 °C kalten Kulturmedium pipettiert und vorsichtig durchmischt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1.200 RPM bei 4 °C zentrifugiert (5810R Zentrifuge, Eppendorf, Deutschland). Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml auf 37 °C vorgewärmtes Kulturmedium resuspendiert, in eine 25 cm² - Zellkulturflasche überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte ein Wechsel des Kulturmediums. Je nach gewünschter Konfluenz wurden die Zellen weiter passagiert (**Kap. 2.9.1**).

2.9.3 Calcium - Phosphat - Transfektion

Die Transfektion adhären wachsender Zellen wurde nach der Calcium - Phosphat - Methode durchgeführt. Die Zellen wurden so ausgesät, dass sie 24 h später eine Konfluenz von 60 - 80 % erreichten. Der Transfektionsansatz enthielt 1 - 2 µg DNA, 125 - 250 µl 0,25 M CaCl₂ und 125 - 250 µl HBS* (Bsp. für 12-Well Platten je Well 150 µl 0,25 M CaCl₂ + 150 µl HBS). Dieser wurde für 1 - 2 min bei RT inkubiert und dann tropfenweise zu den Zellen pipettiert. Nach 24 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ erfolgte ein Mediumwechsel.

* Transfektionspuffer (2 x HBS):	NaCl	280 mM
	HEPES	50 mM
	Na ₂ HPO ₄	150 mM

Puffer auf pH 7,05 einstellen.

2.9.4 Herstellung von primären neonatalen Rattenkardiomyozyten

Primäre neonatale Rattenkardiomyozyten (PNRK) wurden aus dem ventrikulären Gewebe von ein bis drei Tage alten Wistar Ratten (Charles River, Berlin, Deutschland) isoliert, wobei ein von *Vetter et al* etabliertes Protokoll verwendet wurde (Vetter et al., 1998).

Die Tiere wurden vor Beginn der Präparation mit einem 70 % Ethanol haltigen Tupfer gereinigt. In Rückenlage wurden diese mit einer Pinzette fixiert und mit einer Schere dekaptiert. Es erfolgte ein Sternalschnitt bis zum Zwerchfell. Durch leichten Druck mit der Pinzette wurde das Herz an der Schnittstelle sichtbar, entnommen und in eiskalte 1 x ZIM/PS-Lösung^a transferiert. Anschließend wurden von den Ventrikeln die Vorhöfe, Gefäße, Fett- und Bindegewebe entfernt. Die gereinigten Ventrikel wurden nochmals in 1 x ZIM/PS Lösung überführt und gewaschen. Die Ventrikel wurden dann mit zwei Skalpellenspitzen in ca. 1 mm³ große Stücke geschnitten und zweimal in Antibiotika freier ZIM - Lösung gereinigt. Nach Überführung der zerkleinerten Ventrikel in einen 50 ml Erlenmeyerkolben erfolgte der Gewebeaufschluss in 15 ml 1 x ZIM - Trypsin Lösung^b für 15 min bei 37 °C unter Rühren in einem Wasserbad. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in ein 50 ml Röhrchen mit 4 ml eiskaltem FKS^c überführt und 10 min bei 400 g bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml CMRL 1415 - Medium + FKS (1:1) resuspendiert und auf Eis gelagert. Diese Schritte wurden solange wiederholt, bis sich die Gewebestücke fast vollständig aufgelöst hatten. Die gesammelten Überstände aus den resuspendierten Zellpellets wurden gepoolt und erneut für 10 min bei 400 g zentrifugiert. In Abhängigkeit von der Anzahl der präparierten Herzen, wurde das Zellpellet in Kompletmedium^d aufgenommen (1 Herz = 1 ml Medium, 60 Herzen = 60 ml Medium) und auf 1 bis 3 75 cm² Zellkulturflaschen übertragen und für 90 min bei 37 °C in einem Inkubator (0 % CO₂, 5 % O₂) inkubiert. In dieser Zeit erfolgt ein selektives Anheften von Nicht - Muskelzellen. Danach wurde der Überstand mit den angereicherten Kardiomyozyten abgenommen und in eine neue Flasche überführt und die Zellzahl bestimmt. Je nach experimenteller Verwendung wurden die Zellen in entsprechenden Zellkulturplatten in Kompletmedium ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium gegen Vollmedium^e ausgetauscht. 48 h bis 72 h nach Präparation hatten die PNRK eine aus-reichende Zelldichte erreicht und standen für weiterführende

experimentelle Untersuchungen zur Verfügung. Danach erfolgte alle 48 h ein Mediumwechsel.

^a **ZIM/PS** (Calciumfreies Phosphat gepuffertes Zellisolierungsmedium mit Penicillin und Streptomycin):

Konzentration	Mediumzusatz
120 mM	NaCl
4,56 mM	KCl
0,44 mM	KH ₂ PO ₄
0,42 mM	NaHPO ₄
25 mM	NaHCO ₃
5,55 mM	Glukose
3.830 U/ml	Streptomycin
5.000 U/ml	Penicillin

^b **ZIM - Trypsin** Lösung: ZIM - Lösung ohne P/S mit 0,25 % Trypsin (Biochrom AG, Deutschland)

^c **FKS** (Fetales Kälberserum, Biochrom AG, Deutschland)

^d **Komplettmedium** (500 ml) :

Konzentration	Mediumzusatz
415 ml	CMRL 1415 - ATM - Medium (Biochrom AG, Deutschland)
10 %	FKS
10 %	HS (Biochrom AG, Deutschland)
20 µg/ml	Gentamycin (Biochrom AG, Deutschland)
5,4 mM	KCl
1,26 mM	CaCl
2,8 mM	Glukose

^e **Vollmedium** (500 ml) :

Konzentration	Mediumzusatz
415 ml	CMRL 1415 - ATM - Medium (Biochrom AG, Deutschland)
10 %	FKS
20 µg/ml	Gentamycin (Biochrom AG, Deutschland)
5,4 mM	KCl
1,26 mM	CaCl
2,8 mM	Glukose
2 µM	FUDR (Aldrich, Deutschland)

2.9.5 Zellzahl - Bestimmung

Die Zellzahl und der Anteil lebensfähiger Zellen wurden durch Anfärbung der Zellen mit einer Trypanblau - Lösung (Biochrom AG, Deutschland) in einer Neubauer - Zählkammer (Neubauer, Deutschland) unter dem Mikroskop bestimmt. Trypanblau färbt lediglich tote Zellen aufgrund ihrer defekten Membranstruktur. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl (Zellen / ml)} = [(Q1+Q2+Q3+Q4)/4] \times \text{VF} \times 10^4$$

Q: Zellzahl in einem großen Quadrat

VF: Verdünnungsfaktor

2.9.6 Herstellung von Homogenaten aus PNRK

Die Homogenate aus PNRK dienten für biochemische Messungen (**Kap. 2.9.7** und **2.9.8**). Zu den entsprechenden Untersuchungszeitpunkten wurden die transduzierten PNRK einmal mit Ca^{2+} - freien PBS gewaschen und anschließend in 2 ml Reaktionsgefäßen pelletiert und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Bei der Homogenisation entstehen aus myozytären Membranen (Sarkolemm, SR, mitochondriale Membranen), die verschiedene Regulatorproteine enthalten (u.a. PLN, SERCA), Membranfragmente. Das Homogenisationsmedium (**Tab. 2.19**) bewirkt aus thermo-dynamischen Gründen die spontane Bildung von Membranvesikeln. Jedes Vesikel bildet ein abgeschlossenes membranständiges Kompartiment mit den entsprechenden Ca^{2+} - Transportproteinen. Aufgrund dieser Vesikelbildung sind Ca^{2+} - Fluxmessungen in Homogenaten aus PNRK möglich. In Abhängigkeit von der gewählten Ca^{2+} - Fluxmethode, können sowohl retikuläre als auch sarkolemmale Ca^{2+} - Transporte selektiv untersucht werden (Vetter et al., 1995). Nach Resuspendierung der tiefgefrorenen pelletierten PNRK mit je 200 μl eiskaltem Homogenisationsmedium erfolgte die Überführung in Mini - Glas - Potter. Darin wurden die PNRK durch zehnmaliges Auf- und Abbewegen mit einem Teflonpistill auf Eis homogenisiert und anschließend in 50 μl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.9.7 Oxalat - stimulierte Ca^{2+} - Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum

Die Messung der Aktivität des PLN/SERCA - katalysierten Ca^{2+} - Transportes des SR erfolgte durch die Oxalat - stimulierte Aufnahme von $^{45}\text{Ca}^{2+}$ in die Membranvesikel des SR, die in PNRK-Homogenaten enthalten sind. Bei diesen Membranvesikeln ist bei über 90 % die Lipidschicht nach außen angeordnet, sie weisen eine sogenannte „Right-Side-

Out“ - Orientierung auf, weshalb unter *in vitro* Bedingungen die Ca^{2+} - ATPase SERCA unter ATP - Verbrauch das $^{45}\text{Ca}^{2+}$ aus dem Reaktionsmedium in das Lumen des SR - Vesikels transportieren kann. Dieses $^{45}\text{Ca}^{2+}$ bildet zusammen mit Oxalatanionen im Vesikel schwer lösliches ^{45}Ca - Oxalat, was innerhalb der SR - Vesikel präzipitiert. Dadurch wird die freie, intra-vesikuläre Ca^{2+} - Konzentration niedrig gehalten, so dass die Ca - Pumpe Ca^{2+} gegen einen verminderten Konzentrationsgradienten in die SR - Vesikel transportiert. Außerdem kann so der passive Ca^{2+} - Efflux aus den SR - Vesikeln minimiert und somit vernachlässigt werden.

Durch diesen Oxalateffekt wird die in SR - Vesikeln transportierte Ca^{2+} - Menge im Vergleich zur transportierten Ca^{2+} - Menge ohne Oxalatzusatz ca. 100 fach gesteigert. Dadurch ist eine Bestimmung des SR Ca^{2+} - Transports in PNRK - Homogenaten ohne Präparation von SR -Membranfragmenten möglich. Diese Prozesse sind in **Abbildung 2.2** schematisch dargestellt.

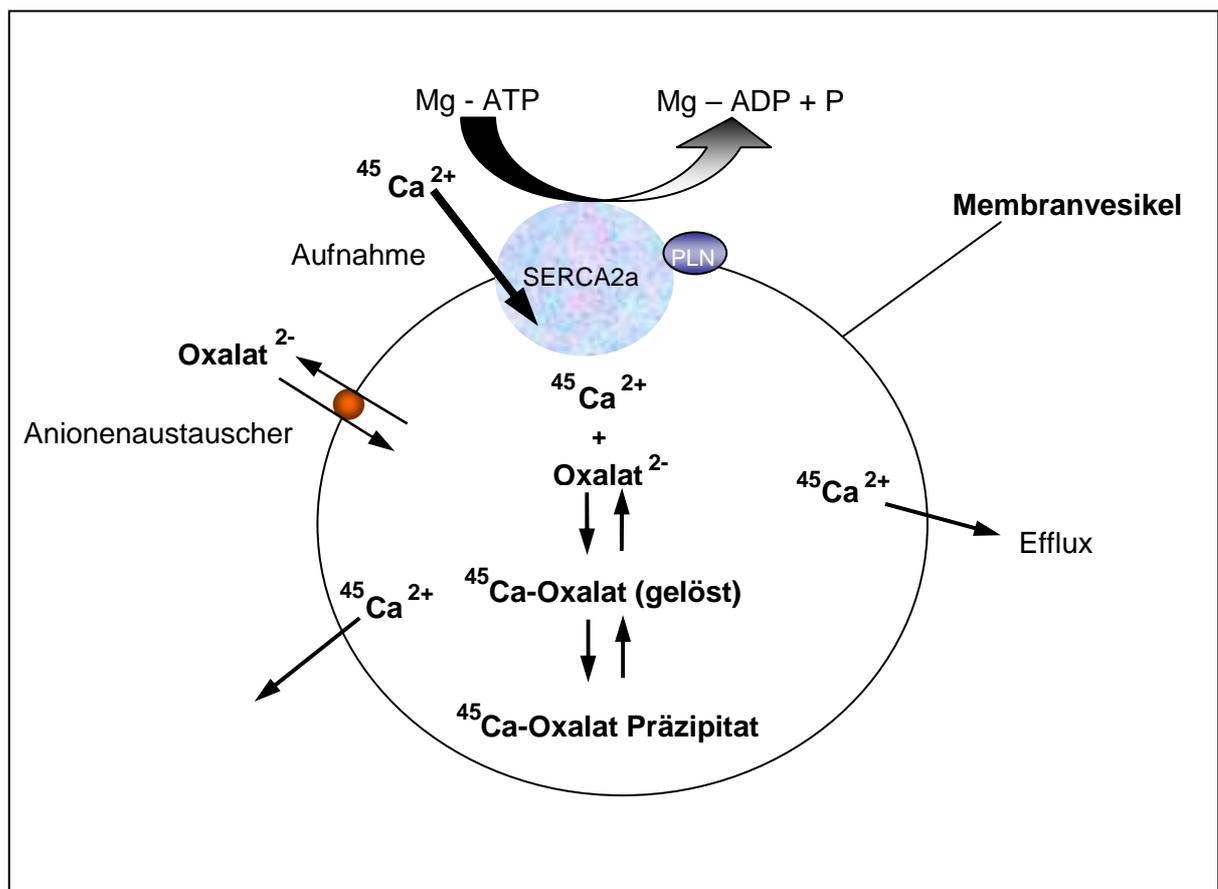


Abbildung 2.2: Prinzip der Oxalat - stimulierten Ca^{2+} - Aufnahme. Senkung der intravesikulären freien Ca^{2+} - Konzentration durch Ca - Oxalatpräzipitation. Oxalat gelangt über einen Anionenaustauscher in das Vesikelvolumen. SERCA2a arbeitet dabei gegen einen niedrigeren Konzentrationsgradienten und es kommt somit zu einer Steigerung der aufgenommenen Ca^{2+} - Menge um den Faktor 100. SERCA2a - Isoform 2a der Ca - ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums, PLN - Phospholamban.

Für die Bestimmung des Oxalat-stimulierten Ca^{2+} - Transport wurde die Millipore - Vakuum - Filtrationsmethode unter Verwendung von radioaktiv markiertem Calciumchlorid ($^{45}\text{CaCl}_2$) eingesetzt (Kozlowski et al., 1994; Solaro and Briggs, 1974). Hierbei wurde eine Probe des Homogenats (**Kap. 2.9.8**) aus zuvor transduzierten PRNK (**Kap. 2.12**) mit einem Reaktionsmedium (**Tab 2.19**) inkubiert, das radioaktiv markiertes $^{45}\text{Ca}^{2+}$ enthielt. Die freie Ca^{2+} - Konzentration wurde mit Hilfe eines $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ - Puffersystems eingestellt.

Tabelle 2.19: Homogenisationsmedium: Zusammensetzung des Reaktionsansatzes (200 μl):

Reaktionsansatz	Volumen (200 μl)	Endkonzentration
160 mM Imidazol		40 mM
20 mM MgCl_2	50 μl	5 mM
400 mM KCl		100 mM
0,1 M NaN_3	20 μl	10 mM
2 mM EGTA	20 μl	0,2 mM
50 mM ATP Tris	20 μl	5 mM
300 mM CrP	4 μl	6 mM
H_2O	52,8 μl	
5 mM $^{45}\text{CaCl}_2$	3,2 μl	0,1375 mM
0,1 M K-Oxalat	20 μl	10 mM
Homogenat	10 μl	3 - 4 μg

Da in PNRK - Homogenaten auch Membranfragmente des Sarkolemm und der Mitochondrien mit anderen Ca^{2+} - Transportsystemen enthalten sind, wurden bei diesem Protokoll die Reaktionsbedingungen so gewählt (Vetter and Will, 1986; Solaro and Briggs, 1974), dass nur der retikuläre PLN/SERCA2a - katalysierte Ca^{2+} - Transport gemessen wurde. Durch die Zugabe von 10 mM NaN_3 wurde die mitochondriale Ca^{2+} - ATPase inhibiert. Die Inakti-vierung des Na/Ca^{2+} - Austauschers erfolgte durch Arbeiten im Na^+ - freien Milieu. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen ist der Anteil der ATP - abhängigen Ca^{2+} - Aufnahme in sarkolemmale Vesikel, der durch die Plasmamembran - Ca^{2+} - ATPase (PMCA) katalysiert wird, vernachlässigbar klein (< 5 %) (Vetter and Will, 1986). Zur Einstellung der gewünschten freien Ca^{2+} - Konzentration im $\text{Ca}^{2+}/\text{EGTA}$ - Puffer wurde die Zugabe von 5 mM $^{45}\text{CaCl}_2$ variiert, wobei die EGTA - Konzentration mit 200 μM immer konstant geblieben ist.

Nach einer Vorinkubation des Reaktionsgemisches für 2 min bei 37 °C wurde die Ca^{2+} - Aufnahme durch Zugabe des Homogenats zum Reaktionsansatz gestartet. Der Oxalat -

stimulierte Ca^{2+} - Aufnahmeprozess wurde nach 3 min wie folgt beendet: 150 μl des Reaktionsmediums wurden auf einen Zellulosemembranfilter ME 25 (Schleicher & Schuell, BioScience, Dassel, Deutschland, Porengröße 0,45 μm) gegeben und vakuumfiltriert. Dadurch wurden die Vesikel von den im Reaktionsmedium enthaltenen Ca^{2+} , ATP und anderen Bestandteilen umgehend getrennt. Durch sofortiges Spülen mit 2 x 3 ml eiskalter Waschlösung (2 mM EGTA, 100 mM KCl, 40 mM Imidazol, pH 7,0) wurden evtl. noch laufende Ca^{2+} - Transportvorgänge voll-ständig gestoppt, sowie noch vorhandenes extravasikuläres Ca^{2+} mit EGTA komplexiert und durch Filtration entfernt (siehe Versuchsaufbau **Abb.2.3**).

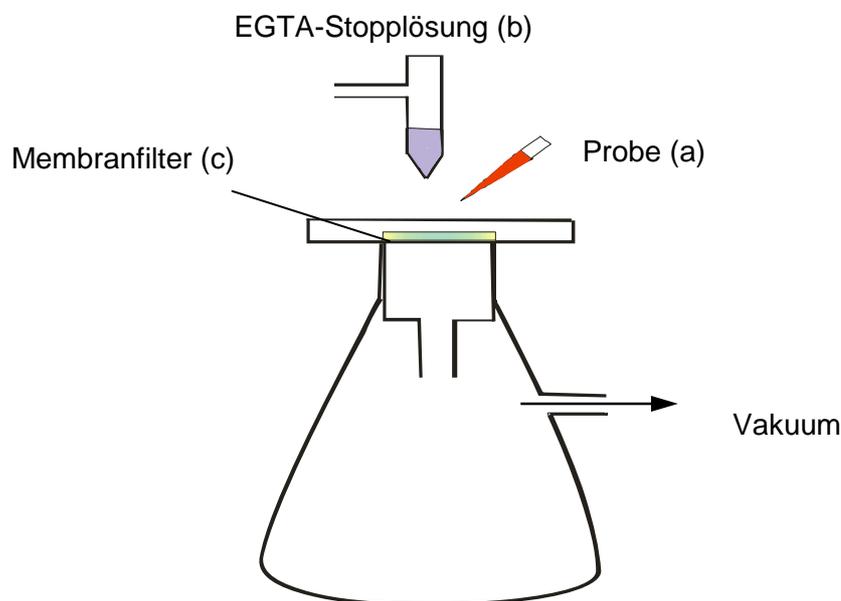


Abbildung 2.3: Versuchsaufbau der Millipore - Filtrationsanlage. Das Reaktionsmedium (a) wurde auf den Membranfilter (c) gegeben und vakuumfiltriert. Danach wurde eine Stopplösung (b) hinzugegeben und schnell vakuumfiltriert. Genaue Erklärung siehe Text.

Die verbliebene filterassoziierte Ca^{2+} - Menge entsprach der in SR - Vesikel durch die SR Ca^{2+} - ATPase transportierten Ca^{2+} - Menge. Die Filter wurden in Szintillationsröhrchen bei 60 °C für 30 min in einem Wärmeschrank getrocknet. Nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Irgasafe Plus, Zinsser Analytic, Frankfurt, Deutschland) wurde die β - Strahlung als Maß für die filterassoziierte $^{45}\text{Ca}^{2+}$ - Menge im Flüssigkeits - Szintillationszähler (Liquid Szintillation Analyzer TRI-CARB 2200CA, Packard BioScience GmbH, Dreieich, Deutschland) nach 8-12 Stunden gegen ^{45}Ca - Standard

gemessen. Der Variationskoeffizient liegt bei dieser Methode unter 5 %. Doppelbestimmungen wurden bei einer oder verschiedenen freien $[Ca^{2+}]$ durchgeführt.

2.9.8 Protein Kinase A stimulierte Ca^{2+} - Aufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum

Um dem Einfluss des Phosphorylierungszustandes von PLN auf die Ca^{2+} - Aufnahme in das SR von transduzierten PNRK zu untersuchen, wurden hierfür bei einer freien $^{45}CaCl_2$ - Konzentration von 0,34 μM entweder 2 μM synthetisches Protein Kinase A (PKA) Inhibitor Protein [PKI6-22)Amid] oder 2 μM katalytische (c) Untereinheit der cAMP abhängigen Protein Kinase A verwendet. Der PKA Inhibitor wurde eingesetzt, um mögliche endogene PKA - Aktivitäten in den Homogenaten zu unterdrücken. Ansonsten wurde wie in **Kapitel 2.9.7** verfahren.

Alle Calcium - Aufnahme Experimente, sowie die dafür notwendigen Vorbereitungen, wurden in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Dr. R. Vetter (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Campus Benjamin Franklin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) durchgeführt.

2.10 Proteinbestimmung in Kardiomyozyten

PNRK wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 200 μl 1 x Lämmli Puffer* aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Eiswasser in einem Bioruptor (Diagenode, Liege, Belgien) beschallt, um die freigesetzte DNA zu zerstören (Einstellungen: „high“, 30 s on/ off Intervalle für 15 min). Die Proben wurden für 5 min bei 37 °C erwärmt und für 1 min bei 9700 g zentrifugiert. Von dem klaren Überstand wurde ein Aliquot für die Proteinbestimmung mit dem DC Protein Assay verwendet (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland). Der Rest wurde bei – 80 °C gelagert.

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach der Methode von *Swank & Munkres* (Swank and Munkres, 1971) m.H. der SDS Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS - Page) mit einem Gelgradienten von 7,5 - 15 %. Dafür wurden die Proben erneut für 5 min auf 37 °C erwärmt. Es wurden je 5 μg Protein pro Geltasche aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel über Nacht bei 40 V auf eine PVDF Membran (Roche, Mannheim, Deutschland) geblottet. Anschließend wurde der Blot reversibel mit Ponceau Rot (Sigma - Aldrich) angefärbt, um die gleichmäßige Proteinbeladung und den Transfer zu kontrollieren. Entfärbt wurde der Blot in 0,5 l TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4)

für 10 min bei RT. Danach erfolgte die Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen der PVDF Membran mit einem Tris haltigen TTBS - Puffer** mit 0,5 % Magermilchpulver für 1 Stunde bei RT. Nach dreimaligem Waschen für je 10 min in 0,5 l TTBS erfolgte die Inkubation mit verdünnten Primärantikörpern (**Tab. 2.20**) bei 4 °C über Nacht. Im Anschluss wurden die Blots für 3 Stunden mit Meerrettich-Peroxidase konjugierten Sekundärantikörpern (Ziege anti - Maus oder Ziege anti - Kaninchen) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA) behandelt. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten wurden die Blots je dreimal für 10 min mit 0,5 l TTBS gewaschen. Eine SR - Membran - Präparation aus Rattenherzen diente als Positivkontrolle. Die Visualisierung der Signale erfolgte mit dem „Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrat“ - Kit (Pierce Biotechnology) und Hyperfilm ECL (Amersham/ GE Healthcare). Die Signalstärke wurde m.H. des Bio-Rad Calibrated GS-800 Scanner und der Quantity One Software (Bio-Rad Laboratories) quantifiziert.

Tabelle 2.20: Verdünnung der Primärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Ursprung	Hersteller
Anti-PLN	1:4.000	Maus Monoklonal	Biomol
Anti-SERCA2	1:5.000	Kaninchen Polyklonal	Dianova
Anti-TnI	1:45.000	Kaninchen Polyklonal	RDI
Anti-CSQ2	1:1.000	Kaninchen Polyklonal	Biomol
Anti-NCX1	1:8.000	Kaninchen Polyklonal	Swant

* **Lämmli - Puffer** (Biorad, München, Deutschland) und 357,5 mM Mercaptoethanol, Ansatz vor Gebrauch mit dest. Wasser 1:2 verdünnen

** **TTBS:** 10 mmol/l Tris-HCl, pH 7,6; 150 mmol/l NaCl, 0,1 % Tween-20

Alle Proteinbestimmungen, sowie die dafür notwendigen Vorbereitungen, wurden in Zusammenarbeit mit den Arbeitsgruppen von Dr. R. Vetter (Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Campus Benjamin Franklin, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Deutschland) und Prof. J.M.J Lamers (Department of Biochemistry, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands) durchgeführt.

2.11 Konstruktion und Produktion adenoviraler Vektoren

Die adenoviralen Vektoren wurden durch *in vitro* Ligation der Shuttle - Plasmide **pAdshPLN_r** und **pAdshCAR4_m** mit dem „Long - Arm“ der Adenovirusmutante RR5 generiert und in HEK 293 Zellen propagiert (**Abb. 2.4**). Bei RR5 handelt es sich um das adenovirale Wildtypgenom **Ad-dl309** mit Deletionen der E1 - Region (Nukleotide 445 bis 3333) sowie der für die E3 - Proteine 14,7 kDa und RID α & β (Nukleotide 30.005 bis 30.750) kodierenden adenoviralen Gene (Hatfield and Hearing, 1993). RR5 verfügt über eine singuläre *Xba* I - Schnittstelle an Nukleotidposition 3333 des Adenovirusgenoms.

2.11.1 Generierung des RR5 - Long - Arm

Aus 5×10^{12} RR5 - Viruspartikeln wurde die DNA isoliert (**Kap. 2.3.2**) und in einem 1 ml Restriktionsansatz (RR5 - DNA 80 - 100 μ g) (**Kap. 2.3.8.1**) mit 400 Units *Xba* I (NEB, Frankfurt, Deutschland) ÜN bei 37 °C verdaut. Nach erneuter Zugabe von 80 U *Xba* I erfolgte eine weitere Inkubation von 4 h bei 37 °C. Anschließend wurde das Restriktionsenzym für 5 min bei 60 °C inaktiviert. Es erfolgte eine elektrophoretische Überprüfung eines Aliquots auf vollständige Restriktion (Long - Arm 33,33 kb und Short - Arm 0,57 kb), bevor der restliche Ansatz dephosphoryliert wurde (**Kap. 2.3.8.2**). Die Trennung beider Fragmente erfolgte durch Ultrazentrifugation auf einem Sucrose-Gradienten (**Kap. 2.11.2.3**). Die Fraktionen mit der 33,33 kb RR5 - Bande wurden gesammelt, gefällt und in TE - Puffer gelöst. Aliquots von 1 μ g wurden bei - 20 °C gelagert.

2.11.2 Generierung und Propagation adenoviraler Vektoren

2.11.2.1 Ligation und Vorkultur

Für die Ligation wurde das adenovirale Shuttle - Plasmid mit *Spe* I geschnitten und 500 ng in einem 40 μ l Reaktionsansatz mit 1 μ g aufgereinigtem RR5 - Long - Arm ligiert (**Kap. 2.3.9**). Mittels Calcium - Phosphat Transfektion (Ca-P-Kit, Stratagene, Deutschland) wurde unter Verwendung des Ligationsansatzes die am Vortag auf einer 60 mm - Kulturschale ausgesäten HEK 293 - Zellen (10^6 Zellen) transfiziert und über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit Low - melting - Agarose (**Kap. 2.11.3**) überschichtet. Nach 7 bis 14 Tagen bildeten sich virale Plaques von denen 5 bis 10 auf der unteren Seite der Kulturschale markiert, mit einer 1000 μ l Pipettenspitze gepickt und in 500 μ l des mit 2 %

FKS versetzten DMEM Low Mediums* aufgenommen wurden (Plaques - Lösung). Zur Amplifikation der isolierten Plaques wurden jeweils 500 µl der viralen Plaques - Lösung auf neue HEK - 293 - Zellen gegeben und für 2 h inkubiert. Danach wurden pro 60 mm Schale 4 ml DMEM (High Medium) mit 10 % FKS zugegeben und weiter inkubiert.

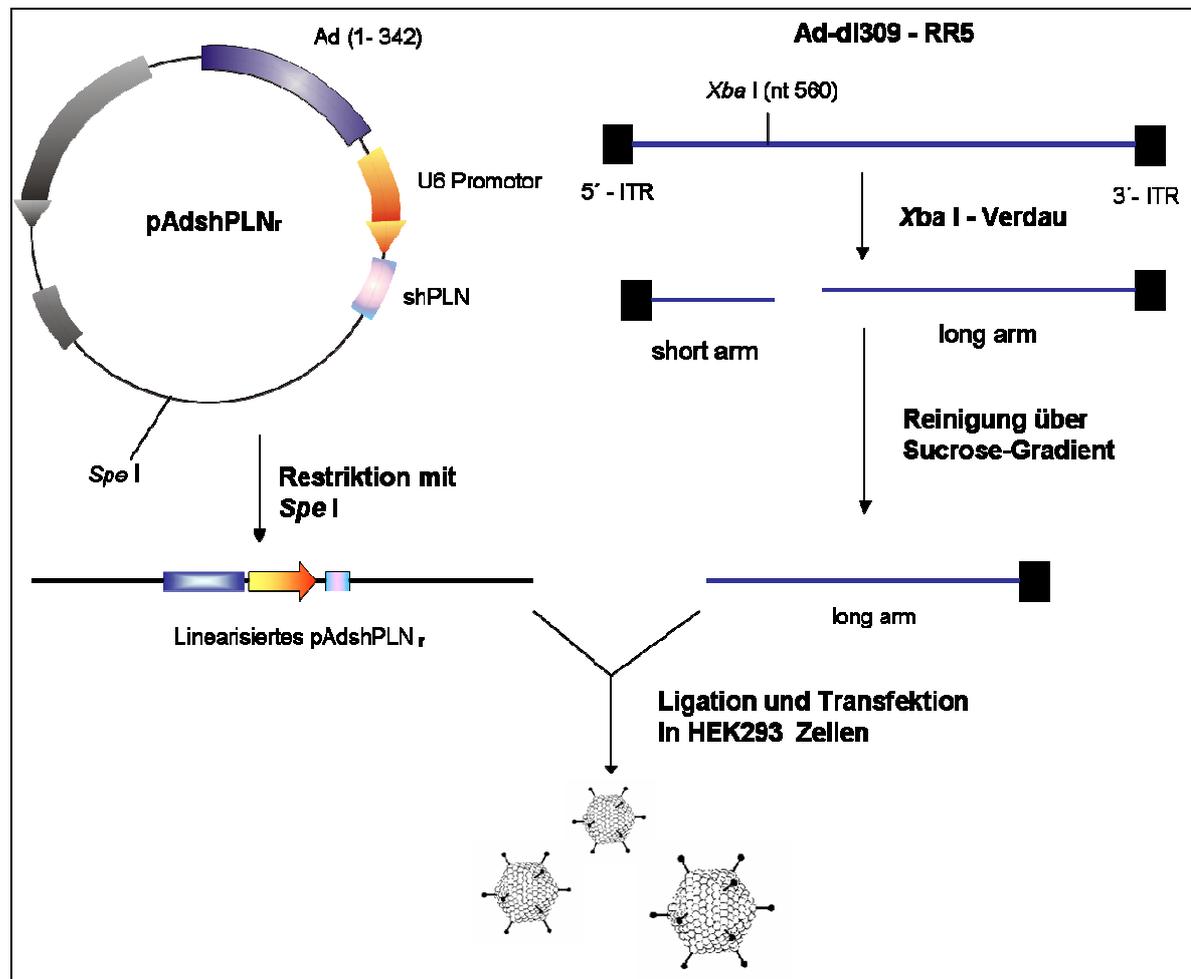


Abbildung 2.4: Produktionsschema von rekombinanten **AdshPLN_r** (modifiziert nach Sipo I., Dissertation 2007). Genaue Beschreibung siehe Text.

In der Regel wurde zwischen 5 und 7 Tagen ein kompletter zytopathogener Effekt (CPE) durchlaufen. Daraufhin wurde das Zelllysat geerntet, in 15 ml - Falcon - Röhren überführt und durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und Auftauen bei 37 °C im Wasserbad aufgeschlossen. Das Lysat wurde für 5 min bei 3.000 RPM (Centrifuge 5810 Eppendorf, Wesseling, Deutschland) zentrifugiert. Vom virushaltigen Überstand (Primär -Lysat) wurden jeweils 500 µl zur weiteren Amplifikation, wie oben beschrieben, verwendet. Nach 5 Tagen wurden erneut Zellen und Kulturmedium geerntet.

Von dem dabei erhaltenen Sekundär - Lysat wurden 1,5 ml in 2 ml Eppendorf - Röhren überführt und 10 min bei 3.000 RPM in der Tischzentrifuge (Eppendorf, Wesseling, Deutschland) zentrifugiert. Aus dem Zellpellet erfolgte die DNA - Isolation mittels DNA - Extraktion - Kit (PeqLab, Erlangen, Deutschland) nach Herstellerangaben und anschließend die Kontrolle auf spezifisches Transgen und RR5 - Vektorhintergrund mit dem Primer - Paar Ad5 324s *Bgl* II / Ad5 4600 as und auf replikationskompetente Adenoviren (RCA) mit dem Primer - Paar Ad5 3315s / Ad5 4600as mittels PCR. Zur Überprüfung der Inserts wurden, abhängig vom Insert, zusätzlich spezifische Primer verwendet. Das RCA - freie und auf Transgen positiv getestete Sekundär - Lysat wurde weiter propagiert und zur Produktion von Adenoviren in größerer Menge verwendet (wie oben beschrieben).

***Low-Medium:** DMEM + 2 % FKS + 1 % Penicillin/Streptomycin

2.11.2.2 Adenovirus - Präparation

Das RCA - freie Sekundär - Lysat (500 µl) wurde gleichmäßig auf die auf einer 60 mm - Kulturplatte ausgesäten HEK 293 Zellen gegeben und für 30 min inkubiert. Danach wurden 4,5 ml Low - Medium zugegeben. Nach ca. 4 Tagen war der Zellrasen komplett lysiert (3. Lysat). Die Zelllysate von drei Schalen wurden gesammelt und in einer sterilen 250 ml - Flasche mit 180 ml Low - Medium gemischt. Zehn 14,5 cm Zellkultur - Schalen mit konfluenten HEK 293 - Zellen wurden mit 10 ml PBS gewaschen und 9 Platten mit jeweils 20 ml der Virus-/ Low-Medium - Lösung infiziert. Eine Schale diente als Zell - Kontrolle. Nach 4 Tagen wurde das entstandene Virus - Lysat der 9 Schalen in 250 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit Nonidet-P40 (Endkonzentration: 0,5 %) zum Zellaufschluss versetzt, durchmischt und 10 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde dann für 10 min bei 13.000 RPM ($20.000 \times g$) bei 4 °C (J-25 Zentrifuge und JA-25 Rotor, Beckman) zentrifugiert und der virushaltige Überstand in einen sterilen 250 ml Erlenmeyerkolben überführt. Die Viruspartikel wurden durch Zugabe von 0,5 Vol PEG/NaCl-Puffer (20 % PEG, 2,5 mM NaCl) über Nacht bei 4 °C präzipitiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation bei 13.000 RPM für 15 min bei 4 °C. Das Virus - Pellet wurde in 4 ml TBS* in einem Polypropylen - Röhren gelöst und bei 3.000 RPM für 5 min bei RT zentrifugiert und über Ultrazentrifugation auf Cäsium - Chlorid gereinigt (**Kap. 2.11.2.3**).

* **TBS:** CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM, NaCl 150 mM, Tris-HCl (pH 7,04)

2.11.2.3 Adenovirus - Reinigung durch Ultrazentrifugation

Zu 4 ml virushaltigem Überstand (**Kap. 2.11.2.2**) wurden 2 g CsCl (Sigma) gegeben (Dichte von 1,34 g/ml). Der Ansatz wurde 1 h bei 4 °C inkubiert und die Zellbruchstücke bei 3.000 RPM für 10 min bei RT abzentrifugiert. Mittels einer Pasteur - Pipette wurde der Überstand in zwei Beckman - Ultrazentrifugen - Röhren (2 ml/Tube) überführt. Beide Röhren wurden durch Zugabe einer 1.34 g/ml CsCl - TBS - Lösung austariert und die Röhren mittels eines Tube - Topper - Heaters (Beckman, USA) versiegelt. Nach der Zentrifugation bei 90.000 RPM für 3 h bei 20 °C (Beckman Ultrazentrifuge, TLA-120 Rotor) wurden die viralen Partikel als weißer, opaleszierender Ring sichtbar. Der Virus - Ring wurde mit einer sterilen Insulin - Spritze abgezogen und in ein 1,5 ml Eppendorf - Gefäß überführt und von überschüssigem CsCl befreit (**Kap. 2.11.2.4**).

2.11.2.4 Entfernung des CsCl - Salzes

Die Entfernung des CsCl - Salzes aus der gereinigten Adenoviren - Fraktion erfolgte über Gelfiltrations - Chromatographie auf NAPTM - Säulen (Amersham Biosciences, USA). Die Säule wurde zunächst mit 25 ml TBS äquilibriert. Danach wurde 1 ml von der Virus - Probe direkt auf die Säule gegeben und der Durchlauf mit 2,5 ml TBS aufgefüllt. Anschließend wurde die Säule mit weiteren 6 ml TBS gewaschen und die Eluate in 1,5 ml Eppendorf - Gefäßen in 12 Fraktionen á 0,5 ml aufgefangen. 10 µl jeder Fraktion wurden mit 90 µl TBS gemischt und die Absorbtion bei 260 nm im Genesys 6 UV - Spektrometer (Thermo Electron Corporation, USA) gemessen. Die Fraktionen mit hohen Konzentrationen wurden gepoolt und erneut bestimmt. Die Virus - Lösung wurde mit Bovines Serum Albumin (Endkonzentration 1 mg/ ml) zum Stabilisieren des Virus gegenüber dem Gefriervorgang versetzt und in 50 µl bis 200 µl Aliquots bei - 80 °C gelagert. Aus einem 200 µl Virus - Aliquot wurde die DNA isoliert und mittels PCR nochmals auf Vorhandensein des Transgens und auf RCA - Kontamination überprüft. Zusätzlich wurde die Integrität des Virus - Genoms durch ein spezifisches Restriktionsmuster mit *Hind* III kontrolliert.

2.11.3 Titer - Bestimmung der rekombinanten Adenoviren

2.11.3.1 Bestimmung der adenoviralen Partikelkonzentration

Die Ermittlung der adenoviralen Partikelkonzentration erfolgte durch die Bestimmung der Gesamtzahl aller Viruspartikel in einer Viruslösung (optical particle units, opu). 10 µl der gereinigten Virus - Lösung wurden in 90 µl TBS verdünnt und die optische Dichte (OD)

bei 260 nm im UV - Spektrometer gemessen. Die Partikelzahl wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration (in Partikel/\mu l)} = \text{OD}_{260} \times 10 \times 10^9$$

2.11.3.2 Plaque Assay zur Bestimmung der biologisch aktiven adenoviralen Partikelkonzentration

Mit Hilfe des zytotoxischen Plaque - Assays lässt sich die Anzahl biologisch aktiver (infektiöser) Viruspartikel (*plaque forming units*, pfu) ermitteln. Die Bestimmung erfolgte über eine absteigende Verdünnungsreihe. Dazu wurden 10 μ l Virus - Probe in 990 μ l DMEM Medium (mit 2 % FKS) aufgenommen (10^{-2} Verdünnung). Diese 10^{-2} - Verdünnung wurde bis auf 10^{-9} dekadisch weiter verdünnt. Anschließend wurden 900 μ l der jeweiligen Verdünnungen auf 6-Loch - Platten mit konfluenten HEK 293 - Zellen gegeben, nachdem das Kulturmedium abgesaugt worden war. Die Platten wurden 1 h bei 37 °C inkubiert. Unterdessen wurde eine autoklavierte 5 % ige Low-Melting-Agarose - Lösung in der Mikrowelle (Bosch, Deutschland) zum Schmelzen gebracht und im Wasserbad auf 42 °C viskös gehalten. Diese Agar - Lösung wurde mit 37 °C warmem Medium auf ein 1,25 % iges Agarose - Medium verdünnt und bei 42 °C im Wasserbad temperiert. Von den 6-Loch -Platten wurden die Virusverdünnungen abgesaugt und die Zellen mit jeweils 3 ml des 1,25 % igen Agarose - Mediums pro Loch überschichtet. Nach Aushärten der Agarose bei RT wurden die Platten bei 37 °C weiter inkubiert. Nach 10 bis 14 Tagen wurden die Plaques ausgezählt und der Titer wie folgt berechnet:

$$\text{Virus-Titer (pfu/ml)} = (\text{N} \times \text{F}) / \text{V}$$

N: Anzahl der gebildeten Plaques

F: Verdünnungsfaktor (entspricht der Verdünnungsstufe)

V: Volumen der zur Infektion verwendeten Virus - Suspension

2.12 Konstruktion und Produktion rekombinanter AAV - Vektoren

2.12.1 Transfektion

Für die Herstellung von rekombinanten Adeno - assoziierten Viren (rAAV) wurden HEK 293T Zellen verwendet. Dafür wurden auf 20 Zellkulturplatten (20 x 14,5 cm Platten) 10×10^6 Zellen pro Platte ausgesät, so dass sie am nächsten Tag ca. 80 % Konfluenz

erreicht hatten. Die Transfektion erfolgte mit Hilfe der Calcium - Phosphat - Methode (**Kap. 2.9.6**). Dabei wurden pro Platte 6 μg AAV-Shuttleplasmid und 18 μg Helferplasmid (**pDP6**) für rAAV6 bzw. 10 μg Shuttleplasmid, 18 μg **p5E18-VP 2/9** und 18 μg *P-Helper* für rAAV9 verwendet (**Abb. 2.5**). Zum Plasmidgemisch wurden 1 ml 0,25 M CaCl_2 dazu pipettiert, geschüttelt und anschließend 1 ml HBS tropfenweise zugegeben. Der Ansatz wurde 1 min bei RT inkubiert, bevor er auf die Zellen gegeben wurde. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO_2 erfolgte ein Mediumwechsel, danach wurden die Zellen für weitere 72 Stunden inkubiert.

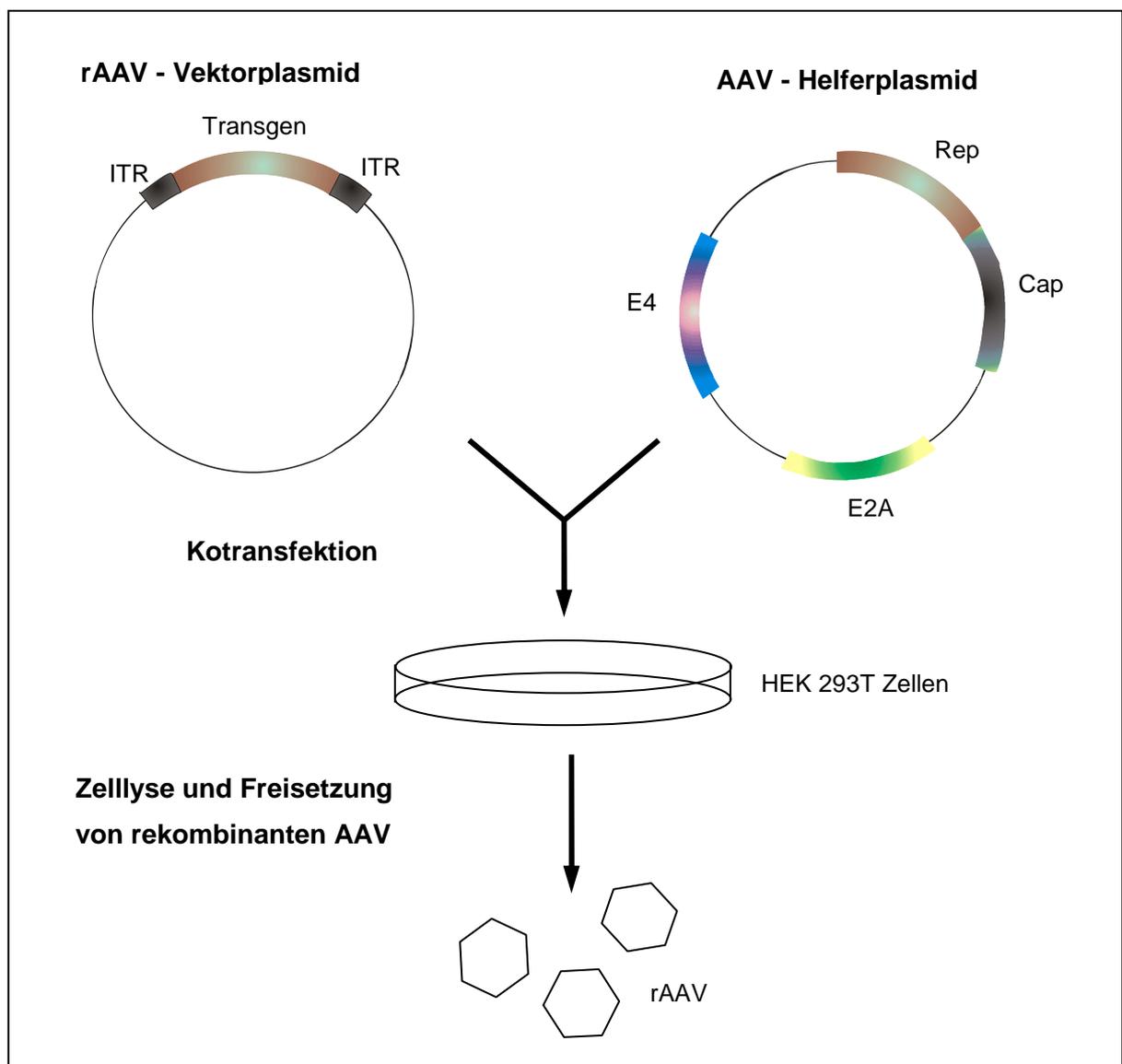


Abbildung 2.5: Schema des 2-Plasmid - Protokolls für die Herstellung von rAAV. HEK 293T Zellen werden mit 2 Plasmiden kotretransfiziert. Das rAAV - Vektorplasmid enthält das von 2 ITRs flankierte Transgen. Das AAV - Helferplasmid trägt die Genkassette für das AAV rep und cap sowie die adenoviralen Gene für E2A und E4. Genaue Beschreibung siehe Text.

2.12.2 Ernte der rAAV - produzierenden Zellen

72 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen durch Abschaben abgelöst und zusammen mit dem Medium resuspendiert und 10 min bei 3.000 g in 50 ml Röhren zentrifugiert (2,5 Platten pro 50 ml). Der Überstand wurde für die Weiterverarbeitung (**Kap. 2.12.4**) in ein Erlenmeyerkolben überführt. Die Zellpellets wurden 2 x mit 25 ml PBS gewaschen und anschließend in 10 ml PBS resuspendiert und bei – 80 °C gelagert oder gleich aufgeschlossen.

2.12.3 Zellaufschluss

Die Zellen wurden durch viermaliges Einfrieren und Auftauen aufgeschlossen. Dabei wurden die Röhren mit dem PBS - Zellgemisch in ein Ethanol - Trockeneisbad gestellt und bei 37 °C in einem Wasserbad wieder aufgetaut. Der gelösten Zell - rAAV - Suspension wurden 15 µl (3.750 U) Benzonase (Merck, Deutschland) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. Dann erfolgte eine Zentrifugation für 30 min bei 6.000 g. Der Überstand wurde nochmals für 20 min bei 6.000 g zentrifugiert. Der Überstand mit der rAAV - Fraktion wurde nun in einem Iodixanolgradienten (**Kap. 2.12.5**) weiter aufgereinigt.

2.12.4 rAAV - Fällung aus Überstand

Der in **Kapitel 2.12.2** gesammelte virushaltige Überstand (ca. 400 ml) wurde mit 8 ml 2,5 M CaCl₂ versetzt, gemischt, 1 h auf Eis inkubiert und anschließend bei 4.000 RPM für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einen Erlenmeyerkolben überführt und 130 ml PEG -Lösung* zugegeben und für 48 h bei 4 °C belassen. Je 50 ml der Virussuspension wurden auf 50 ml Röhren verteilt und 30 min bei 3.000 g zentrifugiert. Die Zellpellets wurden jeweils in 500 µl NaCl-HEPES - Lösung** resuspendiert, gepoolt und nochmals bei 10.000 g für 15 min zentrifugiert. Zum virushaltigen Überstand wurden 8 µl (2.000 U) Benzonase (Merck, Deutschland) zugegeben und für 1,5 h bei 37 °C inkubiert. Diese rAAV - Fraktion wurde nun in einem Iodixanolgradienten weiter aufgereinigt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in der Zentrifuge 5810R (Eppendorf).

***24 % pEG/ NaCl:** 24 % PEG (Poly Ethylen Glykol), 1,86 M NaCl

****NaCl-HEPES - Lösung:** 50 mM HEPES, 0,15 M NaCl, 25 mM EDTA

2.12.5 Iodixanol - Gradient

Die Aufreinigung der rAAV - Fraktion erfolgte durch einen Iodixanolgradienten (**Tab. 2.21**) in einer Ultrazentrifuge (Centrikon T-2050, Schweiz). Der Überstand wurde zuerst mit 6 ml 15 % Iodixanollösung, dann mit 4,5 ml 25 %, mit 3,5 ml 40 % und abschließend mit 3,5 ml 54 % Iodixanollösung unterschichtet. Die Ultrazentrifugenröhrchen wurden mit 1 x PBS/MK-Lösung* bis zum Rand aufgefüllt und austariert und für 2,5 h bei 54.000 g und 18 °C zentrifugiert. Die dabei entstandene sichtbare Virusbande über der 54 % Iodixanolphase wurde mit Hilfe einer Kanüle (18G) abgezogen. Die AAV - Präparation wurde bei – 80 °C gelagert.

Tabelle 2.21: Herstellung eines Iodixanolgradienten

	15 % Iodixanol	25 % Iodixanol	40 % Iodixanol	54 % Iodixanol
1 x PBS/MK	37,5 ml	28 ml	16,5 ml	5 ml
Iodixanol Stock (60 %)	12,5 ml	20 ml	33 ml	45 ml
Phenolrot	/	100 µl	/	100 µl
Gesamtvolumen	50 ml	48 ml	49,5 ml	50 ml

*PBS/MK - Lösung: 1 x PBS, 2,5 mM KCl, 1 mM MgCl₂

2.12.6 Bestimmung des genomischen Titers durch Slot - Blot

Für die genomische Titerbestimmung erfolgte eine Isolation der rAAV - DNA nach **Kapitel 2.3.3**. Der Titer gibt die Anzahl DNA enthaltener AAV - Partikel pro ml an. Für eine genaue Validierung der Virustiter wurde für jedes der zu bestimmenden Virusvektoren ein eigener Standard generiert. Dafür wurden die rAAV - Plasmide (**Kap. 2.8**) mit *sma* I geschnitten, welches sowohl in der 3' ITR als auch in der 5' ITR schneidet und dadurch ein DNA-Fragment von einer Virusgenomlänge generiert. Von diesen rAAV - Plasmid-Standards wurden Verdünnungsreihen von 10¹ - 10⁻⁴ ausgehend von 1 ng/µl verwendet. Von der Vektor-DNA wurden jeweils 10 µl und 20 µl auf den Blot aufgetragen. Für die Hybridisierung wurde eine U6 - Promoter Sonde hergestellt, die in allen Plasmiden und Standards bindet. Die Stärke des Hybridisierungssignals der Vektor - DNA wurde ins Verhältnis zum jeweiligen Standard gesetzt. Um die genaue Anzahl der AAV - Genomkopien zu ermitteln, musste vorher das Molekulargewicht der Standards berechnet werden. Damit ließ sich die Anzahl der Vektor-Kopien im Standard und darauf basierend die spezifische Menge an AAV - Vektor-Genomkopien ermitteln:

Avo x Standardkonzentration / MW des Standards**

Formel zur Berechnung des Molekulargewichtes (MW) (g/mol):

$$[(313,2 \times A^*) + (329,2 \times G^*) + (289,2 \times C^*) + (304,2 \times T^*)] - (62 \times 2)$$

*Entspricht der Anzahl der Nukleotidbasen im Standard

**Avogadro Zahl = $6,022 \times 10^{23}$

2.13 Adeno - bzw. AAV - Vektor vermittelter Gentransfer

PNRK wurden mit einer Zellzahl von $1,2 \times 10^6$ Zellen pro Well einer 6-Well Platte ausgesät. Nach 48 Stunden wurde das Medium entfernt und durch 0,5 ml Ad- bzw. AAV - Vektor haltiges Serumfreies CMRL 1415-ATM Medium ersetzt. 1 Stunde später erfolgte die Zugabe von 2,5 ml 10 % FKS - haltigem Zellkulturmedium. Alle 24 Stunden wurde ein Medium-wechsel mit 2 ml pro Well durchgeführt. Die transduzierten PNRK wurden bei 37 °C in einem Wärmeschrank (0 % CO₂, 5 % O₂) bis zu 13 Tage inkubiert.

2.14 Transfer von Nukleinsäuren und radioaktive Hybridisierung

2.14.1 DNA - Transfer mittels Southern - Blot

Für den Transfer von DNA auf eine Nylonmembran wurde die Southern - Blot - Methode angewendet. Dafür wurden PCR - Fragmente oder restriktionsendonukleasebehandelte genomische DNA elektrophoretisch auf einem Agarosegel (**Kap. 2.3.6**) aufgetrennt. Zur Denaturierung der DNA wurde das DNA - Agarosegel anschließend zweimal 30 min in Denaturierungslösung^{*1} geschwenkt. Danach wurde das DNA - Agarosegel weitere 60 min in Neutralisierungslösung^{*2} geschwenkt und die DNA auf eine Nylonmembran (HybondTM N-Hybridisation Membran; Amersham) mittels Kapillartransfer (über Nacht) übertragen. Als Transferpuffer diente 10 x SSC^{*3}. Die Membran wurde für 30 min an der Luft getrocknet. Anschließend wurde die DNA durch zweimaliges *Cross-linken* unter UV - Licht (150 mJoule/cm^2) im Strata Linker 1200 (Stratagene, Deutschland) an die Membran kovalent gebunden und danach hybridisiert (**Kap. 2.14.6**) oder in einer Klarsichttüte bei 4 °C gelagert.

*1 **Denaturierungslösung:** 0,5 M NaCl, 0,5 M NaOH

*2 **Neutralisierungslösung:** 1,5 M NaCl, 1 M Tris-HCl, pH 8.0

*3 **20 x SSC-Puffer:** 3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat

2.14.2 RNA - Transfer mittels Northern - Blot

RNA - Agarosegele (**Kap. 2.4.2**) wurden mittels Kapillartransfer (über Nacht) auf eine Nylonmembran (HybondTM N-Hybridisation Membran; Amersham) übertragen. Ansonsten wurde wie in **Kapitel 2.14.1** verfahren.

2.14.3 Radioaktive Markierung von DNA - Fragmenten

Das Prinzip der DNA - Markierung beruht auf der Synthese eines komplementären DNA-Stranges mit Hilfe der Taq - Polymerase und unter Verwendung von radioaktiv markierten ³²P-dCTP. Die radioaktiv markierte Einzelstrang - DNA - Sonde wurde mit entsprechenden *antisense* - Primern für Northern Blots oder entsprechender *sense*- bzw. *antisense*-Primer für Southern Blots mit Hilfe einer PCR hergestellt. Dazu diente folgendes Protokoll:

Tabelle 2.22: Reaktionsansatz für die Herstellung von Einzelstrang - DNA - Sonden

Reagenzien	25 µl Reaktionsvolumen
10 x Taq Polymerase Puffer	2,5 µl
dNTP ohne dCTP (1 mM)	0,5 µl
Primer (100 µM)	0,25 µl
DNA - Matrize (100 ng) ¹	-- µl
Taq - Polymerase (5 Units/ µl)	0,25 µl
A. bidest	ad 25 µl
Mineralöl zur Übersichtung	15 µl
³² P dCTP (10 µCi/ µl) ²	3 – 5 µl

¹ Abhängig von der Konzentration der DNA - Lösung

² Abhängig von der Aktivität und von der Stärke des zu erwartenden Signals

2.14.4 Aufreinigung radioaktiv markierter DNA - Sonden

Die radioaktiv markierten PCR - Produkte wurden auf Sephadex - Säulen gereinigt. Dazu wurde in A.bidest. gelöstes Sephadex G-50 (Sigma[®]) in eine Pasteurpipette geschichtet, die Sonde zugegeben und durch weitere Zugabe von A.bidest über die Polymer - Säule gespült. Die erste Fraktion von ca. 500 µl Eluat wurde verworfen. Danach wurden bis zu 8 Fraktionen á 100 µl aufgefangen und die Radioaktivität jeder Fraktion mit dem Bioscan QC 2000 (Bioscan, USA) gemessen. Die Fraktionen mit den höchsten Aktivitäten wurden gepoolt und anschließend als Sonde verwendet.

2.14.5 Radioaktive Prähybridisierung und Hybridisierung

Die radioaktive Hybridisierung der membrangebunden Nukleinsäuren erfolgte in Hybridisierungsröhren (Biometra, Deutschland) mit 5-10 ml (pro 100 cm² Filter) ExpressHyb Hybridization Solution (Clontech) bei 68 °C (Northern Blot) bzw. bei 60 °C (Southern Blot) im Hybridisierungsöfen (Biometra, Deutschland). Zuerst erfolgte eine 30 minütige Prähybridisierung. Anschließend wurde die in **Kapitel 2.14.4** aufgereinigte radioaktive Sonde zum Hybridisierungsansatz hinzugegeben und für 1 h bei 68 °C (Northern Blot) bzw. bei 60 °C (Southern Blot) hybridisiert. Danach wurden die Membranen zweimal für 15 min mit jeweils 10 ml Waschlösung I^{*1} bei RT gewaschen und noch ein bis zweimal mit Waschlösung II^{*2} bei 50 °C für 15 min. Die Filter wurden entnommen und in Klarsichtfolie eingeschlagen.

*¹Waschlösung I: 2 x SSC, 0,05 % SDS

*²Waschlösung II: 0,1 x SSC, 0,1 % SDS

2.14.6 Nachweis und Quantifizierung der Hybridisierungsprodukte

Die in Klarsichtfolie eingeschlagene radioaktiv-markierte Membran wurde in eine Filmkassette mit einem Röntgenfilm (Fuji Film-BAS-1500-Film-Kassette) zu – 80 °C gelegt. Für eine quantitative Auswertung wurde die Membran in eine Phosphoimager-Belichtungsplatte (Fuji Film-Platte BAS-1500) bei RT oder bei 4 °C für mehrere Stunden bis hin zu mehreren Tagen inkubiert. Der Röntgenfilm wurde anschließend entwickelt bzw. die Phosphoimager - Belichtungsplatte mit dem „Fuji Bas 2000 Phospho-Imager“ (Fuji) und der Software BAS Reader 2.21 digital ausgewertet. Die Intensität des Hybridisierungssignals wurde densitometrisch m.H. der Software Tina (Version 2.09g[©] raytest Isotopenmessgeräte GmbH) ermittelt.

2.14.7 Waschen radioaktiv markierter Blots

Für eine Rehybridisierung von bereits radioaktiv-markierten Membranen wurden die Sonden in einem Wasserbad bei 95 - 98 °C durch 5 - minütiges Schwenken in 0,5 % igem SDS (Sigma) vom Filter gelöst (Strippen). Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis kein radioaktives Signal mehr gemessen werden konnte. Danach konnte der Blot erneut hybridisiert werden (**Kap. 2.14.5**).

2.15 Tiermodelle

Die Ratten wurden unter Beachtung der deutschen Tierschutzverordnung gehalten und gepflegt. *In vivo* Experimente für den viralen Gentransfer in Ratten wurden in den USA nach den dort geltenden Richtlinien in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von *R.J. Hajjar* durchgeführt (Cardiovascular Research Center, Mt. Sinai School of Medicine, New York, NY 10029, USA).

2.15.1 Abdominale Aortenligatur bei der Ratte

Vier Wochen alte Sprague Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 70 - 80 g wurden mit einer intraperitonealen Injektion von 65 mg/kg Pentobarbital anästhesiert. Die Tiere wurden über den Larynx mit einem 16-G-Soft Katheter (Angiocath, Becton - Dickson, Sandy, UT) intubiert und mit einem Atemvolumen von 2 ml je 50 Zyklen/min und einem Sauerstoffgehalt von 21 % beatmet. Das Fell oberhalb des Bauchs wurde kurz rasiert. Es erfolgte ein ca. 1 cm großer Schnitt vom Brustbein bis auf Höhe der Schlüsselbeine. Die Aortenwurzel wurde von dem darüberliegenden Thymus freigelegt, wobei um die aufsteigende Aorta ein Metallclip aus inertem Tantalum mit einem Durchmesser von 0,58 mm (Weck, Inc.) gelegt wurde (*Aortic Banding*). Danach wurde der Bauchschnitt wieder vernäht und die Tiere zum Aufwachen in ihre Käfige zurückgebracht (**Abb. 2.6**).

Die scheinoperierten Tiere (Sham) wurden der gleichen Prozedur unterzogen, jedoch ohne Abklemmen der Aorta, durch Anlegen des Tantalum - Clips.

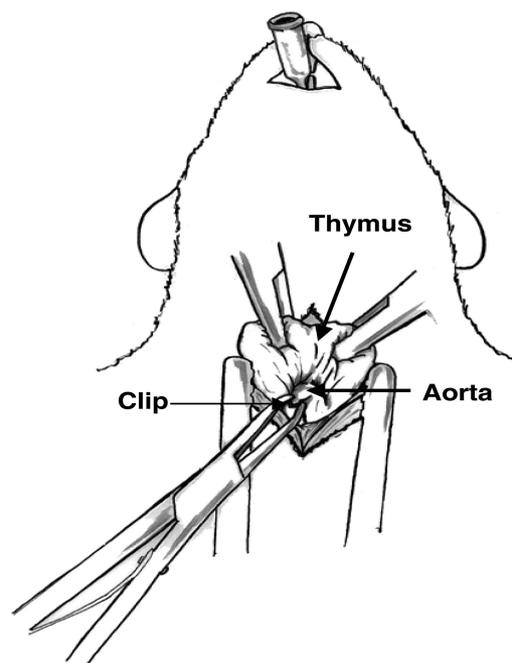


Abbildung 2.6: Abdominale Aortenligatur (Erklärung siehe Text), (Del et al., 2002)

2.15.2 Transthorakale Echokardiografie

Die Transthorakale Echokardiografie (TTE) ist eine nichtinvasive Untersuchungsmethode des Herzens mit Hilfe von Ultraschall. Durch eine Zwei-Dimensionale Bildgebung kann die Herzfunktion in Echtzeit verfolgt werden. Dabei sind die Größe der Herzkammern, die Klappenfunktion sowie die Pumpfunktion gut erkennbar.

Nach 22 Wochen *Transaortic Banding* wurde bei den Ratten eine Transthorakale Echokardiografie durchgeführt. Dafür wurden die Tiere zuvor intraperitoneal mit 40 mg/kg Pentobarbital leicht anästhesiert.

Die 2-D-Echokardiografie wurde im M-Modus mit einem GE Vivid-7 Ultrasound Gerät (General Electric, Norwegen) mit einem 12-MHz Breitband - Schallkopf durchgeführt. Mit Hilfe der „*mid-papillary level* - linksventrikulären Kurzachsen - Ansicht“ konnten die Stärken der hinteren Herzwand, des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers (**LVEDD**) als auch des linksventrikulären endsystolischen Durchmessers (**LVESD**) gemessen werden. Aus LVEDD und LVESD konnte dann die Fraktionsverkürzung (*Fractional-Shortening* - **FS**) nach folgender Formel berechnet werden:

$$\mathbf{FS = (LVEDD - LVESD/LVEDD) \times 100}$$

2.15.3 Viraler Gentransfer *in vivo*

Nach 25 - 30 Wochen bildeten die Ratten mit *Aortic-Banding* eine links-ventrikuläre Dilatation. Erst bei einer Abnahme des FS von mehr als 25 % erfolgte der virale Gentransfer innerhalb von 3 Tagen. Dazu wurden die Tiere anästhesiert und eine Thorakotomie durchgeführt. Mit Hilfe eines 22 G Katheters wurden 3×10^{10} Pfu vom Adenovektor in jeweils 200 µl Lösung von der Spitze des linken Ventrikels bis zur Aortenwurzel appliziert. Während der Injektion wurden die Aorta und die Pulmonalarterie distal zum Katheter für 40 sek. abgeklemmt. Diese Prozedur ermöglichte eine direkte Verteilung der viralen Vektorlösung in das Herz über die Koronargefäße. Anschließend wurde die Brust wieder verschlossen und die Tiere konnten sich erholen. Der virale Gentransfer durch AAV9 erfolgte über eine einfache Schwanzvenen - Injektion von jeweils 5×10^{11} AAV - Vektorgenomen.

2.15.4 Hämodynamikmessung

Die genterapeutisch behandelten Ratten wurden während und am Ende der RNA - Interferenz Therapie hämodynamisch charakterisiert. Dafür wurden sie mit 40 mg/kg Pentobarbital intraperitoneal narkotisiert und künstlich beatmet. Der Brustraum wurde über einen medialen Mittelschnitt eröffnet und das Herz freipräpariert. Es erfolgte ein kleiner Schnitt an der Herzspitze, worüber der Millar-Tip-Katheter® (Durchmesser 2 French) (MILLAR Instruments, TX, USA) in den linken Ventrikel eingeführt wurde (**Abb. 2.7**).

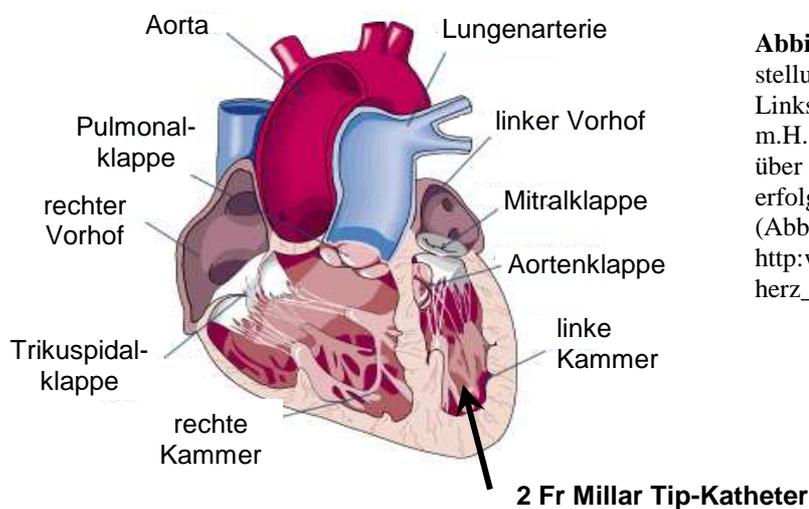


Abbildung 2.7: Schematische Darstellung der Hämodynamikmessung. Links-ventrikuläre Drücke wurden m.H. eines Millar Tip-Katheters® über die Herzspitze nach zuvor erfolgter Thorakotomie gemessen (Abb. modifiziert nach: http://www.onmeda.de/lexika/anatomie/herz_anatomie.html#fx=1).

Daraufhin konnten der links-ventrikuläre-systolische Druck (**LVSP**), der links-ventrikuläre-endiastolische Druck (**LVDP**), die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($+dP/dt_{max}$) sowie die minimale Druckabfallgeschwindigkeit ($-dP/dt_{min}$) und die Zeitkonstante der isovolumetrischen Relaxation (**Tau**) gemessen werden. Die isovolumetrische Relaxation wurde nach der Formel berechnet:

$$P = P_0 e^{-t/\tau} + P_B$$

P = linksventrikuläre isovolumetrische Druck

P₀ = Druck bei $-dP/dt_{min}$

P_B = Restdruck

2.16 Statistische Evaluierung

Die Daten wurden als Durchschnittswerte mit einer Standardabweichung angegeben. Diese wurden m.H. des t - Tests bzw. bei ANOVA mit STATVIEW (Abacus Concepts, Berkley, Ca, USA) ermittelt. Die Unterschiede zwischen zwei Versuchsansätzen wurden als signifikant betrachtet, wenn die P - Werte kleiner als 0,05 waren.

3. Ergebnisse

3.1 Konstruktion und Charakterisierung von pAdshPLN_r

Für die Generierung einer *short hairpin* (sh) RNA gegen Phospholamban diente das pSilencer Plasmid **pSL-PLN17** (Fechner et al., 2007) als Basis, um daraus die Expressionskassette mit U6 - Promoter und der **shPLN_r-RNA** - Sequenz herauszuamplifizieren. Die unter Polymerase III - Promotor stehende **shPLN_r-RNA** wurde in ein adenovirales Shuttleplasmid (Sipo et al., 2006) kloniert. Aus diesem Plasmid wurde dann der adenovirale Vektor **AdshPLN_r** generiert (**Abb. 3.1**).

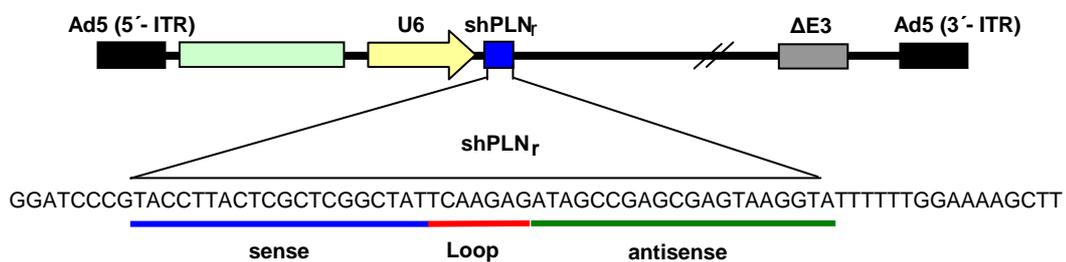


Abbildung 3.1: Vektorkarte von AdshPLN_r und PLN_r-shRNA Sequenz

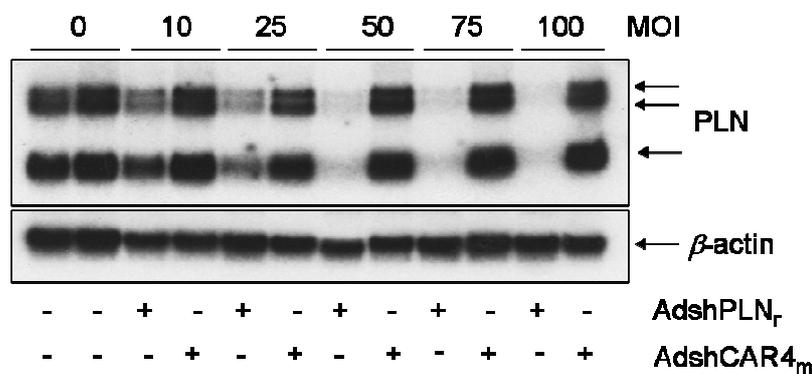
3.1.1 Funktionelle Charakterisierung von AdshPLN_r auf mRNA Ebene

Zur Untersuchung der Silencing Effizienz von endogen exprimiertem Phospholamban (PLN) wurden primäre neonatale Ratten - Kardiomyozyten (PNRK) mit AdshPLN_r transduziert. Dabei wurde sowohl der Einfluss verschiedener Viruskonzentrationen als auch die Dauer des Silencingeffektes auf das PLN untersucht. Als Kontrolle diente dabei der Adenovirusvektor AdshCAR4_m, welcher eine shRNA gegen den Coxsackie Adenovirus Rezeptor (CAR) der Maus generiert und keinen Einfluss auf die Expression von PLN oder den Ca²⁺ - Metabolismus hat. PNRK wurden mit Vektorkonzentrationen von 10 bis 100 MOI's (*Multiplicity of Infection*) transduziert. Nach zwei Tagen wurde die gesamt - RNA aus den Zellen isoliert und die Expression des PLN mittels Northern Blot Hybridisierung unter Verwendung von PLN spezifischen ³²P-markierten Sonden bestimmt, wobei die Normalisierung der quantifizierten PLN - mRNA auf die Expression des ubiquitär exprimierten (*housekeeping*) - Gens β-Aktin erfolgte (**Abb. 3.2a**). Die Transduktion von AdshPLN_r zeigte eine starke dosisabhängige Downregulation der PLN - mRNA Expression. Bei einer MOI von 10 wurde ein Silencing von 27 % erreicht. Bei der maximal verwendeten Vektorkonzentration von 100 MOI wurde die PLN - mRNA

nahezu vollständig herunterreguliert. Die Kontrolle mit **AdshCAR4_m** zeigte, unabhängig von der eingesetzten Vektordosis, keinen Einfluss auf die mRNA Expression von PLN (**Abb. 3.2a**).

Um die Dauer des Silencingeffektes auf PLN näher zu beschreiben, wurden die PNRK über einen Zeitraum von 1 bis 13 Tagen nach Transduktion mit **AdshPLN_r** bzw. **AdshCAR4_m** bei einer Vektorkonzentration von 100 MOI untersucht. Bereits nach 24 Stunden konnte eine starke Runterregulation der PLN - mRNA nach Northern Blot Hybridisierung beobachtet werden. Der Silencingeffekt hielt bis zum 13. Tag an (**Abb. 3.2b**).

a



b

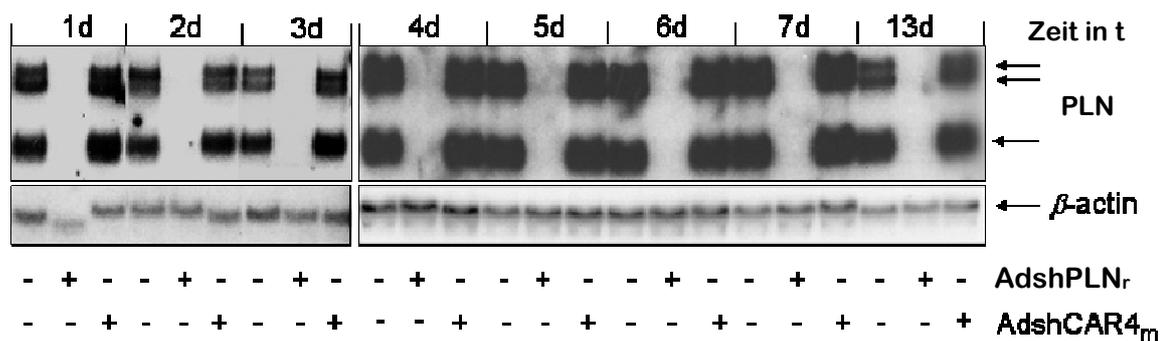


Abbildung 3.2: Silencing der PLN - mRNA Expression durch **AdshPLN_r**. **a)** Dosisabhängige Downregulation von PLN - mRNA durch **AdshPLN_r**. PNRK wurden, wie angegeben, mit **AdshPLN_r** bzw. einem Kontrollvektor **AdshCAR4_m** transduziert. Die Zellen wurden 48 h später geerntet und die PLN - mRNA Expression mittels Northern Blot und mit einer Ratten spezifischen ³²P-markierten PLN - Sonde untersucht. Zur Kontrolle der gleichen RNA - Ladung wurden die Blots mit einer ³²P-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert. **b)** Zeitabhängige Downregulation der PLN - mRNA durch **AdshPLN_r**. PNRK wurden mit **AdshPLN_r** bzw. einem Kontrollvektor **AdshCAR4_m** von jeweils 100 MOI transduziert. Die RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und im Northern Blot analysiert (s.o.). Die PLN - mRNA war während des gesamten Untersuchungszeitraums von 13 Tagen nach Transduktion mit **AdshPLN_r** nicht detektierbar, während die Expression durch die Transduktion mit dem Kontrollvektor unbeeinflusst blieb.

Das Silencing von PLN durch shPLN_r - vermittelte RNA Interferenz konnte durch Quanti-fizierung der PLN - mRNA Expression mit Hilfe einer TaqMan™ - PCR unter Verwendung einer sequenz-spezifischen PLN - Sonde bestätigt werden (**Abb. 3.3**). Es konnte gezeigt werden, dass bei allen angegebenen Zeitpunkten eine Herunterregulation der PLN - mRNA von über 95 % im Vergleich zur Kontrolle mit AdshCAR4_m erreicht wurde (**Abb. 3.3**).

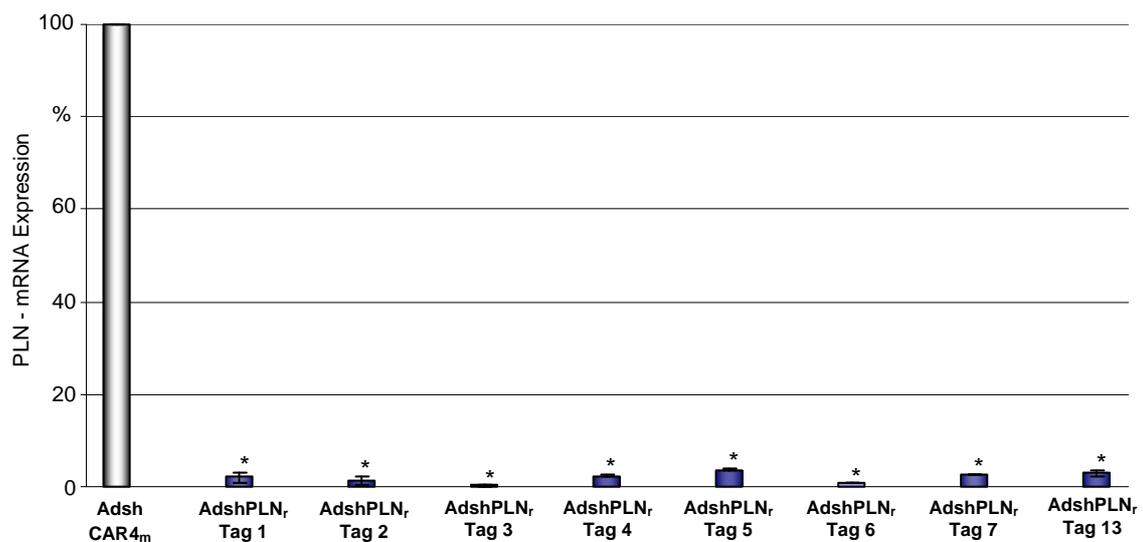


Abbildung 3.3: PLN - mRNA Expression im Zeitverlauf. PNRK wurden mit jeweils 100 MOI AdshPLN_r bzw. einem Kontrollvektor AdshCAR4_m transduziert. Die zelluläre gesamt - RNA wurde zu den angegebenen Zeitpunkten isoliert und in einer TaqMan™ - PCR auf die Expression von PLN untersucht. Die ermittelten Werte wurden gegen das „Housekeeping“ - Gen GAPDH normalisiert. Das Expressionslevel von PLN bei AdshCAR4_m diente jeweils als Vergleichswert und wurde mit 100 % gleichgesetzt. (* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle.)

Auch in Abhängigkeit von der Vektordosis konnte per TaqMan™ - PCR mit zunehmender Konzentration von AdshPLN_r eine Abnahme der PLN - mRNA Expression nachgewiesen werden (**Abb. 3.4**). Bei einer MOI von 10 wurde die PLN - mRNA bereits auf ca. 43 % des Kontrollwertes herunterreguliert. Bei der maximal verwendeten Vektorkonzentration von 100 MOI wurde sogar ein Silencing von über 89 % erreicht. Die ermittelten Werte durch TaqMan™ - PCR wurden gegen das „Housekeeping“ - Gen GAPDH normalisiert. Die Daten zeigen, dass das virale Vektorkonstrukt AdshPLN_r PLN in PNRK, auf transkriptioneller Ebene fast vollständig herunterreguliert hat.

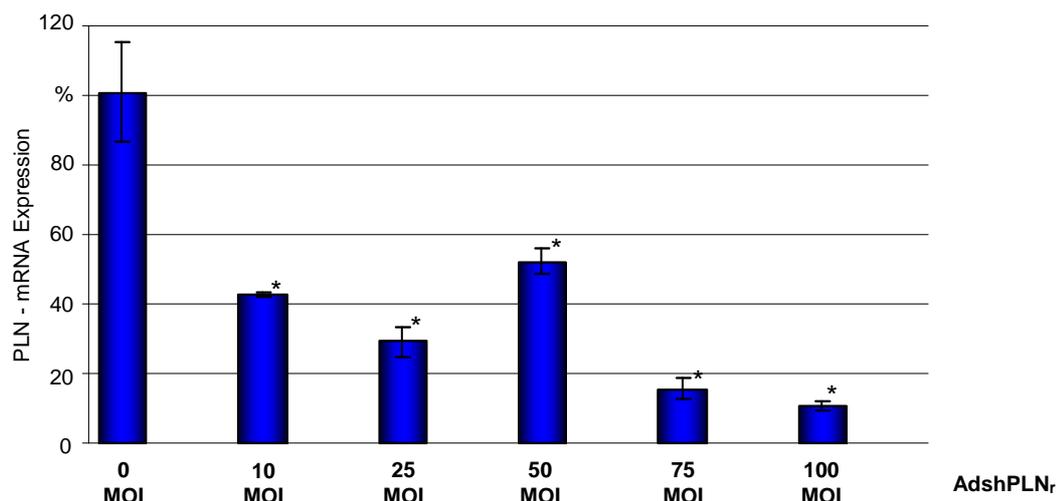
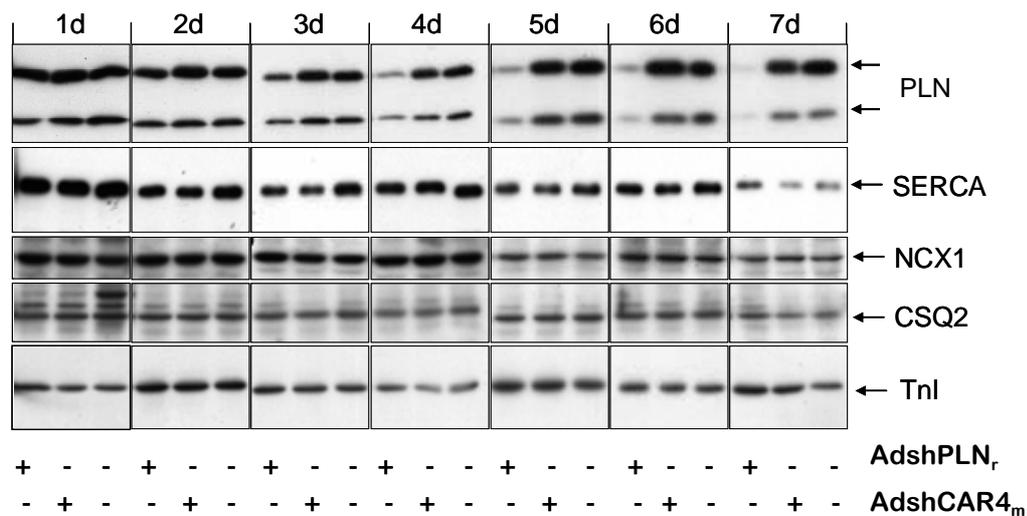


Abbildung 3.4: PLN - mRNA Expression in Abhängigkeit der von AdshPLN_r - Vektordosis. PNRK wurden mit AdshPLN_r bzw. dem Kontrollvektor AdshCAR4_m, wie angegeben, transduziert. Die RNA wurde 48 h später isoliert und mittels TaqMan™ - PCR auf die Expression von PLN quantifiziert. Die Daten wurden gegen das „Housekeeping“ - Gen GAPDH normalisiert. Das Expressionslevel von PLN bei AdshCAR4_m diente jeweils als Vergleichswert und wurde mit 100 % gleichgesetzt. (* p < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle)

3.1.2 Funktionelle Charakterisierung von AdshPLN_r auf Protein Ebene

Um weitere Aussagen über die Funktionalität von AdshPLN_r machen zu können, wurden Untersuchungen auf translationaler Ebene durchgeführt. Dafür wurden PNRK mit 100 MOI AdshPLN_r oder dem Kontrollvektor AdshCAR4_m transduziert und täglich bis Tag 7, die zellulären Proteine isoliert und mittels Western Blot auf PLN - Proteinexpression hin untersucht (Abb. 3.5a). Im Gegensatz zur mRNA - Expression zeigte sich im Western Blot erst am Tag 3 nach Transduktion eine sichtbare Herunterregulation des PLN - Proteins auf 51 ± 4 %. Bis zum Tag 7 nahm die PLN - Proteinexpression kontinuierlich ab. Die maximale Herunterregulation wurde am Tag 7 erreicht. Nur noch 7 ± 2 % konnten nachgewiesen werden.

a



b

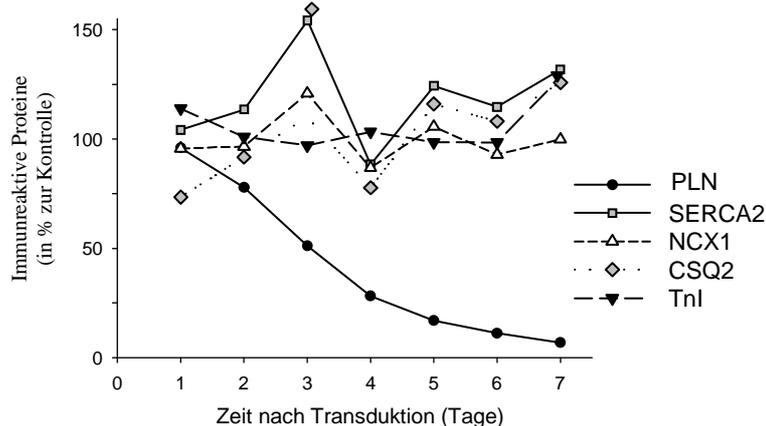


Abbildung 3.5: PLN - Protein Herunterregulation. **a)** Western Blot Analyse der PLN - Protein Expression. PNRK wurden mit 100 MOI **AdshPLN_r** oder einem Kontrollvektor transduziert. Die Proteine wurden zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Transduktion isoliert und in einem Western Blot ausgewertet. 3 Tage nach Transduktion war eine signifikante Herunterregulation von PLN zu beobachten. Dagegen zeigten sich bei SERCA2, NCX1, CSQ2 und TnI keine Veränderungen in der Expressionsstärke während des gesamten Untersuchungszeitraums von 7 Tagen. **b)** Relative Expressionslevels der SERCA2, NCX1, CSQ2 und TnI - Proteine in PNRK, normalisiert zum Western Blot Signal des Kontrollvektors zu den entsprechenden Zeitpunkten.

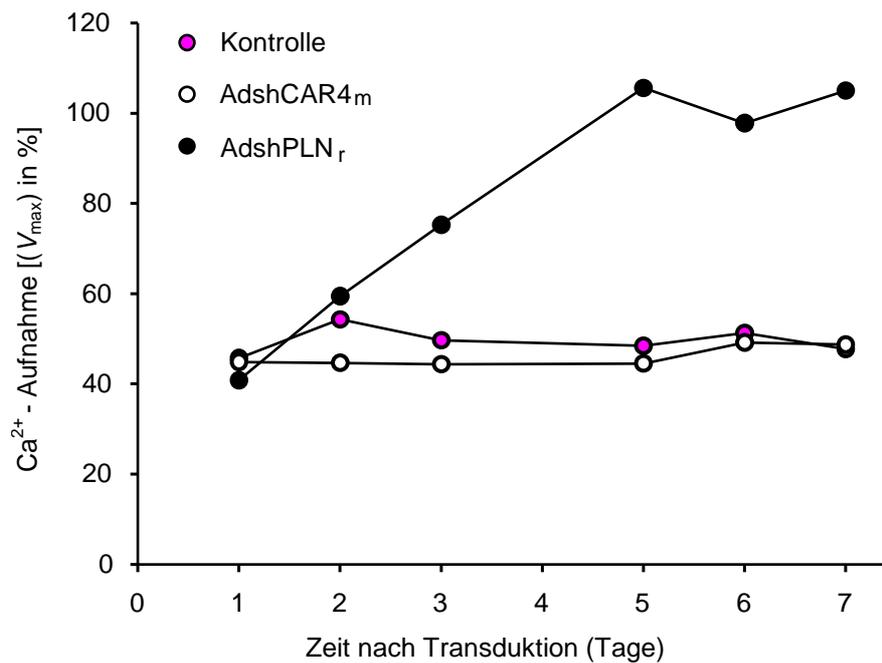
Um mögliche Nebeneffekte des **AdshPLN_r** - Vektors bzw. durch Herunterregulation des PLN auf andere wichtige Proteine der Calcium - Homöostase auszuschließen, wurden unter anderem SERCA2a, NCX1, Calsequestrin (CSQ2) und Troponin I (TnI) näher untersucht. Wie in **Abbildung 3.5a** und **b** zu sehen ist, sind keine signifikanten negativen Auswirkungen auf die Expressionsstärke der Proteine zu beobachten.

3.1.3 PLN - abhängiger Ca^{2+} - Transport

3.1.3.1 Ca^{2+} - Transport in das Sarkoplasmatische Retikulum von PNRK

Da sowohl auf mRNA - als auch auf Protein - Ebene PLN signifikant durch **AdshPLN_r** herunterreguliert werden konnte, ohne die SERCA2 - Expression zu beeinflussen, sollte in PNRK - Homogenaten überprüft werden, ob das Silencing Auswirkungen auf den Ca^{2+} - Transport in das Sarkoplasmatische Retikulum (SR) hat. Es ist bekannt, dass die SERCA unempfindlich gegenüber phosphoryliertem PLN ist, wohingegen unphosphoryliertes PLN bei submikromolaren Ca^{2+} zu einer Abnahme der Ca^{2+} - Affinität der SERCA2 führt (Odermatt et al., 1996). Zu diesem Zweck wurde die Oxalat stimulierte Ca^{2+} - Aufnahme sowohl bei einer submikromolaren freien Ca - Konzentration von 0,34 $\mu\text{M/l}$ nach 3 min gemessen, als auch bei einer gesättigten Konzentration von 3,68 $\mu\text{M/l}$. Der bei der gesättigten Konzentration erreichte Maximalwert (V_{max}) der Ca^{2+} - Aufnahme, diente zur Normalisierung der ermittelten Messwerte. Am Tag 1, nach Transduktion von PNRK mit **AdshPLN_r** bzw. mit **AdshCAR4_m**, zeigten sowohl diese beiden Gruppen, als auch die Kontrolle ohne virale Vektoren bei einem durchschnittlichen Wert von 45 % in Bezug auf V_{max} , keine Veränderung in der Ca^{2+} - Aufnahme. Dieses Niveau blieb bei der Kontrolle und den transduzierten PNRK mit **AdshCAR4_m** bis zum Tag 7 unverändert. Dagegen konnte bei den PNRK mit **AdshPLN_r** eine stetige Zunahme der Ca^{2+} - Affinität der SERCA beobachtet werden, wobei am Tag 5 das Maximum von 100 % in Bezug auf V_{max} erreicht wurde und dieses Plateau bis Tag 7 erhalten blieb (**Abb. 3.6a**). Diese Ergebnisse zeigen eine Zunahme der Ca^{2+} - Affinität der SERCA bei PLN defizienten PNRK. Dieser Zusammenhang wird nochmals in **Abbildung 3.6b** verdeutlicht. Hier wurden die relative Ca^{2+} - Aufnahme und die PLN - Proteinlevel in **AdshPLN_r** transduzierten PNRK gegenübergestellt. Dabei stellte sich eine lineare Beziehung zwischen PLN - Proteingehalt und Ca^{2+} - Affinität heraus.

a



b

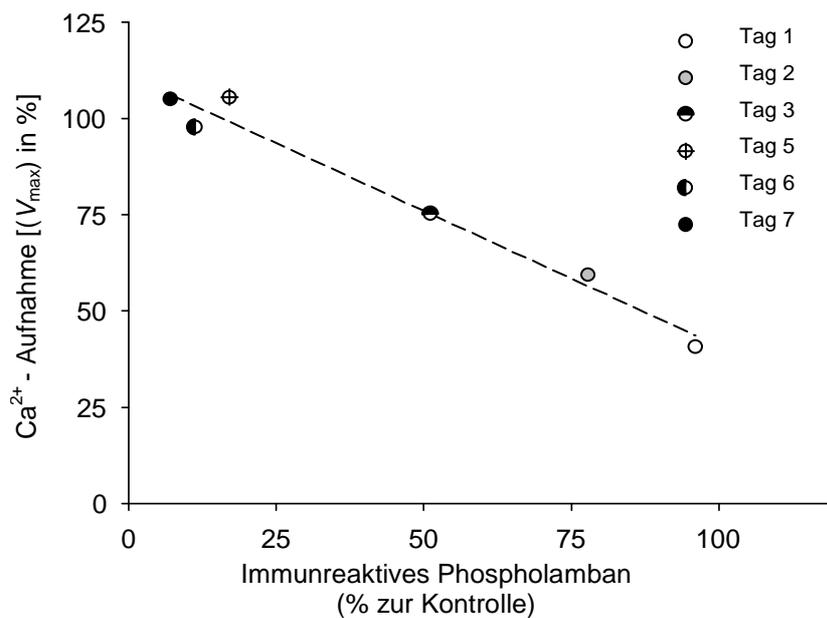


Abbildung 3.6: Ca²⁺ - Aufnahme in das SR aus Homogenaten von AdshPLN_r transduzierten PNRK. **a)** Relative Ca²⁺ - Aufnahme von 0,34 µM freien Calcium in PNRK Homogenaten. PNRK wurden mit AdshPLN_r oder einem Kontrollvektor mit einer MOI von 100 transduziert. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und anschließend wurde die Ca²⁺ - Aufnahme bei submikromolarer (0,34 µM) bzw. bei einer gesättigten (3,68 µM) Ca²⁺ - Konzentration gemessen. Die Werte nach 3 Minuten wurden normalisiert gegen die Werte bei maximaler Aufnahme bei einer gesättigten Ca²⁺ - Konzentration von 3,68 µM. Als Kontrolle dienten nichttransduzierte PNRK und AdshCAR_m. **b)** Verhältnis von relativer Ca²⁺ - Aufnahme zu immunreaktiven PLN-Protein Spiegeln in PNRK - Homogenaten an Tag 1 bis 7 Posttransduktion. Die Daten wurden aus den Ergebnissen der Ca²⁺ - Aufnahme (Abb. 3.5a) und der PLN - Protein Expression aus Abbildung 3.4b berechnet.

3.1.3.2 PKA stimulierter Ca^{2+} - Transport

In einem weiteren Experiment sollte der Einfluss der PKA abhängigen Phosphorylierung auf die PLN Modulation des SERCA katalysierten Ca^{2+} - Transports überprüft werden. Die Untersuchungen wurden mit zwei unterschiedlichen submikromolaren freien Ca^{2+} - Konzentrationen durchgeführt. Neben der Ermittlung der basalen Ca^{2+} - Transportaktivitäten ohne PKA - Zusatz, wurden ebenfalls Messungen in Gegenwart eines Überschusses an synthetischen PKA - Inhibitorpeptid (PKI) durchgeführt, um mögliche endogene PKA -Aktivitäten in den untersuchten Homogenaten komplett zu unterdrücken. Sowohl nicht transduzierte als auch transduzierte PNRK mit **AdshPLN_r** mit einer MOI von 100 zeigten einen Tag nach Vektorapplikation durch PKA Induktion eine Ca^{2+} - Aufnahme von 82 %. Bereits nach 4 bis 5 Tagen Posttransduktion war die Stimulierung durch PKA fast vollständig aufgehoben und blieb bis zum Ende des Experiments am Tag 7 unverändert. Dagegen ergab sich bei nicht transduzierten PNRK eine 1,5 fache Stimulation der Ca^{2+} - Aufnahme von Tag 4 bis 7 (**Abb. 3.7**).

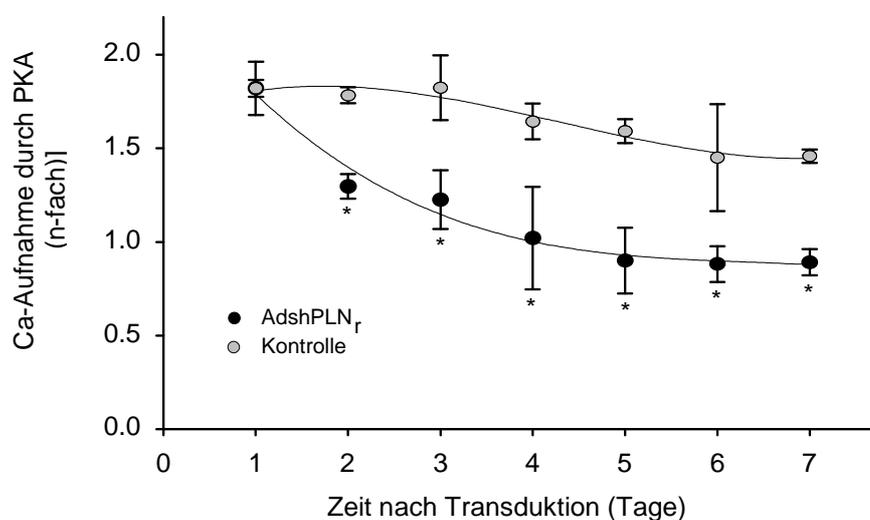


Abbildung 3.7: Stimulation der Ca^{2+} - Aufnahme von PNRK - Homogenaten durch die katalytische Untereinheit der PKA. Eine Normalisierung der Daten erfolgte durch die gemessenen Werte in Anwesenheit von $2 \mu\text{M}$ synthetischen PKA Peptid Inhibitor. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel mit Standardabweichung für jeweils 4 separate Transduktionen. Die Kontrollen sind nicht - transduzierte PNRK.

3.2 Konstruktion von PLN-shRNA exprimierenden scAAV-shPLN - Vektoren

Die bisher gezeigten Ergebnisse demonstrieren eine sehr hohe Effizienz eines shRNA exprimierenden adenoviralen Vektors gegen PLN in PNRK. Bei diesen Experimenten handelte es sich bisher um *in vitro* Untersuchungen. Um Vergleiche anstellen und *in vivo* Experimente am Herzen durchführen zu können, wurden drei verschiedene AAV - Vektoren konstruiert, die sich in ihrer Größe und ihrer Expressionskassette unterschieden (**Abb. 3.8**). Diese selbstkomplementären (sc) AAV - Vektoren basieren auf dem AAV - Pseudotyp 2/6 und exprimieren alle eine „*small hairpin*“ (sh) RNA gegen Ratten - PLN, welche durch einen Polymerase III Maus - Promotor generiert wird. Die Vektoren unterscheiden sich dabei in ihrer Genomgröße von 975 bp bis zu 2,4 kb.

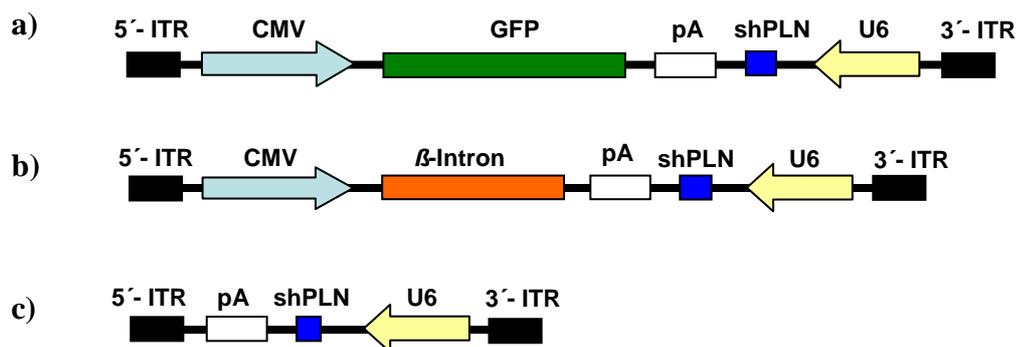


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der AAV - Vektor Genomstruktur. **a)** scAAV-CMV-GFP-shPLN_r (2,4 kb). **b)** scAAV-CMV-β-Intron-shPLN_r (2,14 kb). **c)** scAAV-shPLN_r (975 bp). ITR - *Inverted Terminal Repeat*, CMV - Cytomegalie Virus IE-Promotor, GFP - *Green Fluorescent Protein*, pA - *Bovine Growth Hormone* poly A, shPLN - *short hairpin* RNA gegen PLN, U6 - Polymerase III - U6 Promotor

3.2.1 Charakterisierung der scAAV - Vektoren in PNRK

Für die Untersuchung der Funktionalität der scAAV - Vektoren wurden diese in PNRK transduziert. Dabei wurde der Einfluss verschiedener Viruskonzentrationen, als auch die zeitliche Abhängigkeit der Downregulation auf PLN untersucht. Als Positivkontrolle diente der AdshPLN_r - Vektor. Als Negativkontrolle wurde ein scAAV - Vektor verwendet, der eine shRNA gegen GFP exprimiert und keinen Einfluss auf die Expression von PLN oder den Ca²⁺ - Metabolismus haben sollte. PNRK wurden mit Vektorkonzentrationen von 100 bis 20.000 Partikel pro Zelle (P/Z) transduziert. Nach 5 und 10 Tagen wurde die gesamt - RNA aus den Zellen isoliert und die Expression des

PLN mittels Northern Blot mit einer spezifischen PLN - Sonde bestimmt. Die Normalisierung der quantifizierten PLN - mRNA erfolgte durch Bestimmung der Expression des Housekeeping - Gens β -Aktin (Abb. 3.9a). 5 Tage nach Transduktion zeigte sich bei **scAAV-shPLN_r** und **AdshPLN_r** eine fast vollständige Herunterregulation der PLN - mRNA Expression bei allen verwendeten Konzentrationen. Etwas schwächer war der Effekt bei **scAAV-CMV- β -Intron-shPLN_r**. Diese Wirkung hielt bis zum Tag 10 weiter an. Dagegen konnte bei **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r** nur ein sehr geringer (nach 10 Tagen) bis kein (nach 5 Tagen) Silencingeffekt festgestellt werden. Von den 3 verwendeten Vektorkonzentrationen (4.000, 10.000 und 20.000 P/Z) war die höchste am effizientesten. Die geringste Konzentration ermöglichte immer noch eine fast vollständige Herunterregulation der PLN - mRNA bei **scAAV-shPLN_r** und **scAAV-CMV- β -Intron-shPLN_r** (Abb. 3.9a und b).

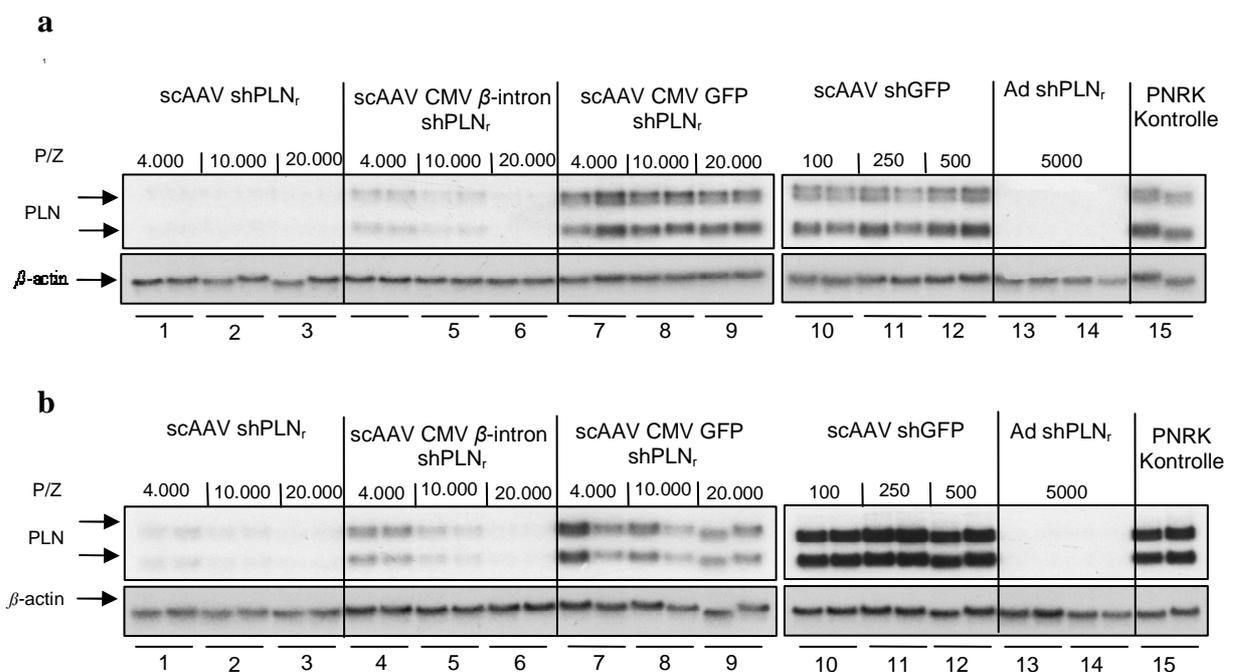


Abbildung 3.9: Silencing der PLN - mRNA Expression durch verschiedene **scAAV-shPLN_r** und **AdshPLN_r** Konstrukte. PNRK wurden mit den Vektoren in unterschiedlichen Konzentrationen, wie angegeben, transduziert. Die Zellen wurden nach 5 Tagen (**a**) und nach 10 Tagen (**b**) geerntet und die RNA mittels Northern Blot und mit einer Ratten spezifischen PLN-Sonde untersucht. Zur Kontrolle der gleichen RNA - Ladung wurden die Blots mit einer ³²P-markierten β -Aktin-Sonde rehybridisiert. Spalten 1-9 zeigen eine dosisabhängige Runterregulation der PLN - mRNA durch **scAAV-shPLN_r**, **scAAV-CMV- β -Intron-shPLN_r**, **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r** sowie durch **AdshPLN_r** (Spalten 13-14). Sowohl Zellen mit **scAAV-shGFP** (Spalten 10-12) als auch unbehandelte Zellen (Spalte 15) zeigten keine Veränderungen in der PLN - mRNA Expression. (P/Z =Partikel/Zelle)

3.2.1.1 Nachweis der PLN-shRNA

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen dem Silencing der PLN - mRNA und der exprimierten PLN-shRNA der verschiedenen Adenovirus- und scAAV - Konstrukte herstellen zu können, wurden diese in PNRK transduziert. Dabei wurde auch die Langzeitexpression der zwei unterschiedlichen Vektorklassen im zeitlichen Verlauf betrachtet. PNRK wurden mit Vektorkonzentrationen von 4.000 bis 20.000 Partikeln pro Zelle (P/Z) transduziert. Nach 5 und 10 Tagen wurde die gesamt-RNA aus den Zellen isoliert und die PLN-shRNA mittels real-time RT-PCR quantifiziert (**Abb. 3.10**). Die höchste PLN-shRNA-Expression wurde mit **AdshPLN_r** nach 5 Tagen erreicht und mit 100 % als Standard festgelegt. Die Levels der PLN-shRNA Expression waren bis zum Tag 10 bei allen drei verwendeten scAAV - Konstrukten signifikant erhöht und blieben über den gesamten Zeitraum konstant. Dagegen kam es bei **AdshPLN_r** nach 10 Tagen zu einer deutlichen Abnahme der PLN-shRNA Konzentration von über 60 %. Beim Vergleich der AAV -Vektor vermittelten PLN shRNA Expression wies **scAAV-shPLN_r** mit 29 % gegenüber **AdshPLN_r** die höchste Konzentration auf. Bei **scAAV-CMV- β -Intron-shPLN_r** war sie bereits um die Hälfte auf ca. 14 % verringert und bei **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r** war lediglich noch eine Expression von unter 2 % zu detektieren. Diese Ergebnisse zeigen eine mögliche Ursache für die in **Abbildung 3.9**. dargestellten Daten.

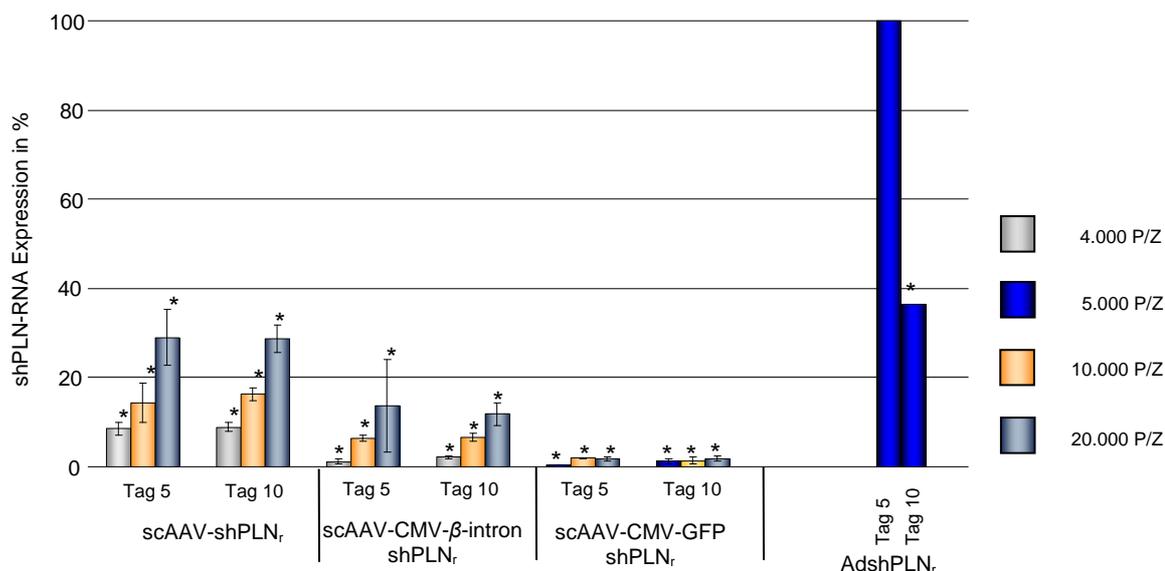


Abbildung 3.10: PLN_r-shRNA Expression. PNRK wurden verschiedenen Vektoren wie beschrieben transduziert. Die RNA wurde nach 5 und 10 Tagen nach Transduktion isoliert und die PLN_r-shRNA mittels real-time RT-PCR quantifiziert. Die höchste Expression am Tag 5 mit **Ad-shPLN_r** diente als Vergleichsstandard (100 %). Die shRNA - Levels aller drei scAAV - Vektorkonstrukte blieben über einen Zeitraum von 10 Tagen relativ konstant im Vergleich zu **AdshPLN_r**. Hier hatte die PLN-shRNA Expression am Tag 10 über 60 % abgenommen. Die höchste Expression bei allen drei Viruskonzentrationen wurde mit dem **scAAV-shPLN_r** - Vektorkonstrukt erreicht. *P < 0,05 im Vergleich zu **Ad-shPLN_r** am Tag 5.

3.2.1.2 Einfluss des CMV - Promotors auf die PLN-shRNA Expression

Die bisherige Charakterisierung der shPLN exprimierenden scAAV - Vektorkonstrukte zeigte jeweils eine differenzierte Effizienz in der Downregulation der PLN - mRNA (**Abb. 3.9**) als auch eine variable PLN-shRNA Expression (**Abb. 3.10**). Die Vektorkonstrukte **AAV-CMV- β -Intron-shPLN_r** und **AAV-CMV-GFP-shPLN_r** unterscheiden sich von **AAV-shPLN_r** unter anderem durch das Vorhandensein eines CMV - Promotors. Um einen möglichen Einfluss des Promotors auf die PLN-shRNA Expression und somit auf die Silencingeffizienz näher zu untersuchen, wurde der CMV - Promotor aus beiden Konstrukten entfernt (**Abb. 3.11**).

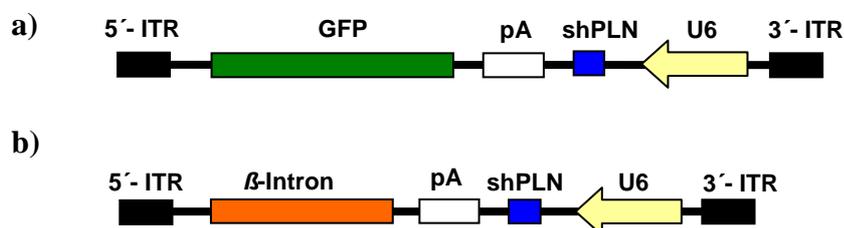


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung der CMV - Promotor deletierten AAV - Vektoren. **a)** **scAAV-GFP-shPLN_r** (1,8 kb). **b)** **scAAV- β -Intron-shPLN_r** (1,6 kb). ITR - Inverted Terminal Repeat, GFP - Green Fluorescent Protein, pA - Bovine Growth Hormone poly A, shPLN - short hairpin RNA gegen PLN, U6 - Polymerase III - U6 Promotor

Anschließend wurden 293T - Zellen mit allen fünf verschiedenen Plasmidvektoren transfiziert. Nach 72 h wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Danach erfolgte die Quantifizierung der PLN-shRNA mittels Real-Time RT-PCR. Das PLN-shRNA Expressionslevel von **pAAV-shPLN_r** transfizierten Zellen wurde als Standard mit 100 % festgelegt. Das Herausschneiden des CMV - Promotors bei **pAAV-GFP-shPLN_r** und **pAAV- β -Intron-shPLN_r** führte zu einer Angleichung des Expressionslevels gegenüber dem Standard. Die Konstrukte mit CMV - Promotor zeigten sowohl gegenüber dem Standard als auch gegenüber dem analogen Vektorkonstrukt ohne CMV - Promotor eine signifikant niedrigere PLN-shRNA Expression (**Abb. 3.12**).

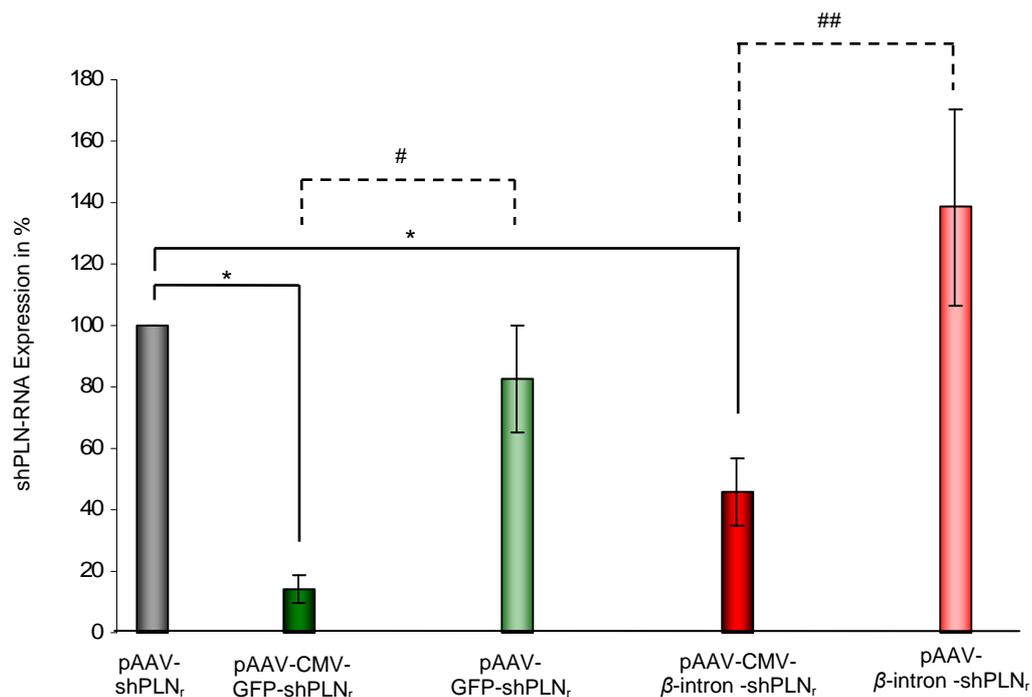


Abbildung 3.12: Einfluss des CMV - Promotors auf die Expression von PLN-shRNA mittels U6 - Promotor in 293T - Zellen. 293T - Zellen wurden mit fünf verschiedenen shPLN - Expressionsplasmidkonstrukten transfiziert. Nach 72 h wurde die RNA isoliert und die PLN-shRNA - Expression durch Real-Time RT-PCR ermittelt. Das Expressionslevel von PLN-shRNA bei **pAAV-shPLN_r** wurde als Standard festgelegt (100 %). Das Entfernen des CMV - Promotors bei **pAAV-GFP-shPLN_r** und **pAAV-β-Intron-shPLN_r** führte zu einer nahezu vollständigen Angleichung des Expressionslevels gegenüber dem Standard. *P < 0.05 im Vergleich zu pAAV-shPLN_r; # P < 0.05 im Vergleich zu **pAAV-GFP-shPLN_r**; ## P < 0.05 im Vergleich zu **pAAV-β-Intron-shPLN_r**

3.2.1.3 Analyse der Genomstruktur der scAAV-shRNA-PLN_r Vektoren

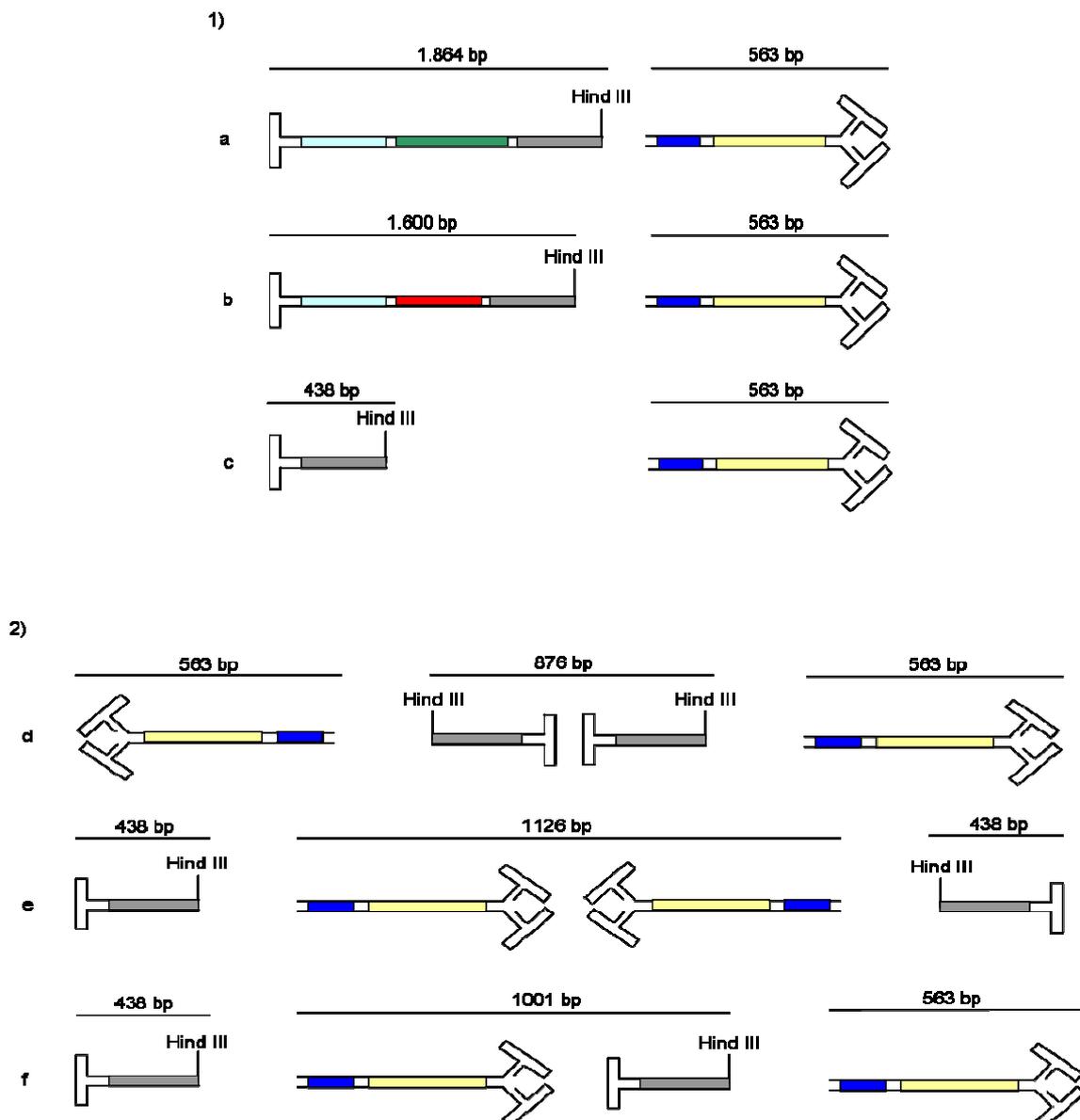
Eine wesentliche Limitierung des Gentransfers durch monomeriche rAAV - Vektoren besteht in der DNA - Synthese des Komplementärstranges, ohne die die Transkription der shRNA nicht möglich wäre. Diese Doppelstrang - Synthese ist ein sehr langsamer Prozess, welcher komplett von der zellulären Maschinerie abhängig ist und vor allem in ruhenden Zellen sehr ineffizient abläuft. Diese Limitierung erschwert die Untersuchungen mit monomeriche rAAV - Vektoren *in vitro* und *in vivo*. Einen Ausweg stellen die *self-complementary* (sc)AAV-Vektoren dar, die bereits über einen DNA - Doppelstrang verfügen und somit wirtszellunabhängig, umgehend mit der Expression vom Transgen beginnen können (McCarty et al., 2001; Ferrari et al., 1996).

Um zu überprüfen, ob die von uns verwendeten AAV - Vektoren (**scAAV-shPLN_r**, **scAAV-β-Intron-shPLN_r**, **scAAV-GFP-shPLN_r**) ein dimerisches Vektoren-genom beinhalteten, wurde die Vektor - DNA isoliert und mit *Hind* III geschnitten (**Tab. 3.1**). Mit der verdauten Virus - DNA wurde ein Southern Blot durchgeführt und mit einer

spezifischen bgH-U6-Promotor - Sonde hybridisiert (**Abb. 3.13**). Weiterhin bestand aufgrund der Vektor-genomgröße die theoretische Möglichkeit anhand des Restriktionsmusters von **scAAV-shPLN_r** auf eine Konkaterisierung zu schließen. Die zu erwartenden möglichen Restriktionsmuster sind in **Tabelle 3.1** zusammengefasst.

Tabelle 3.1: Zu erwartende Fragmente bei *Hind* III - Verdau

Vektorkonstrukt	Fragmente bei 1 Genom-Kopie ¹	Fragmente bei 2 Genom-Kopien ²
scAAV-shPLN _r	438 bp + 563 bp ^c	563 bp + 438 bp + 1001 bp ^f 563 bp + 876 bp ^d 438 bp + 1126 bp ^f
scAAV- β -Intron-shPLN _r	1600 bp + 563 bp ^b	
scAAV-GFP-shPLN _r	1864 bp + 563 bp ^a	



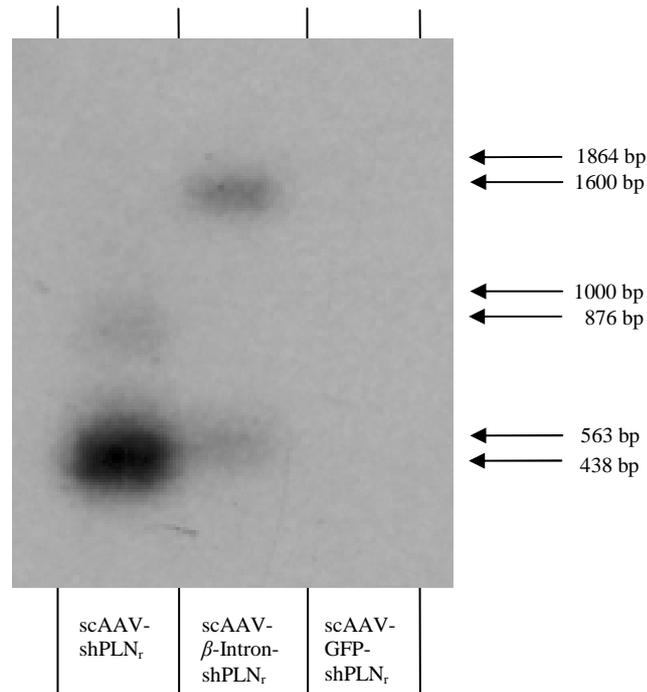


Abbildung 3.13: Southern Blot von *Hind* III verdauter AAV - Vektor DNA. Die Virus-DNA von **scAAV-shPLN_r**, **scAAV-β-Intron-shPLN_r** und **scAAV-GFP-shPLN_r** wurde isoliert und mit *Hind* III geschnitten und anschließend in einem Southern-Blot analysiert. Die DNA wurde mit einer ³²P-markierte bgH-U6-Promotor Sonde hybridisiert. Für **scAAV-shPLN_r** und **scAAV-β-Intron-shPLN_r** sind eindeutige Restriktionsmuster zu erkennen.

In **Abbildung 3.13** ist von der viralen DNA bei **scAAV-shPLN_r** und **scAAV-β-Intron-shPLN_r** ein deutliches Restriktionsmuster zu erkennen. Da ein enzymatischer Verdau nur bei doppelsträngiger DNA erfolgt (Szybalski et al., 1991), handelt es sich bei diesen beiden viralen Konstrukten um dimerische AAV - Vektoren. Bei **scAAV-GFP-shPLN_r** ist nur eine sehr schwache Bande bei 1.864 bp im Southern Blot zu erkennen, weshalb es sich hier ebenfalls um ein Dimer handeln könnte, jedoch ist aufgrund der zu geringen Intensität keine eindeutige Aussage möglich.

Das Restriktionsmuster von **scAAV-shPLN_r** zeigt neben den beiden kleineren Fragmenten (438 bp und 563 bp) eine deutlich größere Bande bei ca. 1.000 bp. Dieses Muster (**Tab. 3.1**) mit einem größeren Restriktionsfragment kann nur entstehen, wenn die virale DNA mindestens mehr als eine Genomkopie pro Viruspartikel enthält. Aufgrund der minimalen Größe der zu verpackenden Virus-DNA (**Abb. 3.8**) und des vorhandenen Restriktionsmusters, ist eine Konkatemisierung bei **scAAV-shPLN_r** sehr wahrscheinlich.

3.3 PLN-shRNA exprimierende scAAV - Vektoren im herzinsuffizienten Rattenmodell

Für die initialen Untersuchungen von PLN-shRNA exprimierenden scAAV - Vektoren in PNRK wurde bisher der Pseudotyp scAAV2.6 verwendet, da er *in vitro* eine hohe Transduktionsrate erzielt. Allerdings ist die Transduktionseffizienz *in vivo* gegenüber dem Pseudotyp scAAV2.9 deutlich geringer, zumal AAV9 neben allen anderen bisher bekannten AAVs den ausgeprägtesten Tropismus für Herzmuskelzellen aufweist (Inagaki et al., 2006; Gregorevic et al., 2004), weshalb für Versuche am Rattentiermodell scAAV2.9 Vektoren generiert wurden.

Von den drei bisher eingesetzten scAAV - Konstrukten ermöglichte **scAAV-shPLN_r** die stärkste PLN Herunterregulation. Deshalb wurde die scAAV-shPLN_r Vektor DNA nachfolgend mit Hilfe eines AAV9-Cap Gen enthaltenden Verpackungsplasmid in AAV9 Kapside verpackt. Als Kontrollvektor wurde ein shGFP exprimierender scAAV9 Vektor verwendet.

3.3.1 Versuchsaufbau für PLN-shRNA vermittelte Modulation der Ca²⁺ - Homöostase im Ratten - Herzinsuffizienzmodell

Als Tiermodell dienten herzinsuffiziente Ratten, induziert durch Aortic-Banding (AB). In der nachfolgenden **Abbildung 3.14** ist der Ablauf des Experiments schematisch dargestellt. Für die RNA-Interferenz-Therapie Studie wurden insgesamt 68 Ratten eingesetzt. Von diesen 68 Tieren wurden 12 Tiere als Negativkontrolle scheinoperiert (sham) ohne AB, wobei zwei Ratten verstarben. An den verbliebenen 56 Tieren wurde ein AB durchgeführt von denen nach 25 bis 30 Wochen 40 Ratten eine linksventrikuläre Dilatation (LV) ausbildeten und eine Verkürzungsfraction (VF) von unter 25 % aufwiesen. Diese 40 Tiere wurden in vier Gruppen zu je 10 Ratten aufgeteilt und mit den AdV **Ad-shPLN_r** und **Ad-shGFP** sowie mit den AAV-Vektoren **scAAV2.9-shPLN_r** und **scAAV2.9-shGFP** transduziert. Einen Monat nach Transduktion wurden die Tiere in der Gruppe mit AdV und drei Monate nach Transduktion die Gruppe mit AAV - Vektoren einer Hämodynamikmessung, Echokardiographie und einer vollständigen morphologischen Analyse unterzogen. In der adenoviralen Vektorgruppe waren 8/10 (**Ad-shGFP**) und 9/10 (**Ad-shPLN_r**) Tiere nach einem Monat noch am Leben. In der AAV-shPLN_r - Gruppe lebten noch 9 von 10 Tieren nach drei Monaten, wohingegen nur 6 von 10 Tieren in der **AAV-shGFP** - Kontrollgruppe überlebt hatten.

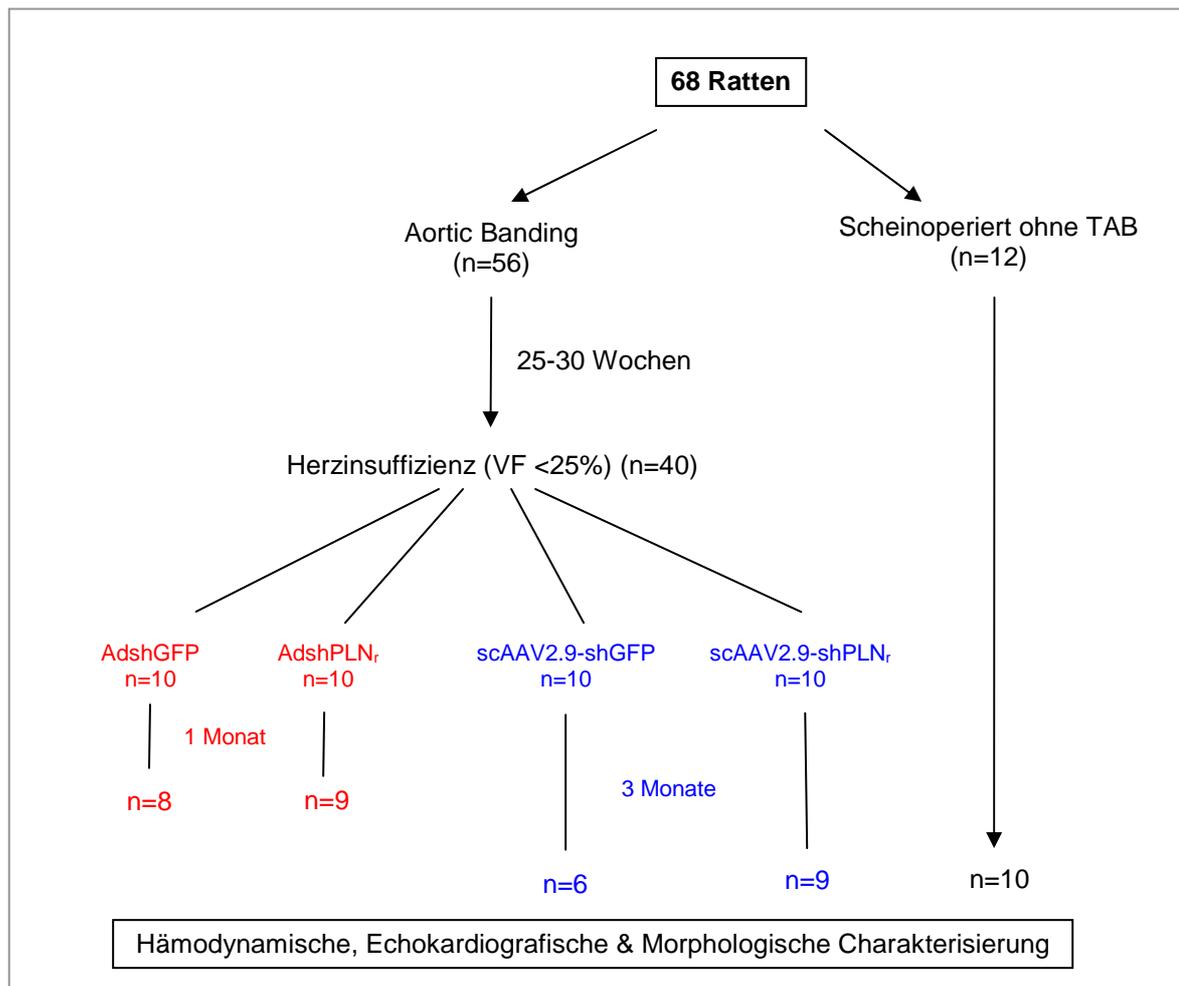


Abbildung 3.14: Schematische Darstellung des Ablaufs des Experiments. Von 68 Tieren wurden 12 Tiere scheinoperiert (Sham) und 56 Tiere einem Aortic-Banding (AB) unterzogen. 40 Tiere mit ausgeprägter Herzinsuffizienz wurden zu je 10 Tieren in vier Gruppen für den viralen Gentransfer aufgeteilt. n - Anzahl der überlebten Tiere.

3.3.2 Häodynamische Charakterisierung

Vier bzw. Zwölf Wochen nach erfolgtem viralem Gentransfer wurden bei den Versuchstieren häodynamische Messungen durchgeführt und über das EKG die Herzfrequenz abgeleitet. Zu den gemessenen häodynamischen Parametern zählten der linksventrikuläre systolische Druck (**LVSP**), der linksventrikuläre enddiastolische Druck (**LVEDP**), die beide ein Maß für den Insuffizienzgrad des Herzen darstellen, die Zu- bzw. Abnahme der maximalen Relaxationsgeschwindigkeit des linken Ventrikels (**+/-dP/dt**) sowie die isovolumische Zeitkonstante tau. Die Herzfrequenz und die Druckparameter wurden in der **Abbildung 3.15** zusammengefasst. Die Herzfrequenz der transduzierten Tiere war gegenüber den Sham - Kontrollen minimal erhöht (**Abb. 3.15a**). Dagegen zeigten sich bei den shGFP - Kontrollgruppen im Vergleich zu den Sham - Tieren

deutliche Verschlechterungen der LVSP - sowie der LVEDP - Werte. In den Ad-shGFP - und AAV-shGFP - Kontrollgruppen wies der LVEDP eine signifikante Steigerung von über 230 % (Ad-shGFP) und 300 % (AAV-shGFP) gegenüber der scheinoperierten Gruppe auf. In den shPLN_r - Gruppen fielen diese Werte auf das Niveau scheinoperierter Kontrolltiere zurück (**Abb. 3.15c**).

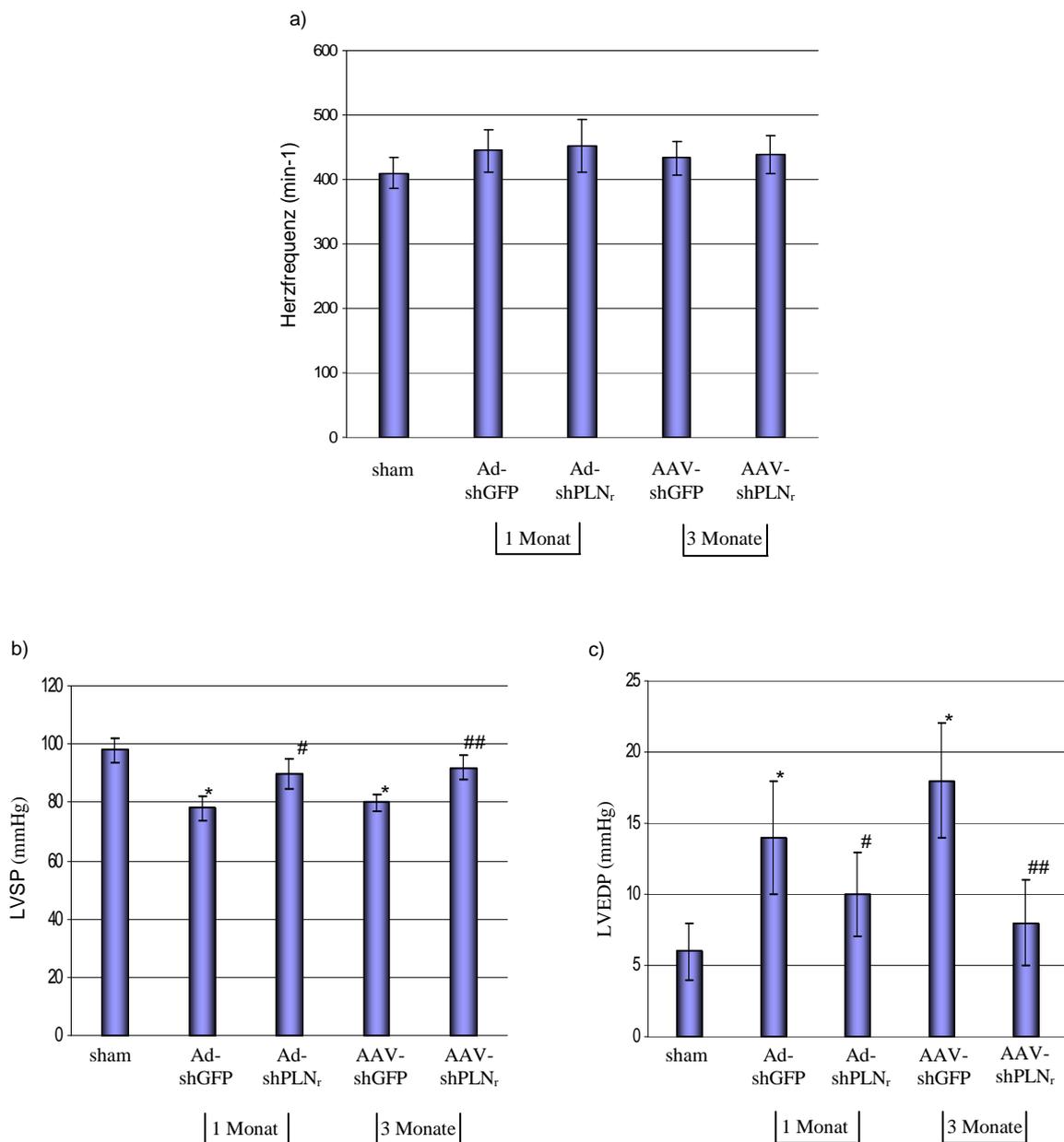
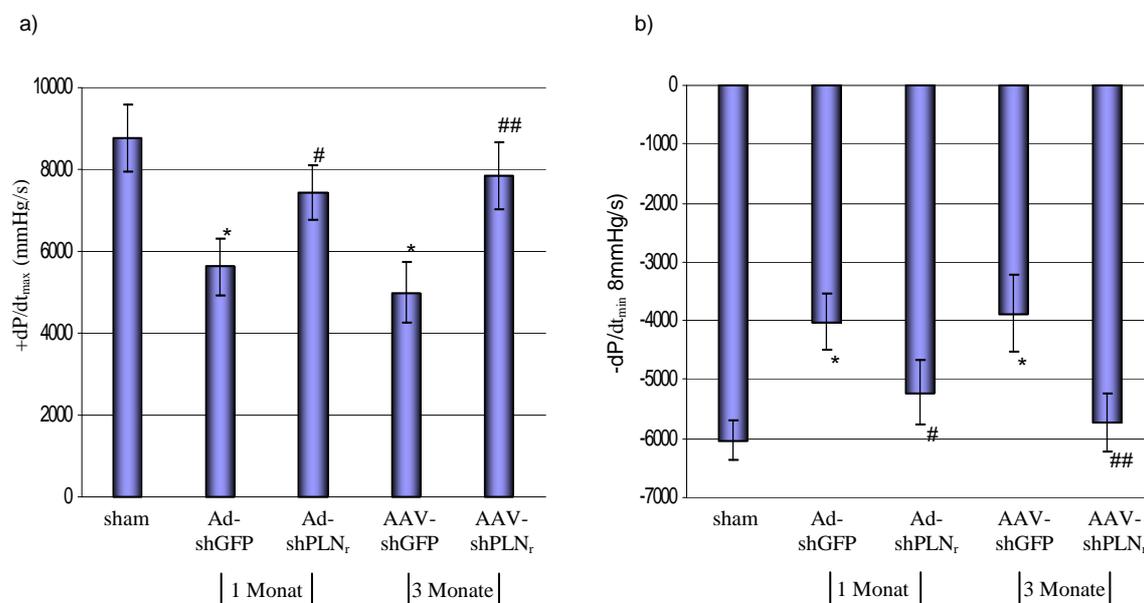


Abbildung 3.15: Hämodynamische Charakteristik der Versuchstiere 1 und 3 Monate nach viralem Gentransfer. Teil I. **a)** Herzfrequenz [min⁻¹] **b)** LVSP - linksventrikuläre systolische Druck [mmHg] **c)** LVEDP - linksventrikuläre enddiastolische Druck [mmHg], **sham** - scheinoperierte Negativkontrolle, *P < 0,05 im Vergleich zu Sham, #P < 0,05 im Vergleich zu Ad-shGFP, ##P < 0,05 im Vergleich zu AAV-shGFP

Die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit ($+dP/dt_{max}$), ein Parameter für die Kontraktilität des Herzens, sank deutlich über 35 % bei **Ad-shGFP** und über 43 % bei **AAV-shGFP** im Vergleich zu Kontrolltieren (**Abb. 3.16a**). Nach viralem Gentransfer mit **Ad-shPLN_r** und **AAV-shPLN_r** konnten ein signifikanter Anstieg gegenüber der GFP - Gruppe erzielt werden und eine Annäherung zum Wert der Sham - Tiere. Der positive Einfluss von **Ad-shPLN_r** und **AAV-shPLN_r** spiegelt sich auch bei der Betrachtung der maximalen Druckabfallgeschwindigkeiten ($-dP/dt_{min}$) wieder. In beiden GFP - Kontrollgruppen kam es zu einem Rückgang der Relaxationszeit des Herzens durch 30 % igen Anstieg von $-dP/dt_{min}$ gegenüber der Sham - Gruppe. Hingegen war ein signifikanter Abfall der shPLN_r - Gruppe im Vergleich zu **Ad-shGFP** und **AAV-shGFP** zu erkennen (**Abb. 3.16b**). Neben der Bestimmung der maximalen Druckabfallgeschwindigkeiten wurde die Zeitkonstante der isovolumischen Relaxation „tau“ (τ) als ein weiterer hämodynamischer Parameter zur Einschätzung der Relaxationsfähigkeit des Myokards ermittelt (Schmidt and Pieske, 2005; Kato et al., 2003).

In der **Abbildung 3.16c** wird die sehr starke Zunahme von über 60 % von τ bei den GFP -Gruppen deutlich. Diese Veränderung konnte bei den shPLN_r - Gruppen fast vollständig wieder rückgängig gemacht werden.



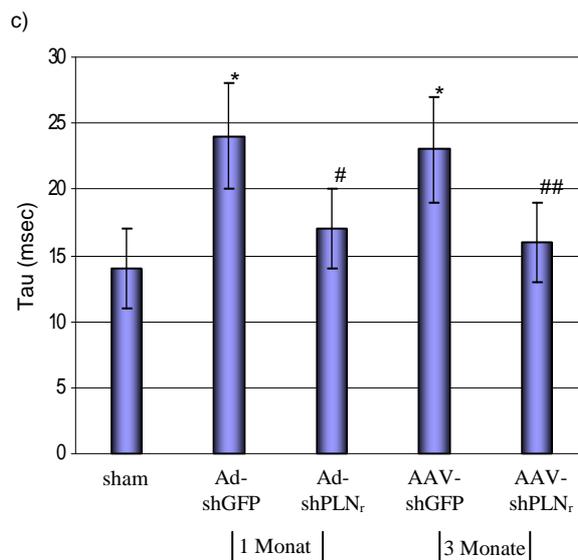


Abbildung 3.16: Hämodynamische Charakterisierung der Versuchstiere 1 und 3 Monate nach Gentransfer. Teil II **a)** ($+dP/dt_{max}$) - maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit [mmHg/s] **b)** ($-dP/dt_{min}$) - maximale Druckabfallgeschwindigkeit [mmHg/s] **c)** „tau“ - Zeitkonstante der isovolumischen Relaxation [msec], **sham** - scheinoperierte Negativkontrolle, * $P < 0,05$ im Vergleich zu Sham, # $P < 0,05$ im Vergleich zu **Ad-shGFP**, ## $P < 0,05$ im Vergleich **AAV-shGFP**

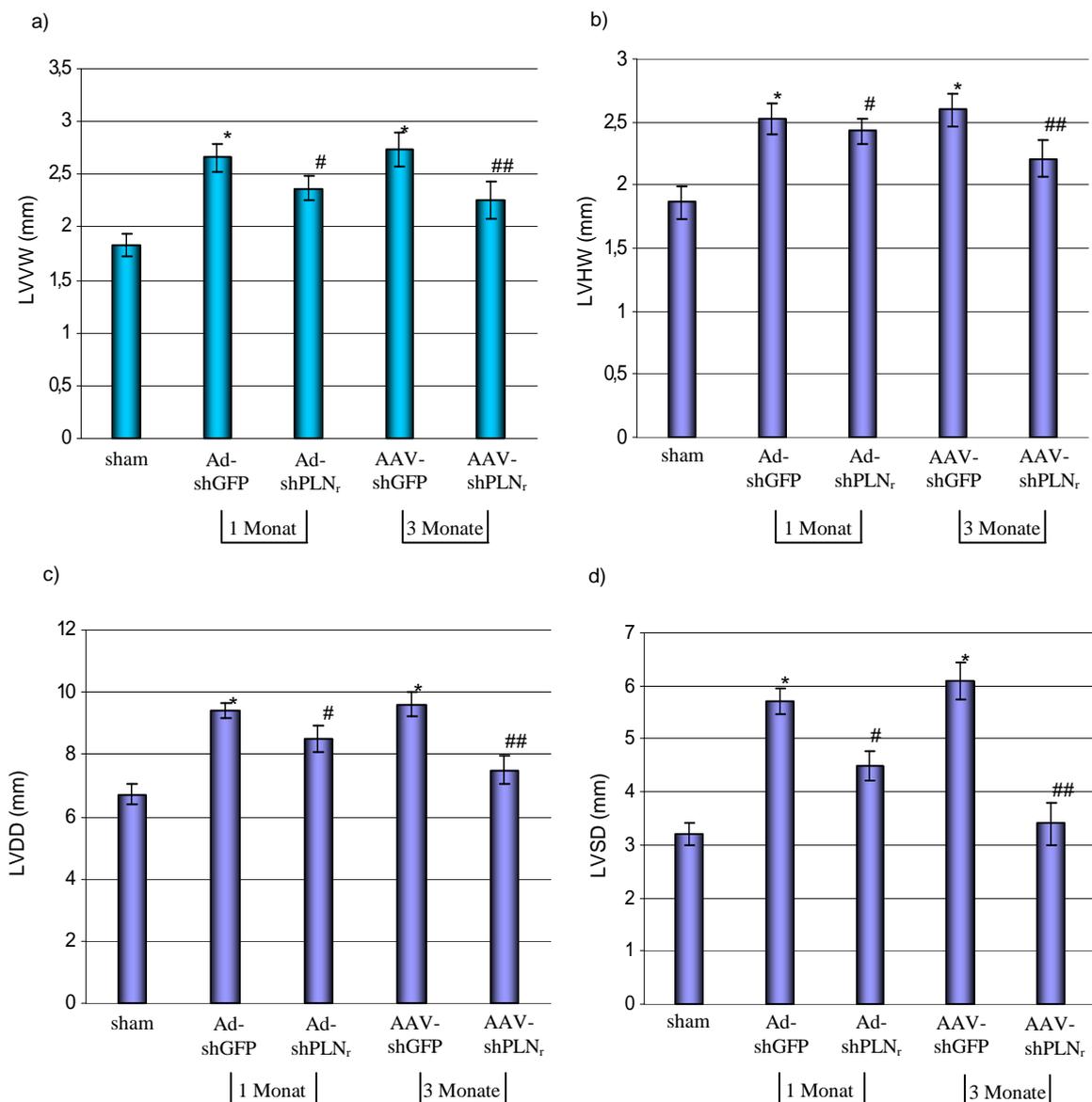
3.3.3 Echokardiografische Charakterisierung

Neben der hämodynamischen Charakterisierung der Versuchstiere erfolgte auch eine echokardiografische Untersuchung ein bzw. drei Monate nach Gentransfer zur weiteren kardiologischen Diagnostik, um Aufschlüsse über die Struktur des Herzmuskels und der Bewegungsabläufe von Herzklappen und -wänden zu erhalten. Dabei wurden unter anderem die Herzwanddicken (**LVVW** - linksventrikuläre Vorderwanddicke, **LVHW** - linksventrikuläre Hinterwand), die Herzbinnenräume (**LVDD** - linksventrikuläre Diastolische Durchmesser und **LVSD** - linksventrikuläre Systolische Durchmesser) sowie die Verkürzung des Herzens während des Pumpvorgangs (**FV** - Fraktionelle Verkürzung) ermittelt.

In der **Abbildung 3.17 a** und **b** war eine deutliche Zunahme der linksventrikulären Wandstärken (**LVVW** bzw. **LVHW**) bei den herzinsuffizienten Ratten im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren zu beobachten. Dagegen nahm die Wanddicke bei **Ad-shPLNr** und bei **AAV-shPLNr** signifikant ab. Ähnlich verhielt es sich bei den Durchmessern des endsystolischen und enddiastolischen Binnenraums des linken Ventrikels (**LVSD** bzw. **LVDD**) (**Abb. 3.17 c** und **d**). Auch hier nahmen die Volumina des LV bei den shGFP-exprimierenden Tieren deutlich zu, während sie bei shPLN-exprimierenden Tieren signifikant verringert waren. Mit dem Kontrollvektor **AAV-shGFP** behandelten Tiere wuchs der **LVSD** im Vergleich zu untransduzierten

Kontrolltieren sogar fast um das Doppelte an und konnte durch **AAV-shPLN_r** nahezu auf den Ausgangswert normalisiert werden.

Schließlich wurde die prozentuale systolische Durchmesserverkürzung aus dem größten und kleinsten Durchmesser der linken Herzkammer ermittelt (**FV**) (**Abb. 3.17e**), die sich aus der Formel berechnet: $(LVDD-LVSD)/LVDD \times 100 \%$. Sie stellt ein Maß für die Kontraktionsleistung des Herzens dar. Die Werte bestätigen die Tendenz der vorherigen Daten. In den beiden shGFP - Gruppen kommt es zu einer signifikanten Verschlechterung der fraktionellen Verkürzung von 52 % auf 39 % bzw. 35 % gegenüber der nicht-transduzierten Kontrollgruppe, wohingegen der virale Gentransfer von **Ad-shPLN_r** und **AAV-shPLN_r** eine Annäherung (46 % und 50 %) an den Normalwert der scheinoperierten Tiere bewirkte (**Abb. 3.17e**).



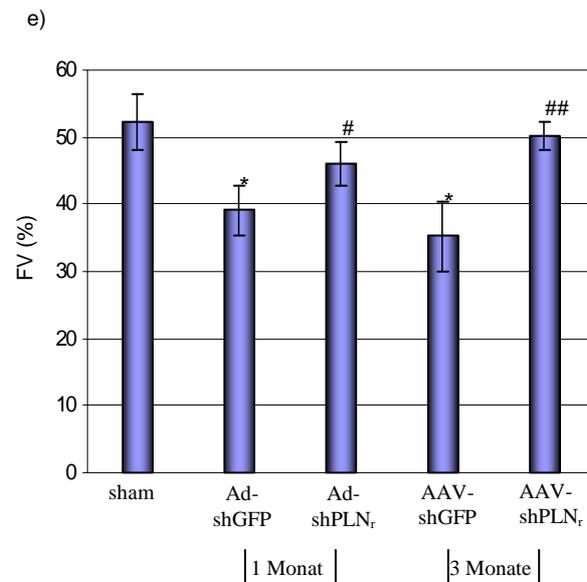


Abbildung 3.17: Echokardiografische Charakterisierung der Versuchstiere 1 und 3 Monate nach Gentransfer. **a)** L_VVW - linksventrikuläre Vorderwanddicke [mm] **b)** L_VHW - linksventrikuläre Hinterwanddicke [mm] **c)** L_VDD - linksventrikuläre Diastolische Durchmesser [mm], **d)** L_VSD - linksventrikuläre Systolische Durchmesser [mm], **e)** FV - fraktionelle Verkürzung [%], *P < 0,05 im Vergleich zu Sham, #P < 0,05 im Vergleich zu Ad-shGFP, ##P < 0,05 im Vergleich zu AAV-shGFP

3.3.4 Morphologische Charakterisierung

Ein weiteres Kriterium zur Beurteilung des Hypertrophiegrades des kardiologischen Phänotyps ist die morphologische Analyse des Herzgewichtes. Dabei wird bei der Ratte das Herzgewicht in Bezug zum Körpergewicht oder zur Länge des Schienbeins (Tibia) gesetzt (**Abb. 3.18**). Bei der Betrachtung der Masse der linken Ventrikel (LV) zeigt sich auch hier der positive Einfluss von shPLN_r auf die Reduktion der Hypertrophie. In allen drei Diagrammen ist bei Ad-shPLN_r sowie bei AAV-shPLN_r ein signifikanter Rückgang der Parameter zu verzeichnen. Die Kontrolltiere mit AB und Ad-shGFP bzw. AAV-shGFP zeigten eine deutlich zunehmende Verschlechterung gegenüber shPLN_r transduzierten Tieren.

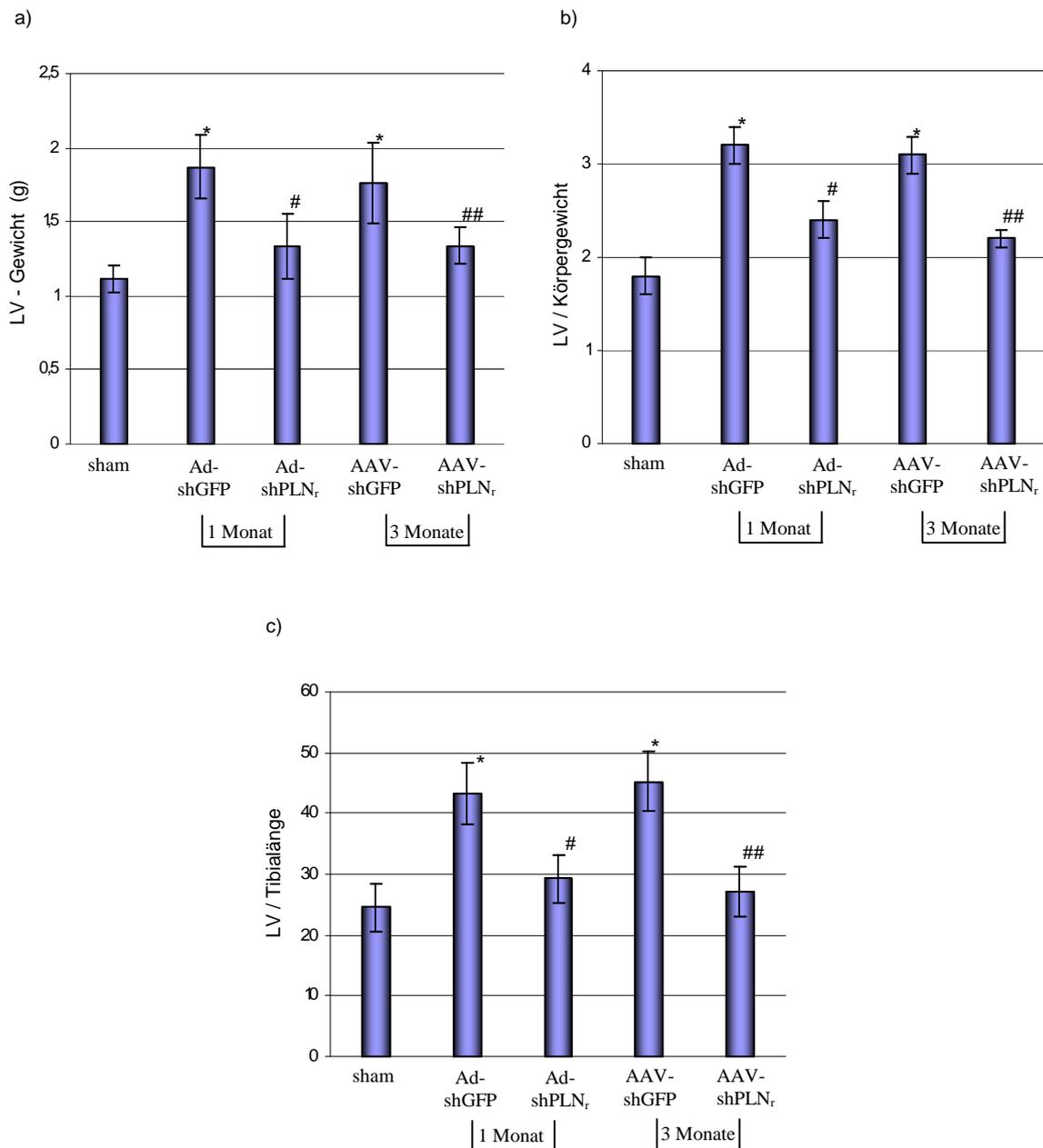


Abbildung 3.18: Morphologische Charakterisierung der Versuchstiere 1 und 3 Monate nach Gentransfer. **a)** LV (Linker Ventrikel) - Gewicht [g] **b)** Quotient aus LV - Gewicht/Körpergewicht **c)** Quotient aus LV - Gewicht/Tibia-Länge, *P < 0,05 im Vergleich zu **Sham**, #P < 0,05 im Vergleich zu **Ad-shGFP**, ##P < 0,05 im Vergleich zu **AAV-shGFP**

3.3.5 Nachweis von PLN-shRNA im Herzen

Anhand der bisherigen Daten zeigte sich ein lang anhaltender positiver Effekt von **AAV-shPLNr** bei TAB induzierten Ratten von über drei Monaten. Um eine mögliche Kausalität der Langzeitwirkung herzuleiten, wurden Versuche unternommen, die PLN-shRNA in den Rattenherzen mit Hilfe von sequenzspezifischen shRNA - Primern und SYBR[®]Green mittels Real-Time RT-PCR zu quantifizieren. Die Quantifizierung wurde an Herzen von einem scheinoperierten Tier, einem TAB - Kontrolltier mit **AAV-shGFP** sowie einer

TAB - Ratte mit **AAV-shPLN_r** jeweils in Dreifach-Bestimmung durchgeführt. Dabei war, wie erwartet, in beiden Kontrollgruppen keine shRNA für Phospholamban nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Zur Veranschaulichung der quantitativen Real-Time PCR für **AAV-shPLN_r** wurde der grafische Echtzeitverlauf der PCR - Reaktion abgebildet (**Abb. 3.19**). Die drei ansteigenden Graphen stellen die Zunahme der Fluoreszenz während eines PCR - Zyklusses dar, welche proportional mit der Menge der PCR - Produkte zunimmt. Zwei der drei Graphen schneiden den Threshold bei Zyklus 40. Eine Aussage über den weiteren Verlauf der Graphen war nicht möglich, da sich die PCR auf 40 Zyklen beschränkte. Aus der Grafik geht deutlich hervor, dass PLN-shRNA in TAB induzierten Ratten mit **AAV-shPLN_r** nach drei Monaten noch nachzuweisen war.



Threshold: 354 (Noiseband)

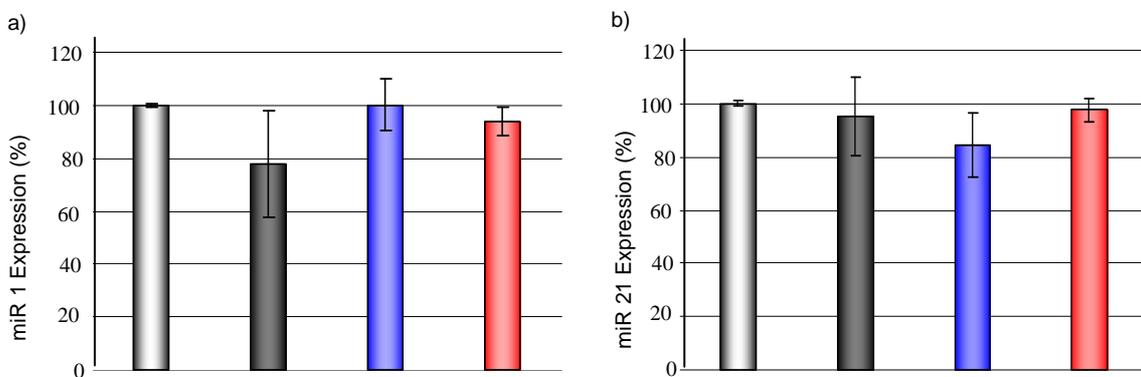
Baseline settings: automatic, Drift correction OFF

Abbildung 3.19: Nachweis von PLN-shRNA in TAB induzierten Rattenherzen. Quantitative Real-Time PCR mit SYBR[®]-Green, drei Monate nach Transduktion mit **AAV-shPLN_r**. Cycle (PCR-Zyklus), Threshold (Schwellenwert), Fluorescence (logarithmische Auftragung der Fluoreszenz)

3.4 Unspezifische Effekte von RNAi - Vektoren

Das zelluläre Prinzip der RNA - Interferenz ist ein effizienter endogener Mechanismus für spezifisches Gensilencing. Diesen Prozess versucht man mit Hilfe von *short hairpin* (sh)-RNAs zu imitieren. Allerdings ist der Einfluss auf die miRNA - Maschinerie (mi-micro) noch größtenteils unbekannt (Grimm et al., 2006; Odermatt et al., 1996). Bisher konnten Zusammenhänge einzelner miRNAs unter anderem bei Herzhypertrophie (Care et al., 2007; van et al., 2007; van et al., 2006) sowie bei Herzinsuffizienz (Thum et al., 2007; van et al., 2006) gefunden werden. Aus diesem Grund sollten mögliche unspezifische Effekte der RNAi -Vektoren auf die miRNA - Levels in PNRK untersucht werden. Für diesen Zweck wurden zuerst Untersuchungen angestellt, die die ausschließliche Wirkung der shRNA exprimierenden viralen Vektoren in PNRK aufzeigen sollten. Dabei wiesen sie gegenüber nichttransduzierten PNRK keine signifikanten Veränderungen auf (Daten nicht gezeigt).

Daraufhin wurde mittels Phenylephrin (**PE**) ein Hypertrophiephänotyp bei den PNRK induziert, um ein vergleichbares *in vitro* - System gegenüber dem TAB - Rattenmodell zur Verfügung zu haben. Für diese Erstuntersuchung wurden die viralen Vektoren **Ad-shPLN_r** und **AAV6-beta-shPLN_r** verwendet, jeweils 5000 P/Z. Die Messungen erfolgten zwei und fünf Tage nach der Vektor - Transduktion. Dabei wurde ein Panel von bereits bekannten herzspezifischen miRNAs (**miR1**; **-21**; **-133a** und **-208**) ausgewählt und analysiert (**Abb. 3.20**). Allerdings zeigten sich bei beiden verwendeten viralen Vektoren mit PE keine signifikanten Veränderungen in der Expression aller vier getesteten miRNAs gegenüber PNRK mit PE als auch ohne PE. Es lässt sich lediglich eine abnehmende Tendenz bei **miR 1** und **133a** für PNRK + PE erkennen.



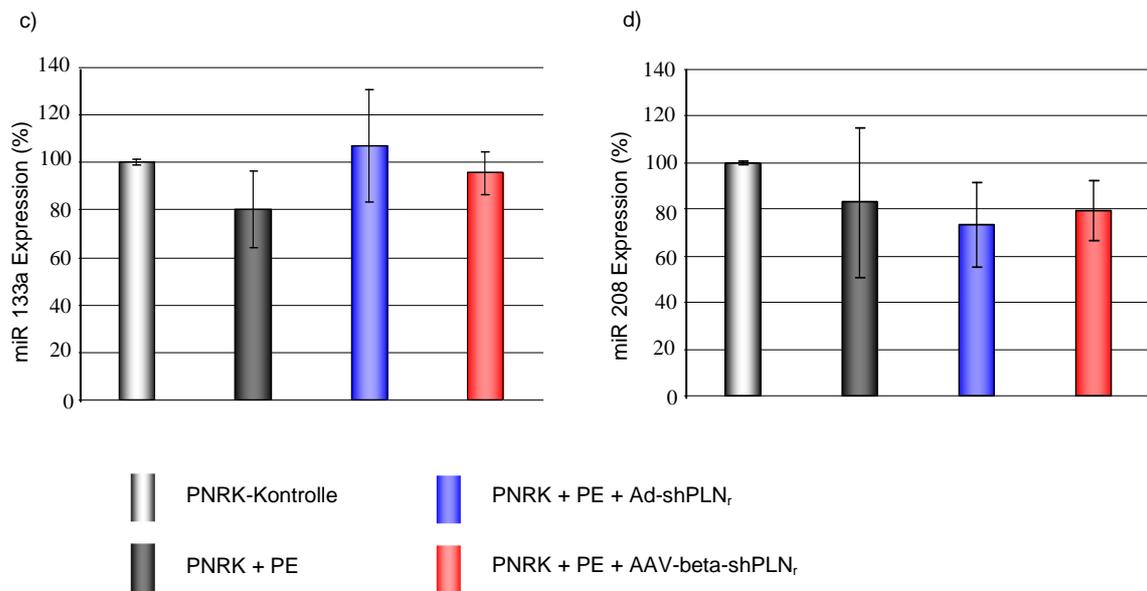
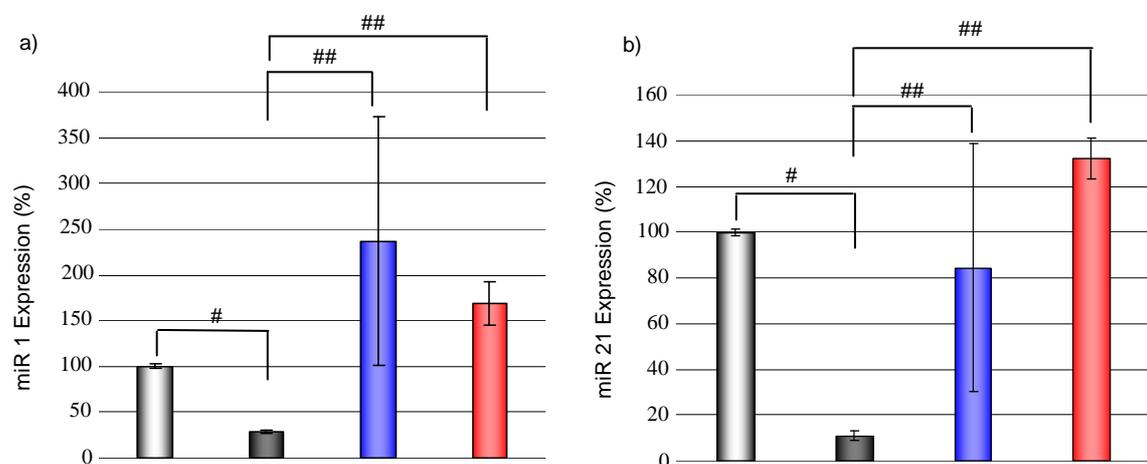


Abbildung 3.20: miRNA - Expression bei hypertrophierten PNRK zwei Tage nach Vektor - Transduktion. Hypertrophieinduktion von PNRK durch PE. Transduktion mit **Ad-shPLN_r** und **AAV-beta-shPLN_r** (5000 P/Z). miRNA - Expression von **a)** miR1, **b)** miR 21, **c)** miR133a und **d)** miR 208.

In den vorangegangenen *in vitro* Experimenten (**Abb. 3.10** und **3.11**) waren bereits am Tag 5 deutliche Effekte durch AAV-shPLN_r - Vektoren zu verzeichnen, weshalb auch für die miRNA Analysen der zweite Messpunkt am Tag 5 durchgeführt wurde (**Abb. 3.20**). Der Einfluss von PE führte bei allen untersuchten miRNAs zu einer eindeutigen Reduktion der Expressionslevel. Bei den vier miRNAs kam es durch PE zu einer Inhibierung der Expression von ca. 50 % bis sogar 90 %. Diese negative Auswirkung durch PE konnte durch **Ad-shPLN_r** sowie durch **AAV-beta-shPLN_r** teilweise vollständig aufgehoben werden. Der Einsatz der viralen Vektoren führte überwiegend zu einem erheblichen Anstieg der miRNA-Expressionslevel.



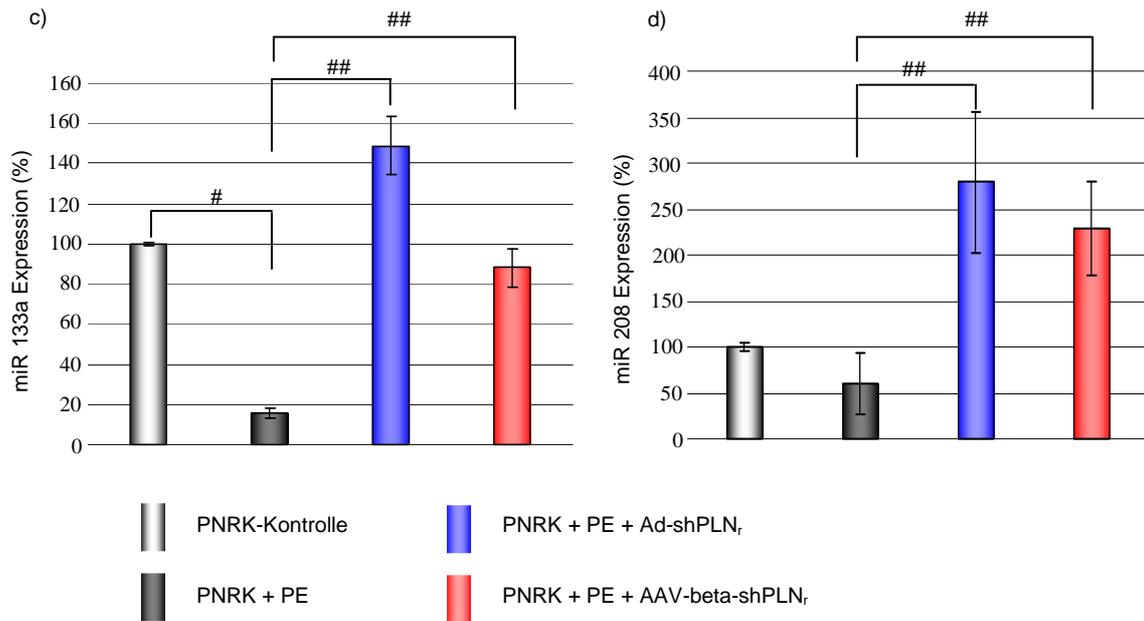


Abbildung 3.20: miRNA - Expression bei hypertrophierten PNRK fünf Tage nach Vektor - Transduktion. Hypertrophieinduktion von PNRK durch PE. Transduktion mit **Ad-shPLN_r** und **AAV-beta-shPLN_r** (5000 P/Z). miRNA - Expression von **a)** miR1, **b)** miR 21, **c)** miR133a und **d)** miR 208. #P < 0,05 im Vergleich zur Kontrolle, ##P < 0,05 im Vergleich zu PNRK+PE

4. Diskussion

Die Dysfunktion der intrazellulären Ca^{2+} - Homöostase in Kardiomyozyten bedingt eine Störung der Relaxationsgeschwindigkeit und der damit einhergehenden Veränderung der muskulären Kontraktilität des pathologisch insuffizienten Herzmuskels (Bluhm et al., 2000; Minamisawa et al., 1999; Arai et al., 1994; Lompre et al., 1994; Bers and Bridge, 1989; Carafoli, 1987). Die Regulation des kardialen Ca^{2+} - Stoffwechsels wird im Wesentlichen durch die Aktivität der SERCA2a gesteuert. Eine verminderte Aktivität der SERCA2a gilt als Ursache für die Abnahme des Ca^{2+} - Gehalts im SR (Hasenfuss, 1998; Pieske et al., 1995). So führt die Verringerung der Ca^{2+} - Konzentration bei terminaler Herzinsuffizienz im Menschen sowie auch in verschiedenen Tiermodellen zu einer Verkürzung der Dauer des Rücktransports des zytosolischen Ca^{2+} und der daraus resultierenden Abnahme der Kontraktionsstärke (Pogwizd et al., 2001; Hobai and O'Rourke, 2001; Yamamoto et al., 1999; Lindner et al., 1998; Hasenfuss et al., 1994).

Bisher gab es zahlreiche therapeutische Ansätze um in die Regulation der Ca^{2+} - Homöostase einzugreifen und somit der Herzinsuffizienz entgegenzuwirken, wie z.B. durch Überexpression von SERCA (Hajjar et al., 1997a) oder des Ca - bindenden Proteins S100A1 (Most et al., 2004), durch Modulation des Ca^{2+} - Kanal - Rezeptors RyR des SR (Yano, 2008; Santonastasi and Wehrens, 2007) bzw. von Sarcolipin (SLN) einem Inhibitor der SERCA -Pumpe (Babu et al., 2006). Eines der zentralsten Modulatorproteine der Ca^{2+} - Homöostaseregulation stellt das PLN dar, was auch die Vielzahl der therapeutischen Modelle unterstreichen. So versuchte man mittels PLN-asRNA (del Monte et al., 2002; Eizema et al., 2000), durch dominant-negative PLN - Mutanten (Iwanaga et al., 2004; Hoshijima et al., 2002; He et al., 1999), PLN - knockout (Luo et al., 1994) oder PLN - Antikörper (Dieterle et al., 2005; Meyer et al., 2004) die PLN - Expression zu inhibieren, um die SERCA - Aktivität zu erhöhen und dadurch die kardiale Kontraktion zu verbessern.

All diese Strategien haben eine Verbesserung des Ca^{2+} - Haushalts des insuffizienten Herzens zum Ziel. Jedoch sind sie in ihrer Effizienz begrenzt und stellen keine kausalen Therapien für die klinische Anwendung dar.

Erst mit der Entdeckung der RNAi (Fire et al., 1998) und der Entwicklung von siRNAs (Elbashir et al., 2001a; Elbashir et al., 2001b) mit deutlich höheren Spezifitäten und Effizienzen als bisher angewandte Methoden (Ogorelkova et al., 2006), stand nun eine Technologie zur Verfügung, die das Potential für den Einsatz in der kardialen Klinik hatte.

In einem ersten Ansatz konnte *Watanabe et al* mit submolaren Mengen einer PLN-siRNA, verpackt in einem Parainfluenzavirus I - Vektor (HVJ - Hemagglutinating virus of Japan), eine Reduktion der PLN - mRNA um 94 % zwölf Stunden nach Transfektion *in vitro* erzielen. Allerdings war bereits nach 36 h ein Rückgang des Silencingeffektes zu beobachten (*Watanabe et al.*, 2004).

Fasst man die Untersuchungen der kardialen Ca^{2+} - Homöostase der letzten Jahre zusammen, so stellt man fest, dass die Inhibierung von PLN eines der vielversprechendsten therapeutischen Ansätze bei der Behandlung von Herzinsuffizienz darstellt.

Aus diesem Grund bestand das Ziel der vorliegenden Arbeit darin, die bisherige PLN-siRNA Technologie weiterzuentwickeln und eine neuartige, effizientere shRNA gegen PLN zu generieren und diese in eigens dafür neu konstruierte, virale Vektorsysteme zu implementieren mit der Absicht, diese erstmalig in einem kardialen Phänotyp *in vivo* einzusetzen.

4.1 Funktionelle Charakterisierung von AdshPLN_r

Der therapeutische Einsatz synthetischer siRNAs ist durch das transiente Gensilencing deutlich limitiert (*Watanabe et al.*, 2004). Hinzu kommen Schwierigkeiten einer effizienten Transferrate in die Zielzellen, wie z.B. Kardiomyozyten. Diese Einschränkungen würden einen Einsatz *in vivo* gravierend erschweren (*Lewis et al.*, 2002).

Mittlerweile konnten mit Hilfe von viralen Vektorsystemen diese Limitierungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* weitestgehend überwunden werden, weshalb wir einen neuartigen PLN-shRNA exprimierenden adenoviralen Vektor (AdV) entwickelten.

Basierend auf pre-screening Experimenten mit verschiedenen siRNAs wurde die effizienteste in einen shRNA - exprimierenden AdV inseriert (*Fechner et al.*, 2007). Initiale Experimente zeigten eine Dosis - Wirkungsbeziehung, wobei mit 100 MOI eingesetztem Vektor das maximale Silencing der PLN - mRNA Expression erreicht wurde. Weiterführende kinetische Untersuchungen ließen erkennen, dass mit der gleichen Dosis von 100 MOI bereits einen Tag nach Vektorapplikation und konstant anhaltend bis zum Tag 13 ein nahezu vollständiger PLN - mRNA Knockdown erzielt werden konnte.

Die PLN-shRNA bewirkte ebenfalls eine nahezu vollständige Herunterregulation auf Proteinebene. Allerdings konnte der Maximalwert erst am Tag 7 erreicht werden. Ein

Grund für diese zeitliche Verschiebung könnte in der Halbwertszeit des Proteins begründet sein. Hinzu kommt, dass mit Beginn des Silencings der PLN - mRNA bis zur vollständigen Inhibierung, die Translation von PLN weiterhin ablaufen kann.

Entgegen unseren Beobachtungen erreichte *Watanabe et al* mit seiner synthetischen PLN-siRNA zwar ebenfalls eine zeitgleiche Herunterregulation der PLN - mRNA aber das Maximum des Silencings für das PLN-Protein setzte bereits zwei Tage nach PLN-siRNA Transfektion ein (Watanabe et al., 2004). Eine offensichtliche Ursache für die zeitliche Verschiebung der Proteininhibierung ist nicht erkennbar. Mögliche Faktoren, wie die Verwendung eines völlig anderen Vektorsystems (HVJ vs. AdV), Unterschiede im Primärzellkultursystem sowie der Einsatz von PLN-siRNA gegenüber PLN-shRNA könnten einen entscheidenden Einfluss auf das Gensilencing haben.

Um mögliche „*Off-target*“ - Effekte der PLN-shRNA sowie toxische Effekte, induziert durch den Vektor, zu ermitteln, wurden Kontrollexperimente durchgeführt. Dabei konnten über einen Beobachtungszeitraum von 7 Tagen keine Veränderungen in der Expressionsstärke von ebenfalls an der Ca^{2+} - Homöostase beteiligten Proteinen, wie SERCA2a, NCX1, CSQ2 und TnI festgestellt werden. Das deutet darauf hin, dass sowohl die PLN-shRNA als auch der Vektor an sich keine unspezifischen Einflüsse auf die kardialen Proteine ausüben. Auch der mitgeführte adenovirale Kontrollvektor **AdshCAR4_m** zeigte keine Auswirkungen auf die Proteinexpression.

Die Ergebnisse belegen eine hohe Spezifität als auch eine hohe Effizienz der PLN-shRNA. Außerdem konnte keine vektorbedingte Toxizität festgestellt werden.

4.1.1 PLN - Downregulation und Ca^{2+} - Transportaktivität

Da das Gensilencing von PLN auf Proteinebene keine Auswirkungen auf die an der Ca^{2+} - Homöostase involvierten Proteine zeigte, sollten mögliche funktionelle Veränderungen auf den Ca^{2+} - Transport in das Sarkoplasmatische Retikulum näher untersucht werden. Dafür wurden Messungen des Oxalat - stimulierten Ca^{2+} - Transports an Homogenaten von Kontrol-len ohne virale Vektoren als auch von transduzierten PNRK mit **AdshPLN_r** und shRNA-Kontrollvektor über einen Zeitraum von 7 Tagen durchgeführt. Mit dieser Methode kann der ATP - abhängige SERCA2a - katalysierte Ca^{2+} - Transport in die SR - Vesikel bei ausgewählten freien Ca^{2+} - Konzentrationen *in vitro* gemessen werden (Cernohorsky et al., 1998). Nichttransduzierte PNRK, wie auch mit Kontrollvektor

transduzierte PNRK, zeigten über den gesamten Beobachtungszeitraum keine Veränderungen in der Ca^{2+} - Aufnahme. Dagegen kam es bei den mit **AdshPLN_r** transduzierten PNRK zu einem stetigen Anstieg der SERCA2a - Ca^{2+} - Aufnahme bis zu einem Maximum von 100 % in Bezug auf V_{max} am Tag 5. Dieses hohe Plateau blieb bis zum Tag 7 erhalten. Dies deutet auf eine erhöhte Ca^{2+} - Affinität der SERCA2a in PLN defizienten PNRK hin.

Der Zusammenhang der zunehmenden Ca^{2+} - Affinität bei PLN defizienten PNRK wird deutlich bei der Betrachtung des Verhältnisses der relativen Ca^{2+} - Aufnahme gegenüber den PLN - Protein - Spiegeln in **AdshPLN_r** transduzierten PNRK, für den eine lineare Beziehung hergestellt werden konnte.

Die Zunahme der Ca^{2+} - Affinität des SR Ca^{2+} - Transportsystems infolge des PLN - Knockouts stimmt mit den Beobachtungen von *Eizema et al* (Eizema et al., 2000) und *Watanabe et al* (Watanabe et al., 2004) wie auch *Luo et al* (Luo et al., 1994) überein. Durch antisense RNA bzw. RNAi Techniken, wie auch in PLN - Knockout Mäusen konnten sie durch die Inhibierung der PLN - Expression die kardiale Ca^{2+} - Aufnahme in das SR steigern.

In einem weiteren Experiment wurde das unmittelbare Ausmaß des PLN - Silencings auf die Ca^{2+} - Aufnahme bei PLN-shRNA transduzierten PNRK durch die Protein - Kinase K (PKA) abhängige Phosphorylierung von PLN bestimmt. Dabei war eine signifikante Abnahme der PKA stimulierten Ca^{2+} - Aufnahme bei PLN-shRNA transduzierten PNRK zu beobachten, die vier Tage nach Transduktion ihr Maximum erreichte und bis zum Ende anhielt. Da die PKA nur das ihm zur Verfügung stehende PLN phosphorylieren kann und somit die Ca^{2+} - Aufnahme gewährleistet, die PLN - Konzentration aber durch das Gensilencing stetig abnimmt, verringert sich auch die Menge an noch zu phosphorylierendem PLN und infolgedessen kommt es zu einem Rückgang der Ca^{2+} - Aufnahme. Dagegen war die PKA stimulierte Ca^{2+} - Aufnahme in der Kontrollgruppe von nichttransduzierten PNRK nahezu unverändert. Diese Daten belegen, dass das PLN - Silencing eine Steigerung der Ca^{2+} - Affinität der SERCA2a bedingt und bestätigen indirekt die zentrale Modulatorfunktion des PLNs bei der kardialen Ca^{2+} - Homöostase.

Die bisherigen Ergebnisse konnten eindrucksvoll zeigen, dass die Kombination von neuartigen shRNAs mit neukonzipierten AdV derzeit bestehende Limitierungen

(Watanabe et al., 2004), wie die der repetitiven Applikation von synthetischen siRNAs und der sehr kurzen Wirkungsdauer erfolgreich umgangen werden kann. So erlaubt das adenovirale Vektorsystem die Expression der PLN-shRNA in der Zielzelle über einen weitaus längeren Zeitraum mit einer deutlich höheren Effizienz. Die zurzeit zur Verfügung stehenden PLN-siRNAs wären für einen klinischen Einsatz nicht anwendbar (Lewis et al., 2002). Demgegenüber könnte die kleine Expressionskassette mit der spezifischen PLN-shRNA sehr leicht in die erst kürzlich entwickelten kardiotropen AAV - Vektoren implementiert und intravenös *in vivo* appliziert werden (Muller et al., 2006).

4.2 Funktionelle Charakterisierung von PLN-shRNA exprimierenden scAAV-shPLN - Vektoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene selbstkomplementäre (sc) AAV - Vektoren zur Expression einer shRNA gegen PLN entwickelt, um die Limitierungen von adenoviralen Vektoren bei der *in vivo* Anwendung, wie erhöhte Toxizität, kurze Expressionszeit und geringer kardialer Tropismus, zu umgehen.

Initial wurden drei verschiedene AAV - Vektoren hergestellt. Diese unterschieden sich prinzipiell in der Größe der verpackten Vektor - DNA, sowie der PLN-shRNA - Expressionskassette und weiterer transkriptional aktiver Komponenten. Zunächst wurden *in vitro* Untersuchungen in PNRK mit drei verschiedenen Vektorkonzentrationen durchgeführt. Dabei stellte sich ein Vektorkonstrukt (**scAAV-shPLN_r**) sowohl nach fünf Tagen als auch nach zehn Tagen am effizientesten heraus, während die anderen beiden Konstrukte signifikant geringere Silencingeffizienzen aufwiesen. Die höchste Vektorkonzentration mit 20.000 P/Z ergab bei allen drei verwendeten Vektorkonstrukten den stärksten Silencingeffekt. **scAAV-shPLN_r** erwies sich als genauso effizient wie **AdshPLN_r**. Dagegen war die Herunterregulation der PLN - mRNA Expression bei **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r** an beiden Untersuchungszeitpunkten nur sehr schwach ausgeprägt.

Diese Beobachtungen gehen einher mit den Expressionsanalysen von PLN-shRNA. Hierbei sollte die Beziehung der PLN-shRNA Expression zur Silencingeffizienz der PLN - mRNA untersucht werden. Zunächst stellte sich heraus, dass mit steigender Vektorkonzentration auch die PLN-shRNA Expression zugenommen hatte. Auffallend war, dass weniger als ein Drittel an PLN-shRNA, synthetisiert durch **scAAV-shPLN_r**, die gleiche Silencingeffizienz der PLN - mRNA bewirkte, wie durch **AdshPLN_r**. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass sich die durch **AdshPLN_r** exprimierte PLN-

shRNA bereits im Sättigungsbereich befindet im Gegensatz zur PLN-shRNA von **scAAV-shPLN_r**. In dem Falle wäre der Unterschied der PLN - mRNA Expression durch **AdshPLN_r** bzw. **scAAV-shPLN_r** methodisch bedingt.

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass die Level der shPLN-RNA Expression für alle drei scAAV - Konstrukte an beiden Untersuchungszeitpunkten jeweils konstant geblieben waren, während bei **AdshPLN_r** am Tag 10 die PLN-shRNA Konzentration um über 60 % abgenommen hatte. Dies könnte auf einen frühzeitigen Abbau der adenoviralen PLN-shRNA exprimierenden Vektoren hindeuten.

4.2.1 Einfluss der Genomstruktur auf die shRNA-PLN_r - Expression

Überraschend war allerdings, dass die anderen beiden Konstrukte (**scAAV-CMV-GFP-shPLN_r** und **scAAV-CMV- β -Intron -shPLN_r**) eine geringere Silencingeffizienz als **scAAV-shPLN_r** aufwiesen, obwohl alle drei Vektorkonstrukte die gleiche PLN-shRNA Expressionskassette beinhalteten. Um dieses Phänomen aufzuklären, wurde eine Reihe von Kontrollexperimenten durchgeführt.

Alle drei Vektoren bestehen aus selbst-komplementären (sc) AAV - Vektorgenomen. Sie haben neben den ITRs und einem poly A - Signal, eine PLN-shRNA Expressionskassette und dem murinen Polymerase III - U6-Promotor gemeinsam. Die beiden Vektoren **scAAV-CMV- β -intron-shPLN_r** und **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r** beinhalten zusätzlich noch eine nicht kodierende β -Intron Sequenz bzw. eine Sequenz für GFP und jeweils einen CMV - Promotor. Das **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r** - Vektorkonstrukt ermöglicht aufgrund des vorhandenen GFP die Kontrolle des Vektortargetings und stellt mit 2,4 kb das Größte der drei Konstrukte dar. Mit dieser Genomgröße lag es an der unteren Grenze der Verpackungskapazität von scAAV-Vektoren. *Wu et al* konnte in seinen Untersuchungen zeigen, dass doppelsträngige AAV - Genome von 2,3 bis 3,3 kb Größe erfolgreich verpackt werden können (Wu et al., 2007).

Für uns stellte sich aber nicht die Frage, die Maximalverpackungskapazität von scAAV - Vektoren zu untersuchen, sondern vielmehr interessierte uns, ob ein AAV - Genom nur mit dem notwendigsten ausgestattet, also mit der vollständigen Expressionskassette für PLN-shRNA, verpackt wird und eine funktionsfähige PLN-shRNA produziert. Außerdem bestand die Überlegung bei der Konstruktion weiterer PLN-shRNA Konstrukte auf GFP zu verzichten, da GFP möglicherweise Apoptose induziert und sogar dilatative Kardiomyopathie hervorrufen kann (Huang et al., 2000; Liu et al., 1999).

Aus diesen Gründen wurden zwei weitere Konstrukte neben **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r**, generiert. Zum einen **scAAV-CMV- β -intron-shPLN_r**, mit 2,14 kb (89 %) Länge und zum anderen **scAAV-shPLN_r**, mit nur 975 bp (41 %).

Erstaunlicherweise erwies sich das Vektorkonstrukt mit der geringsten Genomgröße, welches auch verpackt wurde, mit dem stärksten Gensilencing von PLN am effizientesten. Auch **scAAV-CMV- β -intron-shPLN_r**, zeigte gegenüber **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r**, eine deutlich höhere Silencingwirkung. Mit einer Vektorgenomgröße von nur 41 % von **scAAV-shPLN_r** im Vergleich zu bisher 2,4 kb großen dsAAV - Genomen konnte hier erstmalig die erfolgreiche Verpackung deutlich kürzerer doppelsträngiger AAV - Genome gezeigt werden.

Um die Ursachen für die unterschiedlichen Gensilencingeffizienzen herauszufinden, wurden vergleichende molekulare Analysen der scAAV - Konstrukte durchgeführt.

4.2.2 Einfluss des CMV - Promotors auf die PLN-shRNA - Expression

Das kleinste Vektorkonstrukt **scAAV-shPLN_r**, stellte sich als das Effizienteste in seiner Silencingwirkung heraus. Im Vergleich zu den anderen beiden AAV - Konstrukten unterscheidet es sich durch das Fehlen eines CMV - Promotors. Um die Auswirkung des CMV - Promotors auf die PLN-shRNA Expression näher untersuchen zu können, wurden dafür aus den beiden Konstrukten **scAAV-CMV- β -intron-shPLN_r** und **scAAV-CMV-GFP-shPLN_r** der CMV - Promotor entfernt. Anschließend wurden alle fünf verschiedenen Konstrukte, sowohl die drei ohne CMV - Promotor als auch die zwei mit CMV - Promotor, untersucht. Die Überprüfung erfolgte mit den Plasmidformen der Konstrukte in 293T - Zellen.

In Übereinstimmung mit den Vektor erhobenen Daten, zeigten sich auch hier signifikante Unterschiede in der PLN-shRNA - Expression bei **pAAV-CMV-GFP-shPLN_r** und **pAAV-CMV- β -intron-shPLN_r**, gegenüber den nicht CMV - Promotor haltigen **pAAV-shPLN_r** Plasmidkonstrukten. Die Deletion des CMV - Promotors führte zu einem starken signifikanten Anstieg der PLN-shRNA Expressionsrate von 14 % auf über 82 % bzw 46 % auf über 138 % gegenüber äquivalenten CMV - Promotor Konstrukten. Dies lässt eine suppressorische Wirkung des CMV - Promotors auf die U6 - Promotor gesteuerte PLN-shRNA Expression vermuten.

Entgegen dieser Beobachtung wurde in der bisherigen Literatur nur über eine Steigerung der Silencingeffizienz von shRNAs berichtet, wenn zusätzlich zum Polymerase III Promotor (U6 oder H1) ein Polymerase II Promotor (CMV) anwesend ist, nicht aber über mögliche inhibitorische Effekte des CMV - Promotors. Eine mögliche Erklärung für die steigende Wirkung durch den CMV - Promotor ist neben seinen Enhancerelementen die unmittelbare Nähe zu dem Polymerase III - Promotor (Hassani et al., 2007; Xia et al., 2003). Diese Beobachtungen können durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt werden. Unsere Daten zeigen eindeutig eine Suppressorwirkung des CMV - Promotors auf die PLN-shRNA - Expression.

4.2.3 Inhibitorische Wirkung von GFP auf die PLN-shRNA - Expression

Bei der Betrachtung der Expressionslevel für PLN-shRNA bei den GFP - bzw. β -Intron - Konstrukten sowohl mit CMV - Promotor als auch ohne fiel auf, dass die PLN-shRNA Expressionsraten bei GFP - co - exprimierenden Konstrukten deutlich geringer waren. Da sich **pAAV- β -Intron-shPLN_r** und **pAAV-GFP-shPLN_r** nur noch durch das GFP - Gen bzw. β -Intronsequenz voneinander unterscheiden, könnte GFP einen inhibitorischen Effekt sowohl auf die RNA - Interferenz als auch auf die PLN-shRNA - Expression haben. Frühere Studien haben gezeigt, dass GFP - assoziierte toxische Effekte sowohl nach *in vitro* Transfektion wie auch in Ratten- oder transgenen Mausmodellen beobachtet worden sind. So fand *Liu et al* Hinweise darauf, dass mit GFP transfizierte Zellen zur Apoptose neigen (Liu et al., 1999). In einer transgenen Mauslinie führte die unter einem α MHC - Promotor gesteuerte GFP - Expression sogar zu einer dilatativen Kardiomyopathie (Huang et al., 2000). Weitere Daten zeigten toxische Auswirkungen auf dopaminerge Neuronen durch GFP - Gentransfer in den Hippocampus adulter Ratten (Klein et al., 2006).

Gegen diese Theorie des toxischen Effektes von GFP sprechen allerdings einige Arbeiten, in denen GFP als Fluoreszenzfarbstoff in verschiedenen Transfektionsmodellen als auch in *in vivo* Modellen erfolgreich eingesetzt wurde, ohne Nebenwirkungen beobachtet zu haben (Daniels et al., 2003; Goldman and Roy, 2000; Okabe et al., 1997).

Aufgrund unserer Daten, die auf einen inhibitorischen Effekt von GFP auf die PLN-shRNA Expression hinweisen, sollten bei der Verwendung von GFP als Transduktionskontrolle Alternativen in Betracht gezogen werden.

4.2.4 Konkaterisierung bei scAAV-shPLN_r

Aufgrund der geringen Genomgröße von scAAV-shPLN_r mit 975 bp ergab sich hier die rechnerische Möglichkeit der Konkaterisierung, wobei zwei Genomkopien in einem Viruskapsid verpackt werden können. Dies könnte mit eine Ursache für die hohe Silencingeffizienz von PLN sein. Um diesen Sachverhalt näher zu untersuchen, wurden weitere Experimente durchgeführt.

Durch Restriktionsanalyse konnte zunächst bei allen drei AAV - Vektoren der dimerische Charakter dokumentiert werden. Bei Konkaterisierung sollten bei einem *Hind* III - Verdau von scAAV-shPLN_r mehrere Restriktionsmuster zu erwarten sein.

Der Southern Blot für scAAV-shPLN_r ergab unter anderem eine Bande bei ca. 880 bp. Diese Größe der Bande konnte nur bei einer „Head to Head“ Konstellation von zwei Genomkopien in einem Viruskapsid entstehen. Weiterhin war eine kleinere Bande zu sehen, bei der es sich wahrscheinlich um zwei Fragmente (438 bp und 563 bp) handelt, wobei dies aber nicht ganz eindeutig ist.

Ein weiteres Indiz für eine Doppelbande und somit die Möglichkeit, dass sowohl Kapside mit einer als auch zwei Genomkopien verpackt wurden, ist die Stärke des Blotsignals. Wenn man davon ausgehen würde, dass ausschließlich zwei Genome pro Kapsid verpackt worden wären, so hätten bei einem *Hind* III Verdau die Signalstärken beider Fragmente aufgrund der Sondenhybridisierung annähernd die gleiche Intensität aufweisen müssen, so wie es bei AAV-CMV- β -Intron-shPLN_r zu beobachten ist.

Die Konkaterisierung wurde unter anderem bei rAAV - Genomen angewendet, um die Limitierung der Verpackungskapazität zu umgehen (Nakai et al., 1999; Duan et al., 1998). So konnten Expressionskassetten, die zu groß für einen rAAV - Vektor waren, auf zwei rAAV - Vektoren aufgeteilt und anschließend durch Konkaterisierung in der Zielzelle zu einer funktionellen Kasette wieder zusammengefügt werden (Choi et al., 2005; Duan et al., 2000).

Allerdings wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben, dass auch eine Konkaterisierung, also eine intermolekulare Rekombination (Choi et al., 2005), aus nur einem Vektorgenom einer durch scAAV infizierten Zelle erfolgen kann.

Unsere Ergebnisse zeigen erstmalig die Verpackung von zwei Genomkopien aus einem Vektorgenom pro Viruskapsid durch Konkaterisierung aufgrund der geringen Genomgröße, wodurch die Effizienz der PLN-shRNA positiv beeinflusst werden kann. Das könnte zur Folge haben, dass die zu verabreichende Vektordosis von scAAV

minimiert werden kann, da durch zwei Genomkopien anstatt nur einer, mit der Hälfte der Dosis die gleiche Wirkung erzielt werden kann.

4.3 Anwendung von shRNA exprimierenden Vektoren im herzinsuffizienten Rattenmodell

Die *in vitro* Untersuchungen haben verdeutlicht, dass das durch PLN-shRNA hervorgerufene Gensilencing via RNA - Interferenz nicht nur transkriptionell und auch translationell hoch effizient ist, darüber hinaus ist es auch hochspezifisch.

Daher stellte sich die Frage nach der klinischen Relevanz dieses therapeutischen Ansatzes zur Behandlung von Herzinsuffizienz. Bisher wurden zur Beantwortung dieser Fragen Untersuchungen in primären neonatalen Herzzellkulturen aus der Ratte durchgeführt. Diese stellen nur ein artifizielles, isoliertes *ex-vivo* System dar, in dem sich die komplexen Regulationsvorgänge des Gesamtorganismus nur bedingt widerspiegeln.

Für eine Betrachtung im funktionellen Gesamtkontext von gentherapeutischen Interventionen bieten bisher nur Tiermodelle solch eine Möglichkeit.

Als ein geeignetes und gut beschriebenes Untersuchungsobjekt wurden Sprague Dawley Ratten mit einer induzierten Hypertrophie und Herzinsuffizienz durch *Aortic Banding* verwendet. Dieses Modell wurde bereits erfolgreich beschrieben und bildet die auftretenden klinischen Symptome bei chronischer Herzinsuffizienz gut ab und war daher für unsere Untersuchungen sehr gut geeignet (Del et al., 2002; Kagaya et al., 1996).

Von den drei scAAV - Vektoren erwies sich der AAV - Vektor mit dem kürzesten Genom (**scAAV-shPLN_r**) am effizientesten (siehe 3.2.1), weshalb dieser für die *in vivo* Experimente zum Einsatz kam.

Kürzlich konnte ein neuer AAV - Serotyp 9 identifiziert werden, der über die bisher höchste Transduktionsrate und den ausgeprägtesten Herzzelltropismus verfügt (Inagaki et al., 2006). Die Gruppe um *Pacak et al* zeigte an einem Affenmodell eine effiziente Herztransduktionsrate mit einer ca. 200 fachen geringeren Vektordosis von rAAV9 im Vergleich zu einem rAAV1 - Vektor (Pacak et al., 2006). Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse wurden für die *in vivo* Versuche die Vektoren **scAAV9-shPLN_r** und **scAAV9-shGFP** generiert.

Neben den scAAV - Vektoren kamen auch die adenoviralen Vektoren **AdshPLN_r** und **AdshGFP** als ein Modell für eine Kurzzeitbehandlung und als Vergleichsvektoren zum

Einsatz. Diese wurden aufgrund des schwachen Herzzelltropismus mittels Thorakotomie direkt über den Apex des linken Ventrikels appliziert im Gegensatz zur Schwanzvenenapplikation der AAV - Vektoren.

4.3.1 PLN-shRNA erhöht Überlebensrate bei Tieren mit Herzinsuffizienz

Bei der Betrachtung des Studiendesigns des *in vivo* Gentransfers fällt auf, dass bei einer Ausgangssituation von jeweils 10 Tieren pro virustransduzierter Gruppe, die Mortalitätsrate bei den shGFP - Kontrolltieren höher lag als bei PLN-shRNA behandelten Tieren. Noch deutlicher waren die Auswirkungen bei progredierender Herzinsuffizienz nach drei monatiger Ligatur. Hier überlebten in den Kontrollgruppen nur 6 von 10 Tieren gegenüber 9 von 10 in den mit **scAAV9-shPLN_r** behandelten Gruppen. Diese Ergebnisse waren noch nicht statistisch signifikant, zeigten aber eine deutliche Tendenz.

4.3.2 Normalisierung der Hämodynamik nach viralem PLN-shRNA - Vektortransfer

Sowohl die Gruppe mit AdV als auch die mit AAV - Vektoren zeigten gegenüber den Kontrolltieren (sham) keine signifikanten Unterschiede in ihrer Herzfrequenz.

In Tiermodellen mit druckinduzierter Herzhypertrophie durch *Aortic Banding* konnte ein deutlicher Abfall der SERCA2a - mRNA bzw. Proteinlevel festgestellt werden (Qi et al., 1997; Feldman et al., 1993; de la et al., 1990). Dadurch verringert sich der Ca²⁺ - Einstrom aus dem SR in das Zytosol erheblich, wobei der sich daraus reduzierte Calciumtransient eine verminderte Kontraktion zur Folge hat, welches sich in den Werten des linksventrikulären systolischen Drucks (LVSP) sowie des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) von **Ad-shGFP** und **scAAV-shGFP** widerspiegelte.

Die durch *Aortic Banding* induzierte Herzinsuffizienz führt zwangsläufig zu einer Verringerung von funktionsfähigen Herzmuskelzellen, wodurch die Kontraktilität der verbliebenen Kardiomyozyten sinkt (Anversa et al., 1990). Da damit auch die Herzleistung abnimmt, versucht der Organismus das erforderliche Schlagvolumen unter anderem durch die Erhöhung des LVEDP zu kompensieren (vergl. **Abb. 3.14c**).

Mit beiden Vektorkonstrukten, sowohl **AdshPLN_r** als auch **scAAV-shPLN_r**, konnten die Druckparameter im Vergleich zu den shGFP - Kontrollen signifikant verbessert werden. Mit einer Erhöhung des LVSP auf 92 ± 4 vs 98 ± 4 [mmHG] sowie einer Verringerung von LVEDP auf 8 ± 3 vs 6 ± 2 [mmHG] durch **scAAV-shPLN_r** im Vergleich zur sham -

Kontrolle bewirkte das Gensilencing von PLN nahezu eine Normalisierung auf die Ausgangswerte.

Die Inhibierung der PLN - Expression durch **Ad-shPLN_r** und **scAAV-shPLN_r** führte zu einer Steigerung der SERCA - Aktivität. Daraufhin gelangte mehr Calcium in das SR, wodurch sich der Calciumtransient wieder erhöhte und somit ausreichend Calcium für eine Kontraktion zur Verfügung stand, was in einem signifikanten Anstieg des LVSP resultierte (s.o.).

Die Auswirkungen des Gensilencings von PLN spiegeln sich auch in den Relaxationsparametern wieder. So konnten die Werte für Druckanstiegs- bzw. Druckabfallgeschwindigkeiten, sowie für *tau*, signifikant verbessert werden. Der Einsatz von **scAAV-shPLN_r** führte zu einer beinahe vollständigen Normalisierung der Relaxationsparameter des Myokards bei herzinsuffizienten Tieren.

Die Betrachtung aller hämodynamischen Parameter demonstriert eindrucksvoll die hohe Effektivität der RNA-Interferenz *in vivo* bei der Therapie der induzierten Herzinsuffizienz bei Ratten.

4.3.3 Signifikante Verbesserung der echokardiografischen Parameter nach viralem PLN-shRNA - Vektortransfer

Die echokardiografischen Untersuchungen gingen einher mit den zuvor beschriebenen hämodynamischen Auswertungen bei den PLN-shRNA - Vektoren. Auch hier konnten für alle gemessenen Parameter signifikante Verbesserungen nachgewiesen werden, wobei hier die mit **scAAV-shPLN_r** transduzierten Tiere im Vergleich zu den **AdshPLN_r** - Tieren die größere Verbesserung aufwiesen.

So bewirkte die PLN - Inhibierung durch **scAAV-shPLN_r** bei den systolischen bzw. diastolischen Durchmessern des linken Ventrikels (LV) nahezu die Werte gesunder Kontrolltiere. **AdshPLN_r** transduzierte Tiere zeigten ebenfalls signifikante Verbesserungen der echokardiografischen Parameter aber erreichten nicht annähernd den Wirkungsgrad wie durch **scAAV-shPLN_r**. **AdshPLN_r** zählt zu der 3. Generation adenoviraler Vektoren und damit zu den am weitest entwickelten dieser Klasse, jedoch kann eine Inflammation und eine Aktivierung des Immunsystems der infizierten Zellen durch Aktivierung von MAP-Kinasen und NF- κ B nicht ausgeschlossen werden (Muruve, 2004). Dies und die Tatsache, dass durch das „Aushölen“ des adenoviralen Genoms zur Steigerung der maximalen Verpackungskapazität, die Transgenexpression unter die der

vorherigen Vektorgenerationen gesunken ist, sind eine mögliche Erklärung für den nur begrenzten und temporären Erfolg gegenüber den scAAV - Vektoren (Evans et al., 2006).

Auch die echokardiografischen Parameter konnten die außerordentliche Effizienz der PLN-shRNA an einem herzinsuffizientem Krankheitsmodell belegen und die Vorteile einer Kombination mit scAAV - Vektoren für den gentherapeutischen Einsatz *in vivo* deutlich machen.

4.3.4 Erfolgreiche morphologische Validierung nach viralem Gentransfer

Das *Aortic Banding* bewirkte bei **Ad-shGFP** und **scAAV-shGFP** anhand der morphologischen Parameter eine deutliche Gewichtszunahme des LV bzw. Herzens im Vergleich zu den Sham-Kontrollen, sowie signifikante Erhöhungen der Quotienten aus LV/Körpergewicht und LV/Tibiallänge.

Diese Daten gehen einher mit den Beobachtungen von *Maier et al* sowie von *de la Bastie et al*, die ebenfalls vier bis 16 Wochen nach Aorten Ligatur bei Ratten Zeichen einer schweren Hypertrophie mit deutlich erhöhten Herzgewicht-Körpergewicht-Quotienten festgestellt hatten (Maier et al., 1998; de la et al., 1990). Sowohl die adenoviralen als auch die scAAV - Vektorkonstrukte mit PLN-shRNA führten zu einer signifikanten Reduktion der LV-Gewichte, welche annähernd die Werte der Sham-Kontrollen erreichten und somit zu einer deutlich verbesserten Pumpleistung des Herzens führten.

Fasst man die *in vivo* Ergebnisse dieser vorliegenden Arbeit zusammen, so ist festzuhalten, dass hier erstmalig an einem herzinsuffizienten Rattenmodell erfolgreich gezeigt werden konnte, dass durch effizientes Gensilencing von PLN mittels einer vektor-exprimierenden, hochspezifischen PLN-shRNA der kardiale Phänotyp nahezu vollständig geheilt werden konnte.

4.3.5 Nachweis von PLN-shRNA im transduzierten Rattenherzen

Es stellte sich die Frage, ob drei Monate nach einmaliger Schwanzvenen - Applikation von **scAAV-shPLN_r** in die Ratte ein Nachweis von PLN-shRNA im Herzen möglich ist.

Da der hier verwendete **scAAV-shPLN_r** - Vektor über kein zusätzliches Reporter-gen, wie LacZ oder fluoreszierendes GFP verfügte, konnte ein Nachweis für das Vorhandensein von PLN-shRNA nur mittels quantitativer Real-Time PCR erfolgen.

Wie zu erwarten, konnte in den Sham- und den GFP - Tieren, als Negativ - Kontrollen, keine PLN-shRNA nachgewiesen werden. Nur im Herzgewebe einer **scAAV-shPLN_r**

transduzierten Ratte konnte in allen Messungen einer Dreifachbestimmung mittels Real-Time PCR PLN-shRNA detektiert werden. Allerdings war die Konzentration an PLN-shRNA sehr gering, da der Nachweis erst bei Zyklus 40 erfolgte. Die Real-Time PCR war auf 40 Zyklen angelegt, weshalb wir uns an der äußersten Nachweisgrenze befanden und dieses Ergebnis daher nur die Aussage zulässt, dass drei Monate nach Applikation von **scAAV-shPLN_r** diese immer noch im Myokardgewebe exprimiert wurde. Aussagen über Expressionsstärke oder eine Verteilung im Myokard waren nicht möglich.

4.4 Einfluss der Vektor-exprimierten PLN-shRNA auf die Expression von herzspezifischen miRNAs

RNAi ist ein sehr leistungsfähiges Werkzeug zur näheren Untersuchung von Proteinfunktionen. Geninaktivierungen in Mäusen revolutionierten die Herangehensweise, die Grundlagen in der Biologie zusammen mit einer Vielzahl von Erkrankungen zu studieren (Metzger and Feil, 1999; Kuhn and Schwenk, 1997). Der Versuch einer gezielten Inhibierung der Genexpression in humanen Zellen gestaltete sich aber lange Zeit als sehr schwierig (Weiss et al., 1999). Erst die Entdeckung der RNA Interferenz bei Pflanzen und *C.elegans* eröffneten ganz neue Perspektiven bei der Genregulation (Hamilton and Baulcombe, 1999; Fire et al., 1998; Napoli et al., 1990). Dieser Mechanismus konnte auch erfolgreich in humanen Zellen zum Ausschalten von Zielgenen angewendet werden (McManus and Sharp, 2002; Elbashir et al., 2001a). Mit der schnell zunehmenden Zahl von Anwendern dieser Technologie stellten sich mit der Zeit aber auch erste unerwünschte Nebenwirkungen heraus (Manche et al., 1992; Meurs et al., 1990). Darunter konnten verschiedene solcher sogenannten *Off Target* Effekte beobachtet werden. So kann es zu Kreuzreaktionen der kurzen RNA Moleküle mit anderen homologen Sequenzbereichen kommen, aufgrund der hohen Redundanz der kurzen Nukleotide im Gesamtgenom (Jackson et al., 2003). *Bridge et al* konnte zeigen, dass auch shRNA Moleküle, trotz ihrer optimalen Größe, Interferonantworten induzierten (Bridge et al., 2003). Auch *Sledz et al* wies auf die möglichen Risiken von siRNAs bei der Herunterregulation von Genen in Zellen hin. So fanden sie heraus, dass die Transfektion von siRNAs zu einer Interferon vermittelten Aktivierung des JAK-Stat Pathways führte (Sledz et al., 2003). In einer weiteren Arbeit stellte sich heraus, dass siRNAs ebenfalls unspezifische aber sequenz-abhängige Effekte bewirken und so Auswirkungen auf unbekannte Targets haben können (Scacheri et al., 2004).

Zu einer weiteren Art von kurzen RNA - Molekülen gehören die MicroRNAs (miRNAs). Dabei handelt es sich um einzelsträngige, 21 - 22 nt lange RNA - Moleküle, die durch Bindung an den 3' UTR Bereich der mRNA zu einem translationalem Silencing führen. Diese endogenen RNAs werden zuerst als eine lange RNA transkribiert und anschließend durch eine RNase III (Drosha) zu einer Vorläufer miRNA (pre-miRNA) von ca. 70 nt prozessiert (Lee et al., 2002). Die pre-miRNA bildet dabei eine unvollständige Harnadelstruktur aus, welche anschließend durch eine weitere RNase III (DICER) zur reifen, einzelsträngigen miRNA prozessiert wird (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001). Mittlerweile konnten hunderte von miRNAs aus Pflanzen, Tieren und dem Menschen identifiziert werden (Sontheimer and Carthew, 2005; Lagos-Quintana et al., 2003; Lau et al., 2001) aber nur von wenigen konnte ihre Funktion entschlüsselt werden. In allen bisher untersuchten Organismen führten Defekte in der miRNA Funktion zu erheblichen Störungen in der Entwicklung der Organismen. Es wird vermutet, dass die Sequenzhomologie der miRNA zur Targetsequenz entscheidend dafür ist, ob es zu einer Repression der Translation kommt oder zu einer Degradierung der mRNA (Zeng et al., 2003; Doench et al., 2003).

Die Arbeitsgruppe von *Doench et al* hatte entdeckt, dass siRNAs auch als miRNAs fungieren und aufgrund der hier geringeren erforderlichen Sequenzhomologie im Vergleich zum RNAi - Mechanismus zu *Off target* Effekten führen können (Doench et al., 2003).

Ein weiteres Indiz für eine enge Assoziation von RNAi und miRNA stellen die Ergebnisse von *Grimm et al* dar, der einen möglichen Einfluss von shRNAs auf den zellulären miRNA Pathway aufzeigen konnte, da eine Überexpression von shRNAs sich inhibierend auf das miRNA - Processing auswirken kann (Grimm et al., 2006). Kürzlich konnten einige miRNAs beschrieben werden, die bei der kardialen Hypertrophie bzw. Herzinsuffizienz und der Regulation der Expansion von kardialen Progenitor Zellen involviert sind (Care et al., 2007; van et al., 2007; Thum et al., 2007; Sayed et al., 2007; van et al., 2006).

In Anbetracht all dieser Hinweise sollte zunächst erstmal *in vitro* untersucht werden, ob die in dieser Arbeit verwendeten Vektor-exprimierten shRNAs einen Einfluss auf die Expression spezifischer, kardialer miRNAs (miRNA 1, -21, -133a und -208) haben. Da die hier betrachteten herzspezifischen miRNAs unter anderem im pathologischen Zusammenhang beschrieben wurden und ein vergleichbares *in vitro* System gegenüber dem TAB - Rattenmodell geschaffen werden sollte, wurden für die Experimente mit

PNRK ein hypertrophie-induzierendes Agens, Phenylephrin (PE), verwendet (Care et al., 2007; Backs et al., 2006).

Zunächst wurde der Einfluss der PLN-shRNA - Vektoren auf die Expressionslevel der oben aufgeführten miRNAs im Vergleich zur nicht transduzierten PNRK - Kontrolle ohne zusätzliche Agenzien überprüft. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der miRNA - Expression festgestellt werden, was womöglich auf eine hohe Spezifität der PLN-shRNA zur Zielsequenz hindeutet. Für die Untersuchungen mit PE wurden zwei Zeitpunkte gewählt, einmal nach zwei Tagen und einmal nach fünf Tagen. Der spätere Zeitpunkt entsprach dem gleichen Messpunkt, wie in den zuvor beschriebenen Transduktionsexperimenten in PNRK, um so mögliche Korrelationen anstellen zu können. Die Kontrolle nach zwei Tagen sollte frühzeitige Veränderungen aufzeigen.

Der Einfluss durch das hypertrophieinduzierende PE führte zwei Tage nach Applikation zu einer Auflösung der Homogenität der Micro-RNA Expressionslevel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Bei drei der vier untersuchten miRNAs wirkte PE nach zwei Tagen leicht inhibierend. Allerdings waren diese Tendenzen nicht signifikant.

Dagegen zeigten sich am Tag 5 sehr eindeutige Effekte, sowohl durch PE, als auch durch die shPLN_r - Vektoren und PE. So wurde die anfänglich beobachtete Inhibierung durch PE mit fortschreitender Zeit signifikant verstärkt. Dabei verringerte sich die Expression auf die Hälfte bis fast zur vollständigen Inhibierung. Zu ähnlichen Beobachtungen kamen auch andere Arbeitsgruppen, die zum Teil auch in *in vivo* Hypertrophie - Mausmodellen eine Reduzierung für *miR1* bzw. *miR133* feststellen konnten (Care et al., 2007). Allerdings ist die momentane Datenlage zu den meisten microRNAs noch sehr gering, wie auch bei *miR208*, welche einen offensichtlichen Regulator der β MHC - Expression und des kardiologischen Remodelings darstellt und durch ein Intron des α MHC (alpha-Myosin-schwere-Kette) - Gens kodiert wird. Die Expressionsstärke von *miRNA208* konnte bei Mäusen mit einem Bauch-Aorta-Banding nach 21 Tagen nicht vermindert werden, jedoch bewirkte die Blockade des Stoffwechsellhormons T3 durch Propylthiouracil (PTU) in Ratten eine Abnahme der mRNA Konzentration für α MHC, wie auch für die pre-miRNA 208 (van et al., 2007). Das Silencing in unseren PNRK bezog sich allerdings auf die reife *miRNA208*. Neben dem direkten Effekt der Hypertrophie auf die *miRNA208* - Expression könnte ebenfalls ein Rückkopplungsmechanismus von α MHC, welches bei Hypertrophie vermindert exprimiert wird, sich auf die Regulation der microRNA auswirken (Rupp and Maisch, 2002).

Widersprüchlich sind hingegen die Beobachtungen bei der *miR21* - Expression. Während wir *in vitro* durch PE induzierte Hypertrophie eine nahezu vollständige Herunterregulation feststellen konnten, zeigte sich bei *Sayed et al* eine 2 bis 8 fache Steigerung der *miR21* 7 bzw. 14 Tage nach TAC (Transversale-Aorten-Abschnürung) bei Mäusen (*Sayed et al.*, 2007). Es wurde beschrieben, dass *miR21* ebenfalls bei Menschen mit Krebs hochreguliert ist (*Volinia et al.*, 2006) und antiapoptotisch wirkt (*Meng et al.*, 2006; *Chan et al.*, 2005). Durch einen Hypertrophiephänotyp wird sicherlich auch ein gewisser Grad an Apoptose induziert, was eine Expressionssteigerung von *miR21* erklären würde. Aufgrund der nur schwer miteinander vergleichbaren Modellsysteme und der großen Zeitdifferenzen, ist ein schlüssiger Vergleich hier jedoch nur schwer möglich.

Allerdings haben alle die hier untersuchten microRNAs eines gemeinsam, ihre Expressionslevel konnten durch den Einfluss von **AdshPLN_r**, wie auch durch **AAVshPLN_r**, signifikant verändert und passten sich wieder dem in normalen unbehandelten PNRK vorhandenen Niveau an. Somit konnten unsere Untersuchungen erstmalig zeigen, dass kardiologisch relevante, durch Hypertrophie inhibierte microRNAs, durch das Silencing von Phospholamban mit einer PLN-shRNA wieder in den Normbereich zurückgebracht werden konnten. Welche Mechanismen sich dahinter verbergen, ist noch weitestgehend ungeklärt und bedarf weiterer intensiver Untersuchungen. Ein möglicher Ansatzpunkt könnte dabei das nukleäre Karyopherin-Exportin-5 spielen, da es an der Stabilisierung sowohl für shRNAs als auch für miRNAs beteiligt ist und somit einen gemeinsamen Parameter für weitere Untersuchungen bildet (*Grimm et al.*, 2006; *Bohnsack et al.*, 2004; *Yi et al.*, 2003).

Bei den hier durchgeführten Experimenten zur Aufdeckung des Einflusses auf mögliche microRNA Pathways durch shRNAs handelte es sich um Vorexperimente, um so neue denkbare Ansätze für nachfolgende Untersuchungen zu bilden. Da hier gezeigt werden konnte, dass durch ein gezieltes Ausschalten von PLN einzelne kardiologisch, bedeutsame microRNAs in ihren Expressionslevels wiederhergestellt und teilweise gesteigert werden konnten, sollte in weiterführenden Experimenten geklärt werden, ob es sich hierbei um spezifische Effekte handelt.

5. Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz ist eine schwere Herzerkrankung, bei der eine Störung der intramyokardialen Ca^{2+} - Homöostase vorliegt. Eine zentrale Rolle bei der Regulation des intrazellulären Ca^{2+} spielen dabei zwei Regulatorproteine, die Sarkoplasmatische Retikulum Ca-ATPase (SERCA2a) und ihr Antagonist Phospholamban (PLN). Bei Herzinsuffizienz weist die SERCA2a eine verringerte Aktivität auf, weshalb therapeutische Ansätze darauf zielen, diese wieder zu erhöhen. In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene adenovirale und adeno-assoziierte-Virus-(AAV) Vektoren zur Expression einer shRNA gegen PLN konstruiert, mit dem Ziel, PLN spezifisch mittels RNA - Interferenztechnologie herunterzuregulieren, damit die Aktivität der SERCA2a zu erhöhen, um schließlich einen therapeutischen Effekt bei Herzinsuffizienz *in vivo* zu erzielen.

Zunächst konnte in primären neonatalen Rattenkardiomyozyten (PNRK) mit Hilfe des adenoviralen Vektors **AdshPLN_r** ein fast vollständiges Gensilencing erzielt werden. Bereits bei einer geringen Vektordosis wurde ein deutlicher Rückgang der PLN - mRNA Expression beobachtet, die sich mit einer zeitlichen Verzögerung von ein bis zwei Tagen auch auf die Proteinexpression auswirkte und ihr Maximum am Tag 7 erreichte. Die hohe Spezifität der PLN-shRNA konnte sowohl durch eine mitgeführte Kontroll shRNA als auch durch die unveränderten Proteinlevel von ebenfalls an der Ca^{2+} - Homöostase beteiligten Proteinen demonstriert werden. Das PLN - Silencing führte zu einem deutlichen Anstieg der Ca^{2+} - Affinität der SERCA2a.

Mit Hinblick auf den Einsatz der PLN-shRNA *in vivo* am Zielorgan und einer langfristigen therapeutischen Nutzung wurden verschiedene mit einem *self complementary* (sc) Vektor genom versehene AAV6 – Vektorkonstrukte entwickelt, die einen ausgeprägten Herzzelltropismus zeigten. Die sich anschließende systematische Charakterisierung *in vitro* ergab deutliche Unterschiede in ihrer Silencingeffektivität. Außerdem konnte bei diesen Untersuchungen festgestellt werden, dass zusätzliche Polymerase II - Promotor abhängige GFP - Expressionskassetten im viralen Vektor genom einen negativen Einfluss auf die shPLN_r - Expression und der Silencing - Effizienz haben. Von den hier drei näher untersuchten scAAV-shPLN_r - Vektoren, erwies sich der „kleinste“ mit einer Genomlänge von ca. 1 kb ohne weitere Expressionskassetten am effektivsten. Dieser ermöglichte eine ähnlich starke Herunterregulation der PLN-mRNA in PNRK, wie sie mit dem **AdshPLN_r** erzielt wurde. Auf Grundlage dieser erfolgreichen *in vitro* Daten wurde dieses Vektorkonstrukt in einem herzinsuffizienten Rattenmodell *in*

in vivo eingesetzt, wobei allerdings das PLN-shRNA exprimierende Vektorgenom in ein AAV9 Kapsid verpackt wurde, da AAV9-Vektoren im murinen System eine nahezu 100 % Transduktionsrate kardialer Zellen nach systemischer Applikation *in vivo* ermöglichen.

Die Auswertung der hämodynamischen, echokardiografischen als auch der morphologischen Daten konnten erstmals den erfolgreichen Einsatz einer spezifischen shRNA in einem scAAV-Vektorkonstrukt an einem Ratten - Herzinsuffizienzmodell demonstrieren. Das Gensilencing von PLN im kardialen Phänotyp führte sowohl bei **AdshPLN_r** behandelten Tieren als auch mit **scAAV-shPLN_r** zu einer signifikanten Verbesserung aller kardialen Funktionen sowie zu einer Verlängerung der Überlebenszeit. Darüber hinaus zeigten diese Vektoren eine regulierende Wirkung auf im Rahmen der Entwicklung einer kardialen Hypertrophie bedeutsamen microRNAs. So bewirkten die shPLN - Vektoren eine Normalisierung der microRNA Expressionslevel im Vergleich zu hypertrophierten PNRK - Kontrollen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit dieser Arbeit sehr deutlich gezeigt werden konnte, dass die neueste Generation von scAAV - Vektoren in Kombination mit RNA - Interferenz das Potential hat, gentherapeutisch bei Herzinsuffizienz zum Einsatz zu kommen.

6. Summary

Heart failure is characterized by deficiencies in Ca^{2+} regulation linked to contraction/relaxation of the affected ventricles and the single cardiac myocytes. Central players of cardiomyocyte Ca^{2+} regulation are the Ca-ATPase (SERCA2a) of the sarcoplasmic reticulum (SR) and its negative modulator protein Phospholamban (PLN). The function of the latter two SR proteins has been found to be critically dysregulated in failing hearts. Therefore, targeting the expression and function of the SERCA2a-PLB system by novel gene therapeutic approaches is currently a hot topic in cardiovascular research. In the present work different adenovirale (AdV) and adeno-associated-virus- (AAV) vectors expressing PLN-shRNAs in cardiomyocytes were constructed and tested for their silencing PLN potential. The ultimate goal of this RNA interference approaches was to develop a strategy for improving the Ca^{2+} -transporting activity of the SR Ca^{2+} pump in settings of heart failure.

Initially an almost complete PLN gene silencing could be achieved in primary neonatal rat cardiomyocytes (CM) using the adenovirale vector **AdshPLN_r**. Already with a low vector dose a clear decline of the PLN mRNA expression was observed which was linked to subsequent suppressed PLN protein expression. The latter started with a delay of one to two days and reached its maximum at day 7. The silencing affect of this PLN-shRNA was highly specific as verified by both control experiments using control shRNA as well as by the unchanged protein level of other proteins involved in cardiac Ca^{2+} regulation. The functional consequence of PLN silencing was an increase Ca^{2+} - affinity and Ca^{2+} -transporting activity of the SR Ca^{2+} ATPase at submicromolar free Ca^{2+} - concentrations.

In order to use PLN-shRNA for treatment in chronic heart failure in animal models different self complementary (sc) AAV6-vector constructs with distinct heart muscle cell tropism were developed. A systematic characterization of these constructs in cell cultures showed a high silencing effectiveness. It was also found that inclusion of an additional polymerase II promoter-dependending GFP expression cassette into the viral vector genome reduced both the expression of shPLN_r and the silencing efficacy of the respective vector. One out of three extensively characterized scAAV-shPLN_r vectors turned out to exhibit the most effective PLN silencing activity. The genomic length of this vector was approx. 1 kb. It did not contain other expression cassettes. The degree of reduction of PLN mRNA levels in cultures neonatal rat cardiomyocytes caused by this vector was similar to the previously characterized **AdshPLN_r** vector. In addition, the PLN-shRNA expressing

vector genome was also packed into an AAV9 capsid. The latter exhibited a nearly 100 percent heart tropism in mice after systemic vector application.

The therapeutic potential of the latter vector was examined in settings of experimental chronic heart failure due to pressure-overload heart hypertrophy in rats. Hemodynamic, echocardiographic as well as morphological examinations in this model revealed for the first time that PLN gene silencing after treatment with **scAAV-shPLN_r** - but also with either **AdshPLN_r** - improved the contractile dysfunctions of the hypertrophied rat hearts and prolonged the survival time of the animals with pressure-overload heart hypertrophy. Furthermore, the applied viral vectors apparently modulated the expression levels of certain microRNAs linked to pathological cardiac hypertrophy. They caused a normalization of the microRNA expression level in comparison to hypertrophied CM controls.

Thus, this work shows that the investigated scAAV-vector-based RNA-interference technology is a novel and promising gene therapeutic approach for the treatment of chronic heart failure.

7. Ausblick

Die in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse belegen die hohe Spezifität der hier etablierten shPLN_r - RNA und die deutliche Effektivität der verwendeten viralen Vektoren *in vitro* als auch *in vivo*. Trotz des ausgeprägten Herzzelltropismus der AAV9 Vektoren stellt der Anteil einer Fremdexposition in anderen Organen und Geweben noch den limitierenden Faktor dar. Hinzu kommt, dass jegliche Regulationsmechanismen über die Dauer oder Stärke der Expression einer shRNA fehlen. Diese Limitierungen könnten mit einer neuen Generation von sogenannten microRNA - basierten shRNAs (misiRNA) überwunden werden, da hier für die Transkription der shRNA auch gewebsspezifische und pharmakologisch - regulierbare Polymerase II - Promotoren (z.B. herzspezifische MLC und Tet-abhängige Promotoren) verwendet werden können. Erste Experimente zeigten eine zum Teil höhere Silencing Aktivität der misiPLN_r als die konventionelle shPLN_r.

8. Literaturverzeichnis

1. Acland,G.M., Aguirre,G.D., Ray,J., Zhang,Q., Aleman,T.S., Cideciyan,A.V., Pearce-Kelling,S.E., Anand,V., Zeng,Y., Maguire,A.M., Jacobson,S.G., Hauswirth,W.W., and Bennett,J. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat. Genet.* 28, 92-95.
2. Ameis,D. (2000). [Approaches to gene therapy of hepatocellular carcinoma]. *Internist (Berl).* 41, 208-212.
3. Angeletti,P.C. and Engler,J.A. (1998). Adenovirus preterminal protein binds to the CAD enzyme at active sites of viral DNA replication on the nuclear matrix. *J. Virol.* 72, 2896-2904.
4. Anversa,P., Capasso,J.M., Sonnenblick,E.H., and Olivetti,G. (1990). Mechanisms of myocyte and capillary growth in the infarcted heart. *Eur. Heart J. 11 Suppl B:123-32.*, 123-132.
5. Anversa,P., Ricci,R., and Olivetti,G. (1986). Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review. *J. Am. Coll. Cardiol.* 7, 1140-1149.
6. Arai,M., Matsui,H., and Periasamy,M. (1994). Sarcoplasmic reticulum gene expression in cardiac hypertrophy and heart failure. *Circ. Res.* 74, 555-564.
7. Aravind,L. and Koonin,E.V. (2001). A natural classification of ribonucleases. *Methods Enzymol.* 341:3-28., 3-28.
8. Aronin,N. (2006). Target selectivity in mRNA silencing. *Gene Ther.* 13, 509-516.
9. ATCHISON,R.W., CASTO,B.C., and HAMMON,W.M. (1965). ADENOVIRUS-ASSOCIATED DEFECTIVE VIRUS PARTICLES. *Science.* 149:754-6., 754-756.
10. Babu,G.J., Bhupathy,P., Petrashevskaya,N.N., Wang,H., Raman,S., Wheeler,D., Jagatheesan,G., Wiczorek,D., Schwartz,A., Janssen,P.M., Ziolo,M.T., and Periasamy,M. (2006). Targeted overexpression of sarcolipin in the mouse heart decreases sarcoplasmic reticulum calcium transport and cardiac contractility. *J. Biol. Chem.* 281, 3972-3979.
11. Backs,J., Song,K., Bezprozvannaya,S., Chang,S., and Olson,E.N. (2006). CaM kinase II selectively signals to histone deacetylase 4 during cardiomyocyte hypertrophy. *J. Clin. Invest.* 116, 1853-1864.
12. Bartel,D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116, 281-297.
13. Bassani,J.W., Bassani,R.A., and Bers,D.M. (1994). Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J. Physiol.* 476, 279-293.

14. Bauriedel,G., Skowasch,D., Welz,A., and Luderitz,B. (2005). [Postoperative arrhythmias]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* *130*, 1015-1019.
15. Beaton,A., Palumbo,P., and Berns,K.I. (1989). Expression from the adeno-associated virus p5 and p19 promoters is negatively regulated in trans by the rep protein. *J. Virol.* *63*, 4450-4454.
16. Bennett,J. (2003). Immune response following intraocular delivery of recombinant viral vectors. *Gene Ther.* *10*, 977-982.
17. Bergelson,J.M., Cunningham,J.A., Droguett,G., Kurt-Jones,E.A., Krithivas,A., Hong,J.S., Horwitz,M.S., Crowell,R.L., and Finberg,R.W. (1997). Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science.* *275*, 1320-1323.
18. Berget,S.M. and Sharp,P.A. (1977). A spliced sequence at the 5'-terminus of adenovirus late mRNA. *Brookhaven. Symp. Biol.* 332-344.
19. Berk,A.J. and Sharp,P.A. (1978). Structure of the adenovirus 2 early mRNAs. *Cell.* *14*, 695-711.
20. Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* *409*, 363-366.
21. Bers,D.M. (2002). Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference? *J. Mol. Cell Cardiol.* *34*, 369-373.
22. Bers,D.M., Bassani,J.W., and Bassani,R.A. (1996). Na-Ca exchange and Ca fluxes during contraction and relaxation in mammalian ventricular muscle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *779:430-42.*, 430-442.
23. Bers,D.M. and Bridge,J.H. (1989). Relaxation of rabbit ventricular muscle by Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium pump. Ryanodine and voltage sensitivity. *Circ. Res.* *65*, 334-342.
24. Beuckelmann,D.J., Nabauer,M., and Erdmann,E. (1992). Intracellular calcium handling in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *Circulation.* *85*, 1046-1055.
25. Beuckelmann,D.J. and Wier,W.G. (1988). Mechanism of release of calcium from sarcoplasmic reticulum of guinea-pig cardiac cells. *J. Physiol.* *405:233-55.*, 233-255.
26. Blaese,M., Blankenstein,T., Brenner,M., Cohen-Haguenaer,O., Gansbacher,B., Russell,S., Sorrentino,B., and Velu,T. (1995a). Vectors in cancer therapy: how will they deliver? *Cancer Gene Ther.* *2*, 291-297.
27. Blaese,R.M. (1991). Progress toward gene therapy. *Clin. Immunol. Immunopathol.* *61*, S47-S55.
28. Blaese,R.M., Culver,K.W., Miller,A.D., Carter,C.S., Fleisher,T., Clerici,M., Shearer,G., Chang,L., Chiang,Y., Tolstoshev,P., Greenblatt,J.J., Rosenberg,S.A.,

- Klein,H., Berger,M., Mullen,C.A., Ramsey,W.J., Muul,L., Morgan,R.A., and Anderson,W.F. (1995b). T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. %20;270, 475-480.
29. Bluhm,W.F., Kranias,E.G., Dillmann,W.H., and Meyer,M. (2000). Phospholamban: a major determinant of the cardiac force-frequency relationship. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol.* 278, H249-H255.
 30. Bohnsack,M.T., Czaplinski,K., and Gorlich,D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*. 10, 185-191.
 31. Bridge,A.J., Pebernard,S., Ducraux,A., Nicoulaz,A.L., and Iggo,R. (2003). Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* 34, 263-264.
 32. Buller,R.M., Janik,J.E., Sebring,E.D., and Rose,J.A. (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J. Virol.* 40, 241-247.
 33. Cai,X., Hagedorn,C.H., and Cullen,B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 10, 1957-1966.
 34. Carafoli,E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56:395-433., 395-433.
 35. Care,A., Catalucci,D., Felicetti,F., Bonci,D., Addario,A., Gallo,P., Bang,M.L., Segnalini,P., Gu,Y., Dalton,N.D., Elia,L., Latronico,M.V., Hoydal,M., Autore,C., Russo,M.A., Dorn,G.W., Ellingsen,O., Ruiz-Lozano,P., Peterson,K.L., Croce,C.M., Peschle,C., and Condorelli,G. (2007). MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* 13, 613-618.
 36. Carmell,M.A. and Hannon,G.J. (2004). RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 214-218.
 37. Carter,P.J. and Samulski,R.J. (2000). Adeno-associated viral vectors as gene delivery vehicles. *Int. J. Mol. Med.* 6, 17-27.
 38. Cernohorsky,J., Kolar,F., Pelouch,V., Korecky,B., and Vetter,R. (1998). Thyroid control of sarcolemmal Na⁺/Ca²⁺ exchanger and SR Ca²⁺-ATPase in developing rat heart. *Am J Physiol.* 275, H264-H273.
 39. Cerutti,L., Mian,N., and Bateman,A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem. Sci.* 25, 481-482.
 40. Champion,H.C., Georgakopoulos,D., Haldar,S., Wang,L., Wang,Y., and Kass,D.A. (2003). Robust Adenoviral and Adeno-Associated Viral Gene Transfer to the In Vivo Murine Heart: Application to Study of Phospholamban Physiology. *Circulation* 108, 2790-2797.

41. Chan, J.A., Krichevsky, A.M., and Kosik, K.S. (2005). MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res.* *65*, 6029-6033.
42. Chejanovsky, N. and Carter, B.J. (1989). Mutagenesis of an AUG codon in the adeno-associated virus rep gene: effects on viral DNA replication. *Virology.* *173*, 120-128.
43. Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* *436*, 740-744.
44. Cheng, H., Lederer, W.J., and Cannell, M.B. (1993). Calcium sparks: elementary events underlying excitation-contraction coupling in heart muscle. *Science.* *262*, 740-744.
45. Cheung, A.K., Hoggan, M.D., Hauswirth, W.W., and Berns, K.I. (1980). Integration of the adeno-associated virus genome into cellular DNA in latently infected human Detroit 6 cells. *J. Virol.* *33*, 739-748.
46. Chiorini, J.A., Afione, S., and Kotin, R.M. (1999). Adeno-associated virus (AAV) type 5 Rep protein cleaves a unique terminal resolution site compared with other AAV serotypes. *J. Virol.* *73*, 4293-4298.
47. Chiorini, J.A., Weitzman, M.D., Owens, R.A., Urcelay, E., Safer, B., and Kotin, R.M. (1994). Biologically active Rep proteins of adeno-associated virus type 2 produced as fusion proteins in *Escherichia coli*. *J. Virol.* *68*, 797-804.
48. Chirmule, N., Probert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R., and Wilson, J. (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther.* *6*, 1574-1583.
49. Chiu, Y.L. and Rana, T.M. (2002). RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol. Cell.* *10*, 549-561.
50. Choi, V.W., Samulski, R.J., and McCarty, D.M. (2005). Effects of adeno-associated virus DNA hairpin structure on recombination. *J. Virol.* *79*, 6801-6807.
51. Chomczynski, P. and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* *1*, 581-585.
52. Chow, L.T., Gelinis, R.E., Broker, T.R., and Roberts, R.J. (1977). An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell.* *12*, 1-8.
53. Cleland, J.G., Cohen-Solal, A., Aguilar, J.C., Dietz, R., Eastaugh, J., Follath, F., Freemantle, N., Gavazzi, A., van Gilst, W.H., Hobbs, F.D., Korewicki, J., Madeira, H.C., Preda, I., Swedberg, K., and Widimsky, J. (2002). Management of heart failure in primary care (the IMPROVEMENT of Heart Failure Programme): an international survey. *Lancet.* *360*, 1631-1639.

54. Colyer, J. (1993). Control of the calcium pump of cardiac sarcoplasmic reticulum. A specific role for the pentameric structure of phospholamban? *Cardiovasc. Res* 27, 1766-1771.
55. Colyer, J. and Wang, J.H. (1991). Dependence of cardiac sarcoplasmic reticulum calcium pump activity on the phosphorylation status of phospholamban. *J. Biol. Chem.* 266, 17486-17493.
56. Conrad, C., Miller, C.R., Ji, Y., Gomez-Manzano, C., Bharara, S., McMurray, J.S., Lang, F.F., Wong, F., Sawaya, R., Yung, W.K., and Fueyo, J. (2005). Delta24-hyCD adenovirus suppresses glioma growth in vivo by combining oncolysis and chemosensitization. *Cancer Gene Ther* ..
57. Daniels, D.M., Shen, W.Y., Constable, I.J., and Rakoczy, P.E. (2003). Quantitative model demonstrating that recombinant adeno-associated virus and green fluorescent protein are non-toxic to the rat retina. *Clin. Experiment. Ophthalmol.* 31, 439-444.
58. Davison, A.J., Benko, M., and Harrach, B. (2003). Genetic content and evolution of adenoviruses. *J Gen Virol* 84, 2895-2908.
59. de la Fuente, C.R., Hermida, A.A., Pazo, N.M., and Lado, L.F. (2007). [Epidemiology of heart failure. Ratio of epidemic.]. *An. Med. Interna.* 24, 500-504.
60. de la, B.D., Levitsky, D., Rappaport, L., Mercadier, J.J., Marotte, F., Wisnewsky, C., Brovkovich, V., Schwartz, K., and Lompre, A.M. (1990). Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca²⁺(+)-ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat. *Circ. Res.* 66, 554-564.
61. De, B., Heguy, A., Leopold, P.L., Wasif, N., Korst, R.J., Hackett, N.R., and Crystal, R.G. (2004). Intrapleural administration of a serotype 5 adeno-associated virus coding for alpha1-antitrypsin mediates persistent, high lung and serum levels of alpha1-antitrypsin. *Mol. Ther.* 10, 1003-1010.
62. de, F.A., Vornlocher, H.P., Maraganore, J., and Lieberman, J. (2007). Interfering with disease: a progress report on siRNA-based therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 6, 443-453.
63. Dedieu, J.F., Vigne, E., Torrent, C., Jullien, C., Mahfouz, I., Caillaud, J.M., Aubailly, N., Orsini, C., Guillaume, J.M., Opolon, P., Delaere, P., Perricaudet, M., and Yeh, P. (1997). Long-term gene delivery into the livers of immunocompetent mice with E1/E4-defective adenoviruses. *J. Virol.* 71, 4626-4637.
64. del Monte, F., Harding, S.E., Dec, G.W., Gwathmey, J.K., and Hajjar, R.J. (2002). Targeting phospholamban by gene transfer in human heart failure. *Circulation.* 105, 904-907.
65. Del, M.F., Butler, K., Boecker, W., Gwathmey, J.K., and Hajjar, R.J. (2002). Novel technique of aortic banding followed by gene transfer during hypertrophy and heart failure. *Physiol Genomics.* 9, 49-56.

66. Dieterle,T., Meyer,M., Gu,Y., Belke,D.D., Swanson,E., Iwatate,M., Hollander,J., Peterson,K.L., Ross,J., Jr., and Dillmann,W.H. (2005). Gene transfer of a phospholamban-targeted antibody improves calcium handling and cardiac function in heart failure. *Cardiovasc. Res.* *67*, 678-688.
67. Doench,J.G., Petersen,C.P., and Sharp,P.A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev.* *17*, 438-442.
68. Duan,D., Sharma,P., Yang,J., Yue,Y., Dudus,L., Zhang,Y., Fisher,K.J., and Engelhardt,J.F. (1998). Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J. Virol.* *72*, 8568-8577.
69. Duan,D., Yue,Y., Yan,Z., and Engelhardt,J.F. (2000). A new dual-vector approach to enhance recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression through intermolecular cis activation. *Nat. Med.* *6*, 595-598.
70. Dubielzig,R., King,J.A., Weger,S., Kern,A., and Kleinschmidt,J.A. (1999). Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsidation complexes. *J. Virol.* *73*, 8989-8998.
71. Dzau,V.J. (1992). Angiotensin converting enzyme inhibitors and the cardiovascular system. *J. Hypertens. Suppl.* *10*, S3-10.
72. Eck,S.L., Alavi,J.B., Alavi,A., Davis,A., Hackney,D., Judy,K., Mollman,J., Phillips,P.C., Wheeldon,E.B., and Wilson,J.M. (1996). Treatment of advanced CNS malignancies with the recombinant adenovirus H5.010RSVTK: a phase I trial. *Hum. Gene Ther.* *7*, 1465-1482.
73. Eizema,K., Fechner,H., Bezstarosti,K., Schneider-Rasp,S., van der Laarse,A., Wang,H., Schultheiss,H.P., Poller,W.C., and Lamers,J.M. (2000). 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* *101*, 2193-2199.
74. Elbashir,S.M., Harborth,J., Lendeckel,W., Yalcin,A., Weber,K., and Tuschl,T. (2001a). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494-498.
75. Elbashir,S.M., Harborth,J., Weber,K., and Tuschl,T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods.* *26*, 199-213.
76. Elbashir,S.M., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001b). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* *15*, 188-200.
77. Engelhardt,J.F., Ye,X., Doranz,B., and Wilson,J.M. (1994). Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 6196-6200.
78. Eriksson,H. (1995). Heart failure: a growing public health problem. *J. Intern. Med.* *237*, 135-141.

79. Evans,C.H., Gouze,E., Gouze,J.N., Robbins,P.D., and Ghivizzani,S.C. (2006). Gene therapeutic approaches-transfer in vivo. *Adv. Drug Deliv. Rev.* %20;58, 243-258.
80. Fabiato,A. and Fabiato,F. (1975). Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J. Physiol.* 249, 469-495.
81. Fabry,C.M., Rosa-Calatrava,M., Conway,J.F., Zubieta,C., Cusack,S., Ruigrok,R.W., and Schoehn,G. (2005). A quasi-atomic model of human adenovirus type 5 capsid. *EMBO J.* 24, 1645-1654.
82. Fechner,H., Suckau,L., Kurreck,J., Sipo,I., Wang,X., Pinkert,S., Loschen,S., Rekkittke,J., Weger,S., Dekkers,D., Vetter,R., Erdmann,V.A., Schultheiss,H.P., Paul,M., Lamers,J., and Poller,W. (2007). Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban. *Gene Ther.* 14, 211-218.
83. Feldman,A.M., Weinberg,E.O., Ray,P.E., and Lorell,B.H. (1993). Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ. Res.* 73, 184-192.
84. Ferrari,F.K., Samulski,T., Shenk,T., and Samulski,R.J. (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J. Virol.* 70, 3227-3234.
85. Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* %19;391, 806-811.
86. Fisher,K.J., Jooss,K., Alston,J., Yang,Y., Haecker,S.E., High,K., Pathak,R., Raper,S.E., and Wilson,J.M. (1997). Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat. Med.* 3, 306-312.
87. French,B.A., Mazur,W., Geske,R.S., and Bolli,R. (1994). Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors. *Circulation.* 90, 2414-2424.
88. Garvey,J.L., Kranias,E.G., and Solaro,R.J. (1988). Phosphorylation of C-protein, troponin I and phospholamban in isolated rabbit hearts. *Biochem J* 249, 709-714.
89. Gianni,D., Chan,J., Gwathmey,J.K., Del,M.F., and Hajjar,R.J. (2005). SERCA2a in heart failure: role and therapeutic prospects. *J. Bioenerg. Biomembr.* 37, 375-380.
90. Gil,J. and Esteban,M. (2000). Induction of apoptosis by the dsRNA-dependent protein kinase (PKR): mechanism of action. *Apoptosis.* 5, 107-114.
91. Gilgenkrantz,H., Duboc,D., Juillard,V., Couton,D., Pavirani,A., Guillet,J.G., Briand,P., and Kahn,A. (1995). Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation adenoviral vectors: role of the immune response. *Hum. Gene Ther.* 6, 1265-1274.

92. Ginsberg,H.S. (1999). The life and times of adenoviruses. *Adv. Virus Res.* 54:1-13., 1-13.
93. Goldman,S. and Roy,N. (2000). Reply to "Human neural progenitor cells: better blue than green?". *Nat. Med.* 6, 483-484.
94. Goncalves,M.A. (2005). Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Viol. J.* 2:43., 43.
95. Gorziglia,M.I., Lapcevich,C., Roy,S., Kang,Q., Kadan,M., Wu,V., Pechan,P., and Kaleko,M. (1999). Generation of an adenovirus vector lacking E1, e2a, E3, and all of E4 except open reading frame 3. *J. Virol.* 73, 6048-6055.
96. Gregorevic,P., Blankinship,M.J., Allen,J.M., Crawford,R.W., Meuse,L., Miller,D.G., Russell,D.W., and Chamberlain,J.S. (2004). Systemic delivery of genes to striated muscles using adeno-associated viral vectors. *Nat. Med.* 10, 828-834.
97. Gregory,R.I., Yan,K.P., Amuthan,G., Chendrimada,T., Doratotaj,B., Cooch,N., and Shiekhattar,R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 432, 235-240.
98. Griffiths-Jones,S., Grocock,R.J., van,D.S., Bateman,A., and Enright,A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res.* 34, D140-D144.
99. Grimm,D. and Kay,M.A. (2003). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr. Gene Ther.* 3, 281-304.
100. Grimm,D., Streetz,K.L., Jopling,C.L., Storm,T.A., Pandey,K., Davis,C.R., Marion,P., Salazar,F., and Kay,M.A. (2006). Fatality in mice due to oversaturation of cellular microRNA/short hairpin RNA pathways. *Nature.* 441, 537-541.
101. Grishok,A., Pasquinelli,A.E., Conte,D., Li,N., Parrish,S., Ha,I., Baillie,D.L., Fire,A., Ruvkun,G., and Mello,C.C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* 106, 23-34.
102. Guzman,R.J., Lemarchand,P., Crystal,R.G., Epstein,S.E., and Finkel,T. (1993). Efficient and selective adenovirus-mediated gene transfer into vascular neointima. *Circulation.* 88, 2838-2848.
103. Gwathmey,J.K., Copelas,L., MacKinnon,R., Schoen,F.J., Feldman,M.D., Grossman,W., and Morgan,J.P. (1987). Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ. Res.* 61, 70-76.
104. Gwathmey,J.K., Slawsky,M.T., Hajjar,R.J., Briggs,G.M., and Morgan,J.P. (1990). Role of intracellular calcium handling in force-interval relationships of human ventricular myocardium. *J. Clin. Invest.* 85, 1599-1613.
105. Haase,A.D., Jaskiewicz,L., Zhang,H., Laine,S., Sack,R., Gatignol,A., and Filipowicz,W. (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus

- expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 6, 961-967.
106. Haghghi,K., Kolokathis,F., Gramolini,A.O., Waggoner,J.R., Pater,L., Lynch,R.A., Fan,G.C., Tsiapras,D., Parekh,R.R., Dorn,G.W., MacLennan,D.H., Kremastinos,D.T., and Kranias,E.G. (2006). A mutation in the human phospholamban gene, deleting arginine 14, results in lethal, hereditary cardiomyopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 1388-1393.
 107. Haghghi,K., Kolokathis,F., Pater,L., Lynch,R.A., Asahi,M., Gramolini,A.O., Fan,G.C., Tsiapras,D., Hahn,H.S., Adamopoulos,S., Liggett,S.B., Dorn,G.W., MacLennan,D.H., Kremastinos,D.T., and Kranias,E.G. (2003). Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin. Invest* 111, 869-876.
 108. Hajjar,R.J., Kang,J.X., Gwathmey,J.K., and Rosenzweig,A. (1997a). Physiological effects of adenoviral gene transfer of sarcoplasmic reticulum calcium ATPase in isolated rat myocytes. *Circulation* 95, 423-429.
 109. Hajjar,R.J., Schmidt,U., Kang,J.X., Matsui,T., and Rosenzweig,A. (1997b). Adenoviral gene transfer of phospholamban in isolated rat cardiomyocytes. Rescue effects by concomitant gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase. *Circ Res* 81, 145-153.
 110. Hamilton,A.J. and Baulcombe,D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 286, 950-952.
 111. Hasenfuss,G. (1998). Alterations of calcium-regulatory proteins in heart failure. *Cardiovasc. Res.* 37, 279-289.
 112. Hasenfuss,G., Reinecke,H., Studer,R., Meyer,M., Pieske,B., Holtz,J., Holubarsch,C., Posival,H., Just,H., and Drexler,H. (1994). Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ. Res.* 75, 434-442.
 113. Hassan,A., Tian,Y., Zheng,W., Ji,H., Sandberg,K., and Verbalis,J.G. (2005). Small interfering RNA-mediated functional silencing of vasopressin V2 receptors in the mouse kidney. *Physiol Genomics.* 21, 382-388.
 114. Hassani,Z., Francois,J.C., Alfama,G., Dubois,G.M., Paris,M., Giovannangeli,C., and Demeneix,B.A. (2007). A hybrid CMV-H1 construct improves efficiency of PEI-delivered shRNA in the mouse brain. *Nucleic Acids Res.* 35, e65.
 115. Hatfield,L. and Hearing,P. (1993). The NFIII/OCT-1 binding site stimulates adenovirus DNA replication in vivo and is functionally redundant with adjacent sequences. *J. Virol.* 67, 3931-3939.
 116. He,H., Meyer,M., Martin,J.L., McDonough,P.M., Ho,P., Lou,X., Lew,W.Y., Hilal-Dandan,R., and Dillmann,W.H. (1999). Effects of mutant and antisense RNA of phospholamban on SR Ca(2+)-ATPase activity and cardiac myocyte contractility. *Circulation.* 100, 974-980.

117. He,L. and Hannon,G.J. (2004). MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat. Rev. Genet.* 5, 522-531.
118. Hernandez,Y.J., Wang,J., Kearns,W.G., Loiler,S., Poirier,A., and Flotte,T.R. (1999). Latent adeno-associated virus infection elicits humoral but not cell-mediated immune responses in a nonhuman primate model. *J. Virol.* 73, 8549-8558.
119. Higuchi,R., Dollinger,G., Walsh,P.S., and Griffith,R. (1992). Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N. Y.)*. 10, 413-417.
120. Higuchi,R., Fockler,C., Dollinger,G., and Watson,R. (1993). Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology (N. Y.)*. 11, 1026-1030.
121. Hitt,M.M. and Graham,F.L. (2000). Adenovirus vectors for human gene therapy. *Adv. Virus Res.* 55:479-505., 479-505.
122. Hobai,I.A. and O'Rourke,B. (2001). Decreased sarcoplasmic reticulum calcium content is responsible for defective excitation-contraction coupling in canine heart failure. *Circulation.* %20;103, 1577-1584.
123. Holland,P.M., Abramson,R.D., Watson,R., and Gelfand,D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7276-7280.
124. Hoppe,U.C., Bohm,M., Dietz,R., Hanrath,P., Kroemer,H.K., Osterspey,A., Schmalz,A.A., and Erdmann,E. (2005). [Guidelines for therapy of chronic heart failure]. *Z. Kardiol.* 94, 488-509.
125. Hoshijima,M., Ikeda,Y., Iwanaga,Y., Minamisawa,S., Date,M.O., Gu,Y., Iwatate,M., Li,M., Wang,L., Wilson,J.M., Wang,Y., Ross,J., Jr., and Chien,K.R. (2002). Chronic suppression of heart-failure progression by a pseudophosphorylated mutant of phospholamban via in vivo cardiac rAAV gene delivery. *Nat. Med.* 8, 864-871.
126. Huang,W.Y., Aramburu,J., Douglas,P.S., and Izumo,S. (2000). Transgenic expression of green fluorescence protein can cause dilated cardiomyopathy. *Nat. Med.* 6, 482-483.
127. Hunt,S.A., Abraham,W.T., Chin,M.H., Feldman,A.M., Francis,G.S., Ganiats,T.G., Jessup,M., Konstam,M.A., Mancini,D.M., Michl,K., Oates,J.A., Rahko,P.S., Silver,M.A., Stevenson,L.W., Yancy,C.W., Antman,E.M., Smith,S.C., Jr., Adams,C.D., Anderson,J.L., Faxon,D.P., Fuster,V., Halperin,J.L., Hiratzka,L.F., Jacobs,A.K., Nishimura,R., Ornato,J.P., Page,R.L., and Riegel,B. (2005). ACC/AHA 2005 Guideline Update for the Diagnosis and Management of Chronic Heart Failure in the Adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure): developed in collaboration with the American College of Chest Physicians and the International Society for Heart and Lung

- Transplantation: endorsed by the Heart Rhythm Society. *Circulation*. 20;112, e154-e235.
128. Hutvagner,G., McLachlan,J., Pasquinelli,A.E., Balint,E., Tuschl,T., and Zamore,P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*. 293, 834-838.
 129. Hutvagner,G. and Zamore,P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science*. 297, 2056-2060.
 130. Im,D.S. and Muzyczka,N. (1990). The AAV origin binding protein Rep68 is an ATP-dependent site-specific endonuclease with DNA helicase activity. *Cell*. 61, 447-457.
 131. Inagaki,K., Fuess,S., Storm,T.A., Gibson,G.A., Mctiernan,C.F., Kay,M.A., and Nakai,H. (2006). Robust systemic transduction with AAV9 vectors in mice: efficient global cardiac gene transfer superior to that of AAV8. *Mol. Ther.* 14, 45-53.
 132. Iwanaga,Y., Hoshijima,M., Gu,Y., Iwatate,M., Dieterle,T., Ikeda,Y., Date,M.O., Chrast,J., Matsuzaki,M., Peterson,K.L., Chien,K.R., and Ross,J., Jr. (2004). Chronic phospholamban inhibition prevents progressive cardiac dysfunction and pathological remodeling after infarction in rats. *J Clin Invest*. 113, 727-736.
 133. Iyengar,R. (1993). Multiple families of Gs-regulated adenylyl cyclases. *Adv. Second Messenger Phosphoprotein Res.* 28:27-36., 27-36.
 134. Jackson,A.L., Bartz,S.R., Schelter,J., Kobayashi,S.V., Burchard,J., Mao,M., Li,B., Cavet,G., and Linsley,P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21, 635-637.
 135. Jooss,K., Yang,Y., Fisher,K.J., and Wilson,J.M. (1998). Transduction of dendritic cells by DNA viral vectors directs the immune response to transgene products in muscle fibers. *J. Virol.* 72, 4212-4223.
 136. Kadambi,V.J., Ponniah,S., Harrer,J.M., Hoit,B.D., Dorn,G.W., Walsh,R.A., and Kranias,E.G. (1996). Cardiac-specific overexpression of phospholamban alters calcium kinetics and resultant cardiomyocyte mechanics in transgenic mice. *J. Clin. Invest.* 97, 533-539.
 137. Kagaya,Y., Hajjar,R.J., Gwathmey,J.K., Barry,W.H., and Lorell,B.H. (1996). Long-term angiotensin-converting enzyme inhibition with fosinopril improves depressed responsiveness to Ca²⁺ in myocytes from aortic-banded rats. *Circulation*. 94, 2915-2922.
 138. Kannel,W.B. (2000). Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail. Rev.* 5, 167-173.
 139. Kaplitt,M.G., Feigin,A., Tang,C., Fitzsimons,H.L., Mattis,P., Lawlor,P.A., Bland,R.J., Young,D., Strybing,K., Eidelberg,D., and During,M.J. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. *Lancet*. 369, 2097-2105.

140. Kaspar,B.K., Roth,D.M., Lai,N.C., Drumm,J.D., Erickson,D.A., McKirnan,M.D., and Hammond,H.K. (2005). Myocardial gene transfer and long-term expression following intracoronary delivery of adeno-associated virus. *J Gene Med.* 7, 316-324.
141. Kass-Eisler,A., Falck-Pedersen,E., Alvira,M., Rivera,J., Buttrick,P.M., Wittenberg,B.A., Cipriani,L., and Leinwand,L.A. (1993). Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 11498-11502.
142. Kato,T., Noda,A., Izawa,H., Nishizawa,T., Somura,F., Yamada,A., Nagata,K., Iwase,M., Nakao,A., and Yokota,M. (2003). Myocardial velocity gradient as a noninvasively determined index of left ventricular diastolic dysfunction in patients with hypertrophic cardiomyopathy. *J. Am. Coll. Cardiol.* 42, 278-285.
143. Kaye,D.M., Hoshijima,M., and Chien,K.R. (2008). Reversing Advanced Heart Failure by Targeting Ca(2+) Cycling. *Annu. Rev. Med.* 59:13-28., 13-28.
144. Ketting,R.F., Fischer,S.E., Bernstein,E., Sijen,T., Hannon,G.J., and Plasterk,R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654-2659.
145. Kim,H.W., Steenaart,N.A., Ferguson,D.G., and Kranias,E.G. (1990). Functional reconstitution of the cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2(+)-ATPase with phospholamban in phospholipid vesicles. *J. Biol. Chem.* 265, 1702-1709.
146. King,J.A., Dubielzig,R., Grimm,D., and Kleinschmidt,J.A. (2001). DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* 20, 3282-3291.
147. Kirchberger,M.A., Tada,M., and Katz,A.M. (1974). Adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase-catalyzed phosphorylation reaction and its relationship to calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 249, 6166-6173.
148. Kiss,E., Ball,N.A., Kranias,E.G., and Walsh,R.A. (1995). Differential changes in cardiac phospholamban and sarcoplasmic reticular Ca(2+)-ATPase protein levels. Effects on Ca2+ transport and mechanics in compensated pressure-overload hypertrophy and congestive heart failure. *Circ. Res.* 77, 759-764.
149. Klein,R.L., Dayton,R.D., Leidenheimer,N.J., Jansen,K., Golde,T.E., and Zweig,R.M. (2006). Efficient neuronal gene transfer with AAV8 leads to neurotoxic levels of tau or green fluorescent proteins. *Mol. Ther.* 13, 517-527.
150. Koss,K.L., Grupp,I.L., and Kranias,E.G. (1997). The relative phospholamban and SERCA2 ratio: a critical determinant of myocardial contractility. *Basic Res Cardiol.* 92 Suppl 1:17-24., 17-24.
151. Kotin,R.M., Siniscalco,M., Samulski,R.J., Zhu,X.D., Hunter,L., Laughlin,C.A., McLaughlin,S., Muzyczka,N., Rocchi,M., and Berns,K.I. (1990). Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 2211-2215.

152. Kozlowski,R.Z., Goodstadt,L.J., Twist,V.W., and Powell,T. (1994). Modulation of cardiac L-type Ca^{2+} channels by GTP gamma S in response to isoprenaline, forskolin and photoreleased nucleotides. *Br. J. Pharmacol.* *111*, 250-258.
153. Kranias,E.G. and Solaro,R.J. (1982). Phosphorylation of troponin I and phospholamban during catecholamine stimulation of rabbit heart. *Nature* *298*, 182-184.
154. Kubo,H., Margulies,K.B., Piacentino,V., III, Gaughan,J.P., and Houser,S.R. (2001). Patients with end-stage congestive heart failure treated with beta-adrenergic receptor antagonists have improved ventricular myocyte calcium regulatory protein abundance. *Circulation.* *104*, 1012-1018.
155. Kuhn,R. and Schwenk,F. (1997). Advances in gene targeting methods. *Curr. Opin. Immunol.* *9*, 183-188.
156. Kusenda,B., Mraz,M., Mayer,J., and Pospisilova,S. (2006). MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* *150*, 205-215.
157. Lagos-Quintana,M., Rauhut,R., Lendeckel,W., and Tuschl,T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* *294*, 853-858.
158. Lagos-Quintana,M., Rauhut,R., Meyer,J., Borkhardt,A., and Tuschl,T. (2003). New microRNAs from mouse and human. *RNA.* *9*, 175-179.
159. Lau,N.C., Lim,L.P., Weinstein,E.G., and Bartel,D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* *294*, 858-862.
160. Lee,R.C. and Ambros,V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* *294*, 862-864.
161. Lee,Y., Jeon,K., Lee,J.T., Kim,S., and Kim,V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663-4670.
162. Lewis,D.L., Hagstrom,J.E., Loomis,A.G., Wolff,J.A., and Herweijer,H. (2002). Efficient delivery of siRNA for inhibition of gene expression in postnatal mice. *Nat. Genet.* *32*, 107-108.
163. Lindemann,J.P. (1986). Alpha-adrenergic stimulation of sarcolemmal protein phosphorylation and slow responses in intact myocardium. *J. Biol. Chem.* *261*, 4860-4867.
164. Lindemann,J.P., Jones,L.R., Hathaway,D.R., Henry,B.G., and Watanabe,A.M. (1983). beta-Adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} -ATPase activity in guinea pig ventricles. *J. Biol. Chem.* *258*, 464-471.
165. Lindemann,J.P. and Watanabe,A.M. (1985). Phosphorylation of phospholamban in intact myocardium. Role of Ca^{2+} -calmodulin-dependent mechanisms. *J. Biol. Chem.* *260*, 4516-4525.

166. Lindner,M., Erdmann,E., and Beuckelmann,D.J. (1998). Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* *30*, 743-749.
167. Liu,H.S., Jan,M.S., Chou,C.K., Chen,P.H., and Ke,N.J. (1999). Is green fluorescent protein toxic to the living cells? *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *260*, 712-717.
168. Liu,J., Valencia-Sanchez,M.A., Hannon,G.J., and Parker,R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* *7*, 719-723.
169. Livak,K.J. and Schmittgen,T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* *25*, 402-408.
170. Loiler,S.A., Conlon,T.J., Song,S., Tang,Q., Warrington,K.H., Agarwal,A., Kapturczak,M., Li,C., Ricordi,C., Atkinson,M.A., Muzyczka,N., and Flotte,T.R. (2003). Targeting recombinant adeno-associated virus vectors to enhance gene transfer to pancreatic islets and liver. *Gene Ther.* *10*, 1551-1558.
171. Lompre,A.M., Anger,M., and Levitsky,D. (1994). Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *J Mol Cell Cardiol* *26*, 1109-1121.
172. Louis,C.F., Turnquist,J., and Jarvis,B. (1987). Phospholamban stoichiometry in canine cardiac muscle sarcoplasmic reticulum. *Neurochem. Res.* *12*, 937-941.
173. Lund,E., Guttinger,S., Calado,A., Dahlberg,J.E., and Kutay,U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science.* *303*, 95-98.
174. Luo,W., Grupp,I.L., Harrer,J., Ponniah,S., Grupp,G., Duffy,J.J., Doetschman,T., and Kranias,E.G. (1994). Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of beta-agonist stimulation. *Circ. Res.* *75*, 401-409.
175. Lusby,E.W. and Berns,K.I. (1982). Mapping of the 5' termini of two adeno-associated virus 2 RNAs in the left half of the genome. *J. Virol.* *41*, 518-526.
176. Lusky,M., Christ,M., Rittner,K., Dieterle,A., Dreyer,D., Mourot,B., Schultz,H., Stoeckel,F., Pavirani,A., and Mehtali,M. (1998). In vitro and in vivo biology of recombinant adenovirus vectors with E1, E1/E2A, or E1/E4 deleted. *J. Virol.* *72*, 2022-2032.
177. Maier,L.S., Brandes,R., Pieske,B., and Bers,D.M. (1998). Effects of left ventricular hypertrophy on force and Ca²⁺ handling in isolated rat myocardium. *Am. J. Physiol.* *274*, H1361-H1370.
178. Manche,L., Green,S.R., Schmedt,C., and Mathews,M.B. (1992). Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol. Cell Biol.* *12*, 5238-5248.

179. Manno,C.S., Chew,A.J., Hutchison,S., Larson,P.J., Herzog,R.W., Arruda,V.R., Tai,S.J., Ragni,M.V., Thompson,A., Ozelo,M., Couto,L.B., Leonard,D.G., Johnson,F.A., McClelland,A., Scallan,C., Skarsgard,E., Flake,A.W., Kay,M.A., High,K.A., and Glader,B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. *Blood*. *101*, 2963-2972.
180. Martinez,J., Patkaniowska,A., Urlaub,H., Luhrmann,R., and Tuschl,T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell*. *110*, 563-574.
181. Mathias,P., Wickham,T., Moore,M., and Nemerow,G. (1994). Multiple adenovirus serotypes use alpha v integrins for infection. *J. Virol.* *68*, 6811-6814.
182. Matranga,C., Tomari,Y., Shin,C., Bartel,D.P., and Zamore,P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*. *123*, 607-620.
183. McCarty,D.M., Fu,H., Monahan,P.E., Toulson,C.E., Naik,P., and Samulski,R.J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* *10*, 2112-2118.
184. McCarty,D.M., Monahan,P.E., and Samulski,R.J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* *8*, 1248-1254.
185. McCarty,D.M., Pereira,D.J., Zolotukhin,I., Zhou,X., Ryan,J.H., and Muzyczka,N. (1994). Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus Rep protein. *J. Virol.* *68*, 4988-4997.
186. McLaughlin,S.K., Collis,P., Hermonat,P.L., and Muzyczka,N. (1988). Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J. Virol.* *62*, 1963-1973.
187. McManus,M.T. and Sharp,P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* *3*, 737-747.
188. McMurray,J. (1996). Concise Guide to the Management of Heart Failure - World Health Organization/Council on Geriatric Cardiology Task Force on Heart Failure Education. *Am. J. Geriatr. Cardiol.* *5*, 13-30.
189. Meng,F., Henson,R., Lang,M., Wehbe,H., Maheshwari,S., Mendell,J.T., Jiang,J., Schmittgen,T.D., and Patel,T. (2006). Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. *130*, 2113-2129.
190. Merten,O.W., Geny-Fiamma,C., and Douar,A.M. (2005). Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Ther.* *12 Suppl 1:S51-61.*, S51-S61.
191. Metzger,D. and Feil,R. (1999). Engineering the mouse genome by site-specific recombination. *Curr. Opin. Biotechnol.* *10*, 470-476.

192. Meurs,E., Chong,K., Galabru,J., Thomas,N.S., Kerr,I.M., Williams,B.R., and Hovanessian,A.G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell.* 62, 379-390.
193. Meyer,M., Belke,D.D., Trost,S.U., Swanson,E., Dieterle,T., Scott,B., Cary,S.P., Ho,P., Bluhm,W.F., McDonough,P.M., Silverman,G.J., and Dillmann,W.H. (2004). A recombinant antibody increases cardiac contractility by mimicking phospholamban phosphorylation. *FASEB J.* 18, 1312-1314.
194. Meyer,M., Schillinger,W., Pieske,B., Holubarsch,C., Heilmann,C., Posival,H., Kuwajima,G., Mikoshiba,K., Just,H., Hasenfuss,G., and . (1995). Alterations of sarcoplasmic reticulum proteins in failing human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* 92, 778-784.
195. Mian,I.S. (1997). Comparative sequence analysis of ribonucleases HII, III, II PH and D. *Nucleic Acids Res.* 25, 3187-3195.
196. Minamisawa,S., Hoshijima,M., Chu,G., Ward,C.A., Frank,K., Gu,Y., Martone,M.E., Wang,Y., Ross,J., Jr., Kranias,E.G., Giles,W.R., and Chien,K.R. (1999). Chronic phospholamban-sarcoplasmic reticulum calcium ATPase interaction is the critical calcium cycling defect in dilated cardiomyopathy. *Cell.* 99, 313-322.
197. Monahan,P.E. and Samulski,R.J. (2000). AAV vectors: is clinical success on the horizon? *Gene Ther.* 7, 24-30.
198. Morgan,J.P. (1991). Abnormal intracellular modulation of calcium as a major cause of cardiac contractile dysfunction. *N. Engl. J. Med.* 325, 625-632.
199. Morrissey,D.V., Lockridge,J.A., Shaw,L., Blanchard,K., Jensen,K., Breen,W., Hartsough,K., Machermer,L., Radka,S., Jadhav,V., Vaish,N., Zinnen,S., Vargeese,C., Bowman,K., Shaffer,C.S., Jeffs,L.B., Judge,A., MacLachlan,I., and Polisky,B. (2005). Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* 23, 1002-1007.
200. Morsy,M.A., Gu,M., Motzel,S., Zhao,J., Lin,J., Su,Q., Allen,H., Franlin,L., Parks,R.J., Graham,F.L., Kochanek,S., Bett,A.J., and Caskey,C.T. (1998). An adenoviral vector deleted for all viral coding sequences results in enhanced safety and extended expression of a leptin transgene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 7866-7871.
201. Most,P., Pleger,S.T., Volkers,M., Heidt,B., Boerries,M., Weichenhan,D., Loffler,E., Janssen,P.M., Eckhart,A.D., Martini,J., Williams,M.L., Katus,H.A., Remppis,A., and Koch,W.J. (2004). Cardiac adenoviral S100A1 gene delivery rescues failing myocardium. *J Clin Invest.* 114, 1550-1563.
202. Muller,O.J., Leuchs,B., Pleger,S.T., Grimm,D., Franz,W.M., Katus,H.A., and Kleinschmidt,J.A. (2006). Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc. Res.* 70, 70-78.

203. Mundina de,W.C., Vittone,L., de,C.G., and Mattiazzi,A. (1987). Dissociation between contraction and relaxation: the possible role of phospholamban phosphorylation. *Basic Res. Cardiol.* 82, 507-516.
204. Muruve,D.A. (2004). The innate immune response to adenovirus vectors. *Hum. Gene Ther.* 15, 1157-1166.
205. Muzyczka, N. and Berns K. I. Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. . In: D.M. Knipe and P.M. Howley (Eds), *Fields Virology.* 2327-2359. 2001. Ref Type: Generic
206. Myers,T.W. and Gelfand,D.H. (1991). Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase. *Biochemistry.* 30, 7661-7666.
207. Nakai,H., Iwaki,Y., Kay,M.A., and Couto,L.B. (1999). Isolation of recombinant adeno-associated virus vector-cellular DNA junctions from mouse liver. *J. Virol.* 73, 5438-5447.
208. Napoli,C., Lemieux,C., and Jorgensen,R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* 2, 279-289.
209. Nemerow,G.R. and Stewart,P.L. (1999). Role of alpha(v) integrins in adenovirus cell entry and gene delivery. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 725-734.
210. Odermatt,A., Kurzydowski,K., and MacLennan,D.H. (1996). The v_{max} of the Ca²⁺-ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum (SERCA2a) is not altered by Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphorylation or by interaction with phospholamban. *J Biol. Chem.* 271, 14206-14213.
211. Ogorelkova,M., Zwaagstra,J., Elahi,S.M., Dias,C., Guilbaut,C., Lo,R., Collins,C., Jaramillo,M., Mullick,A., O'Connor-McCourt,M., and Massie,B. (2006). Adenovirus-delivered antisense RNA and shRNA exhibit different silencing efficiencies for the endogenous transforming growth factor-beta (TGF-beta) type II receptor. *Oligonucleotides.* 16, 2-14.
212. Okabe,M., Ikawa,M., Kominami,K., Nakanishi,T., and Nishimune,Y. (1997). 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett.* 407, 313-319.
213. Pacak,C.A., Mah,C.S., Thattaliyath,B.D., Conlon,T.J., Lewis,M.A., Cloutier,D.E., Zolotukhin,I., Tarantal,A.F., and Byrne,B.J. (2006). Recombinant Adeno-Associated Virus Serotype 9 Leads to Preferential Cardiac Transduction In Vivo. *Circ Res* 99, e3-e9.
214. Packer,M., Fowler,M.B., Roecker,E.B., Coats,A.J., Katus,H.A., Krum,H., Mohacsi,P., Rouleau,J.L., Tendera,M., Staiger,C., Holcslaw,T.L., mann-Zalan,I., and DeMets,D.L. (2002). Effect of carvedilol on the morbidity of patients with severe chronic heart failure: results of the carvedilol prospective randomized cumulative survival (COPERNICUS) study. *Circulation.* 106, 2194-2199.

215. Paddison,P.J., Caudy,A.A., Bernstein,E., Hannon,G.J., and Conklin,D.S. (2002). Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev.* *16*, 948-958.
216. Pieske,B., Kretschmann,B., Meyer,M., Holubarsch,C., Weirich,J., Posival,H., Minami,K., Just,H., and Hasenfuss,G. (1995). Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation.* *92*, 1169-1178.
217. Pogwizd,S.M., Schlotthauer,K., Li,L., Yuan,W., and Bers,D.M. (2001). Arrhythmogenesis and contractile dysfunction in heart failure: Roles of sodium-calcium exchange, inward rectifier potassium current, and residual beta-adrenergic responsiveness. *Circ. Res.* *88*, 1159-1167.
218. Presti,C.F., Jones,L.R., and Lindemann,J.P. (1985). Isoproterenol-induced phosphorylation of a 15-kilodalton sarcolemmal protein in intact myocardium. *J. Biol. Chem.* *260*, 3860-3867.
219. Qi,M., Shannon,T.R., Euler,D.E., Bers,D.M., and Samarel,A.M. (1997). Downregulation of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase during progression of left ventricular hypertrophy. *Am. J. Physiol.* *272*, H2416-H2424.
220. Quinones,M.J., Leor,J., Kloner,R.A., Ito,M., Patterson,M., Witke,W.F., and Kedes,L. (1996). Avoidance of immune response prolongs expression of genes delivered to the adult rat myocardium by replication-defective adenovirus. *Circulation.* *94*, 1394-1401.
221. Ramasubbu,K., Mann,D.L., and Deswal,A. (2007). Anti-angiotensin therapy: new perspectives. *Cardiol. Clin.* *25*, 573-580.
222. Rand,T.A., Petersen,S., Du,F., and Wang,X. (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell.* *123*, 621-629.
223. Remme,W.J. and Swedberg,K. (2001). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure. *Eur. Heart J.* *22*, 1527-1560.
224. Ringer,S. (1882). Concerning the Influence exerted by each of the Constituents of the Blood on the Contraction of the Ventricle. *J. Physiol.* 1882. Aug. *3*, 380-393.
225. Romano,G., Pacilio,C., and Giordano,A. (1999). Gene transfer technology in therapy: current applications and future goals. *Stem Cells.* *17*, 191-202.
226. Rotondo,G. and Friendewey,D. (1996). Purification and characterization of the Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* *24*, 2377-2386.
227. ROWE,W.P., HUEBNER,R.J., GILMORE,L.K., PARROTT,R.H., and WARD,T.G. (1953). Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* *84*, 570-573.
228. Rupp,H. and Maisch,B. (2002). [Functional genomics of pressure-loaded cardiomyocytes: etomoxir in heart failure?]. *Herz.* *27*, 166-173.

229. Russell,W.C. (2000). Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* *81 Pt 11:2573-604*, 2573-2604.
230. Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning*.
231. Samulski, Sally, and Muzyczka (1999). *Adeno- Associated Viral Vectors. The development of human gene therapy.* (T. Friedmann, Ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press 1999, Cold Spring Harbor, NY.
232. Samulski,R.J., Zhu,X., Xiao,X., Brook,J.D., Housman,D.E., Epstein,N., and Hunter,L.A. (1991). Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J.* *10*, 3941-3950.
233. Santonastasi,M. and Wehrens,X.H. (2007). Ryanodine receptors as pharmacological targets for heart disease. *Acta Pharmacol. Sin.* *28*, 937-944.
234. Sayed,D., Hong,C., Chen,I.Y., Lypowy,J., and Abdellatif,M. (2007). MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ. Res.* *100*, 416-424.
235. Scacheri,P.C., Rozenblatt-Rosen,O., Caplen,N.J., Wolfsberg,T.G., Umayam,L., Lee,J.C., Hughes,C.M., Shanmugam,K.S., Bhattacharjee,A., Meyerson,M., and Collins,F.S. (2004). Short interfering RNAs can induce unexpected and divergent changes in the levels of untargeted proteins in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1892-1897.
236. Schmidt,A.G. and Pieske,B. (2005). [Diastolic heart failure -- therapy]. *Dtsch. Med. Wochenschr.* *130*, 1213-1216.
237. Schmitt,J.P., Kamisago,M., Asahi,M., Li,G.H., Ahmad,F., Mende,U., Kranias,E.G., MacLennan,D.H., Seidman,J.G., and Seidman,C.E. (2003). Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science.* *299*, 1410-1413.
238. Schulick,A.H., Vassalli,G., Dunn,P.F., Dong,G., Rade,J.J., Zamarron,C., and Dichek,D.A. (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J. Clin. Invest.* *99*, 209-219.
239. Schwarz,D.S., Hutvagner,G., Du,T., Xu,Z., Aronin,N., and Zamore,P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell.* *115*, 199-208.
240. Schwarz,D.S., Hutvagner,G., Haley,B., and Zamore,P.D. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the Drosophila and human RNAi pathways. *Mol. Cell.* *10*, 537-548.
241. Senapathy,P., Tratschin,J.D., and Carter,B.J. (1984). Replication of adeno-associated virus DNA. Complementation of naturally occurring rep- mutants by a wild-type genome or an ori- mutant and correction of terminal palindrome deletions. *J. Mol. Biol.* *179*, 1-20.
242. Shannon,T.R. and Bers,D.M. (2004). Integrated Ca²⁺ management in cardiac myocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1015:28-38.*, 28-38.

243. Shenk T. Adenoviridae: The viruses and their replication. in Fields BN, Knipe DM, and Howley PM (eds), *Fields Virology*: Philadelphia, New York, Lippincott-Raven. 2111-2148. 1996.
Ref Type: Generic
244. Shenk T (2001). Adenoviridae: The viruses and their replication. In: Fields B, Knipe D (eds.), *Fields Virology*, 4th edition, volume 2, 2265–2300. In: Fields B, Knipe D (eds.), 2.
245. Sheu,S.S. and Fozzard,H.A. (1982). Transmembrane Na⁺ and Ca²⁺ electrochemical gradients in cardiac muscle and their relationship to force development. *J. Gen. Physiol.* 80, 325-351.
246. Simmerman,H.K. and Jones,L.R. (1998). Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev.* 78, 921-947.
247. Sipo,I., Wang,X., Hurtado,P.A., Suckau,L., Weger,S., Poller,W., and Fechner,H. (2006). Tamoxifen-regulated adenoviral E1A chimeras for the control of tumor selective oncolytic adenovirus replication in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 13, 173-186.
248. Sledz,C.A., Holko,M., de Veer,M.J., Silverman,R.H., and Williams,B.R. (2003). Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell Biol.* 5, 834-839.
249. Solaro,R.J. and Briggs,F.N. (1974). Estimating the functional capabilities of sarcoplasmic reticulum in cardiac muscle. Calcium binding. *Circ. Res.* 34, 531-540.
250. Song,E., Lee,S.K., Wang,J., Ince,N., Ouyang,N., Min,J., Chen,J., Shankar,P., and Lieberman,J. (2003). RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* 9, 347-351.
251. Sontheimer,E.J. and Carthew,R.W. (2005). Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell.* 122, 9-12.
252. Sorensen,D.R., Leirdal,M., and Sioud,M. (2003). Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J. Mol. Biol.* 327, 761-766.
253. Soutschek,J., Akinc,A., Bramlage,B., Charisse,K., Constien,R., Donoghue,M., Elbashir,S., Geick,A., Hadwiger,P., Harborth,J., John,M., Kesavan,V., Lavine,G., Pandey,R.K., Racie,T., Rajeev,K.G., Rohl,I., Toudjarska,I., Wang,G., Wuschko,S., Bumcrot,D., Koteliansky,V., Limmer,S., Manoharan,M., and Vornlocher,H.P. (2004). Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* 432, 173-178.
254. Srivastava,A., Lusby,E.W., and Berns,K.I. (1983). Nucleotide sequence and organization of the adeno-associated virus 2 genome. *J. Virol.* 45, 555-564.
255. Stark,A., Brennecke,J., Russell,R.B., and Cohen,S.M. (2003). Identification of *Drosophila* MicroRNA targets. *PLoS. Biol.* 1, E60.

256. Steinwaerder,D.S., Carlson,C.A., and Lieber,A. (1999). Generation of adenovirus vectors devoid of all viral genes by recombination between inverted repeats. *J. Virol.* 73, 9303-9313.
257. Stewart,P.L., Burnett,R.M., Cyrklaff,M., and Fuller,S.D. (1991). Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. *Cell* 67, 145-154.
258. Sutherland,E.W. (1970). On the biological role of cyclic AMP. *JAMA.* 214, 1281-1288.
259. Swank,R.T. and Munkres,K.D. (1971). Molecular weight analysis of oligopeptides by electrophoresis in polyacrylamide gel with sodium dodecyl sulfate. *Anal. Biochem.* 39, 462-477.
260. Swedberg,K., Cleland,J., Dargie,H., Drexler,H., Follath,F., Komajda,M., Tavazzi,L., Smiseth,O.A., Gavazzi,A., Haverich,A., Hoes,A., Jaarsma,T., Korewicki,J., Levy,S., Linde,C., Lopez-Sendon,J.L., Nieminen,M.S., Pierard,L., and Remme,W.J. (2005). Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic heart failure: executive summary (update 2005): The Task Force for the Diagnosis and Treatment of Chronic Heart Failure of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 26, 1115-1140.
261. Szybalski,W., Kim,S.C., Hasan,N., and Podhajska,A.J. (1991). Class-IIIS restriction enzymes--a review. *Gene.* 100:13-26., 13-26.
262. Tabara,H., Sarkissian,M., Kelly,W.G., Fleenor,J., Grishok,A., Timmons,L., Fire,A., and Mello,C.C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell.* 99, 123-132.
263. Tada,M., Inui,M., Yamada,M., Kadoma,M., Kuzuya,T., Abe,H., and Kakiuchi,S. (1983). Effects of phospholamban phosphorylation catalyzed by adenosine 3':5'-monophosphate- and calmodulin-dependent protein kinases on calcium transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Mol. Cell Cardiol.* 15, 335-346.
264. Tada,M., Kirchberger,M.A., and Katz,A.M. (1975a). Phosphorylation of a 22,000-dalton component of the cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 250, 2640-2647.
265. Tada,M., Kirchberger,M.A., and Li,H.C. (1975b). Phosphoprotein phosphatase-catalyzed dephosphorylation of the 22,000 dalton phosphoprotein of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J. Cyclic. Nucleotide. Res.* 1, 329-338.
266. Tada,M., Kirchberger,M.A., Repke,D.I., and Katz,A.M. (1974). The stimulation of calcium transport in cardiac sarcoplasmic reticulum by adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 249, 6174-6180.
267. Tahbaz,N., Kolb,F.A., Zhang,H., Jaronczyk,K., Filipowicz,W., and Hobman,T.C. (2004). Characterization of the interactions between mammalian PAZ PIWI domain proteins and Dicer. *EMBO Rep.* 5, 189-194.

268. Talosi,L., Edes,I., and Kranias,E.G. (1993). Intracellular mechanisms mediating reversal of beta-adrenergic stimulation in intact beating hearts. *Am. J. Physiol.* *264*, H791-H797.
269. Thum,T., Galuppo,P., Wolf,C., Fiedler,J., Kneitz,S., van Laake,L.W., Doevendans,P.A., Mummery,C.L., Borlak,J., Haverich,A., Gross,C., Engelhardt,S., Ertl,G., and Bauersachs,J. (2007). MicroRNAs in the human heart: a clue to fetal gene reprogramming in heart failure. *Circulation.* *116*, 258-267.
270. Tomari,Y. and Zamore,P.D. (2005). Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev.* *19*, 517-529.
271. Tomko,R.P., Xu,R., and Philipson,L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *94*, 3352-3356.
272. Toyofuku,T., Kurzydowski,K., Tada,M., and MacLennan,D.H. (1994). Amino acids Glu2 to Ile18 in the cytoplasmic domain of phospholamban are essential for functional association with the Ca(2+)-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *269*, 3088-3094.
273. Ui-Tei,K., Naito,Y., Takahashi,F., Haraguchi,T., Ohki-Hamazaki,H., Juni,A., Ueda,R., and Saigo,K. (2004). Guidelines for the selection of highly effective siRNA sequences for mammalian and chick RNA interference. *Nucleic Acids Res.* *32*, 936-948.
274. van,R.E., Sutherland,L.B., Liu,N., Williams,A.H., McAnally,J., Gerard,R.D., Richardson,J.A., and Olson,E.N. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 18255-18260.
275. van,R.E., Sutherland,L.B., Qi,X., Richardson,J.A., Hill,J., and Olson,E.N. (2007). Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science.* *316*, 575-579.
276. Verma,U.N., Surabhi,R.M., Schmaltieg,A., Becerra,C., and Gaynor,R.B. (2003). Small interfering RNAs directed against beta-catenin inhibit the in vitro and in vivo growth of colon cancer cells. *Clin. Cancer Res.* *9*, 1291-1300.
277. Vetter,R., Kott,M., Schulze,W., and Rupp,H. (1998). Influence of different culture conditions on sarcoplasmic reticular calcium transport in isolated neonatal rat cardiomyocytes. *Mol. Cell Biochem.* *188*, 177-185.
278. Vetter,R., Studer,R., Reinecke,H., Kolar,F., Ostadalova,I., and Drexler,H. (1995). Reciprocal changes in the postnatal expression of the sarcolemmal Na⁺-Ca(2⁺)-exchanger and SERCA2 in rat heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* *27*, 1689-1701.
279. Vetter,R. and Will,H. (1986). Sarcolemmal Na-Ca exchange and sarcoplasmic reticulum calcium uptake in developing chick heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* *18*, 1267-1275.

280. Vieira,J. and Messing,J. (1982). The pUC plasmids, an M13mp7-derived system for insertion mutagenesis and sequencing with synthetic universal primers. *Gene*. *19*, 259-268.
281. Voinnet,O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* *17*, 449-459.
282. Volinia,S., Calin,G.A., Liu,C.G., Ambs,S., Cimmino,A., Petrocca,F., Visone,R., Iorio,M., Roldo,C., Ferracin,M., Prueitt,R.L., Yanaihara,N., Lanza,G., Scarpa,A., Vecchione,A., Negrini,M., Harris,C.C., and Croce,C.M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 2257-2261.
283. Wang,L., Muramatsu,S., Lu,Y., Ikeguchi,K., Fujimoto,K., Okada,T., Mizukami,H., Hanazono,Y., Kume,A., Urano,F., Ichinose,H., Nagatsu,T., Nakano,I., and Ozawa,K. (2002). Delayed delivery of AAV-GDNF prevents nigral neurodegeneration and promotes functional recovery in a rat model of Parkinson's disease. *Gene Ther.* *9*, 381-389.
284. Watanabe,A., Arai,M., Yamazaki,M., Koitabashi,N., Wuytack,F., and Kurabayashi,M. (2004). Phospholamban ablation by RNA interference increases Ca²⁺ uptake into rat cardiac myocyte sarcoplasmic reticulum. *J Mol Cell Cardiol.* *37*, 691-698.
285. Weiss,B., Davidkova,G., and Zhou,L.W. (1999). Antisense RNA gene therapy for studying and modulating biological processes. *Cell Mol. Life Sci.* *55*, 334-358.
286. Williams,B.R. (1997). Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem. Soc. Trans.* *25*, 509-513.
287. Wu,J., Zhao,W., Zhong,L., Han,Z., Li,B., Ma,W., Weigel-Kelley,K.A., Warrington,K.H., and Srivastava,A. (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum. Gene Ther.* *18*, 171-182.
288. Xia,X.G., Zhou,H., Ding,H., Affar,e.B., Shi,Y., and Xu,Z. (2003). An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res.* *31*, e100.
289. Xiao,X., Li,J., and Samulski,R.J. (1996). Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J. Virol.* *70*, 8098-8108.
290. Yamamoto,T., Yano,M., Kohno,M., Hisaoka,T., Ono,K., Tanigawa,T., Saiki,Y., Hisamatsu,Y., Ohkusa,T., and Matsuzaki,M. (1999). Abnormal Ca²⁺ release from cardiac sarcoplasmic reticulum in tachycardia-induced heart failure. *Cardiovasc. Res.* *44*, 146-155.
291. Yang,Y., Nunes,F.A., Berencsi,K., Furth,E.E., Gonczol,E., and Wilson,J.M. (1994a). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *91*, 4407-4411.

292. Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Gonczol, E., Engelhardt, J.F., and Wilson, J.M. (1994b). Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat. Genet.* *7*, 362-369.
293. Yano, M. (2008). Ryanodine receptor as a new therapeutic target of heart failure and lethal arrhythmia. *Circ. J.* *72*, 509-514.
294. Yeh, P., Dedieu, J.F., Orsini, C., Vigne, E., Deneffe, P., and Perricaudet, M. (1996). Efficient dual transcomplementation of adenovirus E1 and E4 regions from a 293-derived cell line expressing a minimal E4 functional unit. *J. Virol.* *70*, 559-565.
295. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011-3016.
296. Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. (2003). MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9779-9784.
297. Zhang, H., Kolb, F.A., Brondani, V., Billy, E., and Filipowicz, W. (2002). Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J.* *21*, 5875-5885.
298. Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell.* *118*, 57-68.
299. Zhang, W.W. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* *6*, 113-138.

9. Publikationsverzeichnis

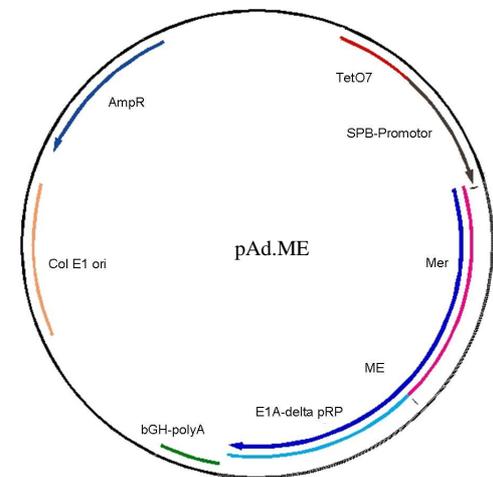
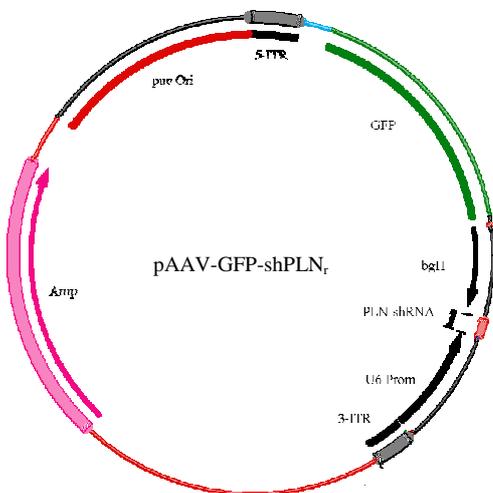
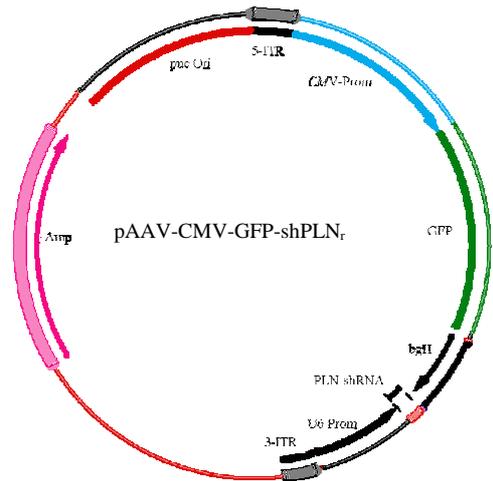
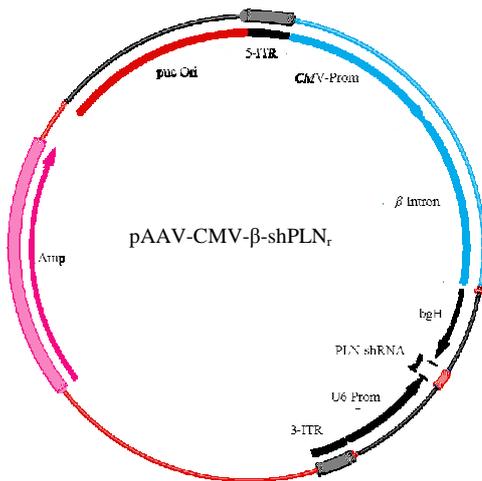
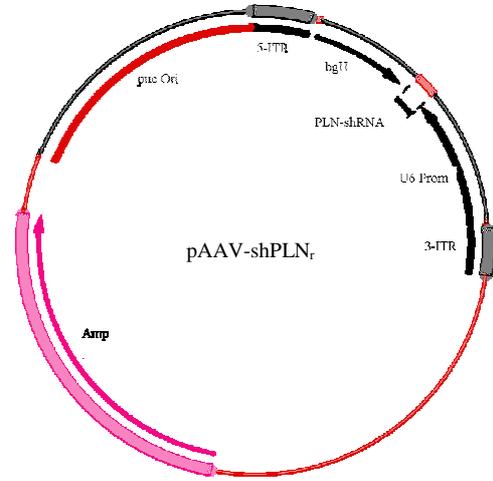
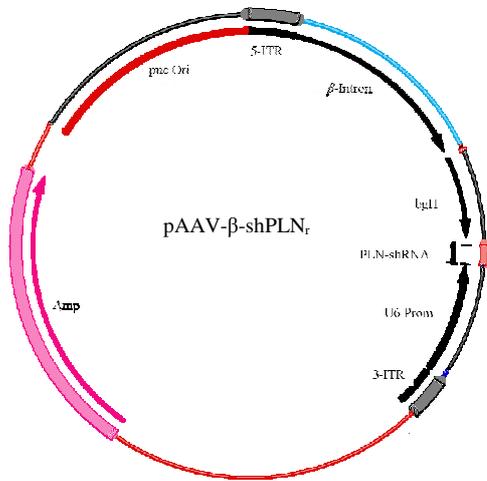
9.1 Originalarbeiten

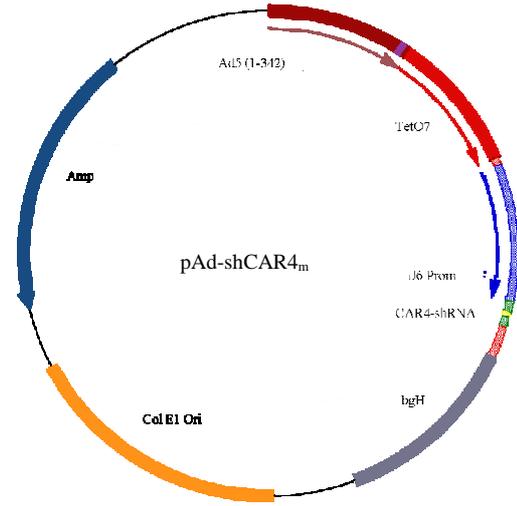
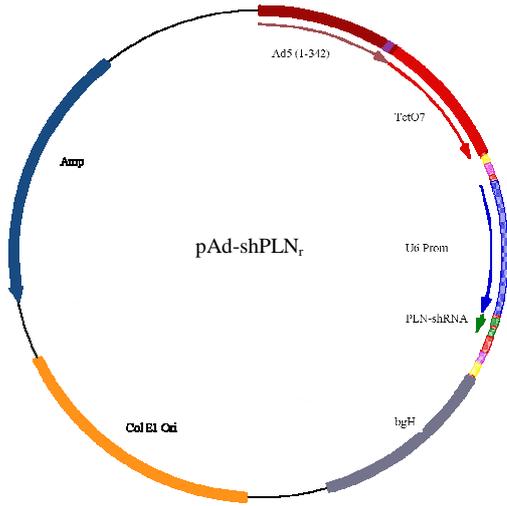
1. Fechner H, Sipo I, Westermann D, Pinkert S, Wang X, **Suckau L**, Kurreck J, Zeichhardt H, Müller O, Vetter R, Erdmann V, Tschöpe C, Poller W.
Cardiac-targeted RNA interference mediated by an AAV9 vector improves cardiac function in coxsackievirus B3 cardiomyopathy.
J Mol Med. 2008 Sep;86(9):987-97. Epub 2008 Jun 12.
2. Escher F, Kuhl U, Sabi T, **Suckau L**, Lassner D, Poller W, Schultheiss HP, Noutsias M.
Immunohistological detection of Parvovirus B19 capsid proteins in endomyocardial biopsies from dilated cardiomyopathy patients.
Med Sci Monit. 2008 Jun;14(6):CR333-338.
3. Skurk C, Wittchen F, **Suckau L**, Witt H, Noutsias M, Fechner H, Schultheiss HP, Poller W.
Description of a local cardiac adiponectin system and its deregulation in dilated cardiomyopathy.
Eur Heart J. 2008 May;29(9):1168-80. Epub 2008 Apr 3.
4. Fechner H, Pinkert S, Wang X, Sipo I, **Suckau L**, Kurreck J, Dörner A, Sollerbrant K, Zeichhardt H, Grunert HP, Vetter R, Schultheiss HP, Poller W.
Coxsackievirus B3 and adenovirus infections of cardiac cells are efficiently inhibited by vector-mediated RNA interference targeting their common receptor.
Gene Ther. 2007 Jun;14(12):960-71. Epub 2007 Mar 22.
5. Sipo I, Fechner H, Pinkert S, **Suckau L**, Wang X, Weger S, Poller W.
Differential internalization and nuclear uncoating of self-complementary adeno-associated virus pseudotype vectors as determinants of cardiac cell transduction.
Gene Ther. 2007 Sep;14(18):1319-29. Epub 2007 Jul 5.
6. Wittchen F*, **Suckau L***, Witt H, Skurk C, Lassner D, Fechner H, Sipo I, Ungethüm U, Ruiz P, Pauschinger M, Tschöpe C, Rauch U, Kühl U, Schultheiss HP, Poller W.
Genomic expression profiling of human inflammatory cardiomyopathy (DCMi) suggests novel therapeutic targets. * F. Wittchen and L. Suckau contributed equally to this paper.
J Mol Med. 2007 Mar;85(3):257-71. Epub 2006 Nov 15.
7. Fechner H, Wang X, Picó AH, Wildner J, **Suckau L**, Pinkert S, Sipo I, Weger S, Poller W.
A bidirectional Tet-dependent promoter construct regulating the expression of E1A for tight control of oncolytic adenovirus replication.
J Biotechnol. 2007 Jan 20;127(4):560-74. Epub 2006 Sep 27.

8. Fechner H, **Suckau L**, Kurreck J, Sipo I, Wang X, Pinkert S, Loschen S, Rekitke J, Weger S, Dekkers D, Vetter R, Erdmann VA, Schultheiss HP, Paul M, Lamers J, Poller W.
Highly efficient and specific modulation of cardiac calcium homeostasis by adenovector-derived short hairpin RNA targeting phospholamban.
Gene Ther. 2007 Feb;14(3):211-8. Epub 2006 Oct 5.
9. Sipo I, Wang X, Hurtado Picó A, **Suckau L**, Weger S, Poller W, Fechner H.
Tamoxifen-regulated adenoviral E1A chimeras for the control of tumor selective oncolytic adenovirus replication in vitro and in vivo.
Gene Ther. 2006 Jan;13(2):173-86.
10. **Suckau L**, Fechner H, Chemaly E, Krohn S, Hadri L, Kockskämper J, Westermann D, Bisping E, Ly H, Wang X, Kawase Y, Chen J, Liang L, Sipo I, Vetter R, Weger S, Kurreck J, Erdmann V, Pieske B, Lebeche D, Schultheiss HP, Hajjar R, and Poller W.
Chronic Cardiac-Targeted RNA Interference for the Treatment of Heart Failure Restores Cardiac Function and Reduces Pathological Hypertrophy.
Circulation, 2009, in press

10. Anhang

10.1 Plasmidkarten





11. Lebenslauf

Aus datenschutzrechtlichen Gründen wird der Lebenslauf in der elektronischen Version nicht mit veröffentlicht.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. W. Poller danke ich für die interessante Aufgabenstellung und die kontinuierliche Unterstützung.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens danke ich Herrn Prof. Dr. V.A. Erdmann.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Henry Fechner für die Einführung in die virale Vektortechnologie und die gute Betreuung meiner Arbeit im Labor. Die konstruktiven Diskussionen, seine fortwährende Hilfsbereitschaft sowie die zahlreichen Anregungen haben mich stets zu Verbesserungen angespornt und entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen Kollegen der AG Poller / Fechner sei für das nette Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit gedankt, insbesondere Sandra Pinkert für Ihr stets offenes Ohr und Diskussionsbereitschaft sowie für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Ein großes Dankeschön geht an Xiaomin Wang, die gute Seele des Labors, für Ihre große Hilfe im Laboralltag.

Zudem bedanke ich mich bei Herrn Priv. Doz. Dr. Roland Vetter, Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie, CBF, und seinen Mitarbeitern für die Einweisung in die Kardiomyozytenpräparation und die gute Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt gilt mein persönlicher Dank Prof. Dr. med. Roger J Hajjar, Gene and Cell Medicine at Mount Sinai, NY, USA für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der *in vivo* Experimente und Prof. Dr. Jos M Lamers, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Holland, der die Kooperation mit R. Hajjar entscheidend vorangetrieben hat.

Bei Dr. Dirk Lassner und seinem Team bedanke ich mich für die Bereitstellung und Nutzung seiner technischen Geräte.

Abschließend möchte ich mich ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Deren Unterstützung und der Glaube an mich haben diese Arbeit erst möglich gemacht.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe erstellt wurde.

Hannover,

.....

(Lennart Suckau)