

Jan Buskase

Zur Bedeutung von Triadin 1 und Junctin am Herzen

2003

Pharmazeutische Chemie

Zur Bedeutung von Triadin 1 und Junctin am Herzen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von
Jan Buskase
aus Lippstadt

2003

Dekan:

Prof. Dr. J. Leker

Erster Gutachter:

Prof. Dr. K. Müller

Zweiter Gutachter:

Prof. Dr. J. Neumann

Tage der mündlichen Prüfungen:

19. , 26. , 30.1.2004

Tag der Promotion:

30.1.2004

Die vorliegende Arbeit wurden am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster in der Zeit von Januar 2000 bis Juni 2003 unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann und Herrn Prof. Dr. rer. nat. K. Müller angefertigt.

Ich danke

Herrn Prof. Dr. med. J. Neumann und Prof. Dr. med. W. Schmitz für die interessante Aufgabenstellung, die stetigen Anregungen und intensive Betreuung bei der Erstellung dieser Arbeit,

Herrn Prof. Dr. rer. nat. K. Müller für die naturwissenschaftliche Betreuung der Arbeit und dem dieser Arbeit entgegengebrachten Interesse,

der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die finanzielle Förderung (SFB 556 Teilprojekt B1, Projektleiter: Prof. Dr. med. J. Neumann und Prof. Dr. med. W. Schmitz) und der innovativen medizinischen Forschung Münster (Förderkennzeichen: NE 510002)

Herrn Dr. med. Uwe Kirchhefer und Herrn Dr. rer. nat. Ulrich Gergs für die Einarbeitung in die Versuchsmethodik und ihre stete Diskussionsbereitschaft, die kritische und schnelle Korrektur dieser Arbeit sowie die freundschaftliche Büroatmosphäre,

meiner „Mit-Doktorandin“ Frau Katharina Methling für die stets vorhandene Bereitschaft zur intensiven Diskussion und ihre freundschaftliche Hilfe in den vergangenen drei Jahren,

allen nicht namentlichen genannten Mitarbeitern des Instituts für die stetige Hilfsbereitschaft sowie das angenehme und kollegiale Arbeitsklima,

herzlichst allen Freunden und Bekannten, die mich in der Zeit der Promotion begleitet und somit maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben,

und nicht zuletzt ganz besonders meinen Eltern, deren immerwährende Unterstützung in jedweder Hinsicht einen entscheidenden Beitrag zur erfolgreichen Beendigung des Pharmazie-Studiums und zur Fertigstellung dieser Arbeit geleistet hat.

1. Einleitung	1
1.1. Regulation der Kontraktionskraft des Herzens	1
1.2. Triadin	8
1.3. Junctin	9
1.4. Herzinsuffizienz	11
2. Fragestellung	15
3. Material und Methoden	16
3.1. Arbeitstechniken mit DNA	16
3.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien und deren Transformation	16
3.1.2. Plasmid-DNA-Präparation	17
3.1.3. Klonierungstechniken	18
3.1.4. RT-PCR-Technik	20
3.1.5. Präparation der Gesamt-DNA	22
3.1.6. Southern-Blotting	22
3.1.7. Herstellung und Markierung einer Adenovirus-DNA-Sonde	23
3.1.8. DNA-Hybridisierung	23
3.2. Arbeitstechniken mit RNA	24
3.2.1. Gesamt-RNA-Präparation	24
3.2.2. RNA-Gelelektrophorese	25
3.2.3. Northern-Blotting	25
3.2.4. Herstellung und Markierung spezifischer Sonden	26
3.2.5. RNA-Hybridisierung	27

3.3. Arbeitstechniken mit Proteinen	27
3.3.1. Herstellung der Homogenate	27
3.3.2. Proteinbestimmung	28
3.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.3.4. Western-Blotting	28
3.3.5. Immunologische Identifizierung von Proteinen	29
3.3.5.1 Quantifizierung der Immunreaktion	29
3.3.5.2 Autoradiographie	30
3.3.6. Quantifizierung der Proteinexpression	30
3.4. Das adenovirale Expressionssystem	30
3.4.1. Herstellung der Shuttle-Vektoren	33
3.4.2. Homologe Rekombination in Bakterienzellen	37
3.4.3. Generierung des Virus in HEK293-Zellen	40
3.4.4. Amplifikation des Virus und Titerbestimmung	41
3.4.5. Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	42
3.5. Isolation und Kultur neonataler Ratten-Kardiomyozyten	43
3.6. Immunfluoreszenz	44
3.7. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten	44
3.8. Statistische Auswertung	45
4. Ergebnisse	48
4.1. Qualitativer Nachweis rekombinanter Adenovirus-DNA	48
4.2. Adenovirale Infektion von HEK293-Zellen	52
4.3. Adenovirale Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	59

4.3.1.	Nachweis der Virus-DNA in infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	59
4.3.2.	Untersuchung der mRNA-Expression	61
4.3.3.	Untersuchung der Proteinexpression	63
4.3.4.	Immunfluoreszenz adenoviral-infizierter neonataler Ratten-Kardiomyozyten	65
4.4.	Optimierung des adenoviral-vermittelten Gentransfers in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	68
4.4.1.	Auswirkung von fötalem Kälberserum (FCS) auf die Infektionsrate adenoviral-infizierter neonataler Ratten-Kardiomyozyten	68
4.4.2.	Proteinexpression von TRD und JCT in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Viruskonzentration	73
4.4.3.	Proteinexpression von TRD und JCT in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Virusinkubationszeit	78
4.5.	Gegenregulation einzelner Gene nach adenoviraler Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	81
4.6.	Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	84
4.7.	Beeinflussung der Ca^{2+} -Transientenmessung durch Co-Expression von Grün-Fluoreszierendem- Protein (GFP)	99
5.	Diskussion	102
5.1.	Adenoviral-vermittelter Gentrans	102
5.2.	Adenovirale Überexpression von Triadin 1 (TRD) in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	107
5.3.	Adenovirale Überexpression von Junctin (JCT) in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten	114
5.4.	Ausblick	117
6.	Zusammenfassung	119

Inhaltsverzeichnis	IV
<hr/>	
7. Anhang	120
7.1. Puffer und Lösungen	120
7.2. Geräte und Bezugsquellen	127
7.3. Primer und PCR-Programme	129
8. Literaturverzeichnis	130

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AC	Adenylylcyclase
AP	Aktionspotential
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-toloniumphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Albumin aus Rinderserum
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
Ca ²⁺	Calciumionen
[Ca ²⁺]	Calciumionenkonzentration
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CIP	Calf intestinal alkaline phosphatase (Alkalische Phosphatase aus Rinderdarm)
CICR	Ca ²⁺ -induzierte Ca ²⁺ -Freisetzung
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Cytomegalievirus-Promotor
CSQ	Calsequestrin
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DCM	dilatative Kardiomyopathie
d. h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatische Retikulum
evtl.	eventuell
FCS	Fetales Kälberserum
FKBP12.6	FK 506-bindendes Protein
x g	Erdbeschleunigung

g	Gramm
h	Stunde
HEK 293	human embryonic kidney cells (Humane embryonale Nierenzellen)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin-ethansulfonsäure
IgG	Immunglobuline der Klasse G
I ₂	Inhibitor 2 der Phosphatase 1
I _{Ca}	L-Typ-Calciumstrom
IP ₃	Inositol-1,4,5,-trisphosphat
IU	infektiöse Einheiten
JCT	Junctin
K	Lysin
kDa	Kilo-Dalton
M	molar (Mol/Liter)
mA	Milliampere
mCi	Milli-Curie = 37 x 10 ⁶ Bq
MCS	multiple Klonierungsstelle
MF	Myofilamente
mg	Milligramm
Mg ²⁺	Magnesiumionen
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
min	Minute
ml	Milliliter
MLC	leichte Kette des Myosins
MLCK	Kinase der leichten Kette des Myosins
mm	Millimeter
mM	Millimolar (Millimol/Liter)
mmol	Millimol
mN	Millinewton
MOI	Multiplizität der Infektion
msec	Millisekunden
mA	Milli-Ampere
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
mV	Millivolt
N	Normalität (Grammäquivalente pro Liter)
n	Stichprobenumfang

NaAc	Natriumacetat
NBT	Nitroblau Tetrazolium
NCX	Sarkolemmaler Na ⁺ /Ca ²⁺ -Kationenaustauscher
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
P	Phosphor
³² P	Radionuklid des Phosphor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	-log [H ⁺]
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PLC	Phospholipase C
PP	Serin/Threonin-Proteinphosphatase
PP1	Serin/Threonin-Proteinphosphatase vom Typ 1
PP2A	Serin/Threonin-Proteinphosphatase vom Typ 2A
Primer	Oligonukleotid für die Polymerase-Kettenreaktion
PWO	DNA Polymerase aus <i>Pyrococcus woesei</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	1. Raumtemperatur 2. Reverse Transkription
RyR	Ryanodin-Rezeptor; synonym: Ca ²⁺ -Freisetzungskanal
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SEM	Standardabweichung des arithmetischen Mittels
SERCA	Calcium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
SL	Sarkolemma
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
TEMED	N, N, N', N'-Tetraethylmethyldiamin
Tn	Troponinkomplex
TnC	Calcium-bindendes Troponin

TnI	Troponin I (Troponin-Inhibitor)
TRD	Triadin 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	Transport-Ribonukleinsäure
u. a.	unter anderem
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	1. Volt 2. Volumen
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil

1. Einleitung

Die Kontraktion des Herzens wird durch die Ca^{2+} -Aufnahme in das sarkoplasmatische Retikulum (SR) und durch die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR durch den Ca^{2+} -Freisetzungskanal (RyR) bestimmt. Während der Repolarisation der Herzmuskelzelle, nach erfolgter Kontraktion, wird der größte Teil des zuvor aus dem SR in das Zytosol freigesetzten Ca^{2+} durch die Ca^{2+} -ATPase (SERCA) in das SR zurückgepumpt und durch Calsequestrin (CSQ), dem Ca^{2+} -bindenden Protein des SR, gespeichert, wo es für den nächsten Kontraktionszyklus zur Verfügung steht. Triadin und Junctin, zwei Proteine des junctionalen SR binden dabei das CSQ an den Ca^{2+} -Freisetzungskanal. Die genaue Funktion von Junctin und Triadin ist bisher nicht bekannt. Jedoch könnte ihre Bindung an den Ca^{2+} -Freisetzungskanal und ihre Lokalisation im junctionalen SR für die elektromechanische Kopplung im Herzen eine wichtige Rolle spielen.

1.1. Regulation der Kontraktionskraft des Herzens

Der Herzmuskel besteht aus einem Verbund einer Vielzahl von einzelnen Myozyten, die ein funktionelles Syncytium bilden. Im normalen Herzzyklus werden im Sinusknoten durch verschiedene Ionenkanäle Aktionspotentiale (AP) generiert, im Reizleitungssystem weitergeleitet und auf alle Muskelzellen übertragen. Als Folge der Erregung kommt es unter anderem zu einer Öffnung von spannungsabhängigen L-Typ Ca^{2+} -Kanälen im Sarkolemma (SL) (siehe Abb.1.1.). Dies ermöglicht den Einstrom von Ca^{2+} -Ionen in das Zytoplasma der Zelle. Hier triggern die Ca^{2+} -Ionen nach Bindung an den Ryanodin-Rezeptor (RyR) die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Diese Zellorganelle ist von zentraler Bedeutung für die Regulation der Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzelle. Dieser Vorgang innerhalb der Zelle wird auch als Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung (CICR) bezeichnet (Fabiato und Fabiato 1975, Sham et al. 1995). Die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus dem SR wird durch einen Proteinkomplex im junctionalen SR reguliert, der aus dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal (auch Ryanodin-Rezeptor genannt), Calsequestrin (CSQ), Triadin (TRD) und Junctin (JCT) besteht. Der RyR fungiert als Pore für das ausströmende Ca^{2+} (Wagenknecht et al. 1989, Bers 2001). Die transmembranären

Proteine Triadin und Junctin verankern Calsequestrin strukturell und funktionell am RyR (Zhang et al. 1997).

Durch die Ca^{2+} -getriggerte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR steigt die Ca^{2+} -Konzentration im Zytosol von etwa 10^{-7} M diastolisch auf etwa 10^{-5} M systolisch an. Die Ca^{2+} -Ionen binden im Zytosol an Troponin C (siehe Abb.1.1.). Troponin C ist eines der kontraktilen Proteine des dünnen Filamentes, welches für die Bindung von Ca^{2+} verantwortlich ist (Lindhout et al. 2003). Troponin C bildet neben Troponin I und Troponin T eine Untereinheit des Troponinkomplexes. Es besitzt eine Strukturanalogie zu dem weitverbreiteten Ca^{2+} -bindenden Protein Calmodulin (Houdusse et al. 1997). Durch die Ca^{2+} -Bindung an Troponin C kommt es zur Konformationsänderung des Troponinmoleküls, wodurch Bindungsplätze für Myosin und Aktin frei werden und sich die beiden kontraktilen Proteine miteinander verknüpfen können. Dies führt zur Verkürzung und Kraftentwicklung jeder einzelnen Herzmuskelzelle und im Verband zur Kontraktion des Herzmuskels. Durch Phosphorylierung verschiedener Proteine der Myofilamente kann die Kontraktionskraft des Herzmuskels reguliert werden. Dabei sind der Troponinkomplex und die leichte Kette des Myosins (MLC-2) mögliche Angriffspunkte der Kinasen. Phosphorylierter Troponin-Inhibitor (TnI) inhibiert das Ca^{2+} -bindende Troponin (TnC). Dadurch wird die Affinität von TnC für Ca^{2+} -Ionen verringert (Solaro et al. 1981, Ward et al. 2002). Eine Phosphorylierung von TnI bewirkt somit eine Desensitivierung der Myofilamente gegenüber Ca^{2+} . Im Gegensatz dazu werden die Myofilamente durch Phosphorylierung der MLC-2 gegenüber Ca^{2+} sensitiviert (Morano et al. 1988).

Für die Relaxation des Herzmuskels ist die Inaktivierung der Aktin-Myosin Interaktion erforderlich. Diese setzt ein, wenn der Ca^{2+} -Troponinkomplex infolge der abfallenden freien zytosolischen Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$ voneinander dissoziiert. Für eine schnelle Senkung von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist insbesondere die schnelle Rückaufnahme der zytosolischen Ca^{2+} -Ionen in das Lumen des SR verantwortlich. Dabei wird Ca^{2+} unter ATP-Verbrauch gegen einen Konzentrationsgradienten durch eine membranständige Ca^{2+} -abhängige Mg^{2+} -ATPase (SERCA) in das SR transportiert (Mintz und Guillain 1997, MacLennan 2000) (siehe Abb.1.1.).

Bisher konnten fünf verschiedene Isoformen der SERCA in unterschiedlichen Muskelgeweben nachgewiesen werden (SERCA 1a/b, SERCA 2a/b, SERCA 3). SERCA 2a ist die Hauptisoform im Herzmuskel (Brandl et al. 1987, Lytton et al. 1988, Zarain-Herzberg et al. 1990, Lytton et al. 1992). Die Molmasse dieses Proteins beträgt 110 kDa und repräsentiert über 40% des Gesamtproteins im kardialen SR (Tada et al. 1978). SERCA 2a ist vor allem im SR-Netzwerk rund um die Myofibrillen lokalisiert (Loukianov et al. 1998). Seine Funktion wird durch Phospholamban (PLB) moduliert. Nach β -adrenerger Stimulation und damit verbundener Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) kommt es zur Phosphorylierung von PLB an der Aminosäure Serin 16 und durch Aktivierung einer Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (Ca/CaM-PK) zur Phosphorylierung an der Aminosäure Threonin 17 (Übersicht bei Simmerman und Jones 1998). Diese Phosphorylierung von PLB erhöht die Affinität von SERCA für Ca^{2+} und führt zu einer vermehrten Aufnahme von Ca^{2+} in das SR (Tada und Katz 1982, Lindemann et al. 1983, Jones 1985, Koss und Kranias 1996). Das aufgenommene Ca^{2+} wird überwiegend an Calsequestrin im SR gebunden (MacLennan und Wong 1971, Mitchell et al. 1988). Bei der nächsten Kontraktion kann somit nach β -adrenerger Stimulation mehr Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt werden, was zu einer erhöhten Kontraktionskraft führt (positiv inotroper Effekt). Darüber hinaus verkürzt sich auch die Relaxationszeit (positiv lusitroper Effekt) durch die schnellere Aufnahme des Ca^{2+} in das SR. Das für die Ca^{2+} -Speicherung im SR verantwortliche Calsequestrin kann zusätzlich an Triadin und Junctin, zwei Proteine des junktionalen SR, Ca^{2+} -abhängig binden. Zusammen mit dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal, durch den Ca^{2+} aus dem SR freigesetzt werden kann (Guo und Campbell 1995, Zhang et al. 1997), bilden diese Proteine einen quartären Proteinkomplex (siehe Abb.1.2.).

Neben PLB werden durch β -adrenerge Stimulation noch weitere regulatorische Proteine phosphoryliert. So können durch Aktivierung der PKA vermehrt spannungsabhängige L-Typ Ca^{2+} -Kanäle phosphoryliert werden, wodurch deren Offenwahrscheinlichkeit erhöht wird (Charnet et al. 1995, Übersicht bei Rapundalo 1998). Die vermehrt einströmenden Ca^{2+} -Ionen vermitteln somit einen verstärkten Ausstrom von Ca^{2+} aus dem SR über den RyR (CICR). Dies führt wiederum zu einer Kontraktionskraftsteigerung (positiv inotroper Effekt) über die oben dargestellten Mechanismen. Die Effekte einer Phosphorylierung von PLB durch Proteinkinasen

können durch die Wirkung von Phosphatasen (PP) vom Typ 1 und 2A beeinflusst werden. Diese PP katalysieren eine Dephosphorylierung des PLB. Sie regulieren auf diese Weise die SERCA 2a-Aktivität (Neumann et al. 1993, MacDougall et al. 1991). Endogene Phosphatase-Inhibitoren, wie z.B. der Inhibitor 1 der Phosphatase 1 (I₁), können wiederum regulatorisch in dieses Gleichgewicht eingreifen (Neumann et al. 1991).

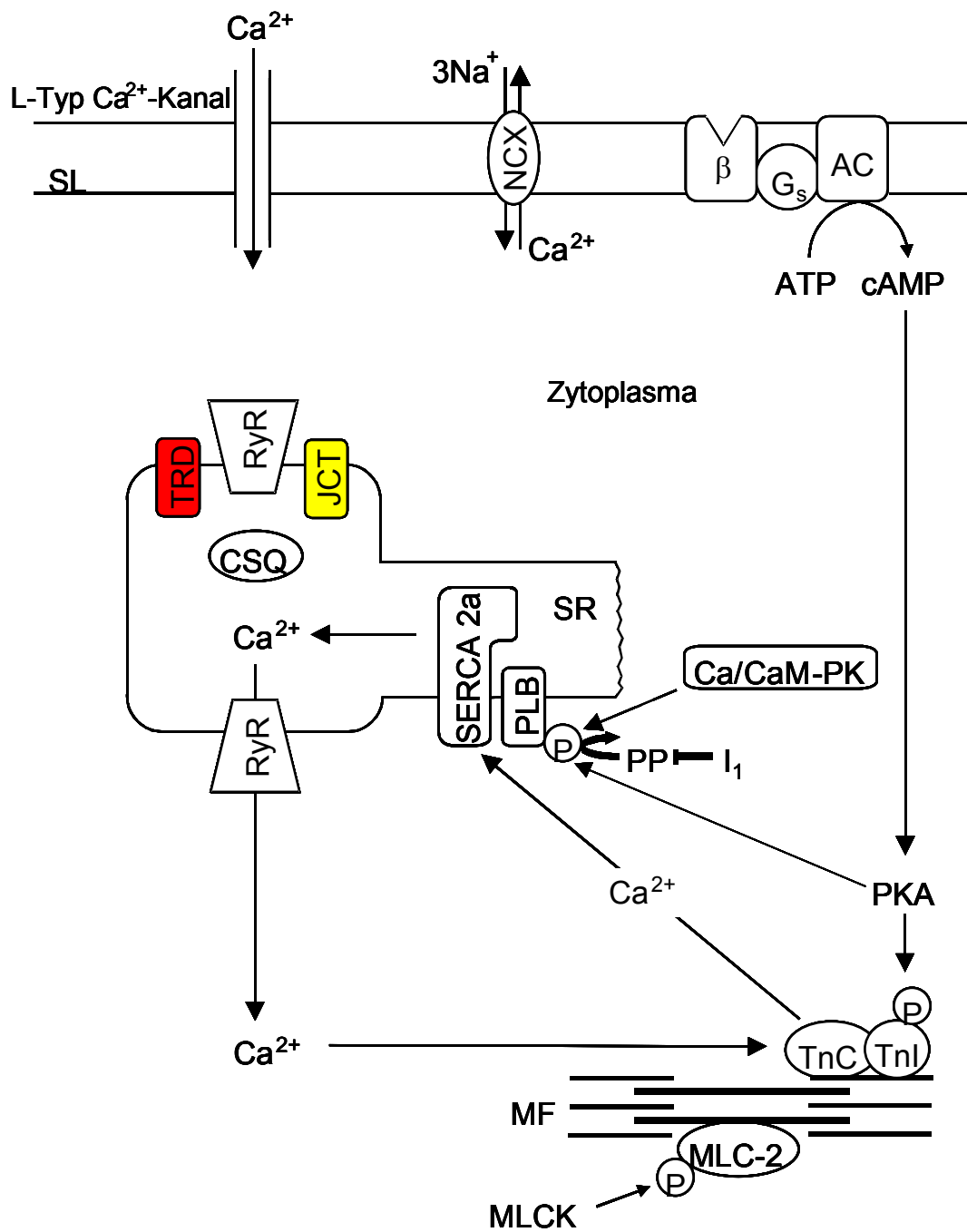


Abb. 1.1. Schema zur Regulation der Ca^{2+} -Homöostase im Myokard

Stimulation von β -Adrenorezeptoren (β) im Sarkolemma (SL) führt über ein stimulierendes G-Protein (G_s) zu einer Aktivierung der Adenylylzyklase (AC). AC katalysiert die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). cAMP aktiviert die Proteinkinase A (PKA), welche unter anderem den L-Typ Ca^{2+} -Kanal und auch Phospholamban (PLB) phosphoryliert. Durch die Phosphorylierung durch PKA oder Ca/CaM-PK (Ca^{2+} /Calmodulin abhängige Proteinkinase II) verliert PLB seinen hemmenden Einfluß auf die Ca^{2+} -ATPase des freien SR (SERCA 2a). Proteinphosphatasen (PP) vom Typ 1 und 2a machen die Phosphorylierung wieder rückgängig. Phosphataseinhibitoren (z.B. I_2) können die Aktivität der Proteinphosphatasen beeinflussen. SERCA 2a transportiert Ca^{2+} in das SR. Neben SERCA 2a transportiert der sarkolemmale $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NCX) freies Ca^{2+} zwischen dem Zytoplasma und dem Extrazellulärraum. Im SR werden Die Ca^{2+} -Ionen an das Ca^{2+} -Speicherprotein Calsequestrin (CSQ) gebunden. CSQ bildet zusammen mit den transmembranären Proteinen des junktionalen SR, Triadin (TRD), Junctin (JCT) und dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal (RyR) einen quartären Proteinkomplex. Während jeder Kontraktion wird Ca^{2+} über den RyR aus dem SR in das Zytoplasma freigesetzt. Dort bindet es an regulatorische Proteine der Myofilamente (MF) wie z.B. den Troponin-Komplex. Der Troponin-Komplex besteht aus dem Ca^{2+} -bindenden Troponin (TnC) und dem Troponin-Inhibitor (TnI). Durch PKA phosphoryliertes TnI inhibiert TnC. Dadurch wird die Affinität von TnC für Ca^{2+} verringert. Ein weiteres wichtiges regulatorisches Protein der Myofilamente ist die regulatorische Untereinheit der leichten Kette des Myosins (MLC-2). Diese kann durch die Kinase der leichten Kette des Myosins (MLCK) phosphoryliert werden.

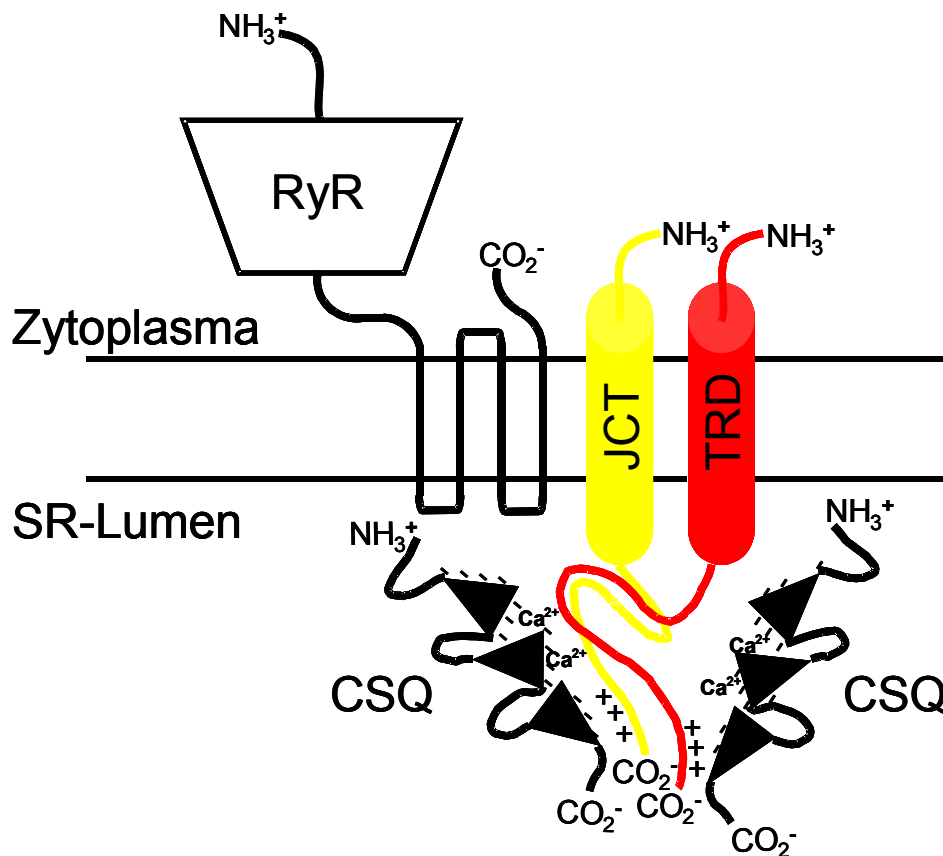


Abb. 1.2.:
Schematische Darstellung des quartären Proteinkomplexes im junktionalen sarkoplasmatischen Retikulum

Dargestellt ist der quartäre Proteinkomplex des junktionalen sarkoplasmatischen Retikulums (SR). Dieser besteht aus den beiden transmembranären Proteinen Triadin (TRD) und Junctin (JCT), dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal oder Ryanodin-Rezeptor (RyR) und Calsequestrin (CSQ). Das im SR-Lumen befindliche CSQ bindet über sein C-terminales Ende Ca^{2+} -Ionen mit hoher Kapazität und dient somit zur Speicherung von Ca^{2+} -Ionen innerhalb des SR. TRD und JCT wirken als "Ankerproteine" und koppeln CSQ über elektrostatische Wechselwirkungen an den Ryanodin-Rezeptor, der als Pore für das ausströmende Ca^{2+} aus dem SR dient. Dabei binden TRD und JCT jeweils über ihr C-terminales Ende an den RyR. Diese Bindung scheint, wie auch die Bindung von TRD und JCT untereinander, Ca^{2+} -unabhängig. Dagegen ist die elektrostatische Wechselwirkung zwischen dem C-terminalen Ende des CSQ und den C-terminalen Enden von JCT und TRD wohl abhängig von der Konzentration an Ca^{2+} -Ionen.

1.2. Triadin

Triadin ist ein Membranprotein und konnte zuerst in SR-Membranvesikeln der Skelettmuskulatur nachgewiesen werden (Caswell et al. 1991). Skelettmuskel-Triadin hat eine scheinbare Molmasse von 95-kDa. Seine primäre Proteinstruktur wurde von der cDNA-Sequenz abgeleitet (Knudson et al. 1993). Skelettmuskel-Triadin lässt sich in eine kurze N-terminale Domäne (Aminosäuren 1-47), in eine transmembranäre, helikale Domäne, (Aminosäuren 48-68) und in eine C-terminale Domäne, welche in das Lumen des SR ragt, unterteilen (Knudson et al. 1993). Der geladene luminale Teil des Skelettmuskel-Triadins interagiert dabei mit dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal und Calsequestrin (Guo und Campbell 1995, Zhang et al. 1997). Guo und Campbell (1995) haben die Calsequestrin-bindende Domäne des Triadins als einen Bereich alternierend positiv (Lysin, E) und negativ geladener (Glutaminsäure, K) Aminosäuren, die auch als KEKE-Struktur bezeichnet wird, postuliert. Diese elektrostatische Interaktion zwischen Triadin und Calsequestrin wird Ca^{2+} -abhängig reguliert, während die Bindung von Triadin an den Ca^{2+} -Freisetzungskanal Ca^{2+} -unabhängig ist (Zhang et al. 1997).

Proteinchemische Untersuchungen konnten die Existenz von Triadin auch im kardialen junktionalen SR zeigen. Die Untersuchung einer Kaninchen-cDNA-Bibliothek führte zur Identifizierung von drei Triadin-Isoformen im Herzen (Guo et al. 1996). Von diesen drei Splicevarianten wurde Triadin 1 im Herzen verschiedener Spezies als Hauptisoform nachgewiesen (Kobayashi and Jones 1999). In allen drei Herz-Isoformen waren die gesamte N-terminale zytoplasmatische, die transmembranäre und die C-terminale Domäne bis zur Aminosäure 264 identisch. Die unterschiedlich errechneten Molmassen der Triadin-Isoformen 1, 2 und 3 mit 32, 35 und 75 kDa konnten durch die unterschiedlichen Längen der Aminosäurenkette hinter der Aminosäure 264 erklärt werden. Es konnten drei Mobilitätsformen mit den entsprechenden Molmassen von 35, 40 und 92 kDa in Western-Blot-Analysen detektiert werden (Guo et al. 1996), wobei Kobayashi und Jones (1999) in einer späteren Arbeit die in Höhe von 40 kDa laufende Mobilitätsform als die glykosylierte Form von Triadin 1 identifizieren und somit die Existenz einer Triadin-Isoform 2 ausschließen konnten. Die Funktion dieser, auf der Aminosäure 75, glykosylierten

Form ist bislang noch unklar. Während Triadin 1 mit über 95% im Herzmuskel exprimiert wird, konnte Triadin 3 nur in Spuren nachgewiesen werden (< 5%).

Neben der Verankerung von CSQ an den RyR durch Triadin konnte in weiteren funktionellen Untersuchungen für Triadin auch eine mögliche Funktion bei der Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR gezeigt werden. So konnten Ohkura und Mitarbeiter (1998) eine Hemmung der Aktivität von isoliertem Ryanodin-Rezeptor durch Skelettmuskel-Triadin in Lipid-Biomembranen zeigen. Des Weiteren wurde eine verminderte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR durch einen gegen die N-terminale Domäne des Skelettmuskel-Triadins gerichteten Antikörper festgestellt (Groh et al. 1999). Im Bereich dieser zytoplasmatischen Domäne (Aminosäuren 18-46) kann Skelettmuskel-Triadin durch eine Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Proteinkinase phosphoryliert werden. Es wurde die Hypothese aufgestellt, diese Phosphorylierung könnte die Interaktion zwischen Skelettmuskel-Triadin und dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal beeinflussen. Die Funktion von kardialem Triadin 1 ist dagegen schlecht verstanden. Kirchhefer und Mitarbeiter (2001) generierten eine transgene Maus, welche Triadin 1 des Hundes im Herzen überexprimierte. Die Folgen waren eine Abnahme des Proteingehalts von Junctin und dem Ryanodin-Rezeptor im Herzen, eine ausgeprägte Herzhypertrophie, sowie kontraktile Abnormalitäten (z.B. Relaxationsstörungen, verminderte Antwort auf β -adrenerge Stimulation und veränderte Frequenz-Kraft-Beziehung). Diese Veränderungen sind möglicherweise auf eine gestörte zelluläre Ca^{2+} -Homöostase zurückzuführen. So waren die diastolischen Ca^{2+} -Transienten erniedrigt, der SR- Ca^{2+} -Gehalt erhöht und die Kinetik der Ca^{2+} -Sparks verlängert (Kirchhefer et al. 2001, Kirchhefer et al. 2003). Diese Veränderungen sind der erste Hinweis darauf, daß Triadin 1 die Ca^{2+} -Homöostase beeinflusst.

Somit lassen die bisherigen Arbeiten den Schluß zu, daß Triadin eine wichtige Rolle innerhalb der elektromechanischen Kopplung zukommt.

1.3. Junctin

Junctin ist wie Triadin ein Membranprotein und wurde zuerst in Membranvesikeln des junktionalen SR von Herz- und Skelettmuskelgewebe nachgewiesen und beschrieben (Mitchell et al. 1988). 1995 folgte dann die Klonierung und Sequenzierung des Proteins (Jones et al. 1995). Das Protein hat eine scheinbare Molmasse von 26 kDa. Seine primäre Proteinstruktur wurde von der cDNA-Sequenz abgeleitet (Jones et al. 1995). Junctin besteht aus 210 Aminosäuren. Die ersten 22 Aminosäuren bilden die N-terminale Domäne, die in das Zytosol ragt. Die Aminosäuren 23-44 machen die transmembranäre Domäne aus, während das C-terminale Ende mit den Aminosäuren 45-210 in das Lumen des SR ragt. Junctin besitzt eine ausgeprägte strukturelle Homologie zum Triadin (Kobayashi et al. 2000). Es bindet wie Triadin Ca^{2+} -abhängig an Calsequestrin, allerdings mit einer höheren Affinität (Zhang et al. 1997). Neben Calsequestrin bindet Junctin Ca^{2+} -unabhängig auch an Triadin und an den Ca^{2+} -Freisetzungskanal (Zhang et al. 1997, Jones et al. 1995). Die Interaktion zwischen Triadin und Junctin kommt über die intraluminalen Aminosäuren dieser beiden Proteine zustande. Sie könnte auf sogenannte KEKE-Strukturen (s.o.) in diesen luminalen Aminosäurebereichen beruhen. Bei subzellulärer Betrachtung war Junctin nur in der Nähe von Calsequestrin und des Ca^{2+} -Freisetzungskanals identifizierbar. Auf Grund der Lokalisation des Junctins im SR und seiner Bindung an den Ca^{2+} -Freisetzungskanal, könnte dieses Protein eine wichtige Rolle bei der Kopplung von Erregung und Kraftentwicklung im Herzen spielen.

Hong und Mitarbeiter (2002) haben eine transgene Maus, welche Junctin des Hundes im Herzen überexprimiert, generiert, um die funktionelle Rolle des Junctins im Herzen besser zu verstehen. Die Folgen waren eine regulatorische Abnahme des Proteingehalts von Triadin und eine Überexpression des Dihydropyridin-Rezeptors im Herzen (Hong et al. 2002, Kirchhefer et al. 2003). Diese Veränderungen waren von einer ausgeprägten Herzhypertrophie und kontraktile Abnormalitäten begleitet.

Zwei Splicevarianten des Junctins sind das Enzym Aspartyl- β -Hydroxylase (Dinchuk et al. 2000) und das Junctat, ein membrangebundenes Ca^{2+} -bindendes Protein des endoplasmatischen Retikulums (Treves et al. 2000). Im Herzen liegt die Aspartyl- β -

Hydroxylase als die enzymatisch aktive Form vor. Es ist aber noch unklar, welche Rolle es in der Herzphysiologie spielt.

Junctat besteht aus 298 Aminosäuren, von denen die ersten 22, die N-terminale Domäne, mit denen des Junctins übereinstimmen. Die luminale Domäne des Junctats besteht hauptsächlich aus negativ geladenen Aminosäuren, die für die Bindung von Ca^{2+} -Ionen verantwortlich sind. Eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen Junctat und Junctin oder anderen Proteinen des junktionalen SR ist eher unwahrscheinlich, da es bei der hohen Ca^{2+} -Konzentration im Lumen des SR zu einer Absättigung der negativ geladenen Bindungsstellen des Junctats kommt (Treves et al. 2000). In der Ca^{2+} -freien Form ist eine direkte Interaktion zwischen Junctat und Junctin oder Junctat und Triadin allerdings denkbar. Die Möglichkeit der Ca^{2+} -Bindung läßt den Schluß zu, daß Junctat eine aktive Rolle bei der Ca^{2+} -Speicherung bzw. -Freisetzung in ER-Membranen verschiedener Gewebe zukommt.

1.4. Herzinsuffizienz

Unter Herzinsuffizienz versteht man die Unfähigkeit des Herzens, eine für die Versorgung des Körpers erforderliche Pumpleistung zu erbringen. Es handelt sich um ein klinisches Bild, bei dem das venöse Blutangebot nicht ausreichend bis in die Peripherie gepumpt werden kann (Braunwald 1981). Als Ursachen einer Herzinsuffizienz kommen u.a. chronische Druckbelastung des Herzens (z.B. bei arterieller Hypertonie), koronare Herzerkrankung, insbesondere der Myokardinfarkt, sowie eine dilatative Kardiomyopathie (Johnson und Palacios 1982) in Frage. Dabei ist die Abnahme der Kontraktilität des Herzens ein gemeinsames Kennzeichen häufiger Formen der Herzinsuffizienz (Colucci und Braunwald 1997). Bei einer Herzinsuffizienz werden vom Organismus Kompensationsmechanismen in Gang gesetzt, um trotz der Abnahme der Herzleistung eine ausreichende Organperfusion zu gewährleisten. Hierzu gehört neben einer Erhöhung des Sympathikotonus, eine kompensatorische myokardiale Hypertrophie, sowie eine gesteigerte Renin- und Adiuretin-Freisetzung. In Folge einer verstärkten β -adrenergen Stimulation durch Katecholamine bei gesteigertem sympathischen Tonus kommt es zunächst zu einer Zunahme von Inotropie, Chronotropie und Lusitropie. Die Aktivierung des Renin-

Angiotensin-Aldosteron-Systems und die Steigerung der Adiuretin-Sekretion bewirken eine Zunahme des Plasmavolumens. Diese zunächst sinnvollen Kompensationsmechanismen wirken sich jedoch im Verlauf der Erkrankung negativ aus. Nach chronischer β -adrenerger Stimulation kommt es schließlich zu einer Desensibilisierung von β -Rezeptoren am Herzen (Bistrow et al. 1982). Gleichzeitig steigert die Katecholaminausschüttung den Ateriellentonus, in dessen Folge eine Erhöhung der Nachlast auftritt. Die Erhöhung von Vor- und Nachlast als Folge der kompensatorischen Mechanismen wirkt sich schließlich zusätzlich belastend auf das insuffiziente Herz aus.

Bei der Herzinsuffizienz kommt es meist auch zu einer Störung der myokardialen Kontraktion und Relaxation. Die kontraktile Dysfunktion bei der Herzinsuffizienz ist wahrscheinlich größtenteils auf eine Reduktion des SR- Ca^{2+} -Gehaltes zurückzuführen. Dabei könnten 3 Faktoren für den verringerten SR- Ca^{2+} -Gehalt verantwortlich sein; eine verminderte Aktivität von SERCA2a, ein Anstieg des Ca^{2+} -Ausstromes über den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher oder ein erhöhter diastolischer Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR durch Hyperphosphorylierung des RyR2 (kardiale Form des Ryanodin-Rezeptors).

Als Folge einer verminderten SERCA2a-Aktivität im insuffizienten Myokard könnte es zu einer Abnahme des Transports für Ca^{2+} -Ionen aus dem Zytoplasma in das sarkoplasmatische Retikulum kommen. Dies könnte schließlich über eine verminderte Ca^{2+} -Beladung des SR zu einer verminderten Maximalkraftentwicklung im insuffizienten Myokard führen (Lindner et al. 1998). Die verminderte SERCA2a-Aktivität bei der menschlichen Herzinsuffizienz ist wahrscheinlich die Folge eines reduzierten Phosphorylierungsgrades von PLB (Huang et al. 1999), einer Abnahme des SERCA2a-Proteins selbst (Lehnart et al. 1998) oder einer veränderten Stöchiometrie von SERCA2a zu PLB. Dagegen konnten andere Arbeitsgruppen, trotz einer verminderten mRNA-Expression, keine verminderte Protein-Expression von SERCA2a im menschlichen insuffizienten Myokard nachweisen (Feldman et al. 1991, Schwinger et al. 1995, Linck et al. 1996). Am Modell der transgenen hypertensiven Ratte konnte eine verminderte Protein-Expression von SERCA2a gezeigt werden (Flesch et al. 1996), während die Aktivität der sarkoplasmatischen Ca^{2+} -ATPase unverändert blieb. Schwinger und Mitarbeiter stellten die Hypothese

auf, daß es beim Übergang von der kompensierten Herzmuskelhypertrophie in eine manifeste Herzinsuffizienz zu einer Abnahme der SERCA2a-Aktivität kommt.

In einem weiteren Tiermodell konnte gezeigt werden, daß nach adenoviraler SERCA2a-Überexpression in herzinsuffizienten Ratten die kontraktile Funktion des einzelnen Kardiomyozyten und auch das Überleben der Tiere signifikant verbessert werden konnte (del Monte et al. 2001). Eine Verbesserung der Kontraktilität durch SERCA2a-Überexpression im Herzen könnte dabei auf dem vermehrten Transport von Ca^{2+} in das SR beruhen.

Ein Anstieg des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) auf mRNA- und Protein-Ebene konnte sowohl bei der menschlichen Herzinsuffizienz (Flesch et al. 1996, Hasenfuss et al. 1999) als auch in Herzinsuffizienz-Modellen von Kaninchen, Meerschweinchen und Hund gezeigt werden (Pogwizd et al. 1999, Sipido et al. 2000, Ahmed et al. 2000). Der durch den höheren Gehalt an NCX bedingte vermehrte Ca^{2+} -Ausstrom bzw. Abfall des $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ist wahrscheinlich ein Kompensationsmechanismus auf die verminderte SERCA2a-Aktivität in insuffizienten Herzen. Schillinger und Mitarbeiter (2000) konnten nach adenoviraler Überexpression von NCX in Kaninchen-Ventrikelzellen eine Abnahme des SR- Ca^{2+} -Gehaltes nachweisen. Durch den vermehrten Ca^{2+} -Ausstrom über den NCX kam es zu einer geringeren Beladung des SR mit Ca^{2+} -Ionen und damit letztendlich zu einer Abnahme der Kontraktilität des Herzens.

Zudem konnte in insuffizienten menschlichen Herzen eine Hyperphosphorylierung von RyR2 durch die Proteinkinase A (PKA) gezeigt werden (Marx et al. 2000). Durch eine lokale Verminderung der Aktivität von Phosphatasen (PP1 und PP2a), die mit dem RyR-Komplex assoziiert sind, könnte diese Hyperphosphorylierung von RyR2 durch die PKA erklärt werden. Die kardiale Form des Ryanodinrezeptors (RyR2) ist ein Tetramer, zusammengesetzt aus vier Typ-2-RyR Polypeptiden (RyR2) und vier FK506-bindenden Proteinen (FKBP12.6). Die Hyperphosphorylierung von RyR2 bewirkt eine Dissoziation von FKBP12.6 vom Ryanodin-Rezeptor. Ohne die Assoziation mit FKBP12.6 ist die Offenwahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors erhöht und weniger koordiniert. Dies führt zu einem erhöhten Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR während der Diastole, was letztendlich in einem geringeren SR- Ca^{2+} -Gehalt

resultiert. McCall und Mitarbeiter (1996) konnten durch Behandlung intakter Herzmuskelzellen mit FK-506 (Tacrolimus) eine Dissoziation von FKBP12.6 vom RyR erzeugen. Dies könnte auch zu einer erhöhten, weniger koordinierten Offenwahrscheinlichkeit des RyR und zu einem erhöhten diastolischen Ca^{2+} -Ausstrom aus dem SR führen. Somit konnte durch diesen Versuch die Hypothese eines verminderten SR- Ca^{2+} -Gehaltes in insuffizienten Herzzellen unterstützt werden.

Interessant ist auch ob und inwieweit die Proteine des junktionalen SR bzw. deren nicht geregeltes Zusammenspiel eine Rolle bei der Entwicklung der menschlichen Herzinsuffizienz spielen. So konnte in diesem Zusammenhang in menschlichen Herzen mit einer dilatativen Kardiomyopathie (DCM) eine signifikante Verminderung der Triadin 1-Proteinexpression gegenüber nicht-insuffizienten Herzen nachgewiesen werden (eigene, nicht veröffentlichte Daten).

2. FRAGESTELLUNG

Triadin und Junctin bilden zusammen mit dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal und Calsequestrin einen quartären Proteinkomplex. Das geregelte Zusammenspiel dieser Proteine des SR scheint von zentraler Bedeutung für die Regulation von Erregung und Kontraktion der Herzmuskelzelle zu sein. Aufgrund ihrer Lokalisation in direkter Nähe des Ca^{2+} -Freisetzungskanals könnten Triadin und Junctin eine mögliche Rolle bei der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR spielen. Ihre genaue Funktion ist aber bisher noch nicht verstanden. Zum besseren Verständnis der Funktion dieser Proteine sollte in der vorliegenden Arbeit Triadin und Junctin in Herzmuskelzellen überexprimiert werden. Dazu haben wir uns des Gentransfers durch Adenoviren bedient. Es sollten Adenoviren generiert werden, die Junctin bzw. Triadin überexprimieren. Mit diesen rekombinanten Adenoviren sollten neonatale Ratten-Kardiomyozyten infiziert werden und die Auswirkungen auf die Expression von SR-Proteinen und die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase bestimmt werden. Die Vorteile des adenoviral vermittelten Gentransfers gegenüber z.B. einem transgenen Tiermodell sollten dabei die Vermeidung der *in vivo*-Gegenregulation anderer SR-Proteine und die Variationsmöglichkeit in der Proteinexpression von Junctin und Triadin durch Änderung der eingesetzten Virusmenge und der Virusinkubationszeit sein.

Aus diesen Versuchen versprechen wir uns neue Erkenntnisse über die Funktion von Junctin und Triadin bei der elektromechanischen Kopplung im Myokard. Zudem sollen die Ergebnisse dieser Arbeit dazu beitragen, das Verständnis kardialer Erkrankungen wie der chronischen Herzinsuffizienz zu verbessern, sowie die Voraussetzungen einer möglichen gentherapeutischen Therapie durch Virusvektoren bei der Herzinsuffizienz zu erarbeiten.

3. Material und Methoden

3.1. Arbeitstechniken mit DNA

3.1.1. Herstellung kompetenter Bakterien und Transformation

Herstellung kompetenter Bakterien

Zur Transformation von Plasmiden wurden Escherichia coli-Bakterienzellen (E. coli) für die Aufnahme von DNA "kompetent" gemacht. Es wurden die E. coli-Stämme XL1 Blue oder Top10F verwendet. Eine Vorkultur wurde in 500 ml LB-Medium (siehe 7.1.) gegeben und das Wachstum durch Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 578 nm überprüft. Nach Erreichen einer OD_{578} von 0.5 (nach 3 bis 4 Stunden) wurde die Kultur für 30 min auf Eis gestellt und anschließend für 10 min (2000 x g, 4°C) zentrifugiert (Centrikon Typ T-124). Das Bakteriensediment wurde mit 100 ml Lösung I (siehe 7.1.) gewaschen und dann in 100 ml Lösung II (siehe 7.1.) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 20 min auf Eis wurden die Zellen für 10 min (1800 x g, 4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4250 µl (Lösung II + 6.6% sterilem Glycerin) resuspendiert und in Aliquots von 200 µl in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

Transformation von Plasmid-DNA in Bakterienzellen

5 - 10 ng Plasmid-DNA bzw. 5 µl eines Ligationsansatzes wurden in 100 µl kompetente Zellen durch Hitzeschock nach einem Standardprotokoll transformiert (Sambrook et al. 1989). Die transformierten Bakterienzellen wurden auf Agarplatten (siehe 7.1.), die das Antibiotikum der Plasmidresistenz enthielten (100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.1.2. Plasmid-DNA-Präparation

Analytische Plasmidisolierung

Aus Bakterienkulturen von 2 bis 5 ml Volumen wurden die Plasmide durch alkalische Lyse isoliert (Birnboim et al. 1979). Die abzentrifugierten Bakterienzellen wurden mit 500 µl Puffer P1 (Resuspensionspuffer, siehe 7.1.) gewaschen. Der Zellrückstand wurde in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und die Zellen durch Zugabe von 200 µl Puffer P2 (Lysispuffer, siehe 7.1.) vollständig lysiert. Durch diese alkalische Lyse in Anwesenheit von SDS wurden Bakterienproteine zerstört und chromosomale Bakterien-DNA denaturiert. Durch Zugabe von 200 µl Puffer P3 (Neutralisationspuffer, siehe 7.1.) wurde die Lösung neutralisiert. Dies führt zu einer raschen Hybridisierung der Plasmid-DNA, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt. Vorhandenes SDS fällt als unlösliches Kalium-SDS in Form eines weißen, flockigen Niederschlags aus. Nach Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur wurde der weiße Niederschlag durch Zentrifugation (15 800 x g, 4°C, 15 min) abgetrennt. Aus dem Überstand wurde die DNA mit 0.7 Volumenteilen 100%igem Isopropanol ausgefällt und für 30 min zentrifugiert (13 600 x g, 4°C). Das DNA-Sediment wurde mit 70%igem Ethanol (4°C) gewaschen und unter Vakuum (SpeedVac® Plus AR) bei Raumtemperatur getrocknet. Die getrocknete DNA wurde in sterilem, bidestilliertem Wasser aufgenommen und bei –20°C gelagert.

Analytische Plasmidisolierung zur anschließenden Sequenzierung

An DNA, die sequenziert werden sollte, wurden besondere Anforderungen bezüglich Reinheit und Gehalt gestellt. Daher wurde die DNA zur Sequenzierung mit dem „Wizard DNA purification Kit“ (Promega, Mannheim, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers isoliert. Hierbei wurde die DNA zusätzlich über eine kleine Anionenaustauschersäule gereinigt.

Präparative Plasmidisolierung

Mit der präparativen Plasmidisolierung wurden Plasmide aus Kulturen mit einem Volumen von 500 ml bis 2 l gewonnen. Dazu wurde der „Plasmid Maxi Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Anweisung des Herstellers verwendet. Die Bakterien

wurden, wie bei der analytischen Plasmidisolierung, alkalisch lysiert; genomische DNA, denaturierte Proteine und SDS wurden ausgefällt. Das Bakterienlysat wurde über eine Anionenaustauschersäule nach Angaben des Herstellers gereinigt.

Photometrische Konzentrationsbestimmung von DNA

Die DNA-Konzentration wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 50 µg DNA/ml (Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der DNA wurde gleichzeitig die OD bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und der Quotient OD_{260}/OD_{280} gebildet. Der Quotient reiner DNA sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

3.1.3. Klonierungstechniken

DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen

Sämtliche DNA-Spaltungen mit Restriktionsendonukleasen wurden nach Angaben der Enzym-Hersteller durchgeführt. Ferner wurden die Puffer der Hersteller für die Entwicklung optimaler Reaktionsbedingungen verwandt.

Dephosphorylierung von 5'-Vektorenden

Um die spontane Religation eines verdauten Vektors mit kompatiblen Enden zu verhindern, wurde die geschnittene DNA mit Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) behandelt. Die CIP spaltet die nach einem Restriktionsverdau verbleibenden Phosphatreste am 5'-Ende der DNA ab. Eine Ligation der Enden ist somit nicht mehr möglich. Das einzubauende DNA-Fragment besitzt diese Phosphatreste noch. Es ist also eine Ligation zwischen Vektor und DNA-Fragment, nicht aber zwischen den Vektorenden möglich. Zur Dephosphorylierung der 5'-Vektorenden wurde der Restriktionsansatz für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert und anschließend auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Abspaltung der Phosphatgruppen erfolgte mit 1 unit CIP (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) pro 7.5 µg DNA in 1 x CIP-Puffer (Roche) für 30 min bei 37°C. Die CIP wurde für 15 min bei 70°C hitzeinaktiviert.

Agarosegelelektrophorese

Mittels der nativen Agarosegelelektrophorese können Nukleinsäuren unterschiedlicher Größe getrennt werden. Die Agarosekonzentration, die üblicherweise zwischen 0.5 und 2.0% liegt, bestimmt dabei den Trennbereich, so daß lineare DNA-Fragmente von 20 bis 0.1 kb getrennt werden können. Je nach gewünschtem Trennbereich wurde die entsprechende Menge Agarose in 50 ml TAE-Puffer (siehe 7.1.) gelöst und aufgeköcht. Um die DNA später durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar zu machen, wurde 0.5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugegeben. Die Proben wurden in einem 10 x Probenpuffer (siehe 7.1.) auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung der DNA im Gel erfolgte in 1 x TAE-Puffer bei einer Feldstärke von 4 mA/cm.

Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Gelextraktion der DNA wurde der „Qiaex II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden, Deutschland) oder der „Qiaquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet. Bei beiden Kits wird zur Isolation der DNA aus Agarosegelen ein Silica-Material verwendet. Das Silica-Material bindet DNA in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotroper Salze. Anschließend kann die DNA, nach einem Waschschrift mit einem Salz-Ethanol-Puffer, durch Lösungen mit geringen Salzkonzentrationen wieder eluiert werden (Vogelstein et al. 1979). Abweichend vom Hersteller-Protokoll wurde die DNA mit destilliertem Wasser von der Glasmilch (Qiaex) bzw. der Silica-Säule (Qiaquick) eluiert. Der DNA-Gehalt der Proben wurde photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Ligation

Der Ligationsansatz bestand aus linearisiertem Vektor und einzubauendem DNA-Fragment in einem molaren Verhältnis von 1:5, 10 Weiss-Einheiten T4 DNA-Ligase (MBI Fermentas) und 0.2 mM ATP in 20 µl 1x Ligase-Puffer (MBI Fermentas). Die Ligation erfolgte bei 16°C über Nacht.

Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung der DNA erfolgte bei der Firma GATC GmbH, Konstanz. Geeignete Sequenzierungs-Oligonukleotide wurden mit Hilfe des Programms OMIGA (Oxford Molecular, Madison) ermittelt.

3.1.4. RT-PCR-Technik

cDNA-Synthese mittels reverser Transkription (RT)

Gesamt-RNA aus Hundeherz (siehe 3.2.1.) wurde mit Oligo(dt)-Primern p(dt)₁₅ in cDNA umgeschrieben. Die cDNA diente als Matrize für die PCR. Die in dem Reaktionsansatz eingesetzte Gesamt-RNA wurde 2 min bei 70°C denaturiert. Der Reaktionsansatz (RT-Reaktion) bestand aus 1 µg denaturierter Gesamt-RNA, 5 mM DTT, 1 mM dNTP (0.25 mM/Nukleotid), 5 µM Primer p(dt)₁₅, 3% DMSO, 6 U c. therm. Polymerase, 5 x RT-Puffer und DEPC-Wasser ad 20 µl. Die reverse Transkription erfolgte für 60 min bei 70°C. Durch Inkubation des Ansatzes auf Eis wurde die Reaktion beendet.

Amplifikation der Junctin-cDNA mittels PCR

Aus der cDNA, synthetisiert durch eine RT-Reaktion (s.o.), wurde die kodierende Sequenz von Junctin mittels PCR amplifiziert. Der PCR-Ansatz enthielt 5 µl RT-Reaktion, 10 µl Enhancer (Eppendorf), 10 x PCR-Puffer (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, Deutschland), 0.4 mM dNTP (0.25 mM/Nukleotid), 1 µM JCT-PCR-P1, 1 µM JCT-PCR-P1R (siehe 7.3.), 2.5 U Taq-Polymerase (Eppendorf) und bidestilliertes Wasser ad 50 µl. Die PCR wurde in einem PCR-Gerät (Gene Amp[®] PCR System 9700, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim, Deutschland) mit dem in Tab. 7.3. beschriebenen Programm durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde gelelektrophoretisch in einem Agarosegel aufgetrennt und die entsprechende Bande (700 bp) aus dem Gel extrahiert (siehe Abb.3.1.).

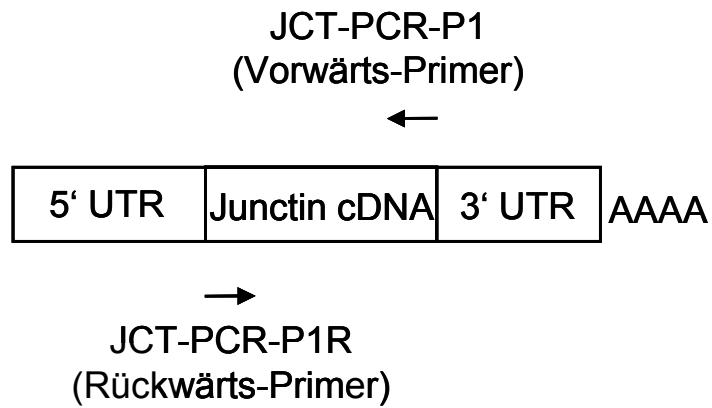
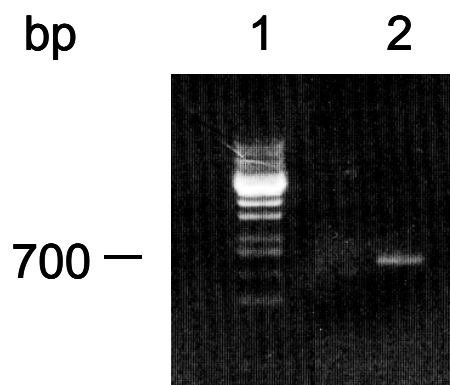
A**B**

Abb. 3.1.:
Herstellung von Junctin-cDNA

Abbildung **A**, Herstellung der Junctin-cDNA mittels PCR-Technik (Schema).
Abbildung **B** zeigt ein 0.8%iges DNA-Agarosegel mit der über PCR amplifizierten Junctin-cDNA. Das PCR-Produkt ist mit einer Größe von 700 bp abgebildet (Spur 2). In Spur 1 wurde ein 1000 bp-Standard geladen.

3.1.5 Präparation der Gesamt-DNA

DNA-Gewinnung aus kultivierten Zellen

Adenoviral infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten einer 3.5 cm²-Schale wurden zunächst in 700 µl TE/SDS-Puffer lysiert. Anschließend wurde das Lysat mit 35 µl Proteinase K-Puffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH, 8, 50 mM EDTA, 0.5% SDS, 20 µg/ml RNase und 0.1 mg/ml Proteinase K) versetzt und über Nacht bei 55°C geschüttelt. Nach Zugabe eines gleichen Volumens Phenol-Chloroform-Lösung wurde sorgfältig gemischt und für 15 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, wobei die Zwischenphase intakt gelassen wurde, nochmals mit Phenol-Chloroform-Lösung ausgeschüttelt, zentrifugiert und in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde abschließend nach Zugabe von 1/10 Volumen 5 M Na-Acetat, pH 6 und 2 Volumen absolutem Ethanol gefällt und durch Zentrifugation (5000 x g, 10 min) sedimentiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das DNA-Sediment mit 70 %igem Ethanol gewaschen und bei 30-35°C getrocknet. Die DNA wurde dann in sterilem Wasser bei 65°C für 10 min gelöst und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 3.1.2.).

3.1.6. Southern-Blotting

Die zu untersuchende, restringierte DNA wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt (siehe 3.1.3.). Nach Anfärbung der DNA mit Ethidiumbromid wurde das Agarosegel photographiert und anschließend in einer Schale für jeweils 30 min mit Denaturierungs- bzw. Neutralisierungs-Puffer überschichtet. Für den Transfer größerer DNA-Fragmente (>10 kb) oder genomischer DNA wurde vor der Denaturierung eine Depurinierung mit 0.2 M HCl für 30 min durchgeführt. Das Agarosegel wurde auf einen Stapel Filterpapier in eine mit 10 x SSC-Puffer (siehe 7.1.) gefüllte Kunststoffwanne gelegt und mit einer Nylonmembran abgedeckt. Die Kanten der Wanne wurden mit Haushaltsfolie abgedichtet. Über die Membran wurden zwei Lagen Blottingpapier sowie mehrere Lagen saugfähigen Zellstoffs geschichtet. Dieser Aufbau wurde mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht belastet. Der Transfer erfolgte je nach Geldicke für 2-16 h. Anschließend wurde die DNA durch Bestrahlung mit UV-Licht für 3 min fixiert. Die

membrangebundene DNA wurde entweder direkt zur Hybridisierung eingesetzt oder, in Folie eingeschweißt, bei 4°C gelagert.

3.1.7. Herstellung und Markierung einer Adenovirus-DNA-Sonde

Diese Sonde wurde mittels PCR-Technik hergestellt. Dabei diente die DNA des Vektors pAdEasy als Matrize. Die Herstellung erfolgte unter der Verwendung der Primer AdEasy-for, AdEasy-rev (siehe 7.3.) und der Taq-DNA-Polymerase in einem Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg). Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde in einem Agarosegel analysiert. Die einzelne, erwartete Bande (ca. 1200 bp) wurde aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde als cDNA-Sonde in eine Markierungsreaktion eingesetzt.

Das isolierte DNA-Fragment (ca. 100 ng in einem Volumen von 11 µl) wurde bei 95°C für 10 min auf dem Heizblock denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung zu vermeiden. Zur denaturierten DNA wurden 4 µl „high prime mix“ (Roche) und 50 µCi α -[³²P]-Desoxycytidintriphosphat (dCTP, 3000 Ci/mmol, NEN-Du Pont) gegeben und für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch die im „high prime mix“ enthaltene Polymerase wurde der zur denaturierten DNA komplementäre Strang unter Einbau der radioaktiv markierten Oligonukleotide gebildet. Als Primer wurden nonamere Oligonukleotide zufälliger Sequenz eingesetzt („random priming“, Feinberg und Vogelstein, 1983). Die so synthetisierte Sonde wurde mittels des „QIAquick Nucleotide Removal Kits“ (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers gereinigt, um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide zu entfernen. Die radioaktive Sonden-DNA wurde mit 250 µl EB-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8) (Qiagen) von der Säule eluiert. Dieser Ansatz wurde für 15 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt, um eine Renaturierung der DNA-Stränge zu vermeiden. Die Sonde wurde auf die vorbereitete prähybridisierte Membran gegeben (siehe 3.1.8.)

3.1.8. DNA-Hybridisierung

Die in der Nylonmembran fixierte DNA wurde für 1 h bei 60°C unter leichtem Schwenken in der Hybridisierungslösung (siehe 7.1.) prähybridisiert. Anschließend wurde die Lösung gegen die denaturierte Sonde in Hybridisierungslösung (10 min,

95°C) ausgetauscht. Die Hybridisierung erfolgte mindestens 6 h oder über Nacht unter stringenten Bedingungen bei 60°C. Die Sonde konnte nach der Inkubation abgenommen und bis zur erneuten Verwendung bei -20°C gelagert werden. Die Membran wurde für 2 x 5 min mit Waschpuffer 1 (2 x SSC, 0.1% SDS) und anschließend für 5 min mit Waschpuffer 2 (0.1 x SSC, 0.1 % SDS, siehe 7.1.) jeweils bei 60°C gewaschen und anschließend feucht in eine Haushaltsfolie eingeschweißt. Es folgte eine Exponierung für ca. 24 h in einer PhosphorImager[®]-Kassette.

3.2. Arbeitstechniken mit RNA

3.2.1. Gesamt-RNA-Präparation

RNA-Gewinnung aus Herzgewebe

Die Gesamt-RNA des Herzgewebes (Gesamtherz der Maus bzw. linker Ventrikel des Menschen) wurde mittels TriStar Reagent[™] (AGS), modifiziert nach Chomcynski und Sacchi (1987), isoliert. 200 mg tiefgefrorenes, pulverisiertes Herzgewebe wurden in 2 ml TriStar Reagent[™] mit Hilfe eines Mikro-Dismembrators für 1 min homogenisiert. Zum Homogenat wurden 400 µl Chloroform hinzugefügt und bei Raumtemperatur für 5 min und 14 000 x g (Centrikon Typ T-124) zentrifugiert. Die obere, wäßrige RNA-haltige Phase wurde abgenommen. Die RNA wurde mit 1 ml Isopropanol ausgefällt und für 15 min bei 15 000 x g (4°C, Tischzentrifuge) zentrifugiert. Das RNA enthaltende Sediment wurde zweimal mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen, in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac[®] Plus AR) bei Raumtemperatur getrocknet und in 40 µl DEPC-Wasser gelöst. Die RNA-Konzentration wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch ermittelt. Dabei entspricht eine optische Dichte (OD) von 1 einer Konzentration von 40 µg/ml (Sambrook et al. 1989). Als Reinheitskontrolle der RNA wurde gleichzeitig die optische Dichte bei 280 nm (Absorptionsmaximum für Proteine) bestimmt und der Quotient OD₂₆₀/OD₂₈₀ gebildet (Sambrook et al. 1989). Die Lagerung der RNA erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80°C.

RNA-Gewinnung aus kultivierten Zellen

Aus adenoviral infizierten, neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (siehe 3.4.5.) wurde die Gesamt-RNA unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen RNA-

Extraktionskits (RNeasy[®], Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Die infizierten Zellen einer 3.5 cm²-Schale wurden in RLT-Puffer (Qiagen) lysiert. Die anschließende Homogenisierung erfolgte mit dem Ultraschallstab (VirSonic[®]). Nach Zugabe von 70%igem Ethanol zu dem Lysat wurde der Ansatz auf eine RNeasy-Säule gegeben. Das Ethanol diente dazu, die Gesamt-RNA an die in der Säule enthaltene RNeasy Silicia-Gel-Membran zu binden. Um anhaftende Verunreinigungen zu entfernen wurde RPE-Puffer (Qiagen) auf die Säule gegeben und anschließend zentrifugiert. Nach Wiederholung des Waschvorganges konnte die RNA in RNase-freiem Wasser eluiert werden. Die Quantifizierung und Lagerung erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.2. RNA-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte nach Sambrook et al. (1989) in einem denaturierenden 1%igen Agarosegel (1% Agarose; 1x MOPS; 2% Formaldehyd, säurefrei; 0.03% Ethidiumbromid). 10 µg RNA einer beliebigen Probe wurden mit 2/3 Volumen Denaturierungspuffer (siehe 7.1.) versetzt, bei 70°C für 5 min denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1/10 Volumen Ladepuffer (siehe 7.1.) auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der RNA erfolgte bei einer Feldstärke von 3 - 4 V/cm für 3-4 h in 1x MOPS-Puffer (siehe 7.1.). Die Betrachtung der mit Ethidiumbromid gefärbten Gele unter UV-Licht (254 nm) erlaubte eine Beurteilung der Qualität der RNA-Präparation und gab Aufschluß über eine mögliche Degradation der RNA anhand der Banden der ribosomalen RNA bei ca. 5 kb (28S) und ca. 2 kb (18S).

3.2.3. Northern-Blotting

Die nach 3.2.2. gelelektrophoretisch getrennte RNA wurde mit einem Kapillarblot-Verfahren (Sambrook et al. 1989) auf eine Nylonmembran (Hybond N[®], Amersham, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Nach dem Transfer in 20 x SSC-Puffer (siehe 7.1.) wurde die RNA durch UV-Licht (254 nm) auf der Nylonmembran fixiert und für zwei Stunden bei 80°C getrocknet.

3.2.4. Herstellung und Markierung spezifischer Sonden

Herstellung einer TRD-cDNA-Sonde

Dazu wurden 10 µg DNA des Vektors pAdTrack-TRD (siehe 3.4.) mit den Restriktionsenzymen Kpn I und Not I (Roche) nach Anleitung des Herstellers für 2 h bei 37°C geschnitten. Nach Hitzeinaktivierung der Restriktionsenzyme (65°C, 15 min) wurde der geschnittene Vektor in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und ein Fragment von 963 bp aus dem Gel isoliert. Dieses Fragment enthielt auch die kodierende Sequenz von Triadin 1. Der DNA-Gehalt dieses Fragments wurde photometrisch bestimmt (siehe 3.1.2.).

Herstellung einer JCT-cDNA-Sonde

Diese Sonde wurde mittels PCR-Technik hergestellt. Dabei diente die DNA des Vektors pAdTrack-JCT als Matrize. Die Herstellung erfolgte unter der Verwendung der Primer JCT-PCR-P1, JCT-PCR-P1R und der Taq-DNA- Polymerase in einem Thermocycler (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland). Ein Teil des PCR-Ansatzes wurde in einem Agarosegel analysiert. Die erwartete Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und gereinigt (Isolierung von DNA aus Agarosegelen: siehe 3.1.3.). Das gereinigte PCR-Produkt wurde als cDNA-Sonde in einer Markierungsreaktion eingesetzt.

Markierung der DNA-Sonden

Die isolierten DNA-Fragmente von Triadin und Junctin (jeweils mind. 10 ng in einem Volumen von 11 µl) wurden bei 95°C für 10 min auf dem Heizblock denaturiert und sofort auf Eis abgekühlt, um eine Renaturierung zu vermeiden. Zur denaturierten DNA wurden 4 µl „high prime mix“ (Roche) und 50 µCi α -[³²P]-Desoxycytidintriphosphat (dCTP, 3000 Ci/mmol, NEN-Du Pont) gegeben. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch die im „high prime mix“ enthaltene Polymerase wurde der zur denaturierten DNA komplementäre Strang unter Einbau der radioaktiv markierten Oligonukleotide gebildet. Als Primer wurden nonamere Oligonukleotide zufälliger Sequenz eingesetzt („random priming“, Feinberg und Vogelstein, 1983). Um nicht eingebaute radioaktive Nukleotide zu entfernen, wurde

die so synthetisierte Sonde mittels des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers gereinigt. Die radioaktive Sonden-DNA wurde mit 250 µl EB-Puffer (Qiagen) von der Säule eluiert. Dieser Ansatz wurde 15 min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt, um eine Renaturierung der DNA-Stränge zu vermeiden

3.2.5. RNA-Hybridisierung

Die Nylonmembran (siehe 3.2.3.) wurde zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen in einer Prähybridisierungslösung (siehe 7.1.) für 3-4 h bei 42°C inkubiert. In diese Lösung wurde die radioaktiv markierte Sonde gegeben (siehe 3.2.4.) und über Nacht bei 42°C hybridisiert. Anschließend wurde die Membran mit 2 x SSC + 0.1% SDS bei Raumtemperatur, dann mit 2 x SSC + 0.1% SDS bei 60°C (siehe 7.1.), sowie mit 0.2 x SSC + 0.1% SDS auch bei 60°C und abschließend mit 0.2 x SSC ohne SDS bei Raumtemperatur für je 15 min gewaschen. Die Membranen wurden feucht in Haushaltsfolie eingeschweißt und in einer PhosphorImager[®]-Kassette für ca. 24 h exponiert.

3.3. Arbeitstechniken mit Proteinen

3.3.1. Herstellung der Homogenate

Gewebe

Pulverisiertes, gefrorenes, myokardiales Gewebe der Ratte, der Maus und des Hundes wurde unter ständiger Kühlung auf Eis in Homogenisationspuffer (0.25 M Saccharose/ 10 mM Histidin) mit einem Ultraschallstab (VirSonic[®]) für dreimal 10 sec homogenisiert. Alle Proben wurden für ca. 10 sec (15 800 x g, 4°C) zentrifugiert und der Überstand als Homogenat bezeichnet.

Adenoviral infizierte Zellen

Adenoviral infizierte Zellen (HEK293-Zellen bzw. neonatale Ratten-Kardiomyozyten) wurden in sterilem, kaltem PBS (siehe 7.1.) gewaschen und in

Saccharose/Histidin/SDS-Puffer (siehe 7.1.) lysiert. Die Proben wurden für 5 min bei 95°C erhitzt, um anhaftende Adenoviren zu inaktivieren. Nicht gelöste Zellbestandteile wurden für dreimal 10 sec mit einem Ultraschallstab homogenisiert. Die Proben wurden für 10 min bei 15 800 x g (Raumtemperatur) zentrifugiert. Der Überstand wurde als Homogenat bezeichnet.

3.3.2. Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach Lowry

Die Bestimmung des Proteingehaltes erfolgte in SDS-haltigen Proben nach Lowry (1951) mit Rinderserumalbumin als Standard.

3.3.3. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Jede Probe wurde vor der Gelbeladung für 10 min auf 95°C erhitzt (Laemmli et al. 1970). Dann wurden 50–200 µg Protein pro Gelspur geladen. Die Gelelektrophorese wurde in Polyacrylamidgelen durchgeführt. Es wurde ein 10%iges Acrylamid enthaltendes Trenngel und ein 4%iges Acrylamid enthaltendes Sammelgel (nach Laemmli, 1970) oder ein 8%iges Acrylamid enthaltendes Porzio-Gel (nach Porzio und Pearson 1977) benutzt. Die weitere Zusammensetzung ist im Anhang (siehe 7.1.) beschrieben. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 4°C stromkonstant mit 40 mA pro Gel für 30 min (Sammelgel) und mit 60 mA pro Gel bis zur vollständigen Auftrennung (Trenngel) in einer Hoefer SE600-Elektrophoresekammer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) in einem Elektrodenpuffer (siehe 7.1.). Auf jedem Gel wurden Molmassen (14 kDa bis 94 kDa, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) mitgeführt.

3.3.4. Western Blot-Verfahren

Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden in einer Transfereinheit (Hoefer) im elektrischen Feld (Towbin et al. 1979, Gershoni 1988) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer wurde stromkonstant mit 1.5 A für

3 h bei 4°C in Transferpuffer (siehe 7.1.) durchgeführt und durch eine Färbung der Membranen mit Ponceau-S-Lösung (siehe 7.1.) kontrolliert.

3.3.5. Immunologische Identifizierung von Proteinen

Die Ponceau-S-gefärbten Membranen wurden, entsprechend des zu erwarteten Molekulargewichts der zu identifizierenden Proteine, in Streifen geschnitten und in bidestilliertem Wasser vollständig entfärbt. Zum Blocken unspezifischer Antikörperbindung wurden die Streifen mit einer 5%igen Milchpulver-Lösung (in Puffer C, siehe 7.1.) für 60 min inkubiert. Nach Inkubation mit dem jeweiligen ersten Antikörper wurden die Streifen bei anschließender nicht-radioaktiver Detektion dreimal mit Puffer C, bei radioaktiver Detektion mit den Puffern A und C (A, C, C, A, je 5 min) gewaschen.

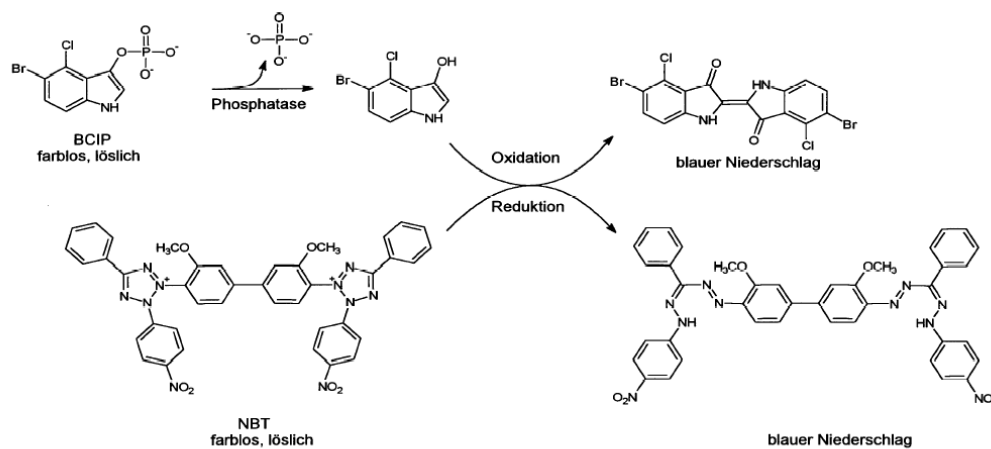
Nach Inkubation mit dem zweiten Antikörper wurden die Streifen bei nicht-radioaktiver Detektion dreimal mit TBS-Puffer, pH 9.4 (siehe 7.1.) sowie einmal mit AP-Puffer (siehe 7.1.) gewaschen, bei radioaktiver Detektion mit den Puffern A und C (A, C, C, A, je 5 min). Die Antikörper wurden in den in Tab. 7.1. angegebenen Verdünnungen eingesetzt. Die Detektion erfolgte mittels nicht-radioaktiver Immunfärbung oder Autoradiographie.

3.3.5.1 Quantifizierung der Immunreaktion

Die Immunfärbung wurde mit dem Fluoreszenzsubstrat ECFTM (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Das ECFTM-Substrat wurde im Verhältnis 1:10 in AP-Puffer verdünnt und die Streifen für 2 min damit inkubiert. Die an den 2. Antikörper gekoppelte alkalische Phosphatase katalysiert die Dephosphorylierung des ECF-Substrats in ein Produkt, das bei Anregung mit UV-Licht fluoresziert (maximale Anregung bei 430 nm). Die Fluoreszenz wurde mit einem PhosphorImager (STORM 860) detektiert und mit Hilfe der ImageQuant[®]-Software quantifiziert. Nach der Detektion mit ECFTM wurden die Membranstreifen mit bidestilliertem Wasser entfärbt und für 10 min in AP-Puffer gewaschen. Anschließend wurden die entsprechenden Proteine auf den Membranstreifen durch eine Farbreaktion mit 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphat-

Toluidin-Salz (BCIP; 1.7%) und Nitroblau-Tetrazolium (NBT; 3.3%) in AP-Puffer detektiert. BCIP dient dabei als Substrat der an den zweiten Antikörper (siehe 7.1.) gekoppelten alkalischen Phosphatase. Es wird nach seiner Dephosphorylierung oxidativ in einen wasserunlöslichen blauen Indigofarbstoff überführt. Als Oxidationsmittel dient NBT, welches bei dieser Reaktion zu einem ebenfalls wasserunlöslichen blauen Farbstoff reagiert. NBT wirkt somit farbverstärkend.

Reaktionsschema der Farbstoff-erzeugenden Redoxreaktion:



3.3.5.2. Autoradiographie

Die Membranstreifen wurden für 2 h mit dem radioaktiv markierten Protein A (^{125}I -Protein A, 1:1000 in 5% Milchpulver-Puffer B) bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend je zweimal in Puffer A und Puffer C gewaschen. Die Membranen wurden für 5 min getrocknet, auf Trockenpapier gelegt, in Frischhaltefolie eingeschlagen und in PhosphorImager[®]-Kassetten exponiert.

Die verwendeten Antikörper sind in Tab. 7.1. angegeben.

3.3.6. Quantifizierung der Proteinexpression

Die Quantifizierung der Signale erfolgte durch Densitometrie mit der ImageQuant[®]-Software (Molecular Dynamics, Sunnyvale, USA). Das unspezifische Hintergrundsignal wurde von jedem Signal abgezogen.

3.4. Das adenovirale Expressionssystem

Die verwendeten Adenoviren gehören zum Serotyp 5, einer Gruppe nicht-onkogener Adenoviren. Sie besitzen eine doppelsträngige, lineare DNA mit einer Länge von ca. 35 kb. Sie sind durch Deletion der Gene E1 und E3 in vivo nicht replikationsfähig. Die E1-Region ist an der Initiation der Transformation beteiligt. Ferner ist das E1-Genprodukt für den Zusammenbau infektiöser Viren essentiell. Die E3-Region ist für die Virusreplikation in Zellkultur nicht essentiell. Das E3-Genprodukt verhindert in vivo eine Immunität der Wirtszellen. Die Deletion des in vitro nicht notwendigen E3-Gens ermöglicht die Aufnahme von Fremdgenen bis zu 7.5 kb (Benihoud et al. 1999). Eine Vermehrung der Viren ist nur in Zelllinien möglich, welche die deletierten Gene E1 und E3 exprimieren und daher komplettieren können (Graham et al. 1973). Dazu gehören humane embryonale Nierenzellen (HEK293).

Abb. 3.2. faßt schematisch die einzelnen Schritte zur Herstellung eines rekombinanten, replikationsdefizienten Adenovirus mit Hilfe des AdEasy-Systems am Beispiel des Adenovirus AdJCT zusammen (He et al. 1998). Das zu exprimierende Fremdgen (JCT) wurde zunächst in ein Rekombinationsplasmid (Shuttle-Vektor) inkloniert. Die direkte Einklonierung des Fremdgens in das AdEasy-Genom ist aufgrund sowohl fehlender singulärer Schnittstellen, als auch der Größe der DNA (36 kb) schwierig.

Als Shuttle-Vektor wurde das Plasmid pAdTrack-CMV verwendet. Das Fremdgen ist von Ad5-DNA-Sequenzen flankiert, mit deren Hilfe das Gen durch homologe Rekombination in das deletierte Ad5-Genom (pAdEasy-1) eingeführt wird. Der rekombinante Shuttle-Vektor und die Adenovirus-DNA (pAdEasy-1) werden in Bakterienzellen kotransfiziert. Nach homologer Rekombination entsteht die rekombinante Adenovirus-DNA (pAdEasy-JCT). Diese wird mit dem Restriktionsenzym *Pac I* linearisiert (Expressionskassette von pAdEasy-JCT siehe Abb. 3.5. A). Die invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (ITR), die für die Amplifikation des Virus notwendig sind, werden dadurch zugänglich. Die linearisierte DNA wird in HEK293-Zellen transfiziert. Durch Ergänzung der deletierten Genprodukte durch die HEK293-Zellen entstehen die rekombinanten Adenoviren.

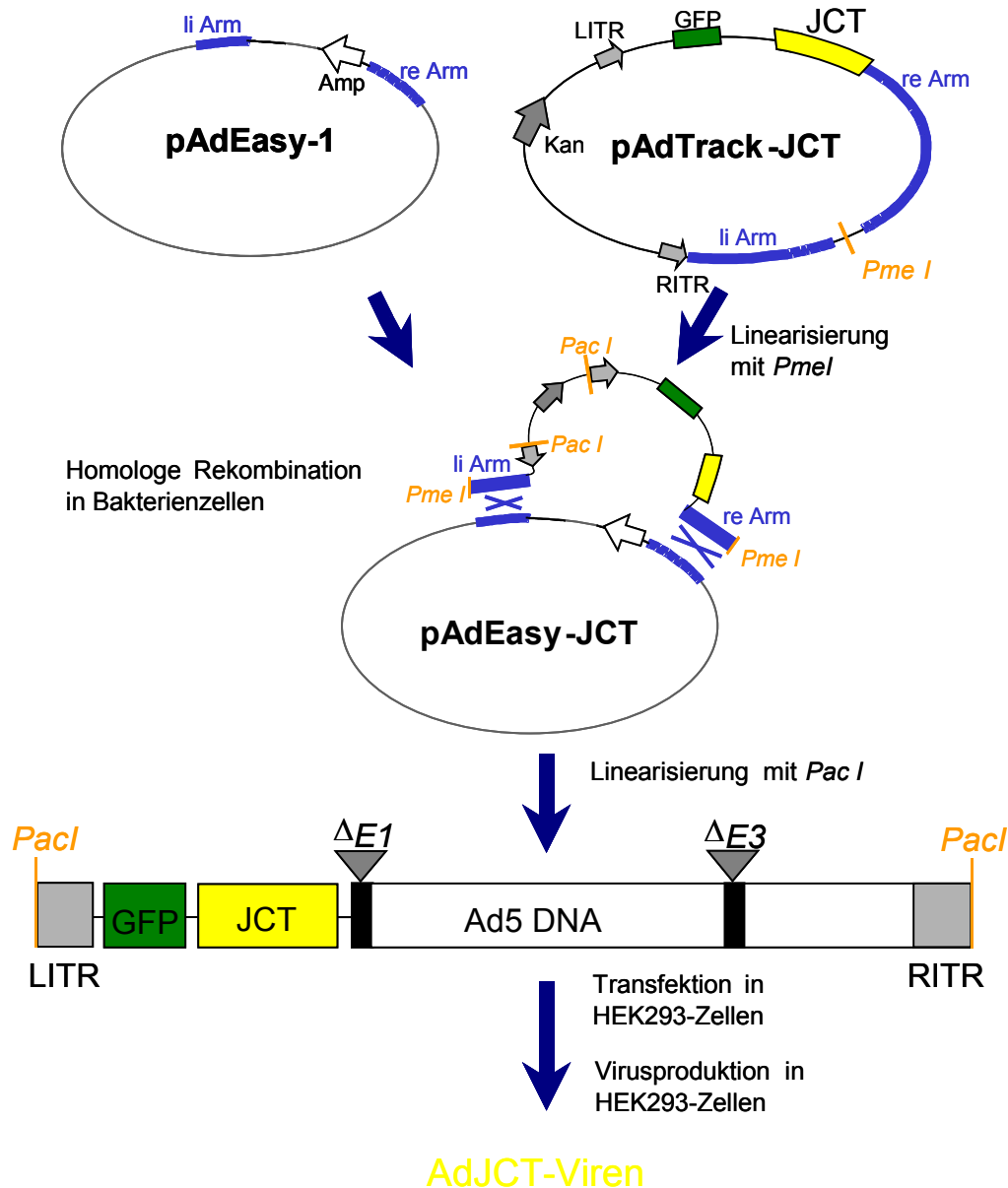


Abb.3.2.:
Schema der Herstellung rekombinanter Adenoviren am Beispiel von Junctin (JCT)

Junctin wurde in die multiple Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack einkloniert. Der rekombinante Shuttle-Vektor pAdTrack-JCT wurde mit dem Restriktionsenzym *Pme I* linearisiert. Durch Rekombination homologer Bereiche (linker (li) Arm und rechter (re) Arm) des Shuttle-Vektors und der adenoviralen DNA (pAdEasy-1) wurde das Fremdgen in das Adenovirus-Genom eingefügt. Durch Linearisierung mit *Pac I* wurden die linke und rechte, invertierte terminale Wiederholungssequenz (LTR, RITR) freigesetzt. Die Virus-DNA (pAdEasy-JCT) wurde in humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) transfiziert. Diese sind in der Lage die Genprodukte der deletierten Bereiche ($\Delta E1$ und $\Delta E3$) von pAdEasy-1 zu komplettieren und infektiöse, aber replikationsdefiziente Viren (AdJCT-Viren) zu bilden. Als Reportergen diente das Gen des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Kan: Kanamycin-Resistenzgen, Amp: Ampicillin-Resistenzgen.

3.4.1. Herstellung der Shuttle-Vektoren

pAdTrack-JCT

Die kodierende Sequenz von JCT wurde mittels RT-PCR-Technik aus Hundeherz-RNA hergestellt (siehe 3.1.4.) und in die Schnittstelle des Restriktionsenzym *EcoR V* der multiplen Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV einkloniert (AdTrack-JCT+GFP, Abb. 3.3. B). Die entsprechende Klonierungsstelle für *EcoR V* wurde mittels PCR, spezifischer Oligonukleotide und JCT-cDNA hergestellt. Darüber hinaus wurde diesem Shuttle-Vektor (AdTrack-JCT+GFP) mittels des Restriktionsenzym *Hpa I* das Reporter-gen GFP entfernt (siehe Abb.3.3. A) und anschließend die DNA religiert. Der neu entstandene Shuttle-Vektor wurde pAdTrack-JCT-GFP benannt. Abb. 3.3.B.

pAdTrack-TRD

Die kodierende Sequenz von Triadin 1 (TRD) wurde mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Kpn I* und *Not I* aus dem Transfervektor pBlueSkript II SK-TRD1 (siehe Abb. 3.4.) herausgeschnitten und in die *Kpn I-Not I*-Schnittstelle der multiplen Klonierungsstelle des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV einkloniert (AdTrackTRD+GFP Abb. 3.3. B). Zusätzlich wurde diesem Shuttle-Vektor (AdTrackTRD+GFP) mittels des Restriktionsenzym *Hpa I* das Reporter-gen GFP entfernt (siehe Abb. 3.3. A) und anschließend die DNA religiert. Der neu entstandene Shuttle-Vektor wurde pAdTrack-TRD-GFP benannt (Abb.3.3. B.).

pAdTrack-CTR

Als Kontrolle diente der Transfervektor pAdTrack-CMV (pAdTrackCTR+GFP) ohne eingebautes Fremdgen. Diesem Shuttle-Vektor wurde mittels des Restriktionsenzym *Hpa I* das Reporter-gen GFP entfernt und anschließend die DNA religiert. Der neu entstandene Shuttle-Vektor wurde pAdTrackCTR-GFP benannt.

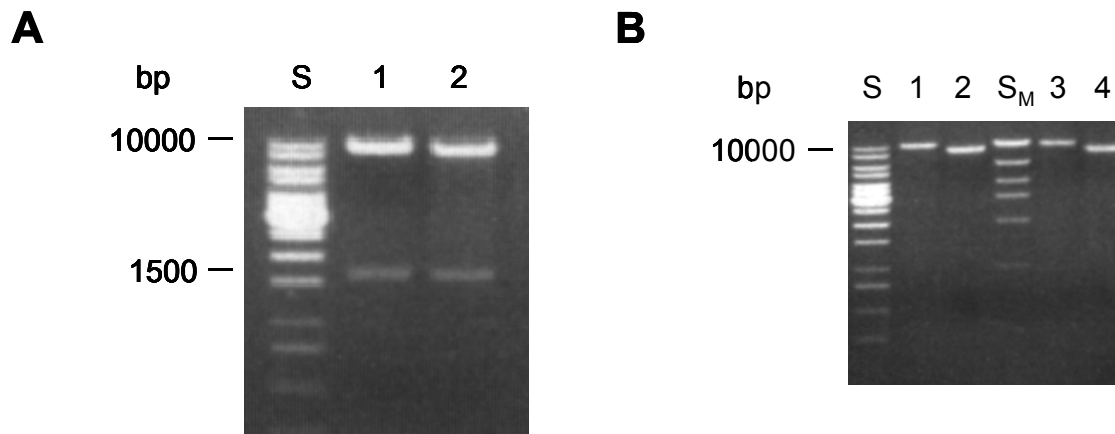


Abb. 3.3.:
Entfernung des Reportergens GFP

In Abbildung **A** ist ein 0.8%iges DNA-Agarosegel dargestellt. Den beiden Shuttle-Vektoren pAdTrack-TRD (Spur 1) und pAdTrack-JCT (Spur 2) wurde durch die Reaktion mit dem Restriktionsenzym *Hpa I* das Reportergen GFP (ca. 1500 bp) entfernt. In Spur S wurde ein 1000 bp-Standard geladen.

Auf dem 0.8%igen DNA-Agarosegel in Abbildung **B** sind die Shuttle-Vektoren pAdTrack-TRD+GFP (Spur 1), pAdTrack-TRD-GFP (Spur 2), pAdTrack-JCT+GFP (Spur 3) und pAdTrack-JCT-GFP (Spur 4) nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *Pme I* dargestellt. In Spur S wurde ein 1000 bp-Standard und in Spur S_M ein Massenstandard geladen.

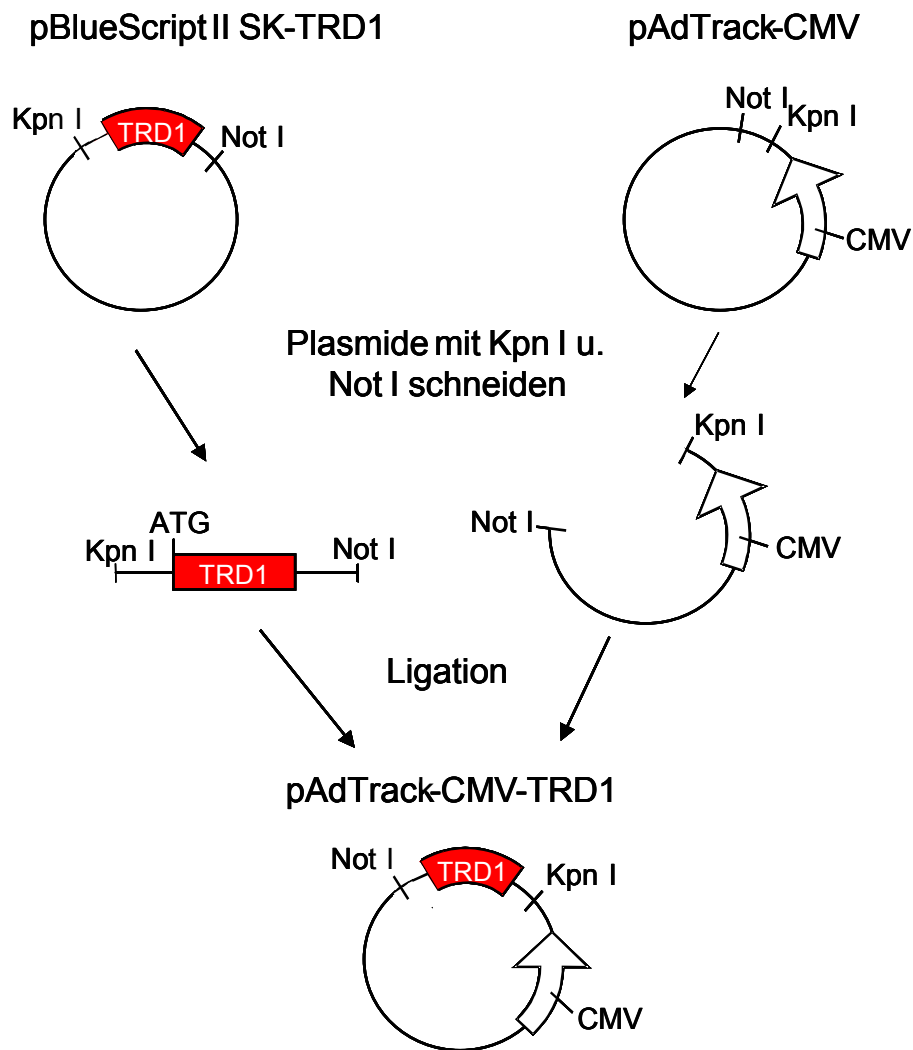


Abb. 3.4.:
Schematische Darstellung der Herstellung des Shuttle-Vektors pAdTrack-TRD

Als ein erster Schritt unserer Klonierungsstrategie wurde die kodierende Sequenz von Triadin 1 (TRD) aus dem Transfervektor pBlueSkript II SK-TRD1 mittels der Restriktionsenzyme *Kpn I* und *Not I*. Es folgte die Ligation der TRD-cDNA in die *Kpn I*-*Not I*-Schnittstelle der MCS des Shuttle-Vektors pAdTrack-CMV (siehe 3.1.3).

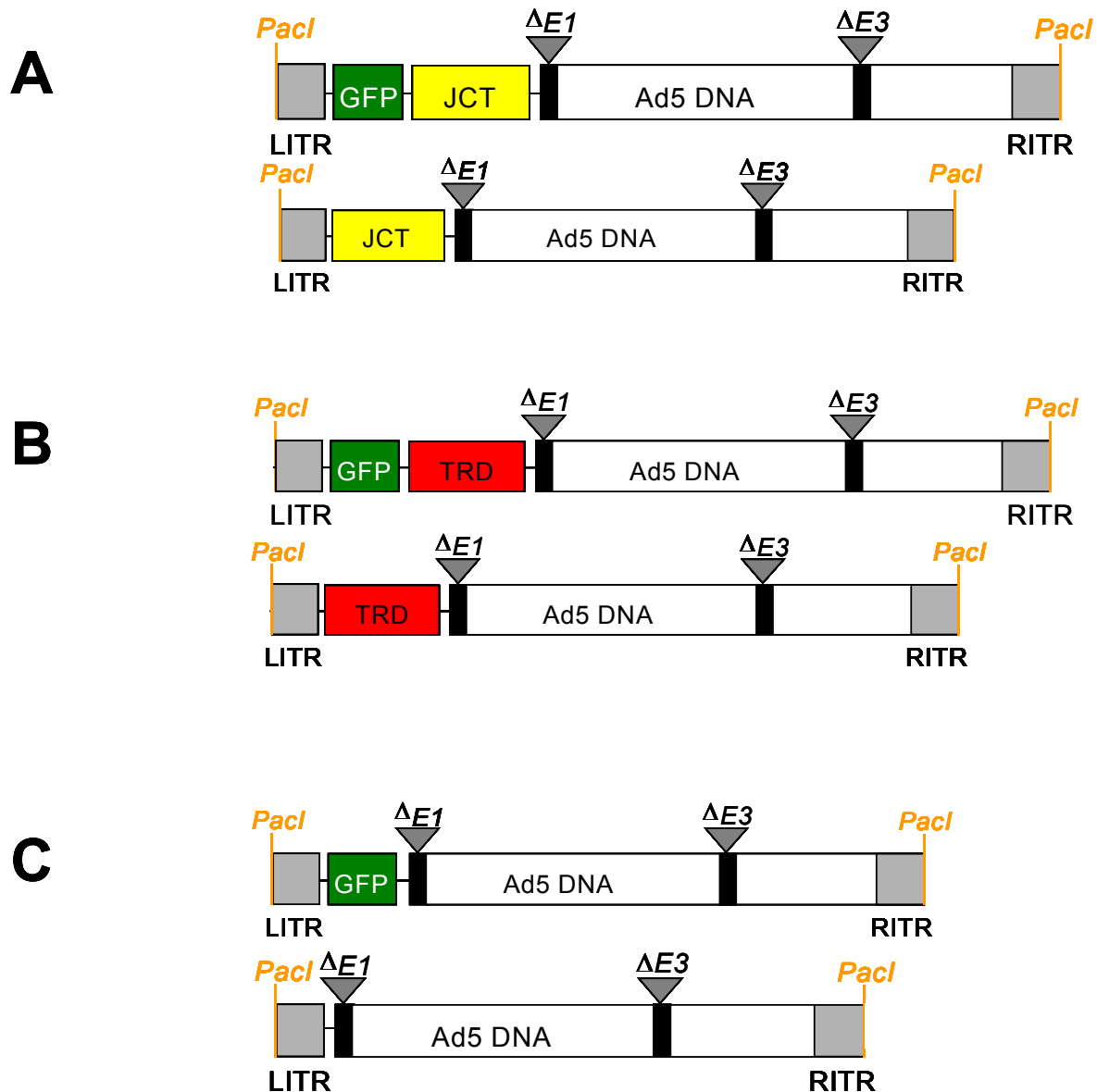


Abb. 3.5.:
Expressionskassetten der rekombinanten Adenoviren nach Linearisierung mit dem Restriktionsenzym *Pac I*

Dargestellt sind die Expressionskassetten der rekombinanten Adenoviren nach Integration der kodierenden Sequenz von JCT, TRD bzw. des Reportergens (grün fluoreszierendes Protein, GFP) in das adenovirale Genom vom Serotyp 5 (Ad5 DNA). **A**, pAdEasy-JCT \pm GFP; **B**, pAdEasy-TRD \pm GFP; **C**, pAdEasy-CTR \pm GFP. JCT, TRD und GFP standen dabei unter Kontrolle des Cytomegalievirus-Promotors (CMV). Die hier dargestellten Expressionskassetten wurden in humane embryonale Nierenzellen transfiziert. Dabei wurden die Genprodukte deletierter adenoviraler Gene ($\Delta E1$, $\Delta E3$) komplettiert. Dadurch entstanden die rekombinanten Adenoviren. Die rechten und linken, invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (RITR, LITR) gewährleisteten die Infektiosität der Adenoviren.

3.4.2. Homologe Rekombination in Bakterienzellen

Herstellung elektrokompeter Zellen (E. coli BJ 5183)

5 ml LB-Medium wurden mit 50 µl des E. coli-Bakterienstammes BJ5183 angeimpft und über Nacht in einem Schüttelinkubator bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Diese Vorkultur wurde in 1 l LB-Medium gegeben und bei 37°C und 180 rpm inkubiert, bis die optische Dichte bei 578 nm 0.6 bis 0.8 betrug. Die Kultur wurde für 1 h auf Eis gestellt und anschließend bei 2000 x g für 10 min (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet zweimal in 100 ml Puffer (10% Glycerol in sterilem bidestilliertem Wasser) gewaschen. Der gewaschene Zellrückstand wurde in 20 ml Waschpuffer (Zusammensetzung s.o.) resuspendiert und wie oben zentrifugiert. Es wurden 19 ml Waschpuffer abgenommen und der Zellrückstand in dem verbleibenden Puffer resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in 40 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Präparation von pAdEasy-DNA und pAdTrack-DNA

Die Plasmidaufreinigung von pAdEasy, pAdEasy-JCT±GFP, pAdEasy-TRD±GFP und pAdEasy-CTR±GFP aus einer 1 l-Bakterienkultur erfolgte über Qiatip 500-Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) in Anlehnung an das mitgelieferte Protokoll des Herstellers (siehe auch 3.1.2.). Der 1 l-Ansatz wurde für 15 min (2500 x g, 4°C) zentrifugiert. Das Bakteriensediment wurde in 40 ml Puffer P1 (siehe 7.1.) resuspendiert, mit 40 ml Puffer P2 (siehe 7.1.) versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert (alkalische Lyse). Zur klaren Lösung wurden 40 ml Puffer P3 (siehe 7.1.) gegeben und mehrfach vorsichtig geschüttelt. Eine vollständige Fällung des weißen, flockigen Niederschlags wurde durch eine 30-minütige Inkubation auf Eis erreicht. Der Niederschlag wurde bei 12 000 x g für 30 min (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals bei 12 000 x g (4°C, 15 min) zentrifugiert, um jeglichen Niederschlag zu entfernen. Der klare Überstand wurde auf zwei mit Puffer QBT (siehe 7.1.) äquilibrierte Qiatip 500-Säulen gegeben. Die Säulen wurden zweimal mit je 30 ml Puffer QC (siehe 7.1.) gewaschen und die DNA mit je 15 ml aufgekochtem Puffer QF (siehe 7.1.) eluiert. Die Verwendung von heißem Elutionspuffer erhöht die Quantität der Elution. Die Eluate wurden vereinigt und die DNA mit 21 ml 100%igem Isopropanol bei -20°C ausgefällt. Der nach Zentrifugation

sichtbare DNA-Rückstand wurde mit 10 ml 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 400 µl sterilem, bidestilliertem Wasser aufgenommen.

Die Plasmidpräparation von pAdTrack-CMV±GFP, pAdTrack-TRD±GFP und pAdTrack-JCT±GFP erfolgte über Qiatip 500-Säulen (Qiagen) nach Anweisung des Herstellers wie unter 3.1.2. beschrieben.

Linearisierung der DNA mit Pme I

Die rekombinanten Vektoren pAdTrack-JCT±GFP, pAdTrack-TRD±GFP und pAdTrack-CTR±GFP wurden mit *Pme I* linearisiert. Dazu wurden 30 µg des rekombinanten pAdTrack-Vektors zunächst 2 h mit jeweils 20 u *Pme I* bei 37°C verdaut. Danach wurden nochmals 20 u *Pme I* zugegeben und für weitere 2 h verdaut. Eine Rekombination kann nur erfolgen, wenn der rekombinante pAdTrack-Vektor vollständig geschnitten ist. *Pme I* wurde hitzeinaktiviert; die linearisierte DNA wurde mit NaAc/Ethanol ausgefällt, in 20 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und die 5'-Enden mit alkalischer Phosphatase aus Rinderdarm in einer Endkonzentration von 1.5 u/µl für 1.5 h bei 37°C dephosphoryliert. Die alkalische Phosphatase wurde für 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert.

Phenolextraktion

Die DNA wurde durch eine Phenolextraktion gereinigt, um die Proteine des Restriktionsverdau zu entfernen. Das Volumen der Ansätze wurde mit sterilem Wasser auf 200 µl erhöht. Anschließend wurden 200 µl gesättigtes Phenol (pH 7.9) zugegeben. Dieses Gemisch wurde geschüttelt und für 5 min bei 15 800 x g (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde mit 200 µl Chloroform/Ethanol (1:1) ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und mit 200 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Nach Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen und die darin enthaltene DNA mittels NaAc/Ethanol-Fällung präzipitiert. Die DNA-Rückstände wurden in insgesamt 60 µl sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden die Proben auf einem 1%igen TAE-Agarosegel mit einem Massenstandard verglichen.

Elektroporation

100 ng pAdEasy-1 wurden mit 500, 600, 700, 800 und 900 ng eines linearisierten und aufgereinigten rekombinanten AdTrack-Konstruktes (pAdTrack-JCT±GFP, pAdTrack-TRD±GFP und pAdTrack-CTR±GFP) gemischt. Jeder Ansatz wurde mit 40 µl der elektrokompenten E. coli BJ 5183 gemischt und in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt (Gene Pulser®-Küvette, Biorad, München, Deutschland). Als Kontrollen dienten ein Ansatz, der nur 100 ng pAdEasy-1 sowie ein Ansatz, der 100 ng des rekombinanten pAdTrack-Vektors enthielt. Die Elektroporation erfolgte in einer Elektroporationskammer (Gene Pulser®, Biorad) bei 2500 V, 200 Ω und 25 µF. Auf den elektroporierten Ansatz wurden sofort 500 µl LB-Medium (siehe 7.1.) gegeben, um ein Absterben der Zellen zu verhindern. Die Zellsuspension wurde aus den Küvetten in 1.5 ml-Eppendorf-Gefäße überführt und bei 37°C und maximaler Schüttelfrequenz (Thermomixer) für 60 min geschüttelt. Die Ansätze wurden auf LB-Agarplatten ausgestrichen. Diese enthielten für den Kontrollansatz, der nur pAdEasy-1 enthielt, 100 µg/ml Ampicillin, für alle übrigen Ansätze 50 µg/ml Kanamycin. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Selektion eines rekombinanten Klons

Von den LB-Agarplatten wurden 20 bis 60 Klone gepickt. Diese wurden zunächst in 20 µl steriles bidestilliertes Wasser gegeben, anschließend in 2 ml LB-Medium (mit 50 µg/ml Kanamycin) überführt und über Nacht bei 180 rpm und 37°C geschüttelt. Die 20 µl Wasser wurden in eine PCR zum Nachweis von pAdEasy eingesetzt. Der PCR-Ansatz bestand aus 20 µl Wasser (mit gepickter Kolonie), 1x PCR-Enhancer (TaqMaster, Eppendorf), 40 mM dNTP (10 mM/Nukleotid), 50 pmol Primer AdEasy-forward, 50 pmol Primer AdEasy-reverse und 0.06 u Eppendorf Master Taq-Polymerase in 1x PCR-Puffer (Eppendorf). Die Primersequenzen und das verwendete PCR-Programm sind in Tab. 7.2.a angegeben.

Aus den über Nacht-Kulturen positiver Klone wurde die DNA isoliert (siehe 3.1.2.) und durch wiederholte PCR auf pAdEasy bzw. JCT und TRD überprüft. Die zum Nachweis von JCT und TRD verwendeten Primer und das PCR-Programm sind in Tab. 7.2.b u. c angegeben. Der PCR-Ansatz war analog dem der pAdEasy-PCR zusammengesetzt. Ein positiver Klon wurde in einen anderen E. coli-Stamm (TOP F

10) mittels Elektroporation umtransformiert. Die DNA wurde präparativ gewonnen (siehe 3.1.2.). Der Klon wurde durch eine Restriktionsanalyse mit dem Enzym *Pac I* überprüft.

3.4.3. Generierung des Virus in HEK293-Zellen

Anzucht und Kultur von HEK293-Zellen

Zur Kultivierung von HEK293-Zellen wurden bei -80°C gelagerte HEK293 Zellen durch schnelle Zugabe von 1 ml vorgewärmtem HEK-Medium (siehe 7.1.) aufgetaut und in eine 25 cm²-Zellkulturflasche mit 5 ml HEK-Medium gegeben. Die Zellen wurden bis zur Konfluenz bei 37°C (5% CO₂) kultiviert. Die Zellpassage erfolgte bei ca. 95% Konfluenz im Verhältnis 1:3.

Vorbereitung der DNA für die Transfektion

Die zu transfizierende DNA (pAdEasy-JCT \pm GFP, pAdEasy-TRD \pm GFP und pAdEasy-CTR \pm GFP) wurde zunächst mit *Pac I* linearisiert. Dazu wurden 10 μg DNA mit 20 u *Pac I* für 4 h bei 37°C geschnitten. Danach wurde das Enzym hitzeinaktiviert (80°C , 20 min). Die DNA wurde mittels NaAc/Ethanol-Präzipitation ausgefällt, um Proteine zu entfernen. Die gefällte DNA wurde in sterilem bidestillierten Wasser aufgenommen. Der Gehalt wurde photometrisch ermittelt.

Transfektion

Zur Transfektion wurden 5 μg der linearisierten Vektoren pAdEasy-JCT \pm GFP, pAdEasy-TRD \pm GFP und pAdEasy-CTR \pm GFP in 150 μl DMEM (Sigma, München, Deutschland) vorgelegt und mit 30 μl Superfect[®] (Qiagen) gut gemischt. Der Ansatz wurde zur Bildung von Mizellen für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde zum Transfektionsansatz 1 ml HEK-Medium (siehe 7.1.) gegeben. Diese Mischung wurde vorsichtig auf die zu 70% konfluenten HEK-Zellen einer 25 cm²-Schale gegeben. Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden 9 ml HEK-Medium zugegeben und der Ansatz im Brutschrank für mehrere Tage inkubiert. Nach 4-6 Tagen zeigten einige, mit pAdEasy-JCT+GFP, pAdEasy-TRD+GFP und pAdEasy-CTR+GFP transfizierte Zellen bei Einstrahlung von UV-Licht eine grüne Fluoreszenz. Die Expression des GFP war das Zeichen für

eine erfolgreiche Transfektion. Sie zeigte die korrekte Funktion eines der beiden CMV-Promotoren an. Zudem diente sie, in den mit pAdEasy-JCT-GFP, pAdEasy-TRD-GFP und pAdEasy-CTR-GFP transfizierten Zellen, als Kontrolle für das Ausmaß der Transfektion bzw. Infektion.

Ernte der Zellen

Zum Zeitpunkt der Ernte leuchteten einige Zellen unter UV-Licht grün. Die Zellen wurden im HEK-Medium mit einer Pipette vom Boden abgelöst und bei 51 x g (Raumtemperatur, 4 min) abzentrifugiert (Zentrifuge Universal 16 R). Das Zellpellet wurde in 10 ml PBS+Mg²⁺ (siehe 7.1.) gewaschen, rezentrifugiert und in 300 µl 100 mM HEPES, pH 7.4 (siehe 7.1.) resuspendiert. Das in HEPES-Puffer gelöste Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff vollständig eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Durch diesen Vorgang wurden die HEK293-Zellen aufgebrochen und die kompletten Viren freigesetzt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die lysierten Zellbestandteile wurden bei 91 x g für 4 min (Raumtemperatur) abzentrifugiert und der virushaltige Überstand bei -80°C gelagert.

Erste Infektion

Eine 75 cm²-Schale mit zu 75% konfluenten HEK293-Zellen wurde mit 50 µl des Überstandes der Transfektion infiziert. Die Infektion erfolgte in 2 ml DMEM + Pen/Strep (siehe 7.1.) ohne Serum für 1 h bei 37°C. Anschließend wurden 20 ml HEK-Medium hinzugegeben und die Schale bei 37°C inkubiert bis einige Zellen unter der UV-Lampe grün fluoreszierten (4 bis 7 Tage).

3.4.4. Amplifikation des Virus und Titerbestimmung

Die Zellen der ersten Infektion wurden wie oben beschrieben geerntet (siehe 3.4.3.). Zur Amplifikation wurden zu 75% konfluente HEK293-Zellen in 185 cm²-Schalen mit je 10 µl Viruslösung der ersten Infektion infiziert (siehe 3.4.3.). Bereits nach einem Tag fluoreszierten einige Zellen bei Einstrahlung von UV-Licht. Die Zellen wurden geerntet, als ca. 80% der Zellen eine grüne Fluoreszenz zeigten. Die Zellen von vier infizierten 185 cm²-Schalen wurden in 1 ml 100 mM HEPES pH 7.4 lysiert. Zur weiteren Vermehrung des Virus wurden zwanzig 185 cm²-Schalen mit je 5 µl des Überstandes der ersten Amplifikation infiziert. Nach 3 - 5 Tagen leuchteten alle

Zellen grün. Die Zellen wurden in 5 ml 100 mM HEPES, pH 7.4, lysiert. Das Virus wurde in dieser Weise weiter amplifiziert, wenn der Titer nicht ausreichend hoch (ca. 10^8 bis 10^{10} IU/ml) war.

Vorbereitung und Infektion der Zellen zur Titerbestimmung

HEK293-Zellen wurden auf sechs 1.5-cm²-Kulturschalen ausgesät. Bei einer Anzahl von ca. 10^6 HEK293-Zellen pro Schale wurde die Infektion vorgenommen.

Zur Infektion wurde zunächst das alte Kulturmedium abgesaugt und 500 µl neues Kulturmedium pro Schale hinzugegeben. 2, 5, 10, 25 und 50 µl der jeweiligen Virussuspension wurden zu einer 1.5-cm²-Schale hinzugegeben, wobei eine nicht-infiziert blieb und als Kontrolle diente. Anschließend wurde für 3 h inkubiert. Nach Zugabe von 1.5 µl frischem Kulturmedium zu jeder Schale wurde für weitere 72 h inkubiert.

Auswertung der Titerbestimmung

Nach 72 h Inkubationszeit entsprach diejenige Viruslysatkonzentration einer MOI (Multiplicity of Infection) von 10-20, bei der die Zellen vollständig abgelöst waren. Als Vergleich bzw. als Negativkontrolle diente die nicht infizierte Schale. Hatten sich nach 72 h keine oder alle Zellen abgelöst, wurde die Titerbestimmung wiederholt, wobei die Viruslysatkonzentration pro Schale dementsprechend erhöht oder erniedrigt wurde.

3.4.5. Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

125.000 bis 2 Mio. neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden 2 Tage nach Isolation und Kultivierung (siehe 3.5.) mit einer MOI von 25 bis 200 in serumhaltigem Kultur-Medium (siehe 7.1.) infiziert. Die Ernte (siehe 3.3.1.) bzw. Weiterverarbeitung der Zellen erfolgte 48 h nach der Infektion.

3.5. Isolation und Kultur neonataler Ratten-Kardiomyozyten

Die Isolation und Kultur neonataler Ratten-Kardiomyozyten erfolgte mit Hilfe des Worthington-Kits[®]. 1-3 Tage alte neonatale Ratten wurden durch Abschneiden des Kopfes mit einer Schere getötet. Die Herzen (10-30) wurden rasch entnommen und in 30 ml Reagenz 1 (Worthington) gegeben. Nach Spülen der Herzen mit 10 ml Reagenz 1 wurden sie anschließend in einer Petrischale mit 2 Skalpelln zerkleinert. Die zerkleinerten Herzen wurden in 10 ml Reagenz 1 aufgenommen, mit 1 ml Trypsin-Lösung (Worthington) versetzt und für 16-20 h bei 2-8°C inkubiert. Dann wurde der Suspension 1 ml Trypsin-Inhibitor-Lösung (Worthington) hinzugefügt. Dieses Gemisch wurde im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Es folgte eine langsame Zugabe von 4 ml Kollagenase-Lösung (Worthington) und eine anschließende Inkubation von 30-40 min bei 37°C. Danach wurde die Zellsuspension 10 mal titriert und durch ein Sieb filtriert. Die Zellen wurden bei 1400 rpm für 10 min abzentrifugiert und in 10 ml DMEM + 15% FCS (siehe 7.1.) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 30 min auf eine Kollagen-beschichtete Petrischale gegeben, um die Kardiomyozyten von den Fibroblasten zu trennen. Nach dieser Zeit haften die Fibroblasten am Boden, während die Kardiomyozyten weiterhin suspendiert bleiben. Dann wurde die Kardiomyozyten-haltige Suspension abgesaugt und für 10 min bei 1400 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml Kulturmedium (siehe 7.1.) aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Dazu wurden 20 µl Zellsuspension abgenommen, mit 80 µl Trypanblau-Lösung versetzt und in eine Neubauerkammer gegeben. Es wurden 4 x 16 Felder ausgezählt, wobei nur die weißen, vitalen Zellen berücksichtigt wurden, während die blauen, toten Zellen nicht in die Zählung eingingen.

Die Zellzahl berechnete sich mit der Formel: Zellzahl = ausgezählte Zellen x 5 (= 5 ml Kulturmedium) x 5 (= Verdünnung der Zellen) x 10⁴ (= Faktor Neubauerkammer).

3.6. Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz wurden neonatale Ratten-Kardiomyozyten in einer 3.5 cm²-Schale kultiviert (ca. 125.000 pro Schale). In jeder Schale befand sich ein Deckgläschen, welches mit Kollagen beschichtet wurde. Kollagen dient zur besseren Anhaftung der Kardiomyozyten an das Trägerobjekt. Es erfolgte eine Virusinfektion mit dem AdEasyTRD- bzw. AdEasyJCT-Virus bei einer MOI von 100. Zwei Tage nach der Infektion wurden die Kardiomyozyten zunächst mit PBS gewaschen und anschließend mit Methanol für 20 min bei RT fixiert. Nach dreimaligem Waschen der fixierten Kardiomyozyten mit PBS wurden unspezifische Bindungsstellen mit "BSA-c-basic blocking solution" (1:10 in PBS, Aurion, Wageningen, Niederlande) für 30 min bei Raumtemperatur (RT) geblockt. Für den Nachweis von Triadin 1 wurden die Kardiomyozyten mit dem Trn6-Antikörper (Verdünnung von 1:100) für 16 h bei RT inkubiert. Zum Nachweis von Junctin wurde der 5D8-A8-Antikörper in 100-facher Verdünnung verwendet (Tab. 7.1.). Die Detektion der gebundenen primären Antikörper erfolgte dann durch eine Immunreaktion mit den an Biotin gekoppelten sekundären Antikörpern gegen Maus-IgG (Junctin) bzw. Kaninchen-IgG (Triadin) in einer Verdünnung von 1:300. Biotin konnte anschließend durch Streptavidin-Cy3 (Verdünnung von 1:200) nachgewiesen werden. Cy3 ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der bei Bestrahlung mit UV-Licht rotes Licht der Wellenlänge 565 nm emittiert. Triadin und Junctin konnten so als rot-gefärbte Bereiche in den Kardiomyozyten visualisiert werden. Für die abschließende Fluoreszenzmikroskopie wurde ein Zeiss Axioskop mit geeignetem Filter verwendet.

3.7. Messung der intrazellulären Ca²⁺-Transienten-Ratio

Die relative Konzentration der im Intrazellularraum befindlichen freien Ca²⁺-Ionen wurde mit Hilfe des Ca²⁺-sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes Indo-1/AM (Grynkiewicz et al. 1985) bestimmt. Von dem hier verwendeten lipophilen und daher membranpermeablen Indo-1/AM (Molecular Probes, Eugene, USA) werden nach Eintritt in die Zelle die Estergruppen durch unspezifische Esterasen abgespalten. Dadurch wird der Farbstoff in seine Ca²⁺-sensitive, membranimpermeable Form überführt (Abb. 3.6.). Der Farbstoff wurde durch eine Xenon-Lampe mit Licht der

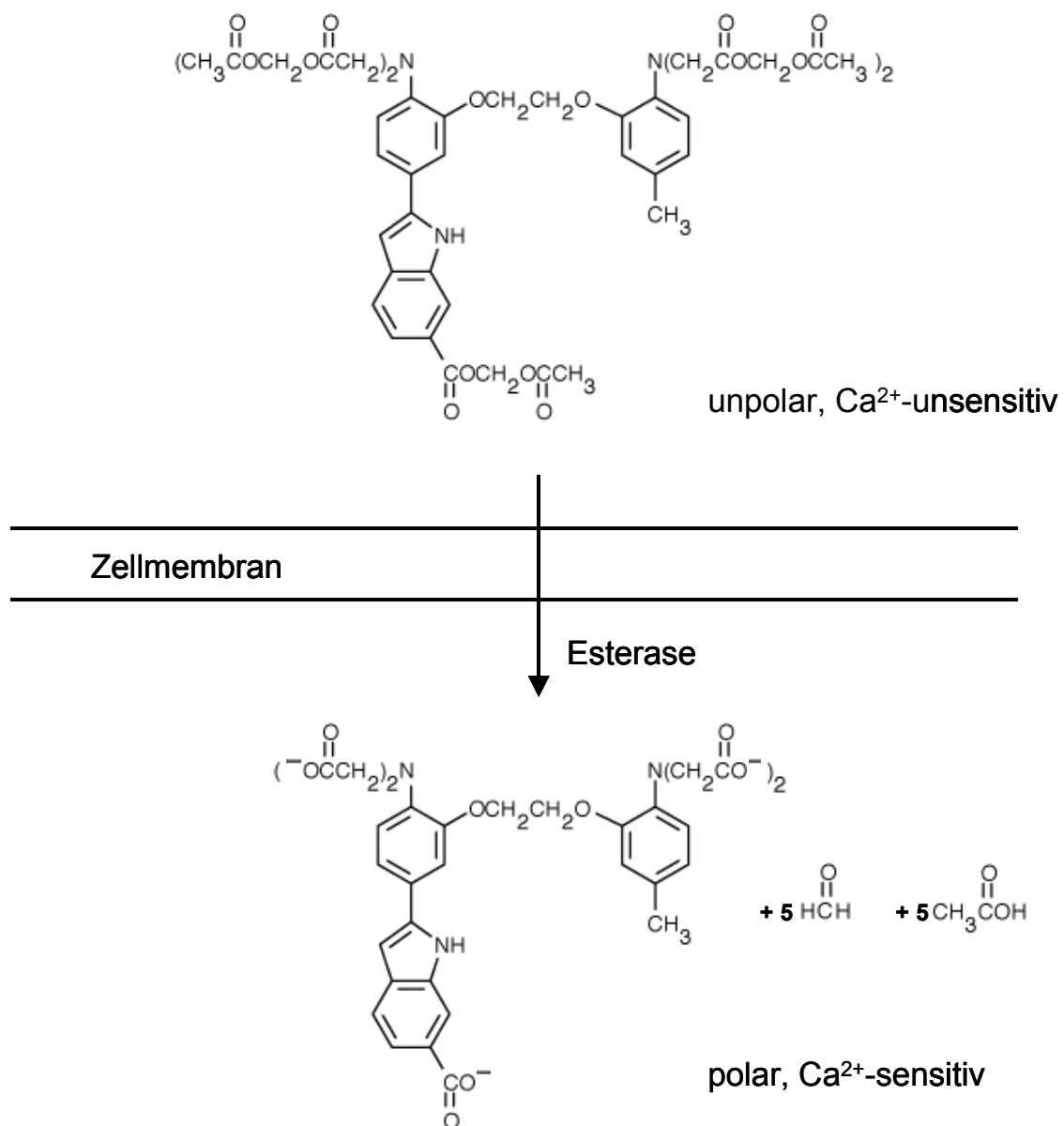
Wellenlänge 365 nm angeregt und die anteilige Emission des vom Indikator ausgesandten Lichtes einer Wellenlänge von 405 und 495 nm durch zwei Photomultiplier registriert (PTI, Princeton, USA). Indo-1 besitzt die Eigenschaft, sein Emissionsmaximum nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen von 495 nm nach 405 nm zu verschieben. Deshalb kann aus dem Quotienten der Emissionen bei 405 und 495 nm die relative intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration berechnet werden (Grynkiewicz et al. 1985). Alle Experimente wurden bei 25°C durchgeführt, um einen Verlust von Indo-1 aus dem Intrazellularraum, der bei höheren Temperaturen leicht auftritt, während der Messungen zu vermeiden (Di Virgilio et al. 1988, Kao 1994).

Messung von Ca^{2+} -Transienten an neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Isolierte, neonatale Ratten-Kardiomyozyten (siehe 3.5.) wurden in der Perfusionskammer eines inversen Mikroskops (Nikon, Tokio, Japan) für 10 Minuten im Meßpuffer (siehe 7.1.) mit 25 μM Indo-1/AM und 2.5% Pluronic F-127 (Molecular Probes, Eugene, USA) bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit Meßpuffer für 10 Minuten perfundiert (2 ml/min), um überschüssigen Farbstoff aus dem Perfusionsbad zu entfernen (Yao et al. 1998). Die Zellen wurden durch Platin-Elektroden mit einer Frequenz von 0.5, 1.0 und 1.5 Hz bei einer Spannung von 50 V elektrisch stimuliert. Die relative intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration der einzelnen Kardiomyozyten, welche im folgenden auch als Ca^{2+} -Transienten bezeichnet wird, wurde registriert (Abb. 3.7.). Die Meßdaten wurden mit einem handelsüblichen Computersystem erfaßt und ausgewertet.

3.8. Statistische Auswertung

Aus den Versuchsergebnissen wurden das arithmetische Mittel und der zugehörige Standardfehler des Mittelwertes (SEM) errechnet. Mit „n“ wurde die Anzahl der Einzelversuche bezeichnet. Die statistische Signifikanz der Unterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mittels t-Test nach Student ermittelt. Bei einem Vergleich mehrerer Gruppen wurde die statistische Signifikanz durch einen Tuckey-Kramer-Test festgestellt. P-Werte kleiner oder gleich 0.05 wurden als signifikant bewertet.

**Abb.3.6. :****Graphische Darstellung der Zellbeladung mit dem Acetoxymethyl-(AM)-Esterderivat Indo-1/AM**

Dargestellt ist die Überführung des membranpermeablen, unpolaren und Ca^{2+} -unsensitiven Farbstoffs Indo-1/AM in die membranimpermeable, polare und damit Ca^{2+} -sensitive Form (Indo-1) nach Abspaltung der Estergruppen durch unspezifische zelluläre Esterasen.

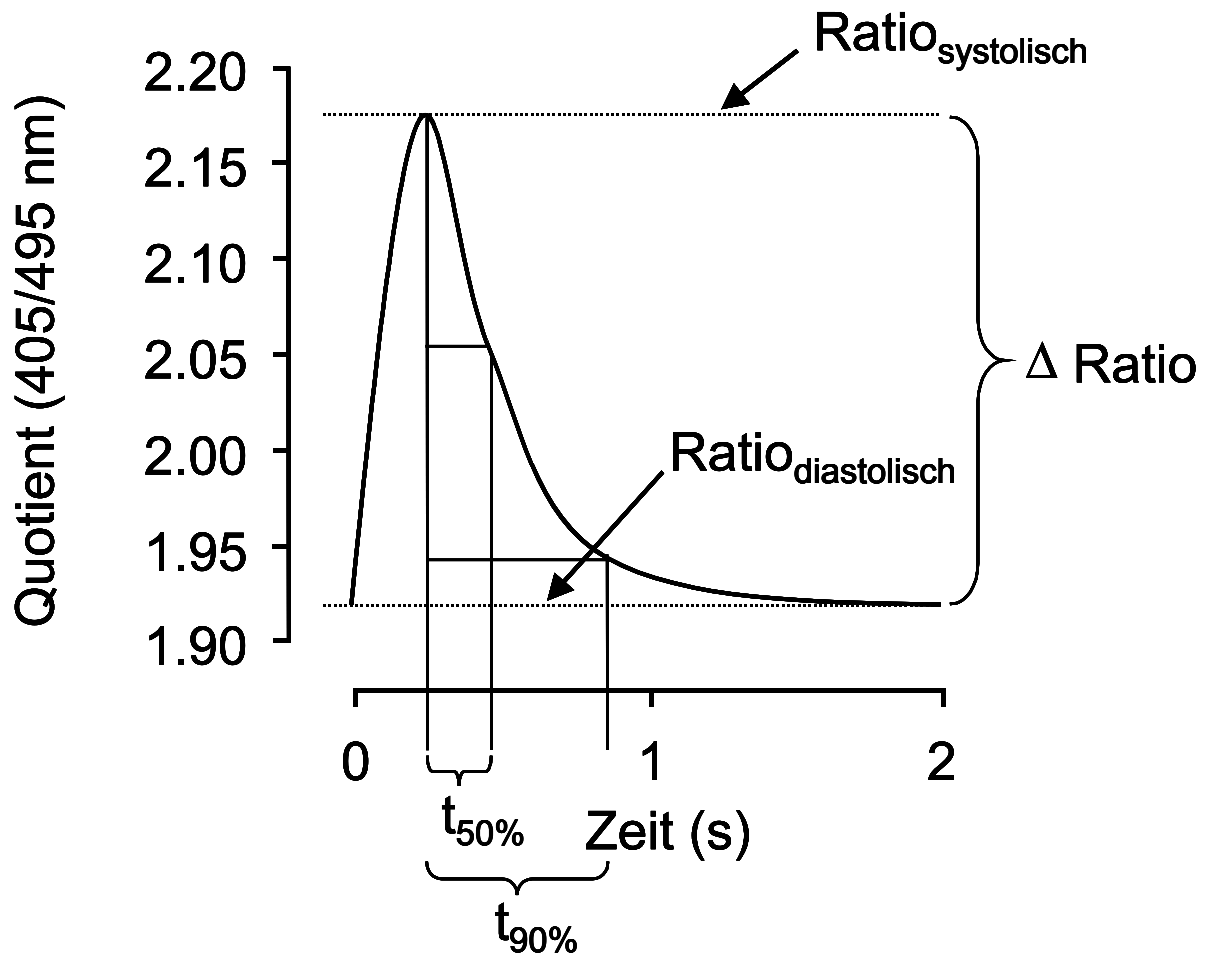


Abb.3.7. :

Graphische Darstellung eines einzelnen Ca^{2+} -Transienten

Es ist dargestellt ein einzelner Ca^{2+} -Transient, gemessen in einem Kardiomyozyten der neonatalen Ratte (nicht infiziert), welche mit einer Spannung von 50 V und einer Frequenz von 0.5 Hz stimuliert wurde. Bei den Transienten wurde jeweils die diastolische Ratio ($\text{Ratio}_{\text{diastolisch}}$), die systolische Ratio ($\text{Ratio}_{\text{systolisch}}$), die Differenz zwischen systolischer und diastolischer Ratio (ΔRatio), die Zeit bis zum Abfall auf die halbmaximale relative Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} ($t_{50\%}$) und die Zeit bis zum Abfall auf 10% der maximalen Konzentration des intrazellulären Ca^{2+} ($t_{90\%}$) ermittelt. Die relative Ca^{2+} -Konzentration ist als Quotient der gemessenen Wellenlängen bei 405 und 495 nm dargestellt.

4. ERGEBNISSE

4.1. Qualitativer Nachweis rekombinanter Adenovirus-DNA

Nach homologer Rekombination der jeweiligen Shuttle-Vektoren (pAdTrackTRD±GFP, pAdTrackJCT±GFP und pAdTrackCTR±GFP) mit der adenoviralen DNA (pAdEasy-1), wurden die neu generierten Expressionsvektoren sowohl mittels PCR-Reaktion, als auch durch Restriktionsverdau analysiert (Abb. 4.1.).

Bei der Generierung der rekombinanten Expressionsvektoren AdEasyJCT+GFP (Abb. 4.2. A), AdEasyTRD-GFP und AdEasyCTR-GFP kam es zu einer alternativen Möglichkeit der homologen Rekombination. Dies zeigte eine Restriktionsanalyse mit *Pac I* (Abb. 4.2. B u. C). Normalerweise rekombinieren der rechte und der linke Arm beider Vektoren miteinander. Bei den oben genannten Expressionsvektoren rekombinierten alternativ der rechte Arm und der bakterielle Replikationsursprung (Ori) aus dem Shuttle-Vektor und der adenoviralen DNA. Nach *Pac I*-Verdau der durch die homologe Rekombination entstandenen Vektoren AdEasyJCT+GFP, AdEasyTRD-GFP und AdEasyCTR-GFP erhielt man entsprechend ein Fragment von 4500 bp anstelle der erwarteten 3000 bp, bei Verdau von AdEasyTRD+GFP, AdEasyJCT-GFP und AdEasyCTR+GFP mit *Pac I*.

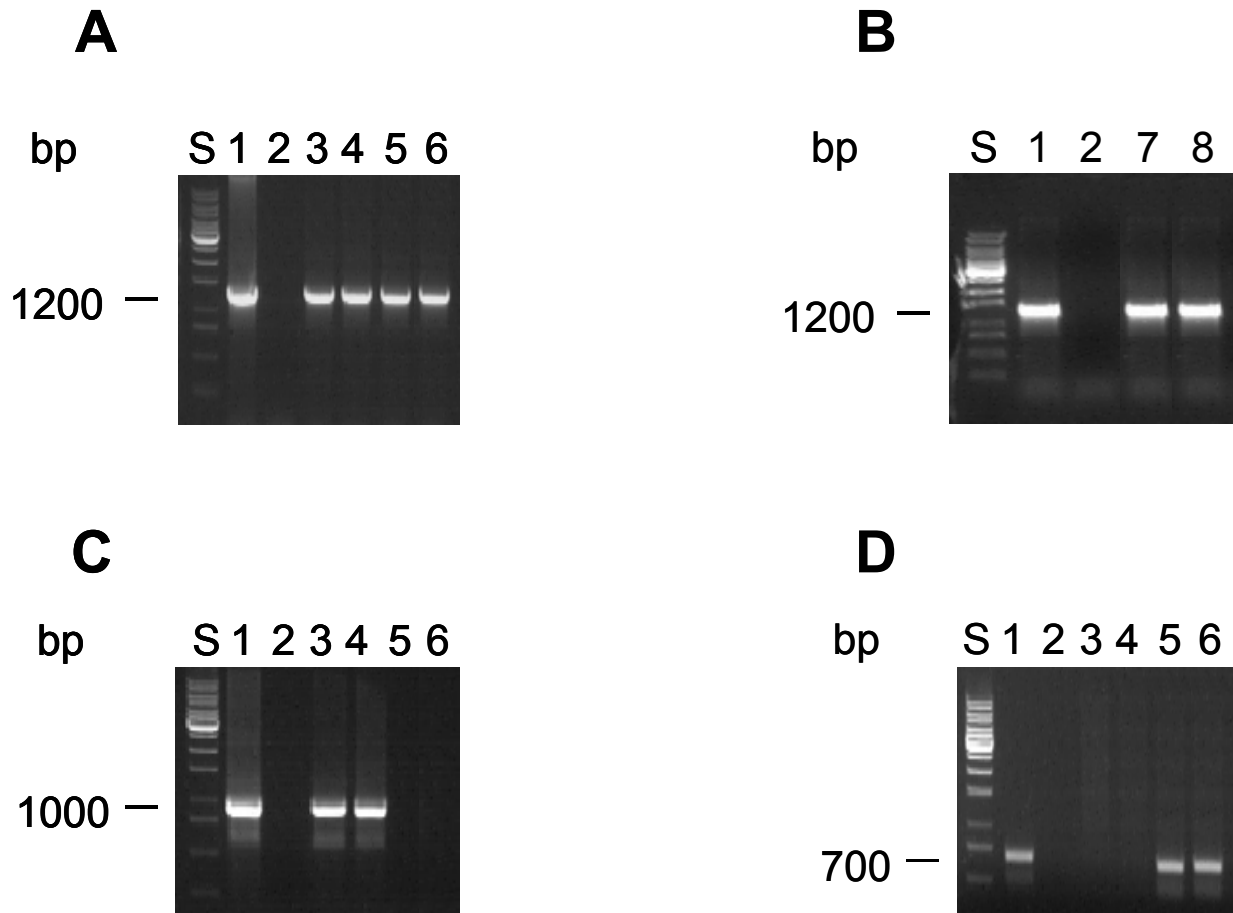
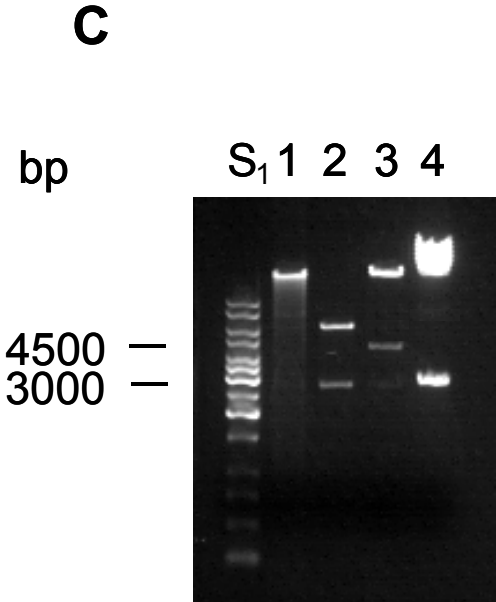
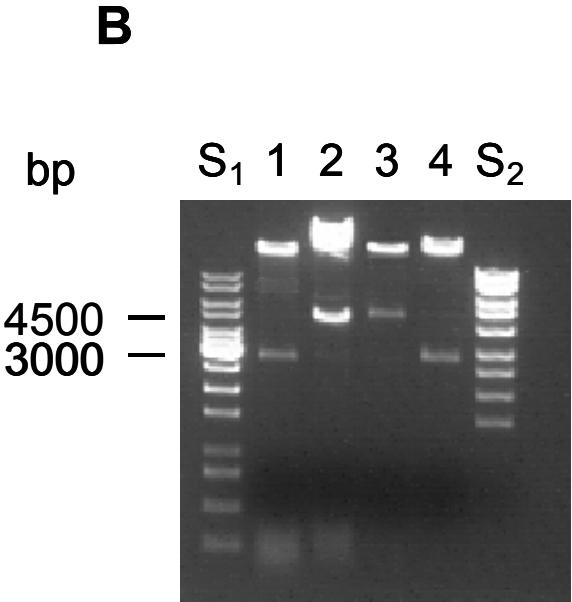
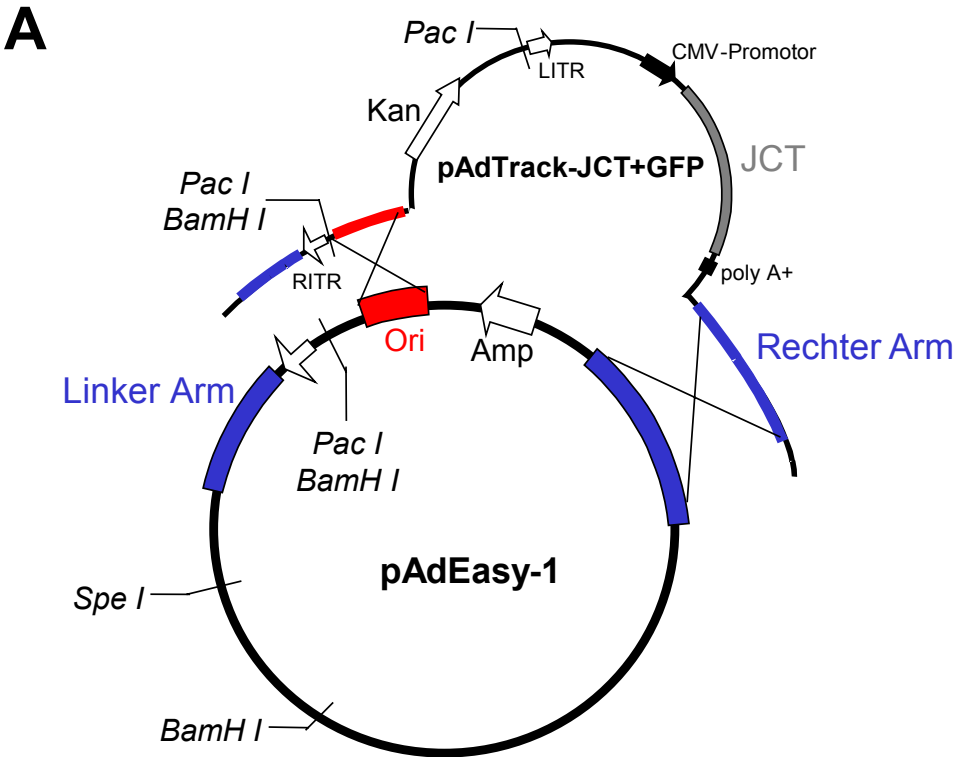


Abb. 4.1.:
Agarosegele zur Analyse von PCR-Syntheseprodukten

Nachweis von pAdEasy-1 in den neu generierten viralen Expressionsvektoren mit den Primern AdEasy-forward und AdEasy-reverse. Beide Primer binden komplementär an die AdEasy-1-DNA und produzieren ein ca. 1.2 kb großes Fragment (**A und B**). Der Nachweis von TRD bzw. JCT in der entsprechenden Virus-DNA ist durch die Synthese eines charakteristischen PCR-Produktes gekennzeichnet (**C**, TRD-PCR-Produkt 990 bp; **D**, JCT-PCR-Produkt 700 bp). Primersequenzen und verwendetes PCR-Programm sind in Tab. 7.2. angegeben.

(**S**) 1 kb-DNA-Leiter als Standard, (**1**) Positivkontrolle, (**2**) Negativkontrolle, (**3**) AdEasyTRD+GFP, (**4**) AdEasyTRD-GFP, (**5**) AdEasyJCT+GFP, (**6**) AdEasyJCT-GFP, (**7**) AdEasyCTR+GFP, (**8**) AdEasyCTR-GFP



**Abb. 4.2.:
Restriktionsanalyse der rekombinanten Adenoviren-DNA**

Dargestellt ist das Schema der homologen Rekombination zur Herstellung von pAdEasyJCT+GFP (**A**) sowie der gelelektrophoretische Nachweis der Restriktionsanalyse (**B**) und (**C**). pAdEasyJCT+GFP wurde durch homologe Rekombination von pAdEasy-1 und dem Shuttle-Vektor pAdTrackJCT+GFP in Bakterienzellen generiert. Zur Restriktionsanalyse wurden pAdEasyTRD+GFP (**B, Spur 1**), pAdEasyTRD-GFP (**B, Spur 2**), pAdEasyJCT+GFP (**B, Spur 3**), pAdEasyJCT-GFP (**B, Spur 4**), pAdEasyCTR-GFP (**C, Spur 3**), pAdEasyCTR+GFP (**C, Spur 4**), pAdEasy-1 (**C, Spur 1**) und pAdTrack (**C, Spur 2**) mit dem Restriktionsenzym *Pac I* verdaut. Zum Größenvergleich wurde eine 1 kb-DNA-Leiter als Standard (**B und C, S₁**) und zum Massenvergleich ein Mengenstandard (**B, S₂**) aufgetragen. Durch alternative homologe Rekombination von rechtem Arm und dem Replikationsursprung (Ori) an Stelle des linken Arms erhielt man nach Verdau mit *Pac I* ein Fragment von 4500 bp für die Expressionsvektoren pAdEasyJCT+GFP, pAdEasyTRD-GFP und pAdEasyCTR-GFP anstelle von 3000 bp.

CMV-Promotor: Cytomegalievirus-Promotor, ITR: invertierte terminale Wiederholungssequenz, LITR: Linke ITR, RITR: Rechte ITR, Amp: Ampicillin-Resistenzgen, Kan: Kanamycin-Resistenzgen.

4.2. Adenovirale Infektion von HEK293-Zellen

Nach Transfektion der Virus-DNA (Expressionsvektoren: AdEasyTRD±GFP, AdEasyJCT+GFP und AdEasyCTR+GFP) in humane embryonale Nierenzellen (HEK293-Zellen) sind diese in der Lage, die Genprodukte der deletierten Bereiche ($\Delta E1$ und $\Delta E3$) von pAdEasy-1 zu komplettieren und infektiöse, aber replikationsdefiziente Viren (AdTRD±GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP) zu bilden. Zur Charakterisierung einer erfolgreichen Virusproduktion diente die Betrachtung von infizierten HEK293-Zellen unter UV-Licht. Eine grüne Fluoreszenz zeigte eine Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und war ein Zeichen für eine erfolgreiche Virusproduktion (Abb. 4.3.).

Eine Untersuchung der Proteinexpression von TRD, JCT und des Virushüllproteins mittels Westernblotting in infizierten HEK293-Zellen diente als ein weiterer Nachweis für eine erfolgreiche Virusproduktion. Dazu wurden zunächst weitere Virusamplifikationen in den HEK293-Zellen durchgeführt und die Titer der jeweiligen Viren (wie unter 3.4.4. beschrieben) somit ausreichend erhöht (ca. 10^{10} bis 10^{12} IU/ml). Die nach Virusfreisetzung lysierten HEK293-Zellen wurden homogenisiert (siehe 3.3.1.) und die Proben der einzelnen Amplifikationen durch Westernblotting analysiert. TRD konnte in mit AdTRD+GFP infizierten HEK293-Zellen mit dem Antikörper Trn6 nachgewiesen werden (Abb. 4.4. A). Mit steigender Amplifikation (1-3) konnte ein Anstieg der TRD-Expression erzielt werden. Das gleiche galt auch für AdJCT+GFP-infizierte HEK293-Zellen, bei denen es mit steigender Amplifikation (1-3) auch zu einem Anstieg der Protein-Expression kam. Das exprimierte JCT konnte mit dem Antikörper 5D8A8 nachgewiesen werden (Abb. 4.4. B).

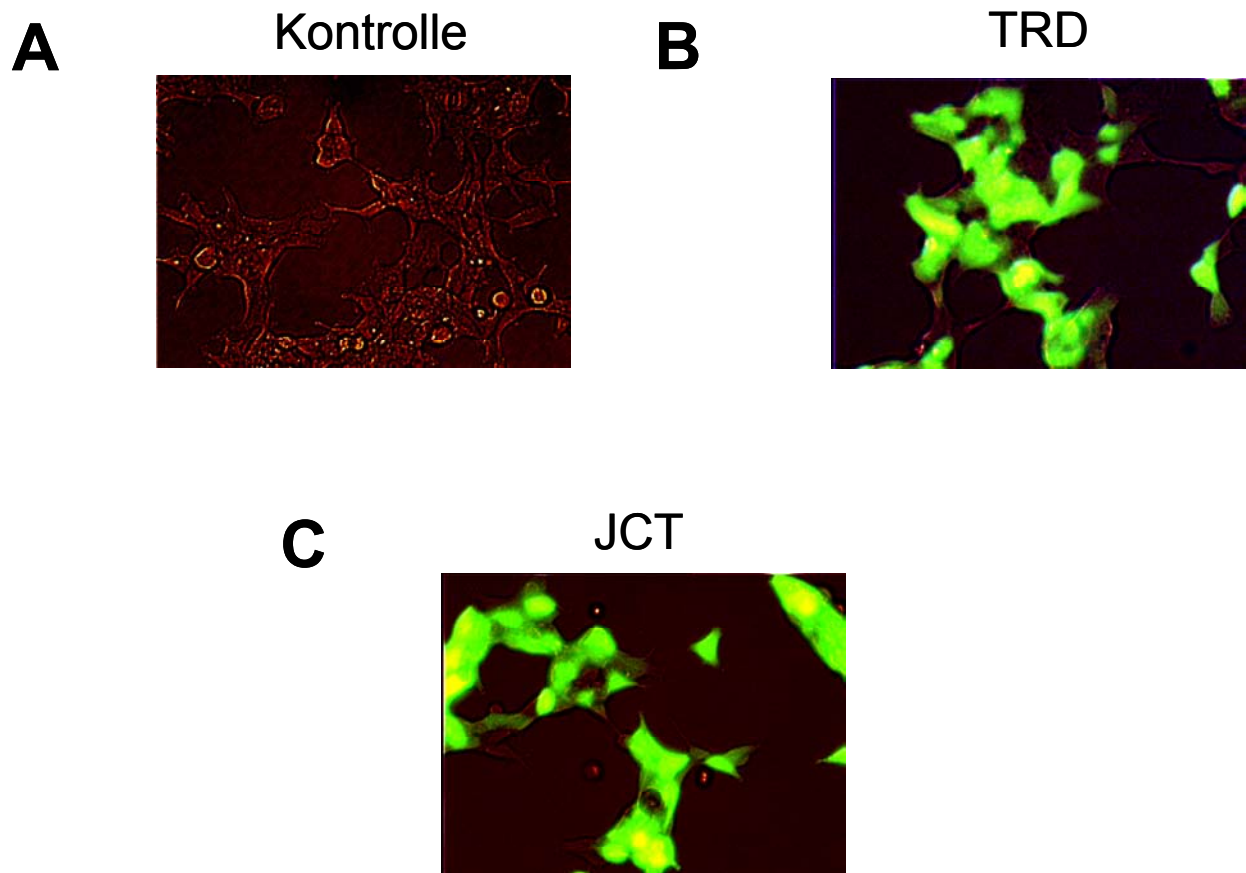


Abb. 4.3.:

Adenovirale Infektion von humanen embryonalen Nierenzellen (HEK293-Zellen)

Diese photographischen Aufnahmen zeigen nicht-infizierte (A), AdTRD+GFP-infizierte (B) und AdJCT+GFP-infizierte (C) HEK293-Zellen bei Betrachtung im Lichtmikroskop unter UV-Licht. Die infizierten HEK293-Zellen wurden für 48 h in virushaltigem Medium kultiviert. AdTRD+GFP und AdJCT+GFP exprimierten das grün fluoreszierende Protein (GFP), das nach Anregung mit UV-Licht grün leuchtete.

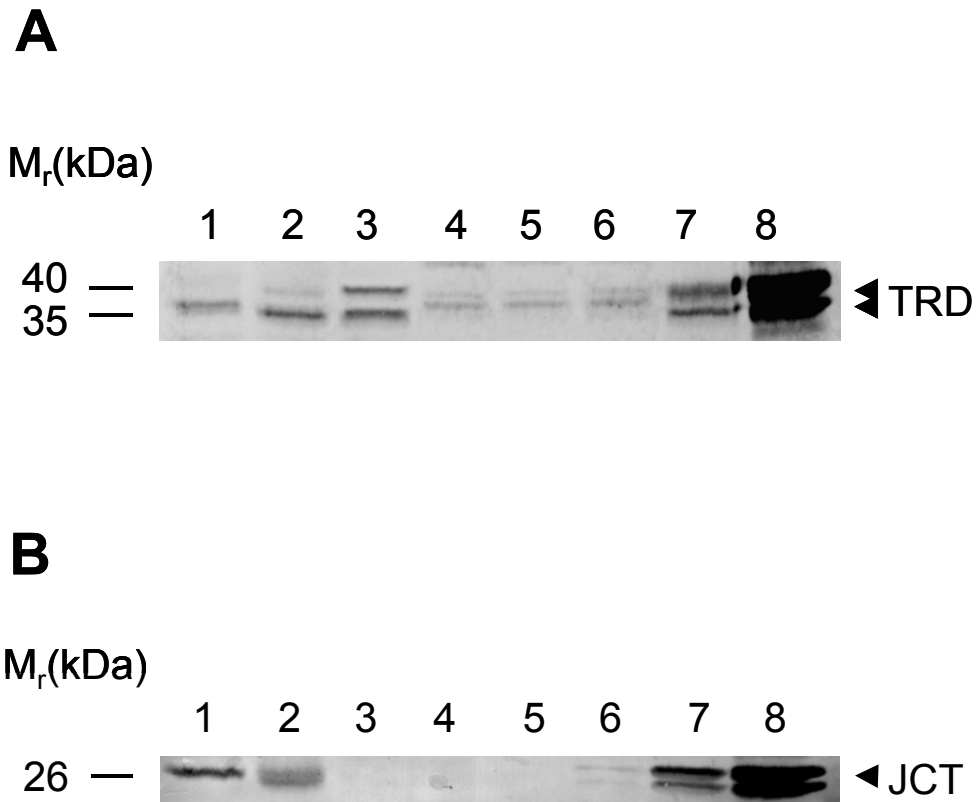


Abb. 4.4.:

Proteinexpression von Triadin 1 und Junctin in adenoviral infizierten HEK293-Zellen

Darstellung des immunologischen Nachweises von Triadin 1 (TRD) (**A**) und von Junctin (JCT) (**B**).

Pro Spur wurden 100 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben. (**A**) Der immunologische Nachweis erfolgte mit dem Antikörper Trn6 gegen TRD. Dieser Antikörper erkennt sowohl die deglykosylierte (35 kDa, untere Pfeilspitze) als auch die glykosylierte (40 kDa, obere Pfeilspitze) Form des TRD der Ratte und des Hundes. Gelbeladung: (1) adulte Ratte, (2) neonatale Ratte, (3) Hund, (4) HEK293-Zellen, (5) mit AdCTR+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation), (6) mit AdTRD+GFP-infizierte HEK293-Zellen (1. Amplifikation), (7) mit AdTRD+GFP-infizierte HEK293-Zellen (2. Amplifikation), (8) mit AdTRD+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation). (**B**) Der immunologische Nachweis von JCT erfolgte mit dem Antikörper 5D8A8. Dieser Antikörper erkennt ausschließlich das JCT des Hundes. Gelbeladung: (1) Hund, (2) JCT-überexprimierende transgene Maus, (3) adulte Ratte, (4) HEK293-Zellen, (5) mit AdCTR+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation), (6) mit AdJCT+GFP-infizierte HEK293-Zellen (1. Amplifikation), (7) mit AdJCT+GFP-infizierte HEK293-Zellen (2. Amplifikation), (8) mit AdJCT+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation).

Ein anderer Nachweis auf die Funktionalität der Viren ist die immunologische Detektion des Virushüllproteins. Die Expression des Virushüllproteins steht dabei im direkten Zusammenhang mit der Anzahl der für die Infektion eingesetzten Viren (Abb.4.5.).

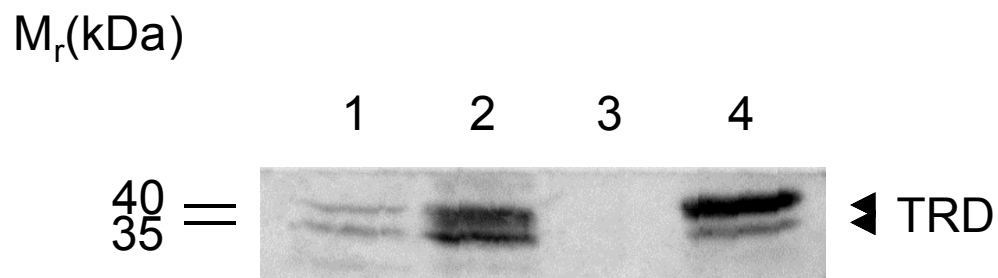
Der Infektionsverlauf von AdTRD-GFP-infizierten HEK293-Zellen konnte nicht durch die Visualisierung einer grünen Fluoreszenz, die für eine GFP-Expression steht, kontrolliert werden. Die Testung der Funktionalität erfolgte hingegen durch Nachweis einer TRD-Expression mittels Westernblotting (Abb. 4.6.).

Alle neu generierten Viren (AdTRD±GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP) bewirkten nach Infektion von HEK293-Zellen bei ausreichend hohem Virustiter eine Zelltoxizität. Diese Eigenschaft kann man sich bei der Virustiterbestimmung (siehe 3.4.4.) zu Nutzen machen. Dabei werden eine Million HEK293-Zellen mit definierten, absteigenden Viruskonzentrationen infiziert und anschließend für 72 h inkubiert. Nach dieser Zeit entspricht diejenige Viruskonzentration einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 10, bei der die Zellen vollständig vom Boden abgelöst waren. Die MOI ist ein Maß für das Verhältnis von Viruszahl (angegeben in IU) zu Zellzahl. Die Werte für die folgenden Viren (AdTRD±GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP) sind in Tab. 4.1. angegeben.



Abb. 4.5.:
Proteinexpression der Virushülle in adenoviral infizierten HEK293-Zellen

Dargestellt ist der immunologische Nachweis des Virushüllproteins in adenoviral infizierten HEK293-Zellen. Pro Spur wurden 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben. Das Virushüllprotein (E2a) wurde mit einem spezifischen Antikörper detektiert. Die Signalstärke korreliert mit der, für die Infektion von HEK293-Zellen eingesetzten Virusmenge. Gelbeladung: (1) adulte Ratte, (2) neonatale Ratte, (3) Hund, (4) HEK293-Zellen, (5) AdCTR+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation), (6) AdTRD+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation), (7) AdJCT+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation).

**Abb. 4.6.:**

Triadin-Expression in HEK293-Zellen, die mit einem für Triadin 1 kodierenden Adenovirus (AdTRD+GFP bzw. AdTRD-GFP) infiziert wurden

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von Triadin 1 (TRD). Pro Spur wurden 100 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben. Gelbeladung: (1) Hund, (2) mit AdTRD-GFP-infizierte HEK293-Zellen (4. Amplifikation), (3) mit AdCTR+GFP-infizierte HEK293-Zellen (4. Amplifikation), (4) mit AdTRD+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation).

	Virusmenge (in μl)	MOI	IU/ml
AdTRD+GFP	0.5	10	2×10^{10}
AdTRD-GFP	0.5	10	2×10^{10}
AdJCT+GFP	0.2	10	5×10^{10}
AdCTR+GFP	0.02	10	5×10^{11}

Tab. 4.1.:
Auswertung der Virustiterbestimmung

Hier ist die jeweilige Virusmenge (in μl) angegeben, die bei adenoviraler Infektion von einer Million HEK293-Zellen und einer Virusinkubationszeit von 72 h, einen vollständigen Zelltod bewirkte. Dies entsprach einer MOI von 10. Die eingesetzte Viruszahl (angegeben in IU/ml) ließ sich demnach wie folgt berechnen: (MOI x Anzahl infizierter Zellen x 1000/eingesetzte Viruskonzentration (in μl))

4.3. Adenovirale Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden, wie unter 3.5. beschrieben, isoliert und kultiviert. Nach 2 Tagen erfolgte eine adenovirale Infektion mit einer MOI von 25 bis 200 in serumhaltigem Kultur-Medium (siehe 7.1.). Neonatale Ratten-Kardiomyozyten sind nicht in der Lage, die deletierten Bereiche ($\Delta E1$ und $\Delta E3$) von pAdEasy-1 zu komplettieren und infektiöse Viren zu bilden (Vergleich HEK293-Zellen). Die Viren können sich somit nach Infektion in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nicht weiter vermehren. Die neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mußten im Gegensatz zu den HEK293-Zellen mit einer höheren Viruskonzentration infiziert werden, um eine vergleichbare Produktion von Virusprotein und rekombinantem Protein (TRD bzw. JCT) zu erhalten.

4.3.1. Nachweis der Virus-DNA in infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Zum Nachweis der Virus-DNA durch Southern-Blotting, wurden neonatale Ratten-Kardiomyozyten mit den rekombinanten Adenoviren AdJCT+GFP, AdTRD+GFP und AdCTR+GFP infiziert. Als Kontrolle dienten nicht-infizierte Zellen und AdEasyTRD+GFP (Virus-DNA). Die Zellen wurden 48 h nach Infektion geerntet und die DNA, wie unter 3.1.5. beschrieben, isoliert. Das Ergebnis des Southernblottings zeigt Abb. 4.7.

Der Nachweis erfolgte mit einer spezifischen Sonde die, gegen eine Teilsequenz der Virus-DNA gerichtet war. In den adenoviral infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten war die Virus-DNA nachweisbar.

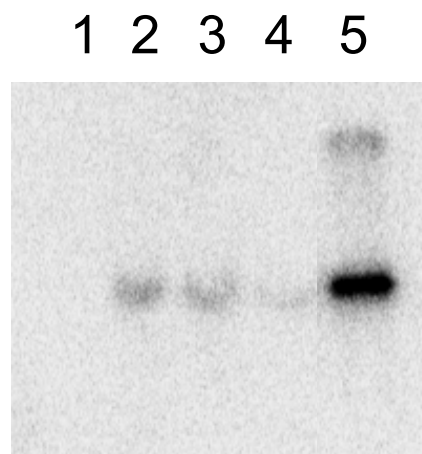


Abb. 4.7.:
Nachweis der Virus-DNA

Dargestellt ist das Autoradiogramm eines Southern Blots mit dem Nachweis von Virus-DNA in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, die mit den rekombinanten Adenoviren infiziert wurden. Gelbeladung: (1) DNA aus nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, (2) DNA aus AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, (3) DNA aus AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, (4) DNA aus AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, (5) pAdEasyTRD+GFP (Virus-DNA).

4.3.2. Untersuchung der mRNA-Expression

Durch Northern Blotting wurde in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten überprüft, ob es zu einer Expression der rekombinanten Gene (TRD bzw. JCT) kommt. Nach Infektion der Zellen mit AdTRD+GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP wurde die Gesamt-RNA, wie unter 3.2.1. beschrieben, isoliert. Eine eventuelle Degradierung der RNA-Proben wurde durch eine elektrophoretische Auftrennung von 20 µg Gesamt-RNA im Agarosegel unter Ethidiumbromidfärbung überprüft und ausgeschlossen (Abb. 4.8.A). Der Nachweis der rekombinanten Gene erfolgte mit einer Sonde, die gegen die kodierende Sequenz von JCT bzw. TRD gerichtet war (siehe 3.2.4.). Die TRD-Sonde war in der Lage sowohl das exogene als auch das endogene Transkript zu erkennen (Abb. 4.8. B), während die JCT-Sonde ausschließlich das exogene Transkript erkannte (Abb. 4.8. C). Dennoch war im Northernblot nur das exogene TRD zu erkennen, was mit hoher Wahrscheinlichkeit auf eine noch zu geringe TRD-mRNA-Produktion in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten zurückzuführen ist (Abb. 4.8.B). In mit AdTRD+GFP- infizierten Zellen war eine massive Expression von TRD-mRNA und in AdJCT+GFP-infizierten Zellen eine massive Expression von JCT-mRNA nachweisbar.

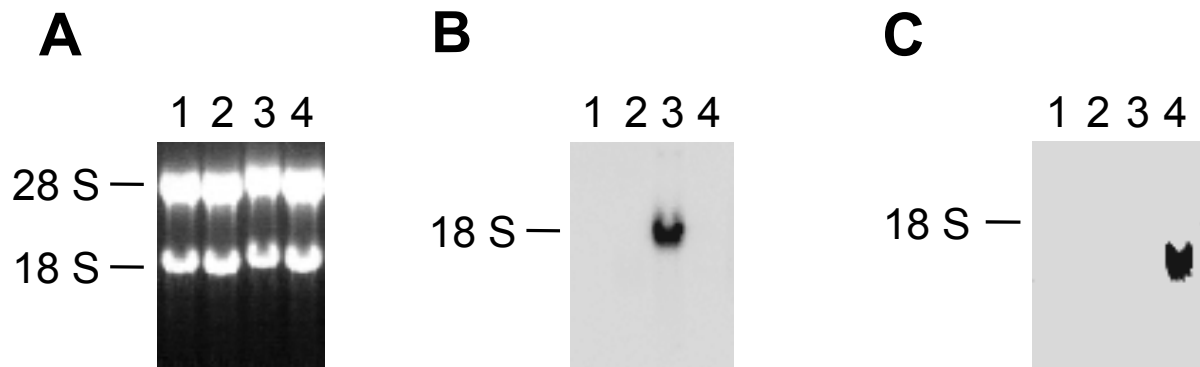


Abb. 4.8.:
RNA-Agarosegel und mRNA-Expression

Photographie eines 1%igen RNA-Agarosegels (**A**). Auf jeder Spur sind 20 μ g Gesamt-RNA aus nicht-infizierten und adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten aufgetragen. **B** und **C** zeigen Autoradiogramme von Northernblots. Gelbeladung: (1) RNA aus nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, (2) RNA aus AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, (3) RNA aus AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, (4) RNA aus AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. In **B** wurde die TRD-mRNA mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, die gegen die kodierende Sequenz von TRD gerichtet war, detektiert. Endogene Ratten-TRD-mRNA konnte in nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**Spur 1**) nicht detektiert werden, obwohl die Sonde dafür ausgerichtet war, sowohl exogene, als auch endogene TRD-mRNA zu erkennen. In **C** erfolgte die Detektion von JCT-mRNA mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde, die die kodierende Sequenz von JCT erkennt. Diese Sonde detektiert nur exogene Hunde-JCT-mRNA. Zum Größenvergleich ist die Bande der ribosomalen RNA (18 S) am linken Bildrand der Abbildung **B** und **C** angegeben.

4.3.3. Untersuchung der Proteinexpression

Die Vorbefunde auf mRNA-Ebene wurden weiterhin auf Protein-Ebene mit Hilfe des Western-Blot-Verfahrens untersucht. 100 µg Homogenat aus AdTRD+GFP- und AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten wurden hierfür in Anwesenheit von SDS elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembranen transferiert. Exprimiertes TRD (Abb. 4.9. A) und JCT (Abb. 4.9. B) konnten mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Der Antikörper Trn6 erkennt dabei sowohl Hunde-, als auch Rattentriadin, während der Antikörper 5D8A8 nur Hundejunctin erkennt. In nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten konnte auf Proteinebene keine TRD-Expression nachgewiesen werden. Dies bestätigte die Untersuchungen auf RNA-Ebene. Die TRD-Proteinexpression in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten ist noch so gering, daß TRD in Homogenat vom Antikörper Trn6 nicht detektiert werden konnte. Dagegen wurde TRD in Homogenaten von adulten Ratten-Kardiomyozyten (100 µg) von diesem Antikörper erkannt (hier nicht gezeigte Daten). Als Kontrolle wurden Homogenate aus AdTRD+GFP- und AdJCT+GFP-infizierten HEK293-Zellen, nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten und Hundeherzgewebe aufgetragen.

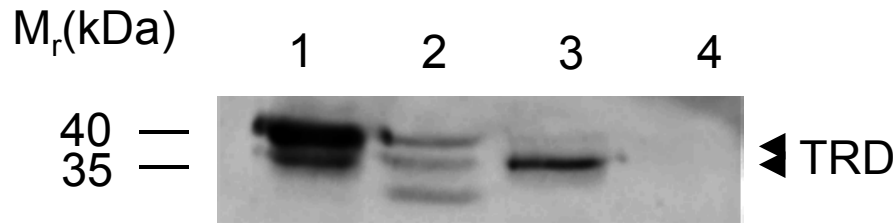
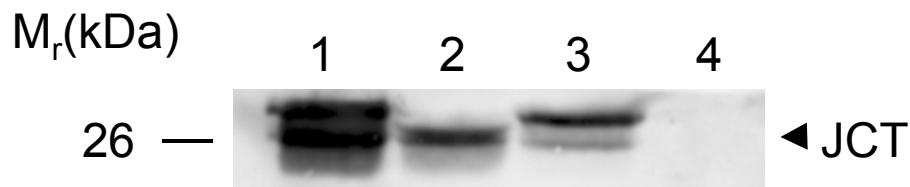
A**B**

Abb. 4.9.:
Proteinexpression

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von TRD (**A**) und JCT (**B**). Pro Spur wurden 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) am Bildrand angegeben. (**A**), Gelbeladung: (1) AdTRD+GFP-infizierte HEK293-Zellen (2. Amplifikation), (2) Hundeherz, (3) AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (4) nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (**B**), Gelbeladung: (1) AdJCT+GFP-infizierte HEK293-Zellen (3. Amplifikation), (2) Hundeherz, (3) AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (4) nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten.

4.3.4. Immunfluoreszenz adenoviral-infizierter neonataler Ratten-Kardiomyozyten

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden mit den rekombinanten Adenoviren AdTRD+GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP bei einer MOI von jeweils 100, wie unter 3.4.5. beschrieben, infiziert. 48 h nach Infektion konnte der Grad der Infektion der Zellen durch die Co-Expression des grün fluoreszierenden Proteins visualisiert werden. Die infizierten Zellen fluoreszierten bei Betrachtung unter UV-Licht grün (Abb. 4.10.). Die Expression von JCT und TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten konnte durch Western-Blot-Analyse nachgewiesen (siehe 4.3.3) und durch Immunfluoreszenz sichtbar gemacht werden. Für die Immunfluoreszenz wurden die Ratten-Kardiomyozyten, wie unter 3.6. beschrieben, behandelt. JCT und TRD konnten, durch Anregung der Zellen mit UV-Licht, als rot gefärbte Bereiche in den Ratten-Kardiomyozyten visualisiert werden (Abb. 4.11.). Die Kerngegenfärbung erfolgte durch Inkubation mit DAPI (Roche) und war durch eine blaue Fluoreszenz gekennzeichnet. In den infizierten Ratten-Kardiomyozyten war im Zellkern eine Expression von GFP sichtbar (Abb. 4.10.). Dagegen kam es zu keiner bzw. nur einer sehr geringen Proteinexpression von JCT und TRD im Zellkern der infizierten Ratten-Kardiomyozyten (Abb. 4.11.).

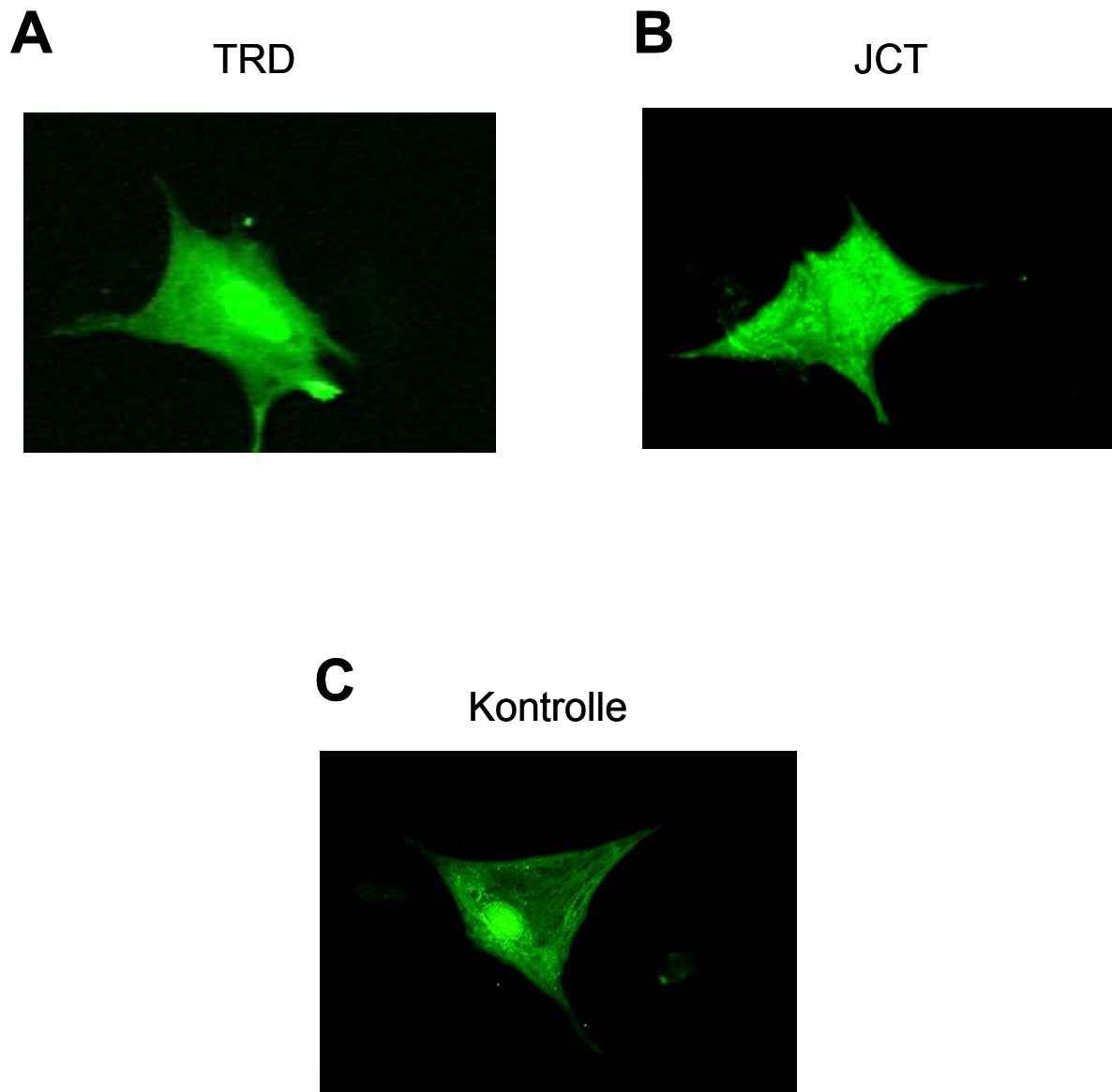


Abb. 4.10.:
GFP-Expression

Dargestellt sind AdTRD+GFP-infizierte (**A**), AdJCT+GFP-infizierte (**B**) und AdCTR+GFP-infizierte (**C**) neonatale Ratten-Kardiomyozyten bei Betrachtung unter UV-Licht. Die Kardiomyozyten wurden mit einer MOI von 100 infiziert und für 48 h in virushaltigem Medium kultiviert. Das exprimierte grün fluoreszierende Protein (GFP) leuchtete nach Anregung mit UV-Licht grün.

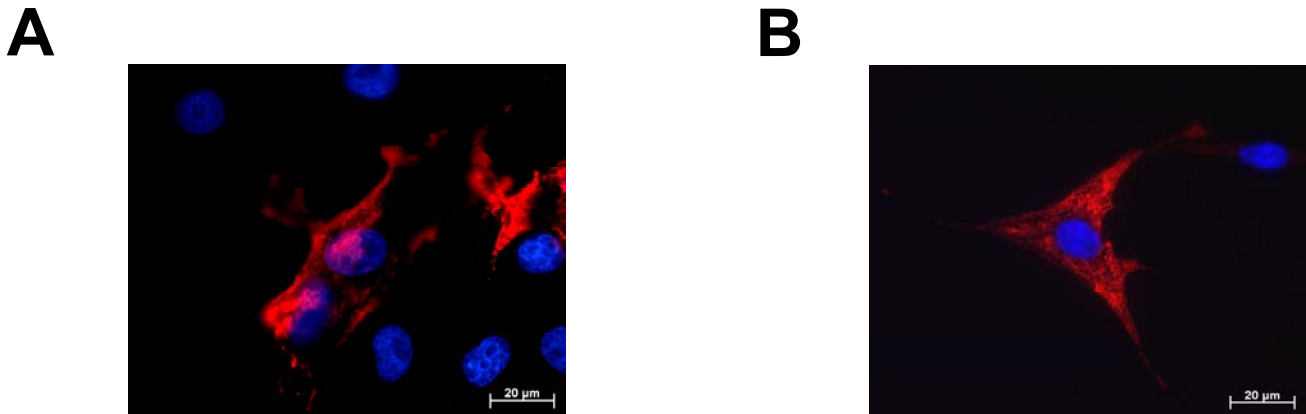


Abb. 4.11.:
Immunfluoreszenz

Dargestellt sind AdTRD+GFP-infizierte (**A**) und AdJCT+GFP-infizierte (**B**) neonatale Ratten-Kardiomyozyten bei Betrachtung unter UV-Licht. Die Kardiomyozyten wurden mit einer MOI von 100 infiziert und für 48 h in virushaltigem Medium kultiviert. Durch das Immunfluoreszenz-Verfahren unter Benutzung eines Cy3-gekoppelten sekundären Antikörpers konnten JCT und TRD nach Anregung der Zellen mit UV-Licht als rot-fluoreszierende Bereiche nachgewiesen werden. Die Zellkerne sind nach Kerngegenfärbung als blau-fluoreszierende Bereiche gekennzeichnet. Im unteren rechten Bereich der Abbildungen befindet sich eine Maßstabsangabe zur Verdeutlichung der Größenverhältnisse.

4.4. Optimierung des adenoviral-vermittelten Gentransfers in neonatalen Ratten- Kardiomyozyten

Nach der Etablierung der Expression von TRD und JCT in isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten sollten die funktionellen Auswirkungen durch die Messung der Ca^{2+} -Transienten (siehe 4.6.) bestimmt werden. Dazu mußten zunächst optimale Infektionsbedingungen für eine hohe Proteinexpression gefunden werden.

4.4.1. Auswirkung von fetalem Kälberserum (FCS) auf die Infektionsrate adenoviral infizierter neonataler Ratten-Kardiomyozyten

Nach Isolation neonataler Ratten-Kardiomyozyten erfolgte eine Kultivierung der Zellen für 48 h in Kulturmedium (siehe 7.1.). Für eine adenovirale Infektion wurde das alte Kulturmedium durch neues Kulturmedium, welches das entsprechende Adenovirus enthielt, ersetzt. Das neue Kulturmedium beinhaltete zusätzlich 2% FCS. FCS hat zahlreiche Eigenschaften, die bei der Kultivierung von Zellen für deren Vitalität von großer Bedeutung sind. Bei einer adenoviralen Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten könnte FCS die Infektionsrate der Zellen verringern, indem es die Rezeptoren, die für eine Viruserkennung verantwortlich sind, auf den Zellen besetzt. Aus diesem Grund wurde folgender Versuch konzipiert:

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden mit AdTRD+GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP mit einer MOI von 100 infiziert und für 48 h in virushaltigem Kulturmedium (mit 2% FCS) inkubiert. Vergleichend erfolgte eine Infektion der neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit den oben genannten Viren, bei der die Zellen zunächst für 2 h in virushaltigem Kulturmedium, welches kein FCS enthielt, inkubiert wurden. Erst anschließend erfolgte die Zugabe von 2% FCS und eine weitere Inkubation für 46 h. 48 h nach adenoviraler Infektion wurden die Zellen unter dem Lichtmikroskop betrachtet. Bei den adenoviral infizierten Zellen, bei denen das FCS erst 2 h später in das Kulturmedium zugefügt wurde, waren mehr Zellen abgestorben, als unter der Vergleichsinfektion mit sofortiger FCS-Zugabe. Anschließend wurden die Zellen, wie unter 3.3.1. beschrieben, geerntet und

homogenisiert. Die jeweilige Proteinexpression wurde in den adenoviral infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mittels Western Blotting untersucht.

TRD konnte in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit dem Trn6-Antikörper (Abb. 4.12.A) nachgewiesen werden. Die TRD-Expression war in den Zellen, denen das FCS sofort nach Infektion zugefügt wurde, um 32% niedriger als in den Zellen, denen das FCS erst 2 h nach der Infektion zugefügt wurde (AdTRD+GFP, FCS 2 h später: 100%; AdTRD+GFP FCS, sofort: $68 \pm 13\%$). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.12.B).

JCT konnte in AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit dem 5D8A8-Antikörper (Abb. 4.13.A) nachgewiesen werden. Die JCT-Expression war in den Zellen, denen das FCS sofort nach Infektion zugefügt wurde, um 16% niedriger als in den Zellen, denen das FCS erst 2 h nach der Infektion zugefügt wurde (AdJCT+GFP FCS 2 h, später: 100%; AdJCT+GFP, FCS sofort: $84 \pm 20\%$). Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte allerdings nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.13.B).

In AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten konnte das GFP mit dem Anti-GFP-Antikörper (Abb. 4.14.A) nachgewiesen werden. Auch die GFP-Expression war in den Zellen, denen das FCS sofort nach Infektion zugefügt wurde, um 26% niedriger als in den Zellen, denen das FCS erst 2 h nach der Infektion zugefügt wurde (AdCTR+GFP, FCS 2 h später: 100%; AdCTR+GFP, FCS sofort: $74 \pm 15\%$). Ein signifikanter Unterschied ergab sich allerdings auch hier nicht (Abb. 4.14.B).

Insgesamt war die Expression aller drei untersuchten Proteine (TRD, JCT und GFP) bei den adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten niedriger, wenn die Zugabe von FCS zum Kulturmedium sofort nach Virusinfektion erfolgte. Allerdings war der Unterschied in der Proteinexpression bei den beiden unterschiedlichen Infektionsmethoden statistisch nicht signifikant. Da die Vitalität der Zellen bei sofortiger FCS-Zugabe 48 h nach Virusinfektion höher war, wurde für die folgenden Versuche das FCS gleich bei Beginn der Infektion zum Kulturmedium zugegeben.

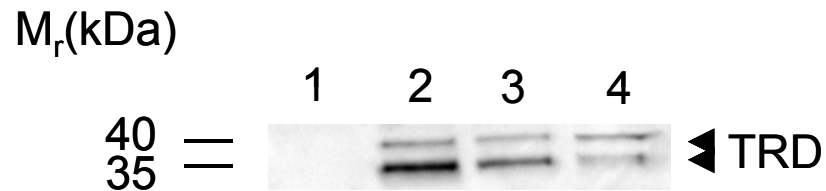
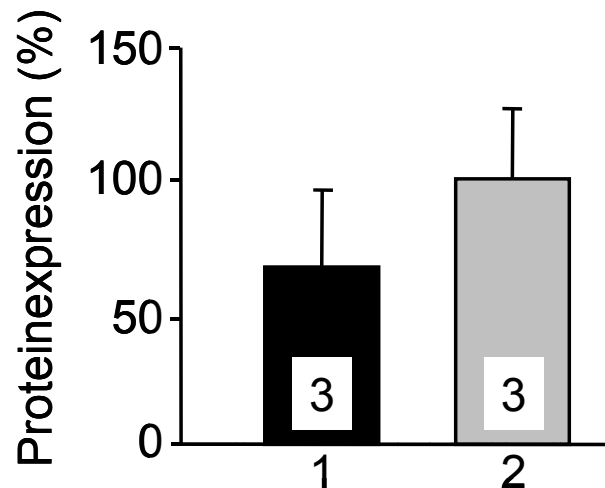
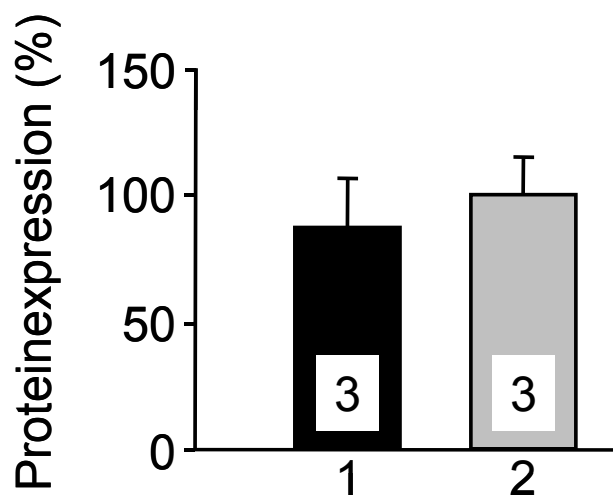
A**B**

Abb. 4.12.:
Adenovirale Expression von TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von FCS

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von TRD (**A**) sowie die Quantifizierung der Expression (**B**) nach Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit AdTRD+GFP in Abhängigkeit von FCS.

(**A**) Pro Gelspur wurden 100 µg Protein aufgetragen. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) am linken Bildrand angegeben. Gelbelastung: (1) nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (2) AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (FCS-Zugabe 2 h nach Virusinfektion), (3) AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (FCS-Zugabe sofort bei Virusinfektion), (4) Hundherz.

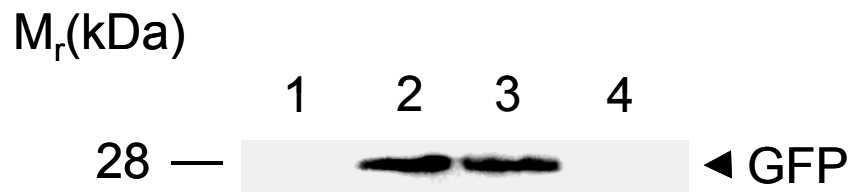
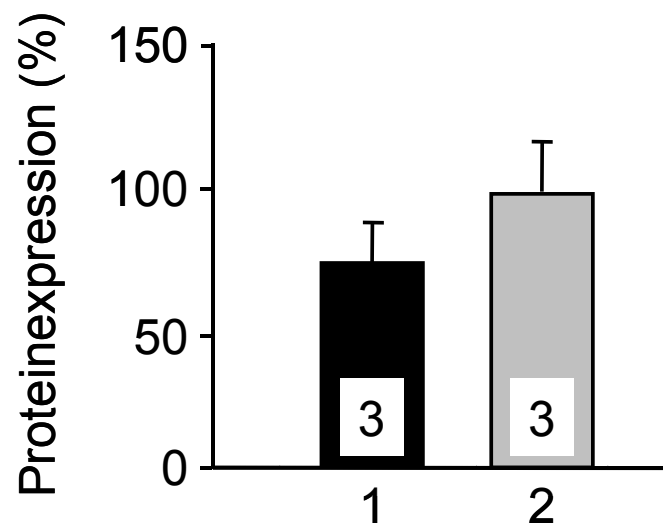
(**B**) Die Expression von TRD wurde mit Hilfe des ImageQuant-Software in drei unabhängigen Versuchen (n=3) quantifiziert. Die TRD-Expression in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit FCS-Zugabe 2 h nach Infektion (2) wurde gleich 100% gesetzt. (1) TRD-Expression in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit FCS-Zugabe sofort bei Infektion.

A**B****Abb. 4.13.:****Adenovirale Expression von JCT in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von FCS**

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von JCT (**A**) sowie die Quantifizierung der Expression (**B**) nach Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit AdJCT+GFP in Abhängigkeit von FCS-Zugabe.

(**A**) Pro Gelspur wurden 100 µg Protein aufgetragen. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben. Gelbeladung: (**1**) nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (**2**) AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (FCS-Zugabe 2 h nach Virusinfektion), (**3**) AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (FCS-Zugabe sofort bei Virusinfektion), (**4**) Hundherz als Kontrolle.

(**B**) Die Expression von JCT wurde in drei unabhängigen Versuchen (n=3) quantifiziert. Die JCT-Expression in AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit FCS-Zugabe 2 h nach Infektion (**2**) wurde gleich 100% gesetzt. (**1**) JCT-Expression in AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit FCS-Zugabe sofort bei Infektion.

A**B****Abb. 4.14.:****Adenovirale Expression von GFP in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von FCS**

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von GFP (**A**) sowie die Quantifizierung der Expression (**B**) nach Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit AdCTR+GFP in An- bzw. Abhängigkeit von FCS.

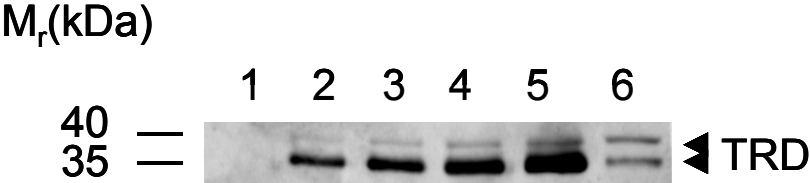
(**A**) Pro Gelspur wurden 100 µg Protein aufgetragen. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben. Gelbelastung: (1) nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (2) AdCTR+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (FCS-Zugabe 2 h nach Virusinfektion), (3) AdCTR+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (FCS-Zugabe sofort bei Virusinfektion), (4) Hundherz-Homogenat.

(**B**) Die Expression von GFP wurde mit Hilfe der ImageQuant-Software quantifiziert (n=3). Die GFP-Expression in AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit FCS-Zugabe 2 h nach Infektion (2) wurde gleich 100% gesetzt. (1) GFP-Expression in AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit FCS-Zugabe sofort bei Infektion.

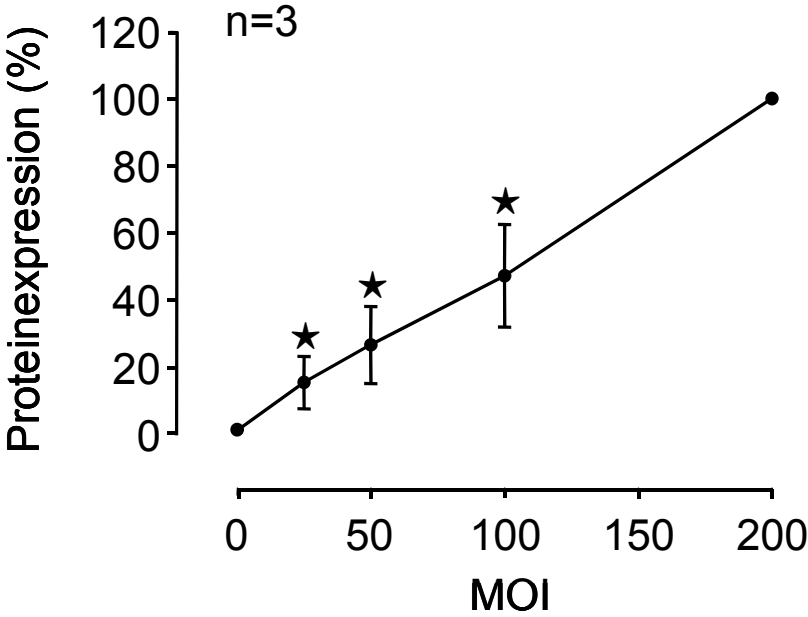
4.4.2. Proteinexpression von TRD und JCT in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Viruskonzentration

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden 2 Tage nach Isolation und Kultivierung mit jeweils steigenden Konzentrationen (MOI 25 bis 200) an AdTRD+GFP und AdJCT+GFP für 48 h infiziert. Die Expression von TRD und JCT wurde auf Proteinebene mittels Westernblotting nachgewiesen (Abb. 4.15. A und 4.16. A). TRD und JCT wurden mit den Antikörpern Trn6 und 5D8A8 (Vergleiche 4.4.1.) detektiert. Es kam zu einem Anstieg der TRD-Expression mit steigenden Viruskonzentrationen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. (AdTRD+GFP MOI von 25: 15.4 ± 7.8 %, AdTRD+GFP MOI von 50: 26.6 ± 11.5 %, AdTRD+GFP MOI von 100: 47.2 ± 15.3 %, AdTRD+GFP MOI von 200: 100 %) (Abb. 4.15. B). Ebenso konnte eine erhöhte JCT-Expression mit steigenden Viruskonzentration verglichen mit nicht-infizierten Zellen nachgewiesen werden. (AdJCT+GFP MOI von 25: 18.7 ± 8.0 %, AdJCT+GFP MOI von 50: 28.7 ± 10.8 %, AdJCT+GFP MOI von 100: 70.0 ± 3.3 %, AdJCT+GFP MOI von 200: 100 %) (Abb. 4.16. B). Bei einer adenoviralen Infektion der neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit einer MOI von 200 und einer Inkubationsdauer von 48 h war allerdings eine erhöhte Absterberate der Zellen unter dem Mikroskop zu beobachten. Aus diesem Grund wurde für die folgenden Versuche auf eine adenovirale Infektion mit einer MOI größer 100 verzichtet.

A



B

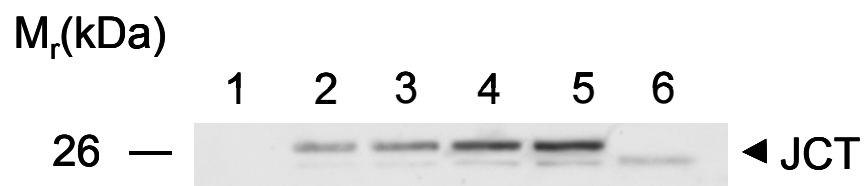
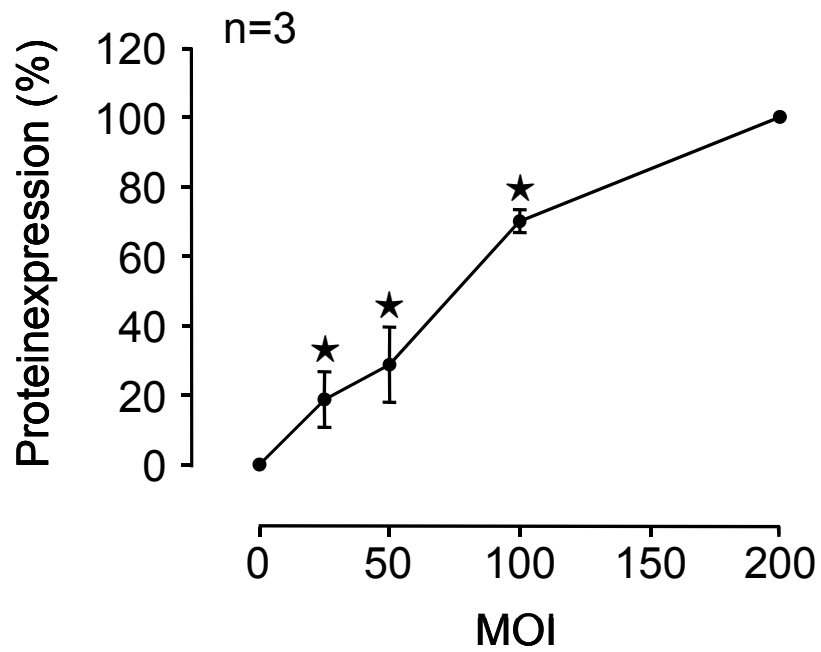


*p < 0.05 vs. MOI 200

**Abb. 4.15.:
TRD-Expression in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten
in Abhängigkeit von der Viruskonzentration**

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von TRD (**A**). Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden mit steigenden Konzentrationen an AdTRD+GFP infiziert. Die Virusmenge ist angegeben als Multiplizität der Infektion (MOI). Die Zellen wurden mit einer MOI von 25, 50, 100 und 200 infiziert und nach 48 h geerntet. Nach Homogenisation der infizierten Zellen wurden in einer SDS-Page pro Spur 100 µg des Homogenats aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf Nitrocellulose und der immunologische Nachweis von TRD mittels eines geeigneten Antikörpers. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben. Gelbeladung: **(1)** nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, **(2)** AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (MOI 25), **(3)** AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (MOI 50), **(4)** AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (MOI 100), **(5)** AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (MOI 200), **(6)** Hundeherz als Kontrolle.

(B) Immunologische Quantifizierung von TRD. Die Expression von TRD wurde mit Hilfe der ImageQuant-Software quantifiziert. Die TRD-Expression in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten bei einer MOI von 200 wurde gleich 100% gesetzt.

A**B**

* $p < 0.05$ vs. MOI 200

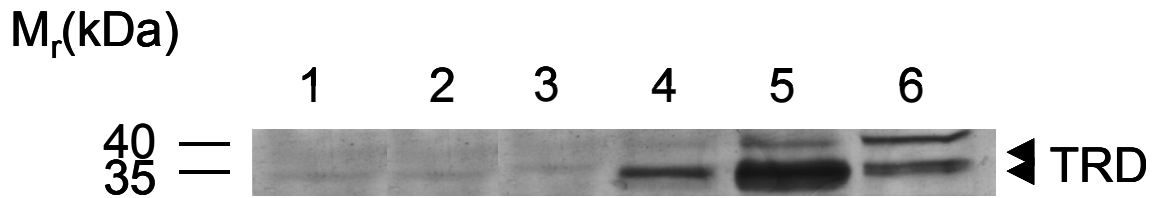
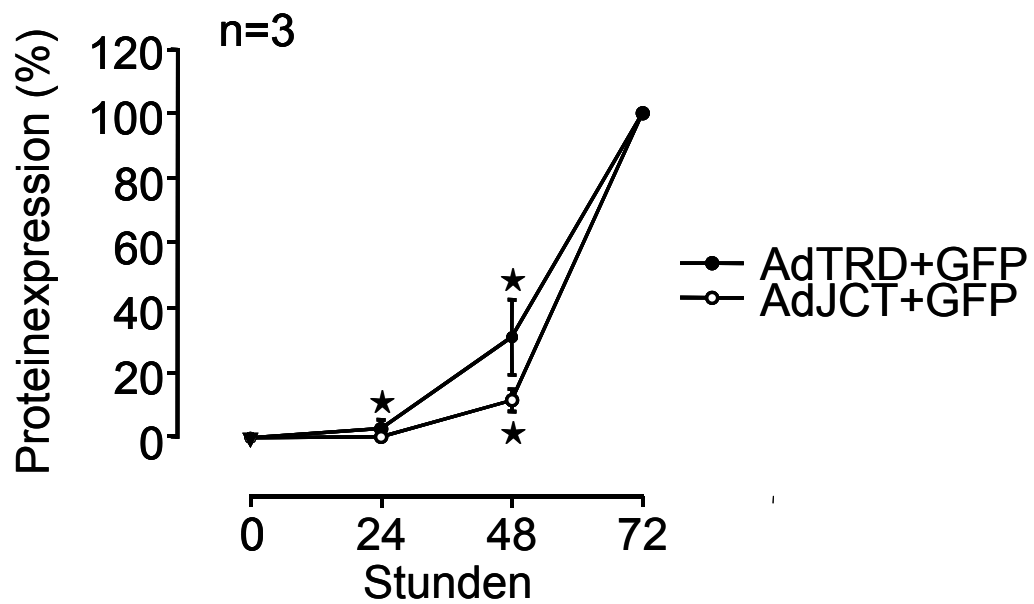
**Abb. 4.16.:
JCT-Expression in AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten
in Abhängigkeit von der Viruskonzentration**

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von JCT (**A**). Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden mit steigenden Konzentrationen an AdJCT+GFP infiziert. Die Virusmenge ist angegeben als Multiplizität der Infektion (MOI). Die Zellen wurden mit einer MOI von 25, 50, 100 und 200 infiziert und nach 48 h geerntet. Nach Homogenisation der infizierten Zellen wurden in einer SDS-Page pro Spur 100 µg des Homogenats aufgetragen. Nach der Gelelektrophorese erfolgte der Transfer der Proteine auf Nitrocellulose und der immunologische Nachweis von JCT mittels eines geeigneten Antikörpers. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben. Gelbeladung: **(1)** nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, **(2)** AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (MOI 25), **(3)** AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (MOI 50), **(4)** AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (MOI 100), **(5)** AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (MOI 200), **(6)** Hundeherz.

(B) Immunologische Quantifizierung von JCT. Die Expression von JCT wurde mit Hilfe der ImageQuant-Software in drei unabhängigen Versuchen quantifiziert. Die JCT-Expression in AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten bei einer MOI von 200 wurde gleich 100% gesetzt.

4.4.3. Proteinexpression von TRD und JCT in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Virusinkubationszeit

Für diesen Versuch wurden neonatale Ratten-Kardiomyozyten mit AdTRD+GFP und AdJCT+GFP jeweils mit einer MOI von 100 infiziert (siehe 4.4.2.). Die Zellen wurden nach 24, 48 und 72 h Virusinkubationszeit geerntet und homogenisiert. Durch das Western-Blot-Verfahren wurde die Proteinexpression von TRD (Abb. 4.17. A) und JCT (Abb. 4.17.B) in den adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, daß es erst 48 h nach Virusinfektion zu einem erkennbaren Anstieg der Proteinexpression in den Zellen kam (Abb. 4.17. C). Der Grad der Proteinexpression von TRD und JCT nach 72 h Virusinkubationszeit wurde jeweils gleich 100% gesetzt. Nach einer Virusinkubationszeit von 48 h war in den infizierten Zellen die TRD-Expression um 31% und die JCT-Expression um 12% erhöht, verglichen mit nicht-infizierten Zellen. Nach 24 h Inkubationszeit war die TRD-Expression und die JCT-Expression unverändert im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Die Vitalität der neonatalen Ratten-Kardiomyozyten wurde nach einer Virusinkubationsdauer von 72 h bei anschließender Betrachtung unter dem Mikroskop als schlecht beurteilt werden. Da es aber nach 24-stündiger Virusinkubation zu einer unveränderten Proteinexpression in den infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten kam, wurden für die folgenden Versuche die neonatalen Ratten-Kardiomyozyten für 48 h mit dem jeweiligen Adenovirus inkubiert.

A**B****C**

* $p < 0.05$ vs. 72 h

Abb. 4.17.:
TRD- und JCT-Expression in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der Virusinkubationszeit

Dargestellt der immunologische Nachweis von TRD **(A)** und JCT **(B)** in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Die Zellen wurden mit einer MOI von 100 infiziert und 24, 48 und 72 h nach Virusinkubation geerntet und homogenisiert. In der SDS-Page wurden pro Spur wurde 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen TRD bzw. JCT. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben.

(A) Gelbeladung: **(1)** nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, **(2)** AdCTR+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, **(3)** AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (24 h Virusinkubation), **(4)** AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (48 h Virusinkubation), **(5)** AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (72 h Virusinkubation), **(6)** Hundeherz.

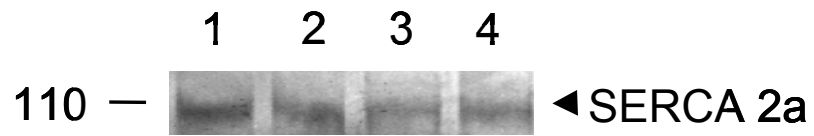
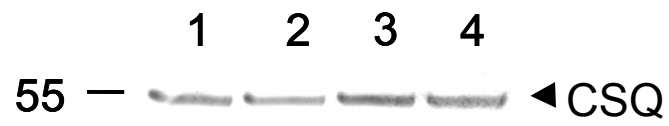
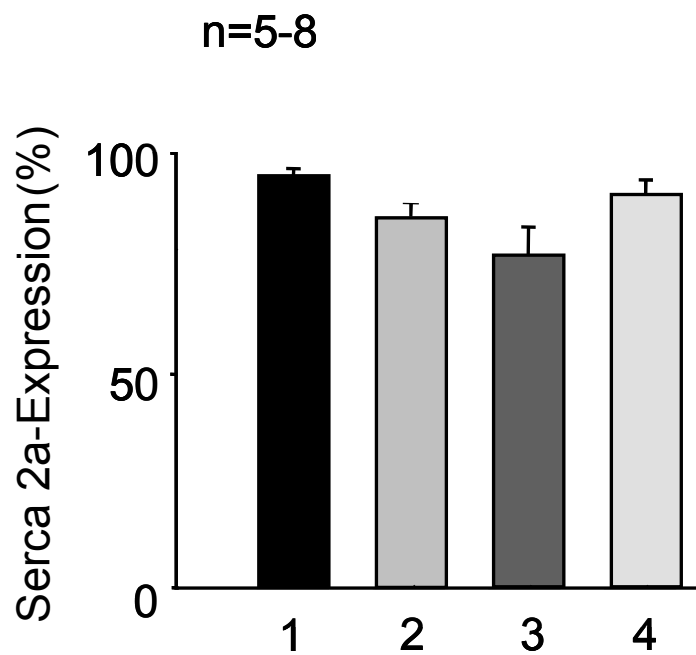
(B) Gelbeladung: **(1)** nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, **(2)** AdCTR+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, **(3)** AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (24 h Virusinkubation), **(4)** AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (48 h Virusinkubation), **(5)** AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (72 h Virusinkubation), **(6)** Hundeherz.

In **(C)** ist die immunologische Quantifizierung von TRD und JCT optisch abgebildet. Die Expression von TRD bzw. JCT wurde mit Hilfe der ImageQuant-Software in drei unabhängigen Versuchen quantifiziert. Der ermittelte Proteingehalt nach 72 h Virusinkubation in den mit AdTRD+GFP-infizierten (MOI 100) und AdJCT+GFP-infizierten (MOI 100) neonatalen Ratten-Kardiomyozyten wurde gleich 100% gesetzt. Abzisse: Inkubationszeit in Stunden; Ordinate: Proteinexpression in Prozent (%).

Die hier vorgestellten Daten zeigen, daß der adenoviral-vermittelte Gentransfer in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten dann optimal ist, wenn die Zellen mit einer MOI von 100 infiziert werden und die Virusinkubationsdauer 48 h beträgt. Für die weiteren funktionellen Untersuchungen in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (Ca^{2+} -Transientenmessung, siehe 4.6.) wurden im Folgenden die oben beschriebenen Infektionsbedingungen eingehalten.

4.5. Gegenregulation einzelner Gene nach adenoviraler Infektion von neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Nach Infektion neonataler Ratten-Kardiomyozyten mit AdTRD+GFP und AdJCT+GFP kam es, wie in 4.3.3. beschrieben, zu einer Überexpression von TRD bzw. JCT auf Proteinebene. Im folgenden Versuch sollte geklärt werden, ob es dabei auch zu einer Gegenregulation von Calsequestrin (CSQ) und SERCA 2a, zwei Proteinen des freien SR, auf Proteinebene kam. Die Proteinexpression dieser Ca^{2+} -regulierenden Proteine wurde nach adenoviraler Infektion neonataler Ratten-Kardiomyozyten durch Western-Blotting quantifiziert. Die Zellen wurden mit AdTRD+GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP und einer MOI von 100 infiziert. Nach 48 h Virusinkubation wurden die Zellen geerntet und homogenisiert. Die immunologische Detektion von SERCA 2a und CSQ erfolgte durch spezifische Antikörper (Abb. 4.18. A). Bei der Quantifizierung der Proteinexpression von CSQ konnte kein Unterschied zwischen nicht-infizierten, AdCTR+GFP-infizierten, AdTRD+GFP-infizierten und AdJCT+GFP-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Der Proteingehalt an SERCA 2a betrug $97.5 \pm 1.6\%$ in nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, $87.7 \pm 3.1\%$ in AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, $78.7 \pm 6.5\%$ in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten und $93 \pm 3.3\%$ in AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen in der SERCA 2a-Expression konnte aber in 5-8 voneinander unabhängig durchgeführten Versuchen nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.18. B). Dies wurde durch eine Varianzanalyse getestet (ANOVA).

A M_r (kDa) M_r (kDa)**B**

**Abb. 4.18.:
SERCA 2a- und CSQ-Expression in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten**

Dargestellt ist der immunologische Nachweis von SERCA 2a und CSQ in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**A**). Pro Spur wurden 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit spezifischen Antikörpern, die gegen SERCA 2a und CSQ gerichtet waren. Zum Größenvergleich ist der Molmassenstandard (in kDa) angegeben.

In (**B**) ist die immunologische Quantifizierung von SERCA 2a dargestellt. Die Expression von SERCA 2a wurde mit Hilfe der ImageQuant-Software in 5-8 unabhängigen Versuchen quantifiziert. Auf der Ordinate ist die Expression von SERCA 2a in Prozent angegeben.

Gelbeladung: (1) nicht-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (2) AdCTR+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (3) AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (4) AdJCT+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten.

4.6. Messung der intrazellulären Ca^{2+} -Transienten-Ratio in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Isolierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden mit einer MOI von 100 adenoviral infiziert (AdTRD+GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP). Nach 48-stündiger Virusinkubation, wurden die Zellen zunächst mit Meßpuffer (siehe 7.1.) gespült und anschließend mit Indo-1, wie unter 3.7. beschrieben, inkubiert. Die Zellen wurden mit einer Frequenz von 0.5, 1.0 und 1.5 Hz bei einer Spannung von 50 V elektrisch stimuliert. Gleichzeitig wurde der Farbstoff (Indo-1) durch eine Xenon-Lampe mit Licht der Wellenlänge 365 nm angeregt und die anteilige Emission des vom Indikator ausgesandten Lichtes bei 405 und 495 nm durch zwei Photomultiplier registriert. Da Indo-1 die Eigenschaft besitzt, sein Emissionsmaximum nach Bindung von Ca^{2+} -Ionen von 495 nm nach 405 nm zu verschieben, konnte aus dem Quotienten der Emissionen bei 405 und 495 nm (Ratio) die relative intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration berechnet werden (siehe 3.7.). Das nach adenoviraler Infektion in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten exprimierte grün fluoreszierende Protein (GFP) hat sein Excitationsmaximum bei 489 nm und sein Emissionsmaximum bei 508 nm. Die Anregung von Indo-1 erfolgte bei einer Wellenlänge von 365 nm. Es konnte keine Beeinflussung bzw. Störung der Registrierung des vom Farbindikator (Indo-1) ausgesandten Lichtes bei 405 nm und 495 nm durch gleichzeitige Anregung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.19. A und B).

Nach elektrischer Stimulation wurde das Ca^{2+} -Signal der einzelnen Zellen, welches im Folgenden auch als Ca^{2+} -Transient bezeichnet wird, registriert. Bei den Transienten wurde jeweils die diastolische Ratio ($\text{Ratio}_{\text{diastolisch}}$), die systolische Ratio ($\text{Ratio}_{\text{systolisch}}$), die Differenz zwischen systolischer und diastolischer Ratio (ΔRatio), die Zeit bis zum Abfall auf den halbmaximalen Wert der relativen Ca^{2+} -Konzentration ($t_{50\%}$) und die Zeit bis zum Abfall auf 10% des maximalen Wertes der relativen Ca^{2+} -Konzentration ($t_{90\%}$) ermittelt.

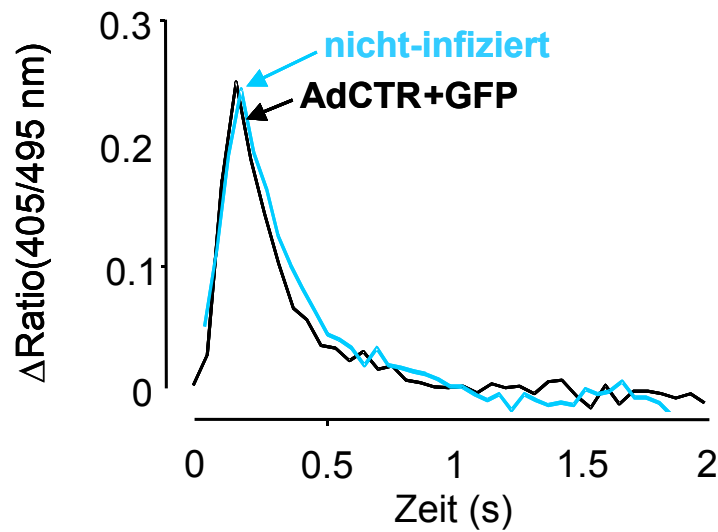
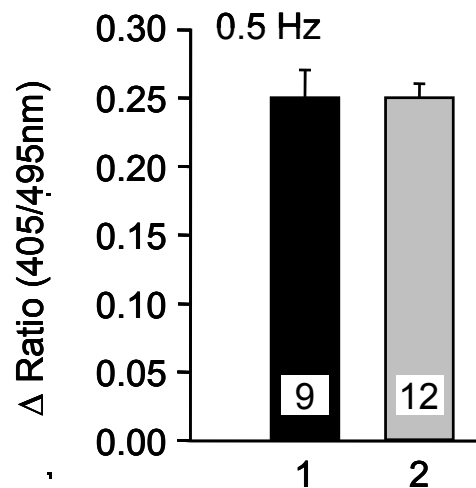
A**B**

Abb. 4.19.:
Beeinflussung der Ca²⁺-Transienten-Messung durch GFP

(A) Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Ca²⁺-Transient von nicht-infizierten und AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Deutlich zu erkennen ist, daß kein Unterschied bezüglich der Amplitude zwischen nicht-infizierten und AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten besteht und somit keine Beeinflussung der Ca²⁺-Transienten-Messung durch gleichzeitige GFP-Anregung erfolgt.

(B) Dargestellt sind die Δ Ratios nach Messung der Ca²⁺-Transienten in nicht-infizierten (1) und AdCTR+GFP-infizierten (2) neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach elektrischer Stimulation mit 0.5 Hz. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben. In 9-12 unabhängig von einander durchgeführten Versuchen konnte kein signifikanter Unterschied ermittelt werden (n=9-12).

Diastolische Ratio ($Ratio_{diastolisch}$)

Nach elektrischer Stimulation der Zellen mit 0.5, 1.0 und 1.5 Hz und Messung der Ca^{2+} -Transienten konnte bei der Ermittlung der diastolischen Ratio kein Unterschied zwischen nicht-infizierten und AdCTR+GFP-infizierten Ratten-Kardiomyozyten gemessen werden. Die diastolische Ratio sowohl in AdTRD+GFP-infizierten, als auch in AdJCT+GFP-infizierten Zellen nahm gegenüber nicht-infizierten und AdCTR+GFP-infizierten Zellen bei einer Stimulation mit 0.5, 1.0 und 1.5 Hz signifikant ab. Ferner war die diastolische Ratio innerhalb der einzelnen Gruppen 1-4 unverändert, wenn die Stimulation von 0.5 auf 1.0 und dann auf 1.5 Hz erhöht wurde. (siehe Abb. 4.20. A-C und Tab. 4.2.)

Systolische Ratio ($Ratio_{systolisch}$)

Es konnte zwischen nicht-infizierten und AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten kein signifikanter Unterschied der systolischen Ratio gemessen werden. Dagegen nahm die systolische Ratio in AdTRD+GFP-infizierten und in AdJCT+GFP-infizierten Zellen gegenüber nicht-infizierten und AdCTR+GFP-infizierten Zellen bei einer Stimulation mit 0.5, 1.0 und 1.5 Hz signifikant ab. Auch eine Erhöhung der Stimulation von 0.5 auf 1.0 und dann auf 1.5 Hz erbrachte keine Änderung der systolischen Ratio innerhalb der einzelnen Gruppen (Abb. 21 A-C und Tab. 4.2.).

Differenz zwischen systolischer und diastolischer Ratio (Δ Ratio)

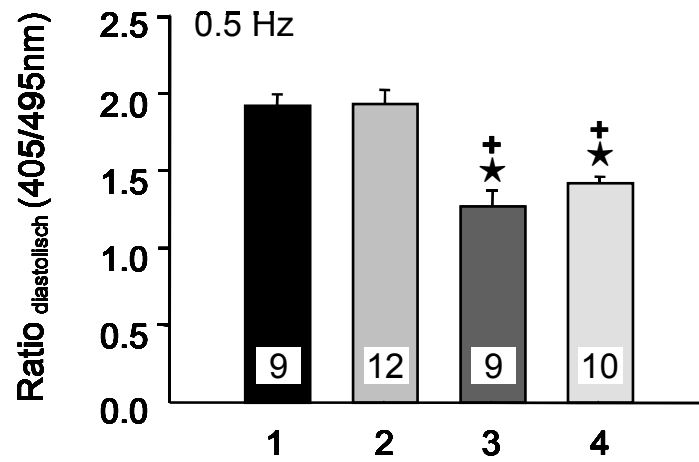
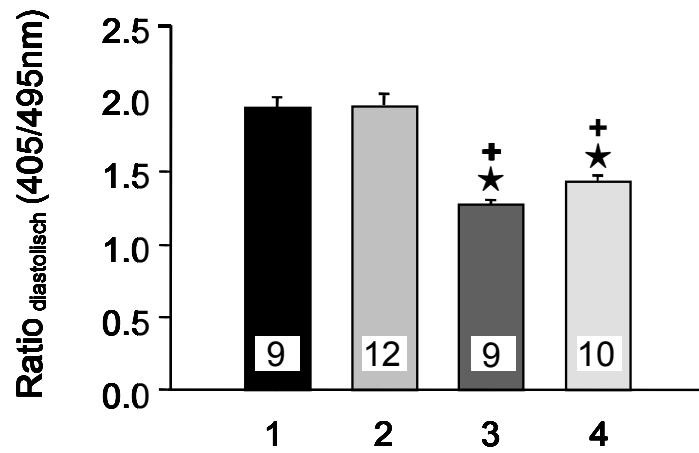
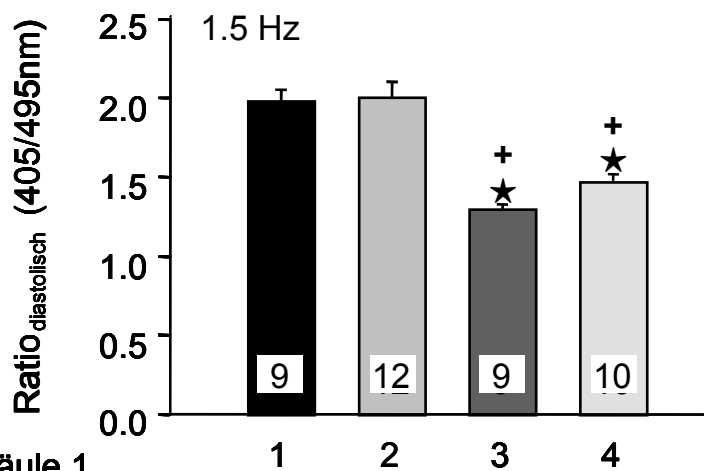
Bei der Bestimmung der Δ Ratio konnte gezeigt werden, daß bei einer elektrischen Stimulation mit 1.0 Hz kein signifikanter Unterschied mehr zwischen AdTRD+GFP-infizierten und AdCTR+GFP-infizierten Zellen bestand. Bei einer weiteren Erhöhung der Frequenz auf 1.5 Hz waren AdTRD+GFP-infizierte Zellen sowohl gegenüber AdCTR+GFP-infizierten als auch gegenüber nicht-infizierten Zellen in der Δ Ratio nicht mehr signifikant unterschiedlich. In Ergänzung zu diesen Daten konnte gezeigt werden, daß die Δ Ratio innerhalb AdJCT+GFP- und AdCTR+GFP-infizierter neonataler Ratten-Kardiomyozyten bei Erhöhung der elektrischen Stimulation von 0.5 auf 1.5 Hz signifikant abnahm (Abb. 4.22. A-C und Tab. 4.2.).

Zeit bis zum Abfall auf halbmaximalen Wert der Ca^{2+} -Transienten-Ratio ($t_{50\%}$)

Es bestanden zwischen nicht-infizierten, AdCTR+GFP-infizierten, AdTRD+GFP-infizierten und AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, nach elektrischer Stimulation der Zellen mit 0.5, 1.0 und 1.5 Hz, keine signifikanten Unterschiede für $t_{50\%}$. Dagegen nahm innerhalb der nicht-infizierten, AdTRD+GFP-infizierten und AdJCT+GFP-infizierten Zellen die Zeit bis zum Absinken des Ca^{2+} -Transienten auf die Hälfte seines Maximums, bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0.5 auf 1.5 HZ, signifikant ab (Abb. 4.23. A-C und Tab. 4.2.)

Zeit bis zum Abfall auf 10% der maximalen Ratio des intrazellulären Ca^{2+} ($t_{90\%}$)

Auch bei der Bestimmung von $t_{90\%}$ der Ca^{2+} -Transienten bestanden zwischen nicht-infizierten, AdCTR+GFP-infizierten, AdTRD+GFP-infizierten und AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, nach elektrischer Stimulation der Zellen mit 0.5, 1.0 und 1.5 Hz, keine signifikanten Unterschiede. Bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz, sowohl von 0.5 auf 1.0 Hz, als auch von 1.0 auf 1.5 Hz, nahm innerhalb der AdCTR+GFP-infizierten, AdTRD+GFP-infizierten und AdJCT+GFP-infizierten Zellen die Zeit, die bis zum Absinken des Ca^{2+} -Transienten auf 10% seines Maximums vergeht, signifikant ab. Bei nicht-infizierten Zellen konnte lediglich bei der Erhöhung der elektrischen Stimulation von 0.5 auf 1.5 Hz eine signifikante Verkürzung von $t_{90\%}$ der Ca^{2+} -Transienten gezeigt werden (Abb. 4.24. A-C und Tab. 4.1.).

A**B****C**

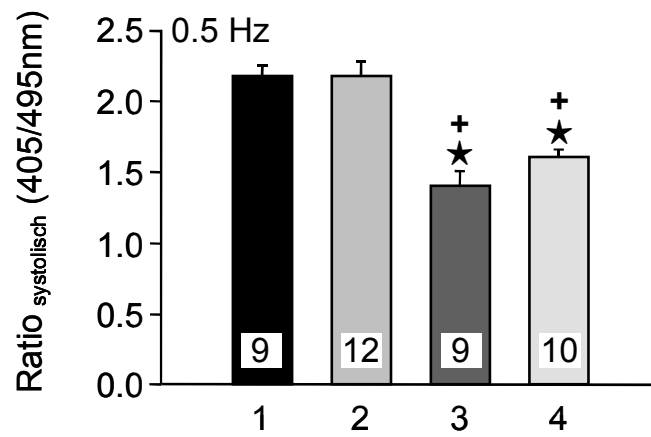
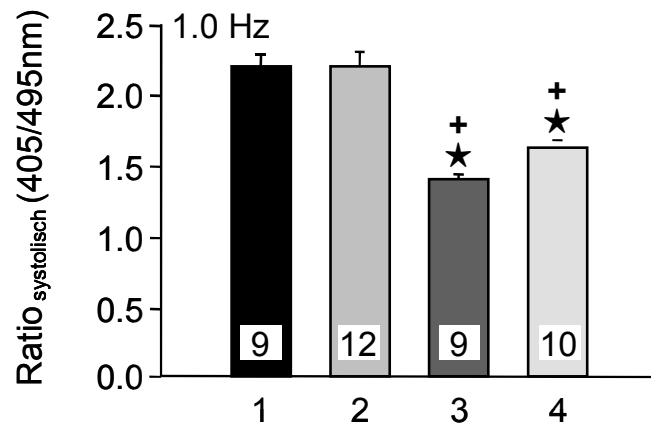
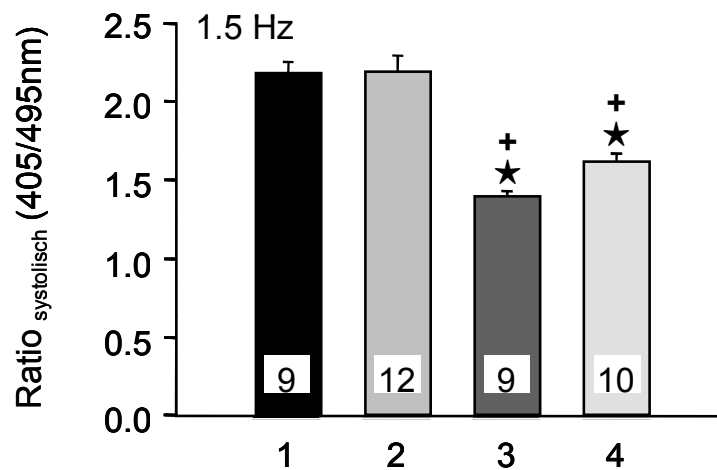
*p < 0.05 vs. Säule 1

+p < 0.05 vs. Säule 2

#p < 0.05 vs. 0.5 Hz

**Abb. 4.20.:
Diastolische Ratio**

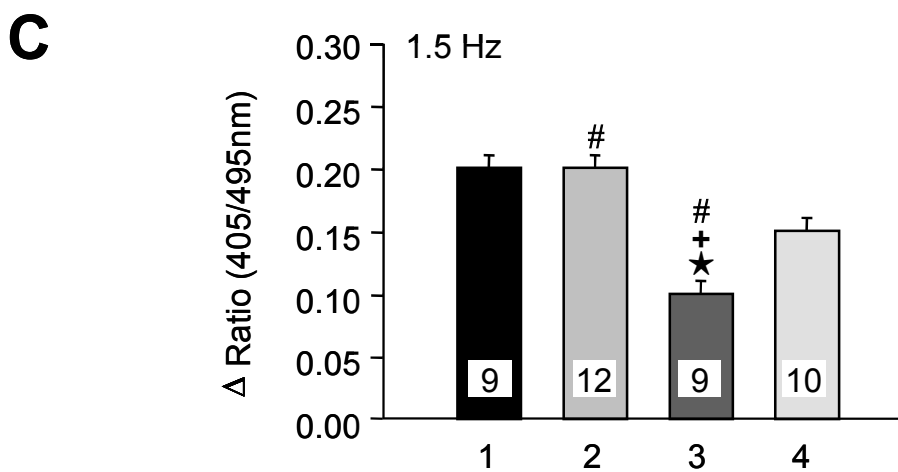
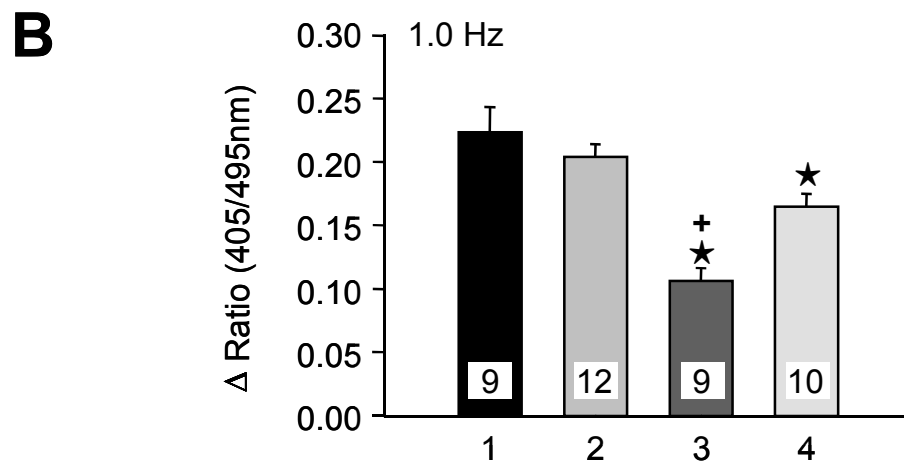
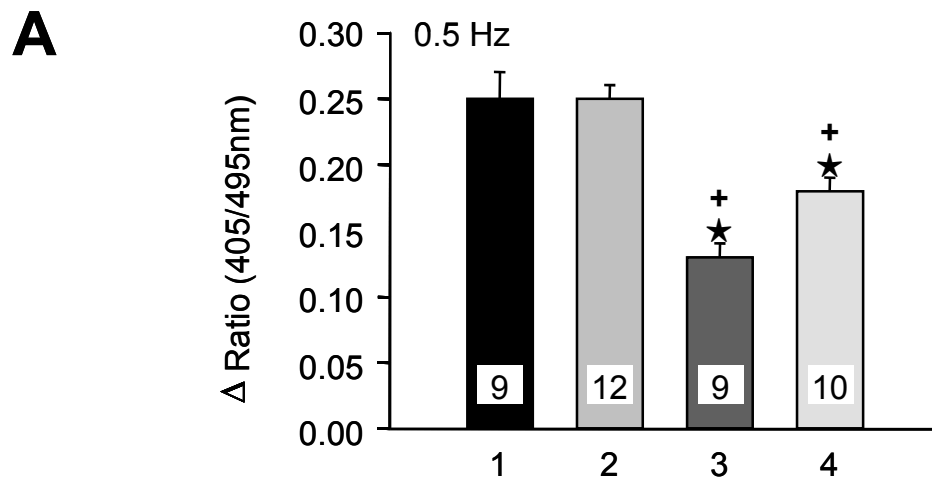
Dargestellt sind die diastolischen Quotienten (Ratios) nach Messung der Ca^{2+} -Transienten in nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**1**), AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**2**), AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**3**) und AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**4**) nach elektrischer Stimulation mit 0.5 Hz (**A**), 1.0 Hz (**B**) und 1.5 Hz (**C**). Die Anzahl der eingesetzten Zellen für die Ca^{2+} -Transienten-Messung ist in den Säulen angegeben (n=9-12).

A**B****C**

★ p < 0.05 vs. Säule 1
+ p < 0.05 vs. Säule 2
p < 0.05 vs. 0.5 Hz

**Abb. 4.21.:
Systolische Ratio**

Als Säulendiagramm sind die systolischen Quotienten (Ratios) nach Messung der Ca^{2+} -Transienten in nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**1**), AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**2**), AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**3**) und AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**4**) nach elektrischer Stimulation mit 0.5 Hz (**A**), 1.0 Hz (**B**) und 1.5 Hz (**C**) dargestellt. Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben (n=9-12).



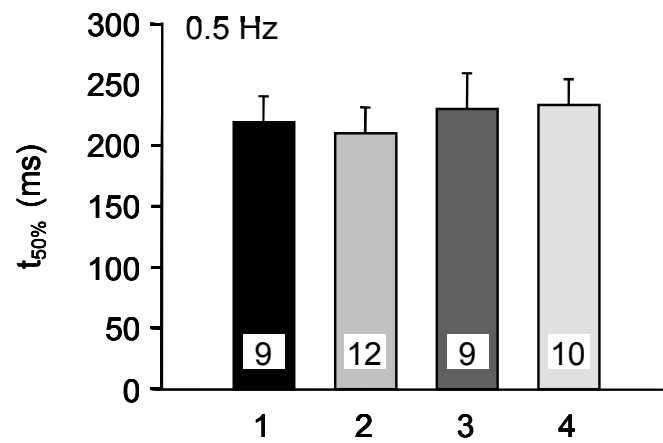
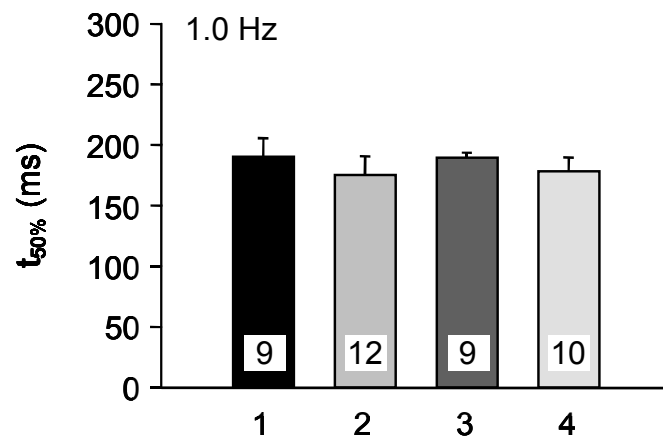
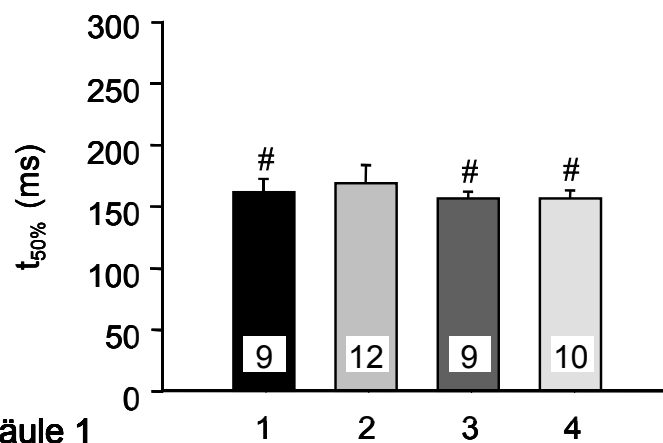
★ $p < 0.05$ vs. Säule 1

+ $p < 0.05$ vs. Säule 2

$p < 0.05$ vs. 0.5 Hz

Abb. 4.22.: **Δ Ratio (Differenz zwischen systolischer und diastolischer Ratio)**

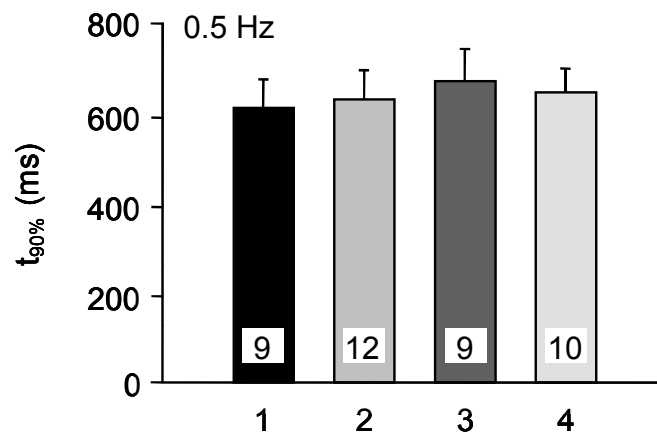
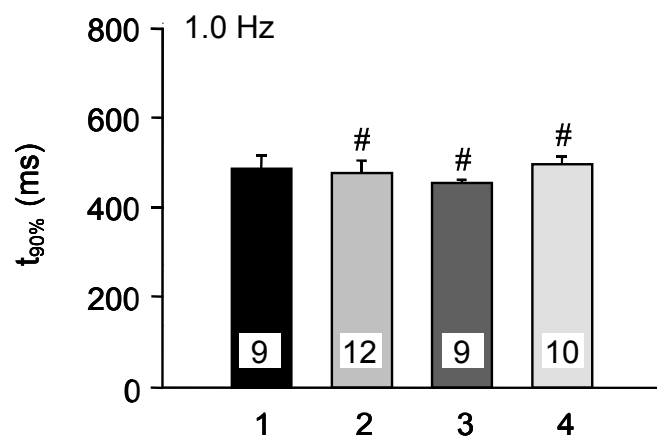
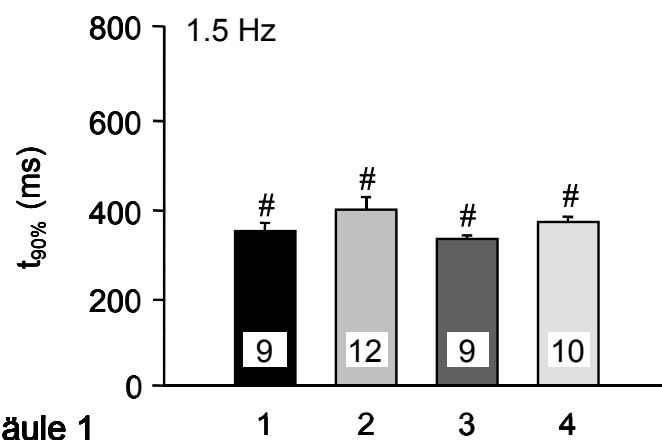
Dargestellt sind die Δ Ratios nach Messung der Ca^{2+} -Transienten in nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**1**), AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**2**), AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**3**) und AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**4**) nach elektrischer Stimulation mit 0.5 Hz (**A**), 1.0 Hz (**B**) und 1.5 Hz (**C**). Die Anzahl der gemessenen Zellen ist in den Säulen angegeben (n=9-12).

A**B****C**

★ p < 0.05 vs. Säule 1
† p < 0.05 vs. Säule 2
p < 0.05 vs. 0.5 Hz

Abb. 4.23.: **$t_{50\%}$ (Zeit bis zum Abfall auf halbmaximalen Wert der Ca^{2+} -Transienten-Ratio)**

Als Säulendiagramm dargestellt sind die Werte für $t_{50\%}$ Ca^{2+} -Transienten-Ratio in nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**1**), AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**2**), AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**3**) und AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**4**) nach elektrischer Stimulation mit 0.5 Hz (**A**), 1.0 Hz (**B**) und 1.5 Hz (**C**) dargestellt. Die Anzahl der eingesetzten Zellen für die Ca^{2+} -Transienten-Messung ist in den Säulen angegeben (n=9-12).

A**B****C**

★ p < 0.05 vs. Säule 1
† p < 0.05 vs. Säule 2
p < 0.05 vs. 0.5 Hz

Abb. 4.25.:

t_{90%} (Zeit bis zum Abfall auf 10% der maximalen Ratio des intrazellulären Ca²⁺-Transienten)

Dargestellt sind die Ergebnisse von t_{90%} nach Messung der relativen intrazellulären Ca²⁺-Konzentration (Ratio) an nicht-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**1**), AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**2**), AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**3**) und AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (**4**) nach elektrischer Stimulation von 0.5 Hz (**A**), 1.0 Hz (**B**) und 1.5 Hz (**C**). Die Anzahl der eingesetzten Zellen für die Ca²⁺-Transienten-Messung ist in den Säulen angegeben (n=9-12).

Tab. 4.2.:
Tabellarische Zusammenfassung der zuvor graphisch dargestellten Ergebnisse (Ca²⁺-Transienten)

0.5 Hz	Δ Ratio	Ratio _{diastolisch}	Ratio _{systolisch}	t _{50%} (ms)	t _{90%} (ms)
1	0.25±0.02	1.92±0.07	2.17±0.07	219±21	607±62
2	0.25±0.01	1.93±0.09	2.17±0.10	210±21	626±64
3	0.13±0.01 ^{★†}	1.27±0.10 ^{★†}	1.40±0.10 ^{★†}	230±27	660±70
4	0.18±0.01 ^{★†}	1.42±0.04 ^{★†}	1.60±0.05 ^{★†}	233±21	641±52

Δ Ratio: Differenz zwischen systolischem und diastolischem Quotienten

1.0 Hz	Δ Ratio	Ratio _{diastolisch}	Ratio _{systolisch}	t _{50%} (ms)	t _{90%} (ms)
1	0.23±0.02	1.95±0.07	2.18±0.08	190±15	469±28
2	0.21±0.01	1.96±0.09	2.18±0.10	175±15	460±26 [#]
3	0.11±0.01 ^{★†}	1.28±0.03 ^{★†}	1.39±0.03 ^{★†}	189±4	439±6 [#]
4	0.17±0.01 [†]	1.44±0.04 ^{★†}	1.61±0.05 ^{★†}	178±11	479±15 [#]

1.5 Hz	Δ Ratio	Ratio _{diastolisch}	Ratio _{systolisch}	t _{50%} (ms)	t _{90%} (ms)
1	0.20±0.01	1.97±0.07	2.17±0.07	157±10 [#]	348±17 [#]
2	0.20±0.01 [#]	1.99±0.10	2.18±0.10	164±14	396±27 [#]
3	0.10±0.01 ^{★†#}	1.29±0.03 ^{★†}	1.39±0.03 ^{★†}	152±5 [#]	330±7 [#]
4	0.15±0.01	1.46±0.05 ^{★†}	1.61±0.05 ^{★†}	152±6 [#]	368±11 [#]

[★]p < 0.05 vs. Kontrollvirus-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (NRK)

[†]p < 0.05 vs. nicht-infizierte NRK

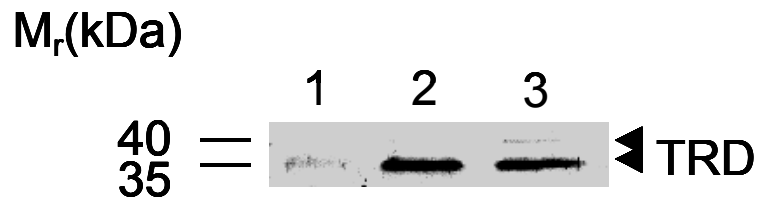
[#]p < 0.05 vs. 0.05 Hz

- 1: nicht-infizierte NRK (n=9)
- 2: Kontrollvirus-infizierte NRK (n=12)
- 3: Junctinvirus-infizierte NRK (n=9)
- 4: Triadinvirus-infizierte NRK (n=10)

4.7. Beeinflussung der Ca^{2+} -Transientenmessung durch Co-Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP)

In diesem Versuch sollte gezeigt werden, daß es auch nach massiver Überexpression von GFP in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten zu keiner Beeinträchtigung der Ca^{2+} -Homöostase innerhalb der Kardiomyozyten kommt. Dabei beeinflußt die massive GFP-Expression weder die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR während der Systole (Bestimmung der Δ Ratio), noch die Ca^{2+} -Aufnahme in das SR während der Diastole (Bestimmung des Abfalls des Ca^{2+} -Transienten). Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden mit AdTRD+GFP bzw. mit AdTRD-GFP und einer MOI von 100 infiziert. Nach elektrischer Stimulation mit einer Frequenz von 0.5 Hz wurden die Ca^{2+} -Transienten der einzelnen Zellen registriert (siehe 4.6.).

Nach Ermittlung der Quotienten (diastolisch, systolisch, Δ) und Zeiten ($t_{50\%}$, $t_{90\%}$) konnte kein signifikanter Unterschied für alle Parameter zwischen AdTRD+GFP- und AdTRD-GFP-infizierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.26.). Dieses Ergebnis läßt die Schlußfolgerung zu, daß es durch eine Co-Expression von GFP und TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten zu keiner Beeinflussung der Ca^{2+} -Homöostase innerhalb der Zelle kommt.

A**B**

0.5 Hz	Δ Ratio	Ratio _{diastolisch}	Ratio _{systolisch}	$t_{50\%}$ (ms)	$t_{90\%}$ (ms)
1	0.25±0.01	1.93±0.09	2.17±0.10	210±21	626±64
2	0.18±0.01*	1.42±0.04*	1.60±0.05*	233±21	641±52
3	0.16±0.01*	1.60±0.04*	1.76±0.04*	204±19	689±29

* $p < 0.05$ vs. Kontrollvirus-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten (NRK)

- 1: Kontrollvirus-infizierte NRK (n=12)
- 2: Triadinvirus+GFP-infizierte NRK (n=10)
- 3: Triadinvirus-GFP-infizierte NRK (n=7)

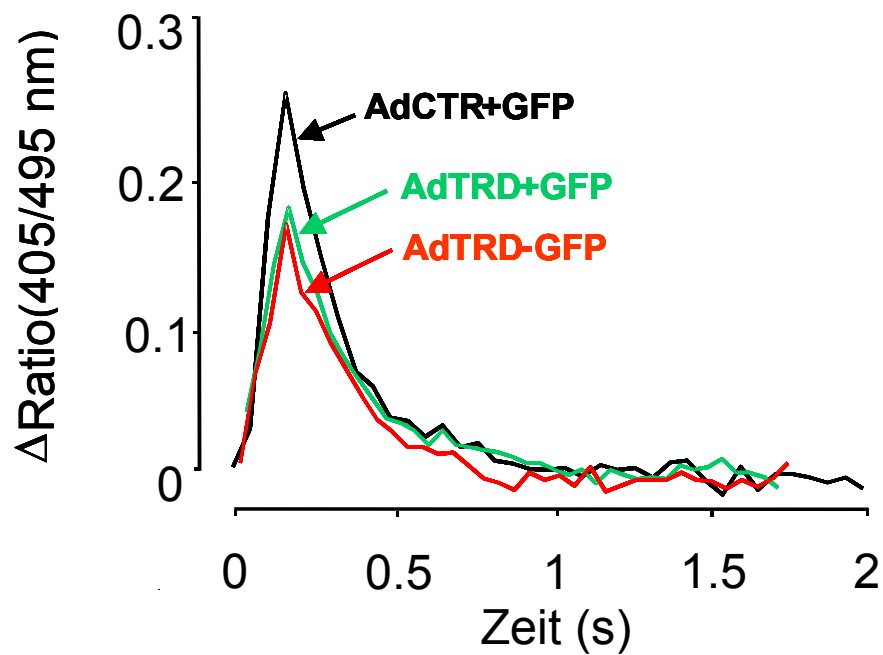
C

Abb. 4.26.: AdTRD±GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten

(A) Dargestellt ist der immunologische Nachweis von TRD in An- und Abwesenheit von GFP in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Die Zellen wurden mit einer MOI von 100 infiziert und 48 h nach Virusinkubation geerntet. Pro Spur wurde 100 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der immunologische Nachweis erfolgte mit einem spezifischen Antikörper gegen TRD (siehe 7.1.). Zum Größenvergleich ist der Molekulargewichtsstandard (in kDa) angegeben.

Gelbeladung: (1) AdCTR+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (2) AdTRD+GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten, (3) AdTRD-GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten.

(B) Tabellarische Darstellung der diastolischen Ratio ($\text{Ratio}_{\text{diastolisch}}$), der systolischen Ratio ($\text{Ratio}_{\text{systolisch}}$), der Differenz zwischen systolischer und diastolischer Ratio (ΔRatio), der Zeit bis zum Abfall auf halbmaximale Ratio des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten ($t_{50\%}$) und der Zeit bis zum Abfall auf 10% der maximalen Ratio des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten ($t_{90\%}$) nach elektrischer Stimulation mit 0.5 Hz. Es wurden AdCTR+GFP-infizierte, AdTRD+GFP-infizierte und AdTRD-GFP-infizierte neonatale Ratten-Kardiomyozyten miteinander verglichen.

(C) Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Ca^{2+} -Transient von AdCTR+GFP-infizierten, AdTRD+GFP-infizierten und AdTRD-GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Deutlich zu erkennen ist, daß kein Unterschied bezüglich der Amplitude zwischen AdTRD+GFP- und AdTRD-GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten besteht.

5. DISKUSSION

5.1. Adenoviral-vermittelter Gentransfer

Gentherapeutische Ansätze haben zum Ziel, therapeutisch relevante Gene in bestimmte Zielzellen einzuführen. Ein Großteil des dafür notwendigen Gentransfers basiert zur Zeit auf der Verwendung von viralen Vektoren. Beim Einsatz viraler Vektoren in der Gentherapie nutzt man die Fähigkeit von Viren, eukaryotische Zellen *in vivo* zu infizieren. Sie sind somit prinzipiell in der Lage, einen erfolgreichen Gentransfer durchzuführen. Neben den zur Zeit im Einsatz befindlichen Vektorviren, den Adenoviren und Retroviren, werden auch adenoassoziierte Viren (Muzyczka 1992), Vaccinaviren (Pastoret und Brochier 1992) und Herpes-simplex-Viren (Geller und Breakefield 1988) zum Gentransfer eingesetzt.

Aufgrund der bestehenden Sicherheitsrisiken bei der Verwendung viraler Systeme (z.B. die Entstehung replikationskompetenter Rekombinanten oder die Kontamination durch Helferviren) wurden parallel auch verschiedene nicht-virale Verfahren zum Gentransfer entwickelt. Dabei beinhaltet das nicht-virale Gebiet sehr unterschiedliche Techniken wie physikalische Methoden, Transfer "nackter DNA", die Verwendung virusanaloger Systeme und der Einsatz von Kationen mit und ohne Lipidbestandteil. Eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Gentherapie ist die effiziente und reproduzierbare Einschleusung und die Expression des gewünschten Gens in den Zellen. Je nach Ort des Transfektionsereignisses spricht man von einem Gentransfer *in vitro*, wenn er ausschließlich in Zellkultur durchgeführt wird (z.B. zu Forschungszwecken), *in vivo*, wenn er ausschließlich im lebenden Organismus durchgeführt wird (z.B. in Studien zur Therapie) und *ex vivo*, wenn Zellen aus einem Organismus entnommen, einem Gentransfer außerhalb des Organismus unterworfen und dann reimplantiert werden (z.B. für therapeutische Studien).

Aufgrund der hohen Transfektionsrate adenoviraler Vektoren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* (Jaffe et al. 1992, Li et al. 1993, Levrero et al. 1991) eignen sich Adenoviren besonders gut für den Gentransfer. Bei den Adenoviren handelt es sich im Gegensatz zu den Retroviren nicht um Viren, die von einer Membran umhüllt sind. Humane Adenoviren werden nach ihren Serotypen unterteilt, wobei die häufigsten in gentherapeutischen Studien verwendeten Viren sich von den Serotypen Ad2 und

Ad5 ableiten. Ihr Genom ist komplett definiert (Horwitz et al. 1990) und sie besitzen zudem den Vorteil, daß sie für den Menschen nicht onkogen sind.

Die ersten einfachen Vektoren, die sich von Adenoviren ableiteten, besaßen Deletionen in den frühen E1- und E3-Genen (Adenoviren der 1. Generation). Die E1-Deletion verhindert eine eigenständige Replikation des Virus und eine Lyse der Zellen (Ali et al. 1994); sie kann durch den Einsatz der HEK293-Zelllinie komplementiert werden (Graham et al. 1977). Die E3-Genprodukte spielen eine Rolle bei der Unterdrückung der Immunantwort des Wirtes nach Virusinfektion und haben in Zellkultur keine Bedeutung.

Im Rahmen dieser Arbeit generierten wir Adenoviren (AdTRD±GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP), die Triadin 1, Junctin und den Fluoreszenzmarker GFP unter Kontrolle des CMV-Promotors überexprimierten. Zur Herstellung dieser Viren verwendeten wir eine Mutante des Adenovirus vom Serotyp 5, die eine Deletion der E1-Region und der E3-Region aufweist und somit replikationsdefizient ist. Eine Vermehrung der Viren war demnach nur noch in Zelllinien (z.B. HEK293-Zellen) möglich, welche die deletierten Gene E1 und E3 exprimieren und daher komplettieren konnten (Graham et al. 1977).

Bei der Vermehrung der Adenoviren durch mehrfache Infektionen (Amplifikationen) von HEK293-Zellen konnten wir einen Virustiter von bis zu 5×10^{11} IU/ml (für AdCTR+GFP) erreichen. Dies zeigt die Fähigkeit des Virus, sich in hohen Konzentrationen produzieren zu lassen, was vermutlich auf die hohe Stabilität dieser membranlosen Partikel zurückzuführen ist (Hitt et al. 1994). Die hohe Virustiterproduktion ist nützlich für die In-vivo-Anwendung adenoviraler Vektoren innerhalb der Gentherapie. Allerdings kann es bei der In-vitro-Vermehrung der Adenoviren in HEK293-Zellen zur Entstehung von replikationskompetenten Adenoviren kommen. Dies wird durch die Rekombination zwischen Sequenzen des Adenovirus und den stabil in das Genom von HEK293-Zellen integrierten adenoviralen Sequenzen der E1-Regionen ermöglicht. Dabei nimmt die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von replikationskompetenten Adenoviren mit der Anzahl neu generierter Adenoviren während des Produktionsprozesses kontinuierlich zu. Ein weiterer Faktor, der die Entstehung von replikationskompetenten Adenoviren

begünstigt, ist die Größe des in den Adenovirus klonierten Transgens. Je größer das Transgen, desto häufiger kommt es zum Auftreten von replikationskompetenten Adenoviren (Bett et al. 1993). Die absolute Menge der replikationskompetenten Adenoviren in Adenovirus-Präparationen ist jedoch oft relativ gering und wurde mit unter 0.5% angegeben (Paielli et al. 2000). Bei weiteren Amplifikationen kann sie allerdings auf über 25% (Amplifikation 19) steigen (Lochmueller et al. 1994). Auch bei der In-vivo-Anwendung des adenoviral-vermittelten Gentransfers beim Menschen im Rahmen einer Gentherapie kann es zur Entstehung von replikationskompetenten Adenoviren kommen. Durch Rekombination mit Wildtyp-Adenoviren, die häufig beim Menschen infolge einer adenoviralen Infektion vorkommen, können gentechnisch entschärfte (E1- und E3-Deletion) Adenoviren ihre ursprünglichen Eigenschaften (Virusreplikation, Zellyse) zurückgewinnen. Das große Problem von replikationskompetenten Adenoviren in gentechnisch entschärften Adenovirus-Präparationen ist somit eine mögliche unkontrollierte Infektion bzw. Virusvermehrung in den Zielzellen, sowie die Eigenschaft der Zellyse nach adenoviraler Infektion. Dem gegenüber führte aber die Replikationsdefizienz in E1-deletierten adenoviralen Vektoren, wie in mehreren Versuchen gezeigt, zu einer verminderten Expressionsrate des rekombinanten Proteins (Merklein et al. 1998). Zur Gewährleistung der Sicherheit bezüglich unkontrollierter Virusreplikationen werden zur Zeit nur Viren eingesetzt, die eine Deletion in der E1-Region aufweisen.

Ein großer Vorteil bei der Verwendung von adenoviralen Vektoren für den Gentransfer ist neben der hohen Virustiterproduktion die Möglichkeit der Transduktion von proliferierenden und nicht-proliferierenden Zellen. Im Gegensatz dazu können z.B. die meisten Retroviren nur proliferierende Zellen infizieren, da der Eintritt in den Zellkern die Abwesenheit der Kernmembran erfordert. Dies schließt die Transduktion von z.B. ruhenden Lymphozyten und hämatopoetischen Stammzellen aus. Auch die einfache Transfektion und die hohe Effizienz des Gentransfers in verschiedenen Zelltypen ist ein weiterer Vorteil des adenoviralen Gentransfers. So konnte im Rahmen dieser Arbeit ein erfolgreicher Gentransfer in neonatale Ratten-Kardiomyozyten gezeigt werden. Die Proteine Triadin 1 (TRD) und Junctin (JCT) in Coexpression mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) wurden nach adenoviraler Infektion neonataler Ratten-Kardiomyozyten mit AdTRD±GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP erfolgreich exprimiert. Dabei stand die

Expressionsmenge dieser Proteine in direktem Zusammenhang mit der eingesetzten Viruskonzentration und Virusinkubationszeit. Mit Zunahme der MOI's (25 bis 200) und Verlängerung der Virusinkubationszeit (24h bis 72h) konnte eine signifikante Steigerung der GFP-, Triadin- und Junctin-Proteinexpression in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten erzielt werden. Eine höhere MOI als 100 und eine längere Virusinkubationszeit als 48h führte zu einem erhöhten Absterben der Zellen. Die eingesetzten Adenoviren (AdTRD±GFP, AdJCT+GFP und AdCTR+GFP) zeigten also bei entsprechender Konzentration und Inkubationsdauer einen ausgeprägten zytotoxischen Effekt. Der beobachtete zytotoxische Effekt der Adenoviren bei entsprechend hoher Konzentration könnte den Einsatz adenoviraler Vektoren in der Gentherapie limitieren. Ferner kann eine starke zelluläre und humorale Immunantwort, hervorgerufen durch virale Proteine nach In-vivo-Infektion mit adenoviralen Vektoren, ein großes Problem in der Gentherapie darstellen. Inzwischen kam es im Rahmen einer gentherapeutischen Behandlung in vivo am Menschen zu einem ersten Todesfall. Der Proband erhielt eine besonders hohe Dosis eines Adenovirus. Offensichtlich führte eine Überreaktion seines eigenen Immunsystems zum Tod (Lehrmann 1999).

Ein weiterer Nachteil des adenoviralen Gentransfers ist die fehlende Integration der viralen DNA in das zelluläre Fremdgenom und die damit verbundene nur transiente Expression des Transgens in der Zielzelle. Das von adenoviralen Vektoren übertragene virale Genom verweilt in den Zielzellen normalerweise nur episomal, somit ist es schwierig, die Dauer der Persistenz und damit der Expression des Transgens in verschiedenen Zelltypen abzuschätzen. Meist ist die Stabilität der Expression nur auf wenige Tage bis Wochen begrenzt. Im Gegensatz dazu haben z.B. retrovirale Vektoren die Eigenschaft, ihr genetisches Material in das Wirtsgenom zu integrieren und somit eine dauerhafte stabile Integration und Expression des Transgens zu gewährleisten. Allerdings bergen retrovirale Vektoren den Nachteil, daß sie auf replizierende Zellen angewiesen sind, deren Zahl sich in vielen Geweben in vivo stark begrenzt hält. Dementsprechend kommt es bei einem retroviral-vermitteltem Gentransfer in vivo nur zu geringen Infektionsraten. Von großem Interesse ist folglich die Konstruktion von adenoviralen/retroviralen Hybridvektoren, die die Vorteile beider Systeme kombinieren. So wird die effiziente In-vivo-Transduktion vieler Zellen (auch nicht proliferierender Zellen) durch den

adenoviralen, die Integration und stabile Expression über den retroviralen Anteil möglich (Feng et al. 1997, Zheng et al. 2000).

Um diese Nachteile, die hauptsächlich bei der In-vivo-Anwendung des adenoviral-vermittelten Gentransfers entstehen, zu minimieren, wird versucht, neuartige Vektorsysteme (z.B. "Gutless"-Vektoren) zu entwickeln bzw. die verwendeten adenoviralen Vektoren dahingehend zu modifizieren, daß die Infektion geeigneter Zielzellen spezifisch und effizient erfolgt (Kochanek et al. 1996, Fisher et al. 1996). Eine Möglichkeit ist z.B. die Verwendung eines gewebespezifischen Promotors anstatt des oft üblichen CMV-Promotors (Inesi et al. 1998). Der große Vorteil des CMV-Promotors, der auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, ist seine starke Enhancer-Funktion. Er ist in allen eukaryotischen Zellen aktiv und erzeugt eine hohe Expressionsrate, was sich auf die In-vivo-Anwendung adenoviraler Vektoren positiv auswirkt. Er ist nicht spezifisch für ein Gewebe oder eine Zellart und deshalb ubiquitär einsetzbar. Aufgrund seiner Unselektivität wirkt sich seine Verwendung jedoch dann negativ aus, wenn das Transgen nur in bestimmten Regionen wirken soll. Auch durch Veränderungen der Fiberproteine, die für die Erkennung zellulärer Rezeptoren (Coxsackie- und Adenovirusrezeptor) verantwortlich sind, wäre eine gezielte Steuerung der Adenoviren auf bestimmte Zellen denkbar.

Die Entwicklung neuer Vektorsysteme beruht auf der zusätzlichen Deletion viraler Leserahmen (z.B. E2- und E4-Region). Virale Genprodukte können eine Immunantwort gegen die transduzierte Zelle induzieren, was eine vorzeitige Eliminierung der rekombinanten DNA (Yang et al. 1994, Tripathy et al. 1996) und eine verkürzte Expressionsdauer des Transgens zur Folge hat. Die Deletion dieser viralen DNA-Sequenzen soll demnach zu einer Verminderung der Immunantwort und Erhöhung der Aufnahmekapazität fremder DNA führen. In den neuartigen "Gutless"-Vektoren sind lediglich noch virale DNA-Sequenzen vorhanden, die für die DNA-Replikation und für die Verpackung der viralen DNA essentiell sind.

5.2. Adenovirale Überexpression von Triadin 1 (TRD) in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Triadin wurde ursprünglich in SR-Membranvesikeln der Skelettmuskulatur nachgewiesen (Caswell et al. 1991). Eine transmembranäre Domäne unterteilt Triadin in einen N-terminalen zytoplasmatischen Anteil und eine C-terminale Domäne, die sich im Lumen des sarkoplasmatischen Retikulums befindet (Knudson et al. 1993). Triadin 1, die Hauptisoform von Triadin im Herzmuskel, ist an der strukturellen Organisation des Ca^{2+} -Freisetzungsapparates des funktionalen sarkoplasmatischen Retikulums beteiligt. Dies konnte durch biochemische Untersuchungen gezeigt werden. Zudem scheint Triadin 1 eine bedeutende Rolle bei der Verankerung von Calsequestrin an den Ryanodin-Rezeptor zu spielen (Guo und Campbell 1995, Zhang et al. 1997, Kobayashi et al 2000). Die funktionellen Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR sind noch nicht genau geklärt. Im Rahmen dieser Arbeit sollte durch die adenovirale transiente Überexpression von Triadin 1 in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten ein Beitrag zur genaueren Bedeutung des Proteins für die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase näher untersucht werden.

Neonatale Ratten-Kardiomyozyten wurden, wie beschrieben, mit einer MOI von 100 adenoviral infiziert und für 48 h Stunden mit dem jeweiligen Virus inkubiert. Die eingesetzte Viruskonzentration und die Länge der Virusinkubationsdauer führte zu einer signifikanten Überexpression des Transgens, bei guter Vitalität der Zellen. Durch Messung der Ca^{2+} -Transienten sollen die Effekte der Triadin 1-Überexpression auf die Ca^{2+} -Homöostase in adenoviral infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten überprüft werden.

Die adenovirale Überexpression von TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führte, im Vergleich zu AdCTR+GFP-infizierten Zellen, zu einer Abnahme der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten-Ratio um 28 %. Dies resultiert aus einer starken Abnahme der systolischen Ca^{2+} -Transienten-Ratio und einer im Vergleich etwas geringeren Abnahme der diastolischen Ca^{2+} -Transienten-Ratio. Dieser Befund könnte auf eine veränderte Speicherung von Ca^{2+} -Ionen im SR, auf eine veränderte Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR oder auf eine veränderte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR hindeuten. Eine Erklärung für die verminderte Ca^{2+} -Freisetzung und die damit verbundene Abnahme der systolischen Ca^{2+} -Transienten-Ratio in TRD-

überexprimierenden neonatalen Ratten-Kardiomyozyten könnte in einer veränderten Speicherkapazität des Calsequestrins liegen. Calsequestrin bindet Ca^{2+} -Ionen mit hoher Kapazität, aber geringer Affinität (Mitchell et al. 1988). Die Proteinsequenz von Calsequestrin enthält viele Abschnitte mit geladenen Aminosäuren, die eine Bindung und damit Speicherung von Ca^{2+} -Ionen begünstigen (Scott et al. 1988). Eine verminderte Expression von Calsequestrin in den AdTRD+GFP infizierten Zellen als Ursache einer verminderten Beladung des SR mit Ca^{2+} -Ionen und einer damit verbundenen geringeren Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR während der Systole konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Es war kein Unterschied in der Proteinexpression von Calsequestrin zwischen AdTRD+GFP- und AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten vorhanden.

Ein weitere Erklärung für die verminderte Ca^{2+} -Freisetzung in TRD-überexprimierenden neonatalen Ratten-Kardiomyozyten während der Systole könnte auch eine veränderte Bindungsfähigkeit von Calsequestrin gegenüber Ca^{2+} -Ionen sein. Ca^{2+} -Ionen konkurrieren mit Junctin und TRD um die Bindung am Calsequestrin (Zhang et al. 1997, Kobayashi et al. 2000). Durch die Überexpression von TRD könnten Ca^{2+} -Bindungsstellen an der Asparaginsäure-reichen Region (Aminosäuren 354-367) des Calsequestrins (Dong et al. 2000) vermehrt durch TRD besetzt werden und somit weniger Ca^{2+} -Ionen durch Calsequestrin gebunden werden. Dies würde zu einer verminderten Beladung des SR mit Ca^{2+} -Ionen und letztendlich zu einer Abnahme des systolischen Ca^{2+} führen.

Die verminderte Ca^{2+} -Freisetzung in den neonatalen Ratten-Kardiomyozyten mit TRD-Überexpression könnte auch in einer veränderten Interaktion der Proteine des junktionalen SR begründet sein. Das C-terminale Ende von TRD bindet über eine sogenannte KEKE-Struktur (siehe Einleitung) in Ca^{2+} -unabhängiger Weise an das C-terminale Ende des Ryanodin-Rezeptors (Zhang et al. 1997). Im Skelettmuskel kam es durch Bindung eines spezifischen Antikörpers, der gegen das N-terminale Ende (Aminosäuren 18-46) von Triadin gerichtet war, zu einer Störung der Interaktion zwischen Triadin und dem Ryanodin-Rezeptor und zu einer Verminderung der Offenwahrscheinlichkeit des Ca^{2+} -Freisetzungskanals (Groh et al. 1999). Dieser Bereich der zytoplasmatischen Domäne (Aminosäuren 18-46) der Skelettmuskel-Form des Triadins schien dabei hemmend auf die Funktion des Ryanodin-Rezeptors

wirken zu können. Eine andere Arbeitsgruppe (Kuniyasu et al. 1999) fand über die Testung eines Toxins einer Skorpionart indirekt Hinweise auf die hemmende Interaktion von TRD mit dem Ryanodin-Rezeptor. Wurde Triadin durch das Toxin aus dem Experiment entfernt, nahm die Öffnungswahrscheinlichkeit des Ryanodin-Rezeptors zu. Diese Interaktion war aber nur bei dem Ryanodin-Rezeptor aus dem Skelettmuskel stark ausgeprägt, während sie bei dem Ryanodin-Rezeptor aus dem Herzen nur sehr schwach war. Auch eine direkte Hemmung der Aktivität des Ca^{2+} -Freisetzungskanals durch Skelettmuskel-TRD konnte nachgewiesen werden (Ohkura et al. 1998). Demnach wäre auch durch eine Überexpression von TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten eine gestörte Interaktion zwischen TRD und dem Ryanodin-Rezeptor und seiner Aktivität bezüglich der Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem SR während der Systole denkbar. Als Folge könnte es zu einem verminderten Gehalt des systolischen Ca^{2+} -Transienten kommen.

Eine adenovirale Überexpression von TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten könnte des weiteren auch zu einer veränderten Mikroarchitektur der infizierten Zelle führen. Eine geänderte räumliche Anordnung der Proteine des quartären Protein-Komplexes (siehe vorne) könnte dann die Interaktion bzw. die Aktivität des Ryanodin-Rezeptors beeinträchtigen. So konnte in Junctin-überexprimierenden Mausherzen eine strukturelle Veränderung in den Ca^{2+} -freisetzenden „Einheiten“ nachgewiesen werden (Zhang et al. 2001). Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zwischen Triadin und Junctin und ihrer vergleichbaren Rolle im junktionalen SR wäre eine veränderte Mikroarchitektur des junktionalen SR auch nach einer Überexpression von Triadin zu erwarten.

Es bleibt offen inwieweit eine adenovirale Überexpression von TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten die Ca^{2+} -Speicherkapazität des SR beeinflusst. Dies könnte durch Versuche mit Coffein in Zukunft näher untersucht werden. Durch Gabe von Coffein in einer Konzentration von 10 mM kommt es zu einer vollständigen Öffnung der Ca^{2+} -Freisetzungskanäle und damit zur Entleerung der Ca^{2+} -Speicher des SR (Bassani und Bers 1995).

Eine Abnahme des diastolischen Ca^{2+} -Gehaltes in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten könnte auf eine veränderte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR während der

Diastole hindeuten. Für den Transport der Ca^{2+} -Ionen in das SR ist die kardiale sarko(endoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) verantwortlich. Eine verminderte SERCA2a-Expression auf Proteinebene oder Aktivität von SERCA2a in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten könnte für eine abgeschwächte Ca^{2+} -Aufnahme in das SR während der Diastole und demnach für die Abnahme der diastolischen Ca^{2+} -Transienten-Ratio entscheidend sein. Allerdings konnte im Rahmen dieser Arbeit kein Unterschied in der Proteinexpression von SERCA2a zwischen AdTRD+GFP- und AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nachgewiesen werden. Aktivitätsmessungen der SR- Ca^{2+} -Pumpe in TRD-überexprimierenden Ratten-Kardiomyozyten wurden nicht durchgeführt, könnten aber Bestandteil weiterer Untersuchungen sein. In einem transgenen Mausmodell, welches Triadin 1 spezifisch im Herzen überexprimiert, konnte auch keine veränderte SERCA2a-Expression auf Proteinebene im Vergleich zu Kontroll-Mäusen nachgewiesen werden. Zudem zeigten durchgeführte Aktivitätsmessungen von SERCA2a keine Unterschiede (Kirchhefer et al. 2001).

Eine weitere Erklärung für den verminderten diastolischen Ca^{2+} -Gehalt wäre eine veränderte Expression bzw. Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX). Im gesunden Herzen ist dieser Kationen-Transporter bedeutend für den diastolischen Ca^{2+} -Auswärtsstrom. Dabei werden im Herzmuskel drei Na^+ -Ionen gegen ein Ca^{2+} -Ion ausgetauscht. Zhang und Mitarbeiter (2001) konnten in adulten Ratten-Kardiomyozyten nach adenoviraler Überexpression des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX1) eine veränderte Kontraktilität und einen veränderten SR- Ca^{2+} -Gehalt nachweisen. Dabei nahm die diastolische $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in NCX1-überexprimierenden Zellen gegenüber mit Kontrollvirus infizierten Zellen signifikant ab. Untersuchungen bezüglich der Proteinexpression von NCX und eine vollständige Blockade des NCX durch Ni^{2+} -Ionen (5mM) (Hobai et al. 1997) in TRD-überexprimierenden neonatalen Ratten-Kardiomyozyten könnten auch hier weiteren Aufschluß über die Aktivität bzw. Expression des Kationenaustauschers innerhalb dieser Zellen geben und demnach auch über seine Beteiligung an einer gestörten Ca^{2+} -Homöostase und an einer diastolischen Funktionsstörung. Diese Untersuchungen stehen noch aus.

Interessant ist auch der Vergleich zwischen einem transgenen Mausmodell, welches TRD spezifisch im Herzen überexprimiert (Kirchhefer et al. 2001) und den, nach

adenoviralem Gentransfer, TRD-überexprimierenden neonatalen Ratten-Kardiomyozyten. Dabei konnte in dem transgenen Mausmodell eine, durch die Überexpression von TRD hervorgerufene, veränderte Expression weiterer SR-Proteine nachgewiesen werden. So war der Proteingehalt von Junctin und dem Ca^{2+} -Freisetzungskanal herunterreguliert. Dies läßt auf eine endogene kompensatorische Antwort bezüglich der Überexpression des exogenen TRD in den transgenen Mausherzen schließen. Eine mögliche Erklärung wäre die nachgewiesene hypertrophe Herzerkrankung bei den 16-20 Wochen alten TRD-Mäusen (Kirchhefer et al. 2002). Eine sich entwickelnde Hypertrophie des Herzens stellt einen Adaptionsmechanismus dar. Dieser geht oft auch mit einer veränderten Expression von Genen einher (Morgan et al. 1987). Das Herz versucht auf diese Weise die stark nachlassende Leistungsfähigkeit auszugleichen. Fetale Regulationsprogramme werden erneut induziert und die Expressionsrate verschiedener Proteine ändert sich, um auf diese Weise einen adäquaten Ausgleich der Kontraktilitätsverminderung zu schaffen (Nadal-Ginard und Mahdavi 1989, Chien et al. 1993).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dagegen in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten keine veränderte Expression anderer SR-Proteine infolge einer kompensatorischen Gegenregulation nachgewiesen werden (z.B. Calsequestrin und SERCA2A. siehe 4.5.). Ob es zu einer veränderten Proteinexpression von Junctin kam, wie in dem transgenen Mausmodell gezeigt, konnte nicht untersucht werden, da der zur Verfügung stehende Antikörper endogenes Junctin der Ratte nicht erkennt. Auch in anderen Arbeiten war die kompensatorische Antwort auf die Überexpression eines exogenen Gens in einem „kurzzeitigem“-Zellkultur-Modell, wie dem adenoviralem Gentransfer in vitro, weit weniger ausgeprägt als in transgenen Tieren (z.B. Zhang et al. 2001). Ein Hauptgrund könnte die nur instabile Integration des Transgens in die Zielzelle während eines adenoviralen Gentransfers sein. Auch die geringe Kontaktzeit mit dem Adenovirus bzw. die geringe Zeit zwischen Gentransfer und Nachweis des Transgens in den Zielzellen (3-5 Tage) könnte als Erklärung für eine nicht oder kaum vorhandene kompensatorische Gegenregulation dienen. Im Vergleich dazu ist bei einem transgenen Tiermodell das Transgen stabil in das Genom integriert und somit die Möglichkeit einer induzierten fetalen Gegenregulation erhöht.

Auch bei der Ermittlung der Ca^{2+} -Transienten konnten Unterschiede zwischen dem transgenen Mausmodell mit kardialer TRD-Überexpression und den AdTRD+GFP-infizierten Zellen gezeigt werden. So waren die Amplituden der Ca^{2+} -Transienten, die als Maß für das intrazellulär freigesetzte Ca^{2+} gelten, zwar in den TRD-Mäusen gegenüber den Kontroll-Mäusen nicht verschieden, jedoch war die Zeit bis zum 50%-igen Absinken des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten in den TRD-Zellen deutlich verlängert (Kirchhefer et al. 2001). In den TRD-überexprimierenden neonatalen Ratten-Kardiomyozyten waren dagegen die Amplituden der Ca^{2+} -Transienten im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich verringert, während die Zeit bis zum 50%-igen Absinken des intrazellulären Ca^{2+} -Transienten unverändert war.

Die gezeigten Unterschiede zwischen dem transgenen Mausmodell und dem adenoviralen Gentransfer in vitro weisen auf ausgeprägte kompensatorische Gegenregulationsmechanismen der transgenen Tiere hin. So ist eine eindeutige Beurteilung der genauen Funktion von Triadin 1 für die Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzellen nur schwer möglich, da die auftretenden Adaptionsmechanismen in Form einer veränderten Expression anderer SR-Proteine (RyR und JCT) die Funktion von Triadin 1 beeinflussen könnten. Durch die adenovirale Überexpression von TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, wie sie im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, könnten solche Gegenregulationsmechanismen vermieden werden. Eine veränderte Ca^{2+} -Homöostase innerhalb dieser TRD-überexprimierenden Zellen wäre demnach direkt auf die Überexpression des Transgens (TRD) zurückzuführen.

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß der Frequenz, mit der die neonatalen Ratten-Kardiomyozyten bei der Ca^{2+} -Transientenmessung stimuliert werden, auf die Ca^{2+} -Homöostase untersucht. Bowditch und Mitarbeiter konnten Ende des 19. Jahrhunderts zeigen, daß ein direkter Zusammenhang zwischen steigender Herzfrequenz und Kontraktionskraftzunahme besteht. Dieses Phänomen wurde von ihnen als positive Treppe bezeichnet (Bowditch 1871). Es konnte u.a. im Meerschweinchenventrikel, Kaninchenventrikel und menschlichen Myokard nachgewiesen werden (Bers 2001). Mehrere Faktoren scheinen dabei für die Kontraktionskraftzunahme nach Erhöhung der Stimulationsfrequenz (positive Treppe) eine Rolle zu spielen. So könnte ein erhöhter I_{Ca} , eine höhere diastolische

intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) und eine vermehrte Beladung des SR mit Ca^{2+} -Ionen als Folge einer erhöhten Stimulationsfrequenz für die Zunahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ und der Kontraktionskraft verantwortlich sein. Zusätzlich führt eine Erhöhung der Stimulationsfrequenz zu einer Zunahme der $[\text{Na}^+]_i$ (Cohen et al. 1982, Boyett et al. 1987), welche die Funktion des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers direkt beeinflusst. Dabei kommt es zu einem verminderten Ausstrom von Ca^{2+} -Ionen aus der Zelle, was letztendlich zu einem erhöhten Ca^{2+} -Gehalt in der Zelle und im SR führt.

Interessanterweise konnte in Ventrikeln der Ratte eine negative Treppe nach Stimulationsfrequenzerhöhung beobachtet werden. Für diese Spezies ist ein relativ hoher SR- Ca^{2+} -Gehalt bei geringer Stimulationsfrequenz charakteristisch. Dies führt wahrscheinlich auch zu einer relativ hohen $[\text{Na}^+]_i$, welche den Ca^{2+} -Ausstrom aus der Zelle via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher limitieren könnte (Shattock und Bers 1989). Aufgrund des sehr hohen Gehaltes an Na^+ - und Ca^{2+} -Ionen in der Zelle schon bei niedriger Frequenz steigt deren Konzentration bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz nicht weiter an, und es kommt zu keinem Anstieg bzw. zu einem leichten Abfall des SR- Ca^{2+} -Gehaltes.

Wir konnten im Rahmen dieser Arbeit eine signifikante Abnahme der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten in AdCTR+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0.5 Hz auf 1.5 Hz zeigen (negative Treppe). Dagegen war in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten keine negative Treppe bezüglich der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten-Ratio nachzuweisen. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich eine gestörte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR während der Systole infolge der TRD-Überexpression in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten (siehe oben).

Darüber hinaus konnte in AdCTR+GFP- und in AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten eine signifikante Abnahme von $t_{90\%}$ (Zeit bis zum Abfall auf 10% der maximalen Amplitude der Ca^{2+} -Transienten-Ratio) nach Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0.5 auf 1.0 Hz und von 1.0 auf 1.5 Hz nachgewiesen werden. Diese schnellere Abnahme der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz könnte auf eine erhöhte Aktivität der SR- Ca^{2+} -ATPase (SERCA2a) zurückzuführen sein. Zunächst kommt es durch die Frequenzerhöhung

zu einem Anstieg der $[Ca^{2+}]_i$ verbunden mit einer Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Proteinkinase II (Ca/CaM-PK) (Schouten 1990). Ca/CaM-PK besitzt die Eigenschaft, Phospholamban an der Aminosäure Threonin 17 zu phosphorylieren. Phosphoryliertes PLB erhöht die Affinität von SERCA2a zu Ca^{2+} -Ionen und führt zu einer vermehrten Aufnahme von Ca^{2+} in das SR und somit zu einem beschleunigten Abfall der $[Ca^{2+}]_i$. Diese Hypothese konnte durch die Arbeiten von Bassani et al. (1995b) und Li et al. (1997, 1998) unterstützt werden, in denen gezeigt wurde, daß eine Inhibition der Ca/CaM-PK durch KN-62 und KN-93 die beschleunigte Abnahme der $[Ca^{2+}]_i$ bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz in Ratten-Kardiomyozyten verhindert.

Da kein Unterschied von $t_{90\%}$ zwischen AdCTR+GFP- und AdTRD+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten bestand, ist keine Beeinflussung der SERCA2a-Aktivität bzw. deren Funktion durch eine adenovirale Überexpression von TRD zu erwarten.

5.3. Adenovirale Überexpression von Junctin (JCT) in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten

Junctin ist wie Triadin ein Membranprotein des junctionalen sarkoplasmatischen Retikulums. Dort scheint es eine ähnliche funktionelle Rolle zu spielen wie Triadin. Die beiden Proteine werden nicht durch dieselben Gene kodiert, besitzen aber eine ausgeprägte strukturelle und biochemische Homologie zueinander. Junctin bindet, wie Triadin, in Ca^{2+} -abhängiger Weise an Calsequestrin; allerdings mit einer höheren Affinität. Neben Calsequestrin bindet Junctin, Ca^{2+} -unabhängig, auch an Triadin und den Ca^{2+} -Freisetzungskanal (Zhang et al. 1997, Jones et al. 1995). Somit ist Junctin ebenfalls ein integraler Bestandteil des Proteinkomplexes, der Calsequestrin auf der luminalen Seite des junctionalen SR am Ryanodin-Rezeptor verankert (Zhang et al. 1997). Auf Grund seiner Lokalisation im SR und seiner Bindung an den Ca^{2+} -Freisetzungskanal könnte diesem Protein eine wichtige Funktion innerhalb der Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzelle zukommen. Die genaue Bedeutung von Junctin für die Ca^{2+} -Homöostase in isolierten Herzmuskelzellen sollte hier, mit Hilfe einer

adenoviral vermittelten transienten Überexpression von Junctin in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, genauer untersucht werden.

Die adenovirale Überexpression von JCT in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führte, im Vergleich zu AdCTR+GFP infizierten Zellen, zu einer Abnahme der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten-Ratio um 48%. Dies resultiert, wie auch bei der adenoviralen Überexpression von TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten, aus einer starken Abnahme der systolischen Ca^{2+} -Transienten-Ratio und einer im Vergleich etwas geringeren Abnahme der diastolischen Ca^{2+} -Transienten-Ratio. Aufgrund der ausgeprägten strukturellen Homologie zwischen TRD und JCT könnten die Ursachen für eine derart veränderte Ca^{2+} -Homöostase in den AdTRD+GFP- bzw. AdJCT+GFP-infizierten Zellen vergleichbar sein. Dies unterstützt die Vermutung einer Funktionshomologie der beiden junctionalen SR-Proteine.

So könnten auch durch die Überexpression von JCT Ca^{2+} -Bindungsstellen am Calsequestrin vermehrt durch JCT besetzt werden. Als ein Resultat könnten weniger Ca^{2+} -Ionen durch Calsequestrin gebunden werden. Dies könnte sich in einer verminderten Beladung des SR mit Ca^{2+} auswirken. Die stärkere Abnahme der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten-Ratio in JCT-überexprimierenden im Vergleich zu TRD-überexprimierenden neonatalen Ratten-Kardiomyozyten könnte auf dem unterschiedlichen Bindungsverhalten dieser beiden Proteine gegenüber Calsequestrin, in Abhängigkeit der $[\text{Ca}^{2+}]_i$, beruhen. So bindet TRD Calsequestrin nur in Anwesenheit von Ca^{2+} (1 mM, Guo und Campbell 1995), während JCT in Abwesenheit von Ca^{2+} stark an eine Calsequestrin-Affinitätssäule (Zhang et al. 1997) bindet, aber bei 10 mM Ca^{2+} keine Bindung mehr zwischen JCT und Calsequestrin nachweisbar ist. Somit könnte es je nach Ca^{2+} -Gehalt im SR zu einem unterschiedlichen Bindungsverhalten zwischen Calsequestrin und TRD bzw. JCT kommen, was mit einer veränderten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR korrelieren könnte.

Zhang und Mitarbeiter (2001) konnten in Junctin-überexprimierenden Mäuseherzen eine strukturelle Veränderung in den Ca^{2+} -freisetzenden „Einheiten“ nachweisen. Eine möglicherweise veränderte Mikroarchitektur in AdJCT+GFP infizierten Zellen könnte in einer geänderten räumlichen Anordnung der Proteine des quartären

Proteinkomplexes resultieren. Eine Störung der Interaktion bzw. der Aktivität des Ryanodin-Rezeptors mit Auswirkungen auf die Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR während der Systole wäre demzufolge denkbar.

Auch in AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten konnten keine Anzeichen einer kompensatorischen Gegenregulation nach JCT-Überexpression nachgewiesen werden. So war der Proteingehalt von Calsequestrin und SERCA2a in den JCT-überexprimierenden Zellen gegenüber AdCTR+GFP-infizierten Zellen nicht signifikant verschieden. Der Proteingehalt von TRD in AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht bestimmt werden, da die Proteinexpression unterhalb der Detektionsgrenze des verwendeten Antikörpers lag. In transgenen JCT-überexprimierenden Mäusen konnte dagegen eine endogene kompensatorische Antwort infolge der Überexpression des exogenen JCT gezeigt werden. Dabei kam es zu einer Abnahme des Proteingehaltes von TRD und dem Ryanodin-Rezeptor im Vergleich zu Kontroll-Mäusen (Hong et al. 2002, Kirchhefer et al. 2003). Auch hier war eine beobachtete Hypertrophie der transgenen Mäuseherzen (19%) (Kirchhefer et al. 2003) eine mögliche Erklärung für die Induktion gegenregulatorischer Mechanismen.

Ein auffälliger Unterschied zwischen AdTRD+GFP- und AdJCT+GFP-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten war, daß es in den JCT-überexprimierenden Zellen im Gegensatz zu den TRD-überexprimierenden Zellen zu einer signifikanten Abnahme der Amplitude der Ca^{2+} -Transienten bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz von 0.5 auf 1.5 Hz kam (negative Treppe). Eine mögliche Erklärung dafür könnte in dem unterschiedlichen Bindungsverhalten von JCT bzw. TRD gegenüber Calsequestrin, in Abhängigkeit von $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (siehe oben), begründet sein. So kommt es normalerweise bei Erhöhung der Stimulationsfrequenz zunächst zu einer Erhöhung des I_{Ca} und der diastolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Dies führt dann zu einer vermehrten Beladung des SR mit Ca^{2+} -Ionen, was in einem veränderten Bindungsverhalten von JCT bzw. TRD gegenüber Calsequestrin resultieren könnte.

5.4. Ausblick

Triadin 1 (TRD) und Junctin (JCT), zwei Proteine des junctionalen sarkoplasmatischen Retikulums, scheinen eine entscheidende Funktion bei der Ca^{2+} -Freisetzung aus dem SR und letztendlich bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion des Herzmuskels zu haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen die zentrale Rolle dieser beiden Proteine bei der Regulation der Ca^{2+} -Homöostase der Herzmuskelzelle belegen. Durch den Einsatz des Adenovirus-vermittelten Gentransfers waren die veränderten Ca^{2+} -Transienten in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten direkt auf die Wirkung der jeweiligen überexprimierten Proteine, TRD und JCT, zurückzuführen. Veränderungen in der Ca^{2+} -Homöostase, korrelierend mit einer Störung der myokardialen Kontraktion und Relaxation, sind Kennzeichen der Herzinsuffizienz (Colucci und Braunwald 1997). Somit könnten TRD und JCT bei der Entstehung der terminalen Herzinsuffizienz eine Rolle spielen.

Einerseits sollte die adenovirale Überexpression von TRD und JCT zum grundsätzlich besseren Verständnis der Mechanismen bei der Kopplung von Erregung und Kontraktion dienen. Andererseits sollte im Rahmen dieser Arbeit die Voraussetzung für eine mögliche Gentherapie durch adenovirale Vektoren untersucht werden. Dabei ist die spezifische und effiziente Infektion von geeigneten Zielzellen von größter Wichtigkeit. Die im Rahmen dieser Arbeit beobachtete zelluläre Toxizität in adenoviral-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten in Abhängigkeit von der verwendeten Viruskonzentration und der Dauer der Virusinkubationszeit stellt ein großes Problem bei der Verwendung adenoviraler Vektoren für die Gentherapie dar. Des Weiteren ist der Einsatz dieser Art der Gentherapie durch die in mehreren Arbeiten beschriebene massive Immunantwort des Organismus nach i.v.-Injektion adenoviraler Vektoren stark beschränkt. Um diese Limitierung zu beseitigen, könnte versucht werden, das Wirtsspektrum eines Virus dahingehend zu verändern, daß die Infektion geeigneter Zielzellen spezifisch und effizient erfolgt. Durch Modifikationen des Adenovirus, z.B. durch die Verwendung eines gewebespezifischen Promotors oder durch Veränderungen der Fiberproteine, die für die Erkennung zellulärer Rezeptoren (Coxsackie- und Adenovirusrezeptor, Bergelson et al. 1997) verantwortlich sind, wäre eine gezielte Steuerung der

Adenoviren auf bestimmte Zellen denkbar. Auch die Verwendung eines anderen Applikationssystems (z.B. Dosieraerosol) oder die Kombination des adenoviralen Vektorsystems mit einem anderen geeigneten viralen Vektorsystem, z.B. Retroviren (Feng et al. 1997), könnten die unerwünschten Begleiterscheinungen bei der herkömmlichen adenoviralen Gentherapie vermindern und deren Einsatz optimieren.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über die Bedeutung von Junctin (JCT) und Triadin 1 (TRD), zwei Proteinen des junctionalen sarkoplasmatischen Retikulums (SR), für die kardiale Kontraktilität zu erlangen.

Zu diesem Zweck wurden Messungen von Ca^{2+} -Transienten an isolierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach transienter Überexpression von JCT bzw. TRD durchgeführt, um die physiologische Rolle dieser beiden Proteine zu untersuchen. Eine transiente Überexpression von JCT bzw. TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten wurde durch die Verwendung eines adenoviral-vermittelten Gentransfers mit Hilfe der im Rahmen dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Adenoviren (TRD-Virus und JCT-Virus) erreicht. Der Grad der Überexpression von JCT bzw. TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten nach adenoviraler Infektion korrelierte dabei mit der eingesetzten Viruskonzentration und der Virusinkubationsdauer. Eine Virusinkubationszeit von 48 h und eine 100-fache Virusinfektion erwies sich für nachfolgende physiologische Untersuchungen (Ca^{2+} -Transientenmessung) als optimal.

Die adenovirale Überexpression von TRD in neonatalen Ratten-Kardiomyozyten führte zu einer Abnahme der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten um 28%. Dies resultiert aus einer starken Abnahme des systolischen Ca^{2+} -Transienten und einer im Vergleich etwas geringeren Abnahme des diastolischen Ca^{2+} -Transienten. Die Ursachen für die Verminderung der systolischen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in TRD-Virus-infizierten neonatalen Ratten-Kardiomyozyten könnte in einer veränderten Bindungsfähigkeit von Calsequestrin (CSQ) für Ca^{2+} , einer Beeinflussung der Bindung von CSQ an den Ryanodin-Rezeptor (RyR) oder einer, durch die Überexpression von TRD bedingten, veränderten Offenwahrscheinlichkeit des RyR liegen. Die Expression anderer SR-Proteine, wie CSQ oder der Ca^{2+} -ATPase (SERCA 2a), war unverändert.

Die adenovirale Überexpression von JCT, ein mit TRD strukturell verwandtes Protein, ergab vergleichbare Ergebnisse. Diese waren eine Abnahme der Amplitude des Ca^{2+} -Transienten und ein unveränderter Proteingehalt von CSQ und SERCA 2a. Beide Proteine scheinen folglich neben ihrer strukturellen Homologie auch ähnliche Funktionen im junctionalen sarkoplasmatischen Retikulum zu erfüllen und in entscheidendem Maße die Ca^{2+} -Homöostase und damit letztlich die Kontraktion des Herzmuskels zu beeinflussen. Veränderungen in ihrer Expression könnten somit auch pathophysiologische Veränderungen bei der Herzinsuffizienz mitbedingen.

7.1. Puffer und Lösungen

Alle Chemikalien wurden in Pro-analysi-Qualität oder im besten kommerziell erhältlichen Reinheitsgrad verwendet. Alle radioaktiven Substanzen wurden von Hartmann Analytics, Braunschweig, oder von NEN-DuPont, Bad Homburg bezogen. Das für die Puffer und Lösungen verwendete Wasser wurde als Reinstwasser aus einer Wasseraufbereitungsanlage (TKA-LAB, TKA, Niederelbert) gewonnen.

Arbeitstechniken mit DNA

LB-Medium:	Trypton Hefeextrakt NaCl pH 7.0	10% (m/V) 5% (m/V) 5% (m/V)
LB-Agar:	Agar-Agar in LB-Medium pH 7.5	15% (m/V)
Lösung I (komp. E. coli):	MOPS pH 7.0 Rubidiumchlorid	10 mM 10 mM
Lösung II (komp. E.coli):	MOPS pH 6.5 Rubidiumchlorid CaCl ₂	10 mM 10 mM 50 mM
Puffer P1(Resusp.-puffer):	Tris HCl pH 8.0 EDTA RNase A Lagerung bei 2 bis 8°C	50 mM 10 mM 100 µg/ml
Puffer P2 (Lysispuffer)	NaOH SDS	200 mM 1% (m/V)
Puffer P3 (Neutralis.-puffer)	Kaliumacetat pH 5.5	3.0 M
10x Probenpuffer	Bromphenolblau Glycerol 1x TBE	10 mg 50% (V/V) 50% (V/V)
TAE-Puffer	Trisacetat pH 8.0 Na ₂ EDTA	40 mM 0.1 mM
TE-Puffer	Tris Base EDTA pH 8.0	50 mM 100 mM

10 x SSC	NaCl Natriumcitrat pH 7.0	1.5 M 150 mM
----------	---------------------------------	-----------------

100 x Denhardt`s	Ficoll (400) Polyvinylpyrrolidon (PVP) BSA	2% 2% 2%
------------------	--	----------------

Hybridisierungslösung	6 x SSC 5 x Denhardt`s SDS Salmon Sperm-DNA	0.5% 0.1mg/ml
-----------------------	--	------------------

Waschpuffer 1 (2 x SSC + 0.1% SDS)

2 x SSC + 0.1% SDS:	NaCl Natriumcitrat SDS pH 7.0	300 mM 30 mM 0.1%
---------------------	--	-------------------------

Waschpuffer 2 (0.1 x SSC + 0.1 % SDS)

0.1 x SSC + 0.1% SDS	NaCl Natriumcitrat SDS pH 7.0	15 mM 1.5 mM 0.1%
----------------------	--	-------------------------

Ampicillintrihydrat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	CN Biomedicals Inc., Aurora, USA
dNTP-Stamm, 20 mM	AGS, Heidelberg
Ethidiumbromid	Sigma, Taufkirchen
Hefeextrakt	Difco/Becton Dickinson, Heidelberg
Oligo(dt)-Primer p(dt) ₁₅	Roche, Mannheim
RNase	Qiagen, Hilden
RNase-Inhibitor	AGS, Heidelberg
Trypton/Peptone 140	Gibco BRI/Life Technologies, Karlsruhe

Arbeitstechniken mit RNA

Mit Ausnahme des Denaturierungs- und des Ladepuffers wurden alle Lösungen und Geräte vor Verwendung autoklaviert. Nicht autoklavierbare Geräte wurden vor Gebrauch mit DEPC-Wasser gespült.

Denaturierungspuffer:	Formaldehyd, säurefrei Formamid, denionisiert in 1x MOPS	8.7% (V/V) 63.3% (V/V)
DEPC-Wasser:	Diethylpyrocarbonat in bidest. Wasser	0.5% (V/V)
Ladepuffer für RNA:	Bromphenolblau-Lösung, gesättigt in DEPC-Wasser Glycerol, autoklaviert	50%(V/V) 50% (V/V)
10x MOPS:	3-Morpholino-Propan-Sulfonsäure Natriumacetat EDTA pH 7.5	0.2 M 0.05 M 0.01 M
Prähybridisierungslösung:	Formamid, deionisiert NaCl NaH ₂ PO ₄ EDTA SDS Rinderserumalbumin Polyvinylpyrrolidon Ficoll tRNA	50% 0.9 M 60 mM 6 mM 0.2% 0.1% 0.1% 0.1% 0.4 mg/ml
Präzipitationslösung:	Natriumcitrat NaCl in DEPC-Wasser	0.8 M 1.2 M
2 x SSC	NaCl Natriumcitrat pH 7.0	300 mM 30 mM
2 x SSC + 0.1%SDS:	NaCl Natriumcitrat SDS pH 7.0	300 mM 30 mM 0.1%
0.2 x SSC + 0.1% SDS	NaCl Natriumcitrat	30 mM 3 mM

	SDS pH 7.0	0.1%
Rinderserumalbumin	Sigma, Deisenhofen	
Ethidiumbromid	Sigma, Deisenhofen	
tRNA	Roche, Mannheim	
Hybond®	Amersham Biosciences, Freiburg	
MMLV-Reverse Transkriptase	AGS, Heidelberg	
Oligo(dt)-Primer p(dt)15	Roche, Mannheim	

Arbeitstechniken mit Proteinen

Saccharose/Histidin/
SDS-Puffer

	Saccharose	0.25 M
	Histidin	0.01 M
	SDS	1%

Porziogel-Puffer	Tris	0.2 M
	Glyzin	0.6 M
	EDTA	0.12 mM
	SDS	0.2%
	Glycerol	10%
	Polyarcylamid 1%	0.4%

Oberer Puffer	Tris	0.5 M
	SDS	0.4%

Sammelgel 5%	Acrylamid 38%	1 ml
	H ₂ O	5.85 ml
	Oberer Puffer	2.35 ml
	TEMED	6 µl
	Ammoniumpersulfat (APS) 10%	95 µl

Trenngel 7.5%	Acrylamid 38%	7.4 ml
	H ₂ O	4.6 ml
	Glycerol/H ₂ O 1:1	6.25 ml
	1 x Porzio Puffer	18.75 ml
	TEMED	32.5 µl
	Ammoniumpersulfat (APS) 10%	150 µl
Porziogel 8%	Acrylamid 38%	7.4 ml
	H ₂ O	9.9 ml
	2 x Porzio Puffer	17.5 ml
	TEMED	58 µl
	Ammoniumpersulfat (APS)	233 µl
	Elektrodenpuffer	Tris
Glycin		125 mM
SDS		1%
pH 8.8		
Transferpuffer	Na ₂ HPO ₄	42 mM
	NaH ₂ PO ₄	8 mM
	pH 7.4	
Ponceau S-Lösung	Ponceau S	0.2%
	Trichloressigsäure	3%
	Sulfosalicylsäure	3%
Puffer C	Tris	13 mM
	NaCl	154 mM
	Tween 20	0.1%
	pH 7.4	
AP-Puffer	NaCl	100 mM
	MgCl ₂ x 6H ₂ O	5 mM
	Triethanolamin	100 mM
	pH 9.4	

Puffer A	Tris	13 mM
	NaCl	154 mM
	pH 7.4	

TBS-Puffer	NaCl	154 mM
	Tris	10 mM
	pH 7.4	

ECF TM -Substrat	Amersham Biosciences, Freiburg
Protran [®] Nitrocellulose Membran BA 85	Schleicher und Schuell GmbH, Dassel

Das adenovirale Expressionssystem

LB-Medium	siehe oben	
Puffer P1, P2, P3	siehe oben	
Puffer QBT	NaCl	750 mM
	MOPS pH 7.0	50 mM
	Isopropanol	15%
	Triton X-100	10%
Puffer QC	NaCl	1 M
	MOPS	50 mM
	Isopropanol	15%
	pH 7.0	
Puffer QF	NaCl	1.25 M
	Tris	50 mM
	Isopropanol	15%
	pH 8.5	
PBS + Mg ²⁺	NaCl	140 mM
	KCl	2.7 mM
	Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
	KH ₂ PO ₄	1.5 mM
	MgCl ₂	6.1 mM
	pH 7.45	

HEPES-Puffer	HEPES pH 7.4	100 mM
HEK-Medium	DMEM ohne Glutamin Fetales Kälberserum Penicillin G Streptomycinsulfat L-Glutamin	500 ml 10% 100 u/ml 100 µg/ml 4 mM
Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)		Sigma, Taufkirchen
L-Glutamin 200 mM		ICN Biomedicals Inc, Aurora, USA
Penicillin/Streptomycin-Lösung		Gibco/Life Technologies, Karlsruhe

Isolation und Kultur neonataler Ratten-Kardiomyozyten

DMEM + FCS 15%	DMEM ohne L-Glutamin Fetales Kälberserum	17 ml 3 ml
Kulturmedium	DMEM Fetales Kälberserum Pferdeserum Penicillin/Streptomycin L-Glutamin	43 ml 1 ml 5 ml 0.5 ml 0.5 ml

Messung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration

Messpuffer	NaCl KCl CaCl ₂ x 2 H ₂ O NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O MgCl ₂ x 6 H ₂ O Glucose x H ₂ O	120 mM 5.4 mM 1.8 mM 0.42 mM 1.05 mM 5 mM
------------	--	--

HEPES	5 mM
EDTA	5 x 10 ⁻⁵ mM
Ascorbinsäure	0.28 mM

Indo-1/AM	Molecular Probes, Eugene, USA
Pluronic™ F-127 (20% in DMSO)	Molecular Probes, Eugene, USA

Antikörper

Tab. 7.1.: Verwendete Antikörper zum immunologischen Nachweis von Proteinen (pk = polyklonal, mk = monoklonal).

1. Antikörper	Verd.	2. Antikörper	Firma/Referenz
E2a	1:1000	[1125]-Protein A/ Protein A-AP	
Anti-GFP (mk)	1:100	[1125]-Protein A/ Protein A-AP	Q•Biogene
2A7-A1 (mk)	1:1000	[1125]-Protein A/ Protein A-AP	Mahony and Jones, 1986
5D8-A8 (mk)	1:1000	[1125]-Protein A/ Protein A-AP	Zhang et al. 1997
Trn6 (pk)	1:1000	[1125]-Protein A/ Protein A-AP	Kobayashi and Jones, 1999
2D12 (mk)	1:1000	[1125]-Protein A/ Protein A-AP	Field and Jones, 1993
αdhCSQ (pk)	1:1000	[1125]-Protein A/ Protein A-AP	MacDouglas et al. 1991

Der zweite Antikörper wurde, wenn im Text nichts anderes angegeben wurde, in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

7.2. Geräte und Bezugsquellen

Gerät	Bezugsquelle
Autoklav Varioklav Typ 500	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim
Autoclav Tuttnauer Systec Typ 3850 EL	Systec GmbH, Wetztenberg
Betazähler TRI-CARB 1600 TR	Canberra Packard GmbH, Dreieich
Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg

Elektrophoresekammer	Hoefler Scientific Instruments San Franc. USA
Gene Pulser	Biorad Laboratories GmbH, München
Kontrollmonitor PVM 97	SONY, Tokio, Japan
Mikro-Dismembrator U	B. Braun Biotech International AG, Melsungen
Mikromanipulator Narishige MN-3333	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmgH, Bensheim
Mikroskop Leica DMIL	Leica, Wetzlar
Mikroskop Labovert FS	Leitz, Wetzlar
Mikroskop (invers) TE-300	Nikon, Tokio, Japan
Mikroskop (invers) Diaphot 200	Nikon, Tokio, Japan
Omiga	Oxford Molecular, Madison, USA
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf AG, Hamburg
PhosphorImager Kassetten	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Photometer Uvikon 922	Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz
Photomultiplier D 104	Photon Technologie International (PTI), Brunswick NJ 08852
Photomultiplier Radiance 2000	Bio Rad, Hemel Hempstead, UK
Polytron PT-MR 3000	Kinematica AG, Littau, Schweiz
Pumpe P1	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Schüttler Modell 3015	GFL, Burgwedel
Reinstwasseranlage TKA-LAB Typ HP4	TKA Wasseraufbereitungssysteme GmbH, Hiederelbert
Schüttelinkubatur	Infors AG, Bottmingen, Schweiz
Schüttler Modell Unimax 2010, RO-5	Heidolph GmbH + Co.KG, Schwabach
Software Felix™ (Ver. 1.1)	Photon Technologie International (PTI), Brunswick NJ 08852
Storm 860	Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA
Stimulator CS	Hugo Sachs Elektronik-Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten
Stimulator Grass SD9	Grass Instrument Company, Quincy, MA, USA
Tischzentrifuge Modell 5415 C mit Standardrotor F-45-18-11	Eppendorf AG, Hamburg
Transfereinheit Hoefler	Hoefler Scientific Instruments San Franc. USA
Ultraschallstab VirSonic® 60	Virtis, New York, USA
UV-Lichtanlage Docu Gel-V 8A400	MWG Biotech, Ebersberg
Vakuumzentrifuge SpeedVac Plus AR Modell SC 110AR	Savant Instruments Inc., Farmingdale New York, USA

Video Camera Module XC-75	SONY, Tokio, Japan
Video Edge-Detector VED 105	Crescent Electronics, South East Sandy, Utah, USA
Xenon-Lichtbogenlampe PowerArc® 75 W	Photon Technologie International (PTI), Brunswick NJ 08852
Zentrifuge Centrikon T-124	Kontron Instruments AG, Zürich, Schweiz
Zentrifuge Universal 16	Hettich/Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf
Zentrifuge Varifuge 3.0 R	Heraeus Holding GmbH, Düsseldorf

7.3. Primer und PCR-Programme

In den folgenden Tabellen sind die Primer und PCR-Programme zur Amplifikation der verschiedenen Untereinheiten sowie die verwendeten Sequenzierungsprimer angegeben. Alle Primer sind in 5' – 3'- Orientierung geschrieben.

Tab. 7.2.a: Primer zum Nachweis von pAdEasy	
AdEasy-forward	TTG ATA GGG TCT CTT ACC AGC
AdEasy-reverse	AAC AGT GCG GGA ATG TTA CC
Produktgröße:	ca. 1250 bp
Tab. 7.2.b: Primer zum Nachweis von TRD	
AdTrack-seq-forward	TCC ATG CCG AGA GTG ATC CC
TRD1-reverse	ACT TGA AGT CTG ATC TCG G
Produktgröße:	ca. 990 bp
Tab. 7.2.c: Primer zum Nachweis von JCT	
JCT-PCR-P1	GAC TGA AGA AAC CAA AAT GG
JCT-PCR-P1R	GCA GTA AAT TGT GAT GAG G
Produktgröße:	ca. 700 bp

PCR-Programm zum Nachweis von pAdEasy, TRD und JCT:			
Denaturierung	3 min	94°C	1 Zyklus
Denaturierung	20 sec	94°C	9 Zyklen
Annealing	30 sec	58°C	
Elongation	2 min	72°C	
Denaturierung	20 sec	94°C	19 Zyklen, Verlängerung der Elongation um 5 sec pro Zyklus
Annealing	30 sec	58°C	
Elongation	2 min	72°C	
Elongation	7 min	72°C	1 Zyklus

8. LITERATURVERZEICHNIS

Ahmed GU, Dong PH, Song G, Ball NA, Xu Y, Walsh RA, Chiamvimonvat N (2000) Changes in Ca²⁺-cycling proteins underlie cardiac action potential prolongation in pressure-overloaded guinea pig model with cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 86(5): 558-70

Ali M, Lemoine N, Ring C (1994) The use of DNA viruses for gene therapy. *Gene Therapy* 1: 367-384

Bassani RA, Bers DM (1995) Rate of diastolic Ca release from the sarcoplasmic reticulum intact rabbit and rat ventricular myocytes. *Biophys J.* 68(5):2015-22

Bassani JW, Yuan W, Bers DM (1995) Fractional SR release is regulated by trigger Ca and SR Ca content in cardiac myocytes. *Am Physiol* 268: 1313-1319

Bassani RA, Mattiazzi A, Bers DM (1995) CaMKII is responsible for activity-dependent acceleration of relaxation in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 268(2 Pt 2): H703-12

Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 10(5): 440-7

Bergelson JM, Cunningham JA, Droguett G, Kurt-Jones EA, Krithivas A, Hong JS, Horwitz MS, Crowell RL, Finberg RW (1997) Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5. *Science* 275(5304): 1320-3

Bers DM (2001) *Excitation-contraction coupling and cardiac contractile force.* Boston, MA: Kluwer Academic Press

Bett A, Prevec L, Graham F (1993) Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* 67: 5911-5921

Birnboim HC, Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7, 1513-1523

Bowditch HP (1871) Über die Eigenthümlichkeiten der Reizbarkeit, welche die Muskelfasern des Herzens zeigen. *Ber Sachs Ges Wiss.* 23:652-689

Boyett MR, Hart G, Levi AJ, Roberts A (1987) Effects of repetitive activity on developed force and intracellular sodium in isolated sheep and dog Purkinje fibres. *J Physiol* 388: 295-322

Brandl CJ, DeLeon S, Martin DR, MacLennan DH (1987) Adult form of the Ca^{2+} ATP-ase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 262: 3768-3774

Braunwald E (1981) Heart failure: pathophysiology and treatment. *Am Heart J* 102(3 Pt 2): 486-90

Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, Billingham ME, Harrison DC, Stinson EB (1982) Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307(4): 205-11

Casewell AH, Brandt NR, Brunschwig JP, Pukerson S (1991) Localisation and partial characterisation of the oligomeric disulfide-linked molecular weight 95.000 protein (triadin) which binds the ryanodine and dihydropyridine receptors in skeletal muscle triadin vesicles. *Biochem* 30: 7507-7513

Charnet P, Lory P, Bourinet E, Collin T, Nargeot J (1995) cAMP-dependent phosphorylation of the cardiac L-type Ca channel: a missing link ? *Biochimie* 77: 957-962

Chien KR, Zhu H, Knowlton KU, Miller-Hance W, van Bilsen M, Obrein TX, Evans SM (1993) Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol* 55: 77-95

Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159

Cohen CJ, Fozzard HA, Sheu SS (1982) Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. *Circ Res* 50(5): 651-62

Colucci WS, Braunwald E (1997) Pathophysiology of heart failure. In: E Braunwald (Hrsg.), *Heart disease*, WB Saunders company, Philadelphia, 5. Auflage: 394-420

del Monte F, Williams E, Lebeche D, Schmidt U, Rosenzweig A, Gwathemy JK, Lewandowski ED, Hajjar RJ (2001) Improvement in survival and cardiac metabolism after gene transfer of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase in a rat model of heart failure. *Circulation* 104: 1424-1429

Dinchuk JE, Henderson NL, Burn TC, Huber R, Ho SP, Link J, O'Neil KT, Foch RJ, Scully MS, Hollis JM, Hollis GF, Friedman PA (2000) Aspartyl β -hydroxylase (Asph) and an evolutionarily conserved isoform of Asph missing the catalytic domain share exons with junctin. *J Biol Chem* 275: 39543-39554

Di Virgilio F, Steinberg TH, Swanson JA, Silverstein SC (1988) Fura-2 secretion and sequestration in macrophages. A blocker of organic anion transport reveals that these processes occur via a membrane transport system for organic anions. *J Immunol* 140: 915-920

Dong WS, Jianjie M, Do HK (2000) The asp-rich region at the carboxyl-terminus of calsequestrin binds to Ca^{2+} and interacts with triadin. *FEBS Letters* 486(2000) 178-182

Fabiato A, Fabiato F (1975) Contractions induced by a calcium-triggered release of calcium from the sarcoplasmic reticulum of single skinned cardiac cells. *J Physiol Lond* 249 (3): 469-495

Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13

Feldmann AM, Ray PE, Sitan CM, Mercer JA, Miobe W, Bristow MR (1991) Selective gene expression in failing human heart. Quantification of steady-state levels of

messenger RNA in andomyocardial biopsies using the polymerase chain reaction. *Circulation* 83 (6): 1866-72

Feng M, Jackson WH, Jr, Goldman CK, Rancourt C, Wang M, Dusing SK, Siegal G, Ccuriel DT (1997) Stable in vivo gene transduction via a novel adenoviral/retroviral chimeric vector. *Nat Biotechnol* 15(9): 866-70

Fisher KJ, Choi H, Burda J, Chen SJ, Wilson JM (1996) Recombinant adenovirus deleted of all viral genes for gene therapy of cystic fibrosis. *Virology* 217: 11-22

Flesch M, Schwinger RH, Schnabel P, Schiffer F, van Gelder I, Bavendiek U, Südkamp M, Kuhn-Regnier F, Böhm M (1996) Sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase and phospholamban mRNA and protein levels in end-stage heart failure due to ischemic or dilated cardiomyopathy. *J Mol Med* 74: 321-32

Flesch M, Schwinger RH, Schiffer F, Frank K, Sudkamp M, Kuhn-Regnier F, Arnold G, Bohm M (1996) Evidence for functional relevance of an enhanced expression of the Na^{+} - Ca^{2+} -exchanger in failing human myocardium. *Circulation* 94(5): 992-1002

Geller AI, Breakefield XO (1988) Adefective HSV-1 vector expresses Escherichia coli beta-galactosidase in cultured peripheral neurons. *Science* 241(4873): 1667-9

Gershoni JM (1988) Protein blotting: A manual. In: Glick NT (Hrsg.), *Methods of biochemical analysis*, Wiley, New York, 33. Auflage: 1-58

Graham FL, van der Eb AJ (1973) A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52: 456-457

Graham F, Smiley J, Russel W, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-77

Groh S, Marty I, Ottolia M, Prestipino G, Chapel A, Villaz M, Ronjat M (1999) Functional interaction of the cytoplasmic domain of triadin with the skeletal ryanodine receptor. *J Biol Chem* 274: 12278-12283

Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Bio Chem* 260: 3440-3450

Guo W, Campbell KP (1995) Association of triadin with the ryanodine receptor and calsequestrin in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 9027-9030

Guo W, Jorgensen AO, Jones LR, Campbell KP (1996) Biochemical characterization and molecular cloning of cardiac triadin. *J Biol Chem* 271: 458-465

Hasenfuss G, Schillinger W, Lehnart SE, Preuss M, Pieske B, Maier LS, Prestle J, Minami K, Just H (1999) Relationship between Na^+ - Ca^{2+} -exchanger protein levels and diastolic function of failing human myocardium. *Circulation* 99(5):641-8

He TC, Zhou S, da Costa LR, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509-2514

Hitt M, Bett A, Prevec L, Graham F (1994) Construction and Propagation of human adenovirus vectors. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. Academic Press Inc: 479

Hobai IA, Bates JA, Howarth FC, Levi AJ (1997) Inhibition by external Cd^{2+} of Na/Ca exchange and L-type Ca channel in rabbit ventricular myocytes. *Am. J. Physiol.* 272 (Heart Circ. Physiol. 41): H2164-H2172)

Hong CS, Cho MC, Kwak YG, Song CH, Lee YH, Lim JS, Kwon YK, Chae SW, Kim DH (2002) Cardiac remodeling and atrial fibrillation in transgenic mice overexpressing junctin. *FASEB*

Horwitz M (1990) Adenoviridae and their replication. In: Fields B und Knipe D (eds) *Virology*, Raven Press, New York: 1679-1721

Houdusse A, Love ML, Dominguez R, Grabarek Z, Cohen C (1997) Structures of four Ca²⁺-bound troponin C at 2.0 Å resolution: further insights into the Ca²⁺-switch in the calmodulin superfamily. *Structure* 5: 1695-1711

Huang B, Wang S, Qin D, Boutjdir M, El-Sherif N (1999) Diminished basal phosphorylation level of phospholamban in the postinfarction remodeled rat ventricle: role of beta-adrenergic pathway, protein, phosphodiesterase, and phosphatases. *Circ Res.* 85(9): 848-55

Inesi G, Lewis D, Sumbilla C, Nandi A, Strock C, Huff KW, Rogers TB, Johns DC, Kessler PD, Ordahl CP (1998) Cell-specific promoter in adenovirus vector for transgenic expression of SERCA1 ATPase in cardiac myocytes. *J Pphysiol* 274: C645-C653

Jaffe JA, Daniel C, Longenecker M (1992) Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver. *Nat genet* 1: 372-378

Johnson RA und Palacios I (1982) Dilated cardiomyopathies of the adult (first of two parts). *N Engl J Med* 307 (17): 1051-1058

Jones LR (1985) Sarcolemmal enzymes mediating β-adrenergic effects on the heart. *Curr Top Membr Transp* 25: 11-41

Jones LR, Field LJ (1993) Residues 2-25 of phospholamban are insufficient to inhibit Ca²⁺ transport ATPase of cardiac sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 268(16): 11486-8

Jones LR, Zhang L, Sanborn K, Jorgensen AO, Kelley J (1995) Purification, primary structure, and immunological characterization of the 26 kDa calsequestrin binding protein (junctin) from cardiac junctional sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* 270: 30787-30796

Kao JPY (1994) Practical aspects of measuring [Ca²⁺] with fluorescent indicators. *Meth Cell Biol* 40: 155-181

Kirchhefer U, Neumann J, Baba HA, Begrow F, Kobayashi YM, Reinke U, Schmitz W, Jones LR (2001) Cardiac hypertrophy and impaired relaxation in transgenic mice overexpressing triadin 1. *J Biol Chem* 276: 4142-4149

Kirchhefer U, Baba HA, Kobayashi YM, Jones LR, Schmitz W, Neumann J (2002) Altered function in atrium of transgenic mice overexpressing triadin 1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1334-H1343, 2002

Kirchhefer U, Neumann J, Bers DM, Buchwalow IB, Fabritz L, Hanske G, Justus I, Riemann B, Schmitz W, Jones LR (2003) Impaired relaxation in transgenic mice overexpressing junctin. *Cardiovasc Res.* 59(2):369-79

Knudson CM, Stang KK, Moomaw CR, Slaughter CA, Campbell KP (1993) Primary structure and topological analysis of a skeletal muscle-specific junctional sarcoplasmic reticulum glycoprotein (triadin). *J Biol Chem* 268(17): 12646-54

Kobayashi YM and Jones LR (1999) Identification of triadin 1 as the predominant triadin isoform expressed in mammalian myocardium. *J Biol Chem* 274: 28660-28668

Kobayashi YM, Alseikhan BA, Jones LR (2000) Localisation and characterization of the calsequestrin-binding domain of triadin 1. Evidence of a charged beta-strand in mediating the protein-protein interaction. *J Biol Chem* 275: 17639-17646

Komuro I, Yazaki Y (1993) Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu rev Physiol* 55: 55-75

Kochanek S, Clemens PR, Mitani K, Chen HH, Chan S, Caskey CT (1996) A new adenoviral vector: Replacement of all viral coding sequences with 28 kb of DNA independently expressing both full-length cystotrophin and β -Galaktosidase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 93: 5731-5736

Koss KL, Kranias EG (1996) Phospholamban: a prominent regulator of myocardial contractility. *Circ Res* 79: 1059-1063

Kuniyasu A, Kawano S, Hirayama Y, Ji YH, Xu K, Ohkuras M, Furukawa KI, Ohizumi Y, Hiraoka M, Nakayama H (1999) A new skorpion toxin (BmK-PL) stimulates Ca^{2+} -release channel activity of the skeletal-muscle ryanodine receptor by an indirect mechanism. *Biochem J* 339, 343-350

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

Lehnart SE, Schillinger W, Pieske B, Prestle J, Just H, Hasenfuss G (1998) Sarcoplasmic reticulum proteins in heart failure. *Ann NY Acad Sci* 853:220-30

Lehrmann S (1999) Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* 401, 517-518

Levrero M, Barban V, Manteca S, Balsamo C, Avantiaggiati ML, Natoli G, Skellekens H, Tiollais P, Perricaudet M (1991) Defective and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes in vitro and in vivo. *Gene* 101(2): 195-202

Li QT, Kay MA, Finegold M, Stratford-Perricaudet LD, Woo SLC (1993) Assessment of recombinant adenoviral vectors for hepatic gene therapy. *Hum Gene Ther* 4: 403-409

Li L, Satoh H, Ginsburg KS, Bers DM (1997b) The effect of Ca^{2+} -calmodulin-dependent kinase II on cardiac excitation-contraction coupling in ferret ventricular myocytes. *J Physiol* 501 (Pt 1): 17-31

Li L, Chu G, Kranias EG, Bers DM (1998) Cardiac Myocyte calcium transport in phospholamban knockout mouse: relaxation and endogenous CaMKII effects. *Am J Physiol* 274(4 Pt 2): H1335-47

Linck B, Boknik P, Eschenhagen T, Muller FU, Neumann J, Nose M, Jones LR, Schmitz W, Scholz H (1996) Messenger RNA expression and immunological quantification of phospholamban and SR- Ca^{2+} -ATPase in failing and nonfailing human hearts. *Cardiovasc Res* 31(4): 625-32

Lindemann JP, Jones LR, Hathaway DR, Henry BG, Watanabe AM (1983) β -adrenergic stimulation of phospholamban phosphorylation and Ca^{2+} -ATPase activity in guinea pig ventricles. *J Biol Chem* 258: 464-471

Lindhout DA, Sykes BD (2003) Structure and dynamics of the C-domain of human cardiac troponin C in complex with the inhibitory region of human cardiac troponin I. *J Biol Chem*

Lindner M, Erdmann E, Beuckelmann DJ (1998) Calcium content of the sarcoplasmic reticulum in isolated ventricular myocytes from patients with terminal heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 30(4): 743-9

Lochmueller H, Jani A, Huard J, Prescott S, Simoneau M, Massie B, Karpati G, Acsadi G (1994) Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants (Δ E1 + Δ E3) during multiple passages in 293 cells. *Hum Gene Ther* 5: 1485-1491

Loukianov E, Ji Y, Baker DL, Reed T, Babu J, Loukianova T, Greene A, Shull G, Periasamy M (1998) Sarco(endo)plasmic reticulum Ca^{2+} ATPase isoforms and their role in muscle physiology and pathology. *Ann NY Acad Sci* 853: 251-9

Lowry OH, Rosebrough NJ, Fass AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275

Lytton J und Mac Lennan DH (1988) Molecular cloning of cDNAs from human kidney coding for two alternatively spliced products of the cardiac Ca^{2+} ATPase gene. *J Biol Chem* 263: 15024-15031

Lytton J, Westlin M, Burk SE, Shull GE, MacLennan DH (1992) Functional comparisons between isoforms of the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum family of calcium pumps. *J Biol Chem* 267: 14483-14489

MacDougall LK, Jones LR, Cohen P (1991) Identification of the major protein phosphatases in mammalian cardiac muscle which dephosphorylate phospholamban. *Eur J Biochem* 196(3): 725-34

MacLennan DH, Wong PT (1971) Isolation of a calcium-sequestering protein from sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 1231-1235

MacLennan DH (2000) Ca^{2+} signalling and muscle disease. *Eur J Biochem* 267(17): 5291-7

Mahony L, Jones LR (1986) Developmental changes in cardiac sarcoplasmic reticulum in sheep. *J Biol Chem* 261(32): 15257-65

Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, Jayaraman T, Burkhoff D, Rosemblyt N, Marks AR (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* 101(4): 365-76

McCall E, Li L, Satoh H, Shannon TR, Blatter LA, Bers DM (1996) Effects of FK-506 on contraction and Ca^{2+} -transients in rat cardiac myocytes. *Circ Res.* 79(6): 1110-21

Merklein F (1998) Adenovirus-vermittelter Gentransfer und Expression von normalen und mutagenisierten Antiproteasen, Gerinnungsfaktor IX und Firefly Luciferase in Primärkulturen humaner vaskulärer Endothelzellen. Würzburg, Univ Diss 1998

Mintz E, Guillain F (1997) Ca^{2+} transport by the sarcoplasmic reticulum ATPase. *Biochim Biophys Acta* 1318(1-2): 52-70

Mitchell RD, Simmerman HKB, Jones LR (1988) Ca^{2+} binding effects on protein conformation and protein interactions of canine cardiac calsequestrin. *J Biol Chem* 263: 1376-1381

Morano I, Bächle-Stolz C, Katus A, Rüegg JC (1988) Increased calcium sensitivity of chemically skinned human atria by myosin light chain kinase. *Basic Res Cardiol* 83: 350-359

Morgan HE, Gordon EE, Kira Y, Chua HL, Russo LA, Peterson CL, McDermottPJ, Watson PA (1987) Biochemical mechanism of cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 49: 533-543

Muzyczka N (1992) Use of adeno-associated virus as a general transduction vector for mammalian cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 158:97-129

Nadal-Ginard B, Mahdavi V (1989) Molecular basis of cardiac performance. *J Clin Invest* 84: 1693-1700

Neumann J, Gupta RC, Schmitz W, Scholz H, Nairn AC, Watanabe AM (1991) Evidence for isoproterenol-induced phosphorylation of phosphatase inhibitor-1 in the intact heart. *Circ Res* 69: 1450-1457

Neumann J, Bokník P, Herzig S, Schmitz W, Scholz H, Gupta RC, Watanabe AM (1993) Evidence for physiological functions of protein phosphatases in the heart: evaluation with okadaic acid. *Am J Physiol* 265: H257-H266

Ohkura M, Furukawa KI, Fujimori H, Kuruma A, Kawano S, Hiraoka M, Kuniyasu A, Nakayama H, Ohizumi Y (1998) Dual regulation on the skeletal muscle ryanodine receptor by triadin and calsequestrin. *Biochem* 37: 12987-12993

Paielli DL, Wing MS, Rogulski KR, Gilbert JD, Kolozsvary A, Kim JH, Hughes J, Schnell M, Thompson T, Freytag SO (2000) Evaluation of the biodistribution, persistence, toxicity, and potential of germ-line transmission of a replication-competent human adenovirus following intraprostatic administration in the mouse. *Mol Ther* 1(3): 263-74

Pastoret PP, Brochier B (1992) Development of a recombinant vaccinia-rabies for oral vaccination of foxes against rabies. *Dev Biol Stand* 79: 105-11

Pogwizd SM, Qi M, Yuan W, Samarel AM, Bers DM (1999) Upregulation of Na⁺/Ca²⁺-exchanger expression and function in an arrhythmogenic rabbit model of heart failure. *Circ Res.* 85(11): 1009-19

Porzio MA, Pearson AM (1977) Improved resolution of myofibrillar proteins with sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Acta* 490: 27-34

Rapundalo ST (1998) Cardiac protein phosphorylation: functional and pathophysiological correlates. *Cardiovasc Res* 38: 559-588

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 2. Auflage

Schillinger W, Janssen PM, Emami S, Henderson SA, Ross RS, Teucher N, Zeitz O, Philipson KD, Prestle J, Hasenfuss G (2000) Impaired contractile performance of cultured rabbit ventricular myocytes after adenoviral gene transfer of Na⁺-Ca²⁺-exchanger. *Circ Res* 87(7): 581-7

Schouten VJ (1990) Interval dependence of force and twitch duration in rat heart explained by Ca²⁺ pump inactivation in sarcoplasmic reticulum. *J Physiol* 431: 427-44

Schwinger RGH, Böhm M, Schmidt U, Karczewski P, Bavendiek U, Flesch M, Krause EG, Erdmann E (1995) Unchanged protein levels of SERCA II and phospholamban but reduced Ca²⁺ uptake and Ca²⁺-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum from dilated cardiomyopathy patients compared with patients with nonfailing hearts. *Circulation* 92: 3220-3228

Scott BT, Simmermann HKB, Collins JH, Nadal-Ginard B, Jones LR (1988) Complete amino acid sequence of canine cardiac calsequestrin deduced by cDNA cloning. *J Biol Chem* 263: 8958-8964

Sham JSK, Cleemann L, Morad M (1995) Functional coupling of Ca²⁺ channels and ryanodine receptors in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 92: 121-125

Shattock MJ, Bers DM (1989) Rat vs. Rabbit ventricle: Ca flux and intracellular Na assessed by ion-selective microelectrodes. *Am J Physiol* 256(4 Pt 1): C813-22

Simmerman HKB, Jones LR (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev* 78: 921-947

Sipido KR, Volders PG, de Groot SH, Verdonck F, Van de Werf F, Wellens HJ, Vos MA (2000) Enhanced Ca^{2+} -release and Na/Ca exchange activity in hypertrophied canine ventricular myocytes: potential link between contractile adaptation and arrhythmogenesis. *Circulation* 102(17): 2137-44

Solaro RJ, Robertson SP, Johnson JD, Holroyde MJ, Potter JD (1981) Troponin-I phosphorylation: A unique regulator of the amounts of calcium required to activate cardiac myofibrils. *Cold Spring Harb Conf Cell Prolif* 8: 901-911

Tada M, Yamaoto T, Tonomura Y (1978) Molecular mechanism of active calcium transport by sarcoplasmic reticulum. *Physiol Rev* 58: 1-79

Tada M, Katz AM (1982) Phosphorylation of the sarcoplasmic reticulum and sarcolemma. *Annu Rev Physiol* 44: 401-423

Towbin H, Staehlin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels on nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 76: 4350-4354

Treves S, Feriotto G, Moccagatta L, Gambari R, Zorzato F (2000) Molecular cloning, expression, functional characterization, chromosomal localization, and gene structure of junctate, a novel integral calcium binding protein of sarco(endo)plasmic reticulum membrane. *J Biol Chem* 275: 39555-39568

Tripathy SK, Black HB, Goldwasser E, Leiden JM (1996) Immune responses to transgene-encoded proteins limit the stability of gene expression after injection of replication-defective adenovirus vectors. *Nat Med* 2(5): 545-50

Vogelstein B, Gillespie D (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 76(2): 615-9

Wagenknecht T, Grassucci R, Frank J, Saito A, Inui M, Fleischer S (1989) Three-dimensional architecture of the calcium channel/foot structure of sarcoplasmic reticulum. *Nature* 338: 167-170

Ward DG, Cornes MP, Trayer IP (2002) Structural consequences of cardiac troponin I phosphorylation. *J Biol Chem* 277(44): 41795-801

Yang Y, Nunes F, Berencsi K, Furth E, Gönczöl E, Wilson J (1994) Cellular Immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* 91: 4407-4411

Yao A, Su Z, Nonaka A, Zubair I, Lu L, Philipson KD, Bridge JHB, Barry WH (1998) Effects of overexpression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger on [Ca²⁺] transients in murine ventricular myocytes. *Circ Res* 82: 657-665

Zarain-Herzberg A, MacLennan DH, Periasamy M (1990) Characterisation of rabbit cardiac sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase gene. *J Biol Chem* 265: 4670-4677

Zhang L, Kelley J, Schmeisser G, Kobayashi YM, Jones LR (1997) Complex formation between junctin, triadin, calsequestrin, and the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 272: 23389-23397

Zhang L, Franzini-Armstrong C, Ramesh V, Jones LR (2001) Structural alterations in cardiac calcium release units resulting from overexpression of junctin. *J Mol Cell Cardiol* 33(2): 233-47

Zhang XQ, Song J, Rothblum LI, Lun M, Wang X, Ding F, Dunn J, Lytton J, McDermott PJ, Cheung JY (2001) Overexpression of Na⁺/Ca²⁺ exchanger alters contractility and SR Ca²⁺ content in adult rat myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2079-H2088, 2001

Zheng C, Baum BJ, Iadarola MJ, O'Connell BC (2000) Genomic integration and gene expression by a modified adenoviral vector. *Nat Biotechnol* 18(2) 176-180

Lebenslauf

Name: Jan Buskase
Geburtsdatum: 02.04.1972
Geburtsort: Lippstadt
Familienstand: ledig
Eltern: Hermann Buskase
Hedwig Buskase, geb. Wülfing

Schulbildung

1978 – 1982 Heilig-Kreuz-Grundschule, Mehrhoog
1982 – 1991 Konrad-Duden-Gymnasium, Wesel
22.06.1991 Allgemeine Hochschulreife (Abitur)

Zivildienst

08/1991 – 08/1992 Zivildienst im St. Martinistift, Wesel

Berufsausbildung

09/1992 – 03/1994 PTA-Lehranstalt, Duisburg: Ausbildung zum
Pharmazeutisch-Technischen-Assistenten (PTA)

Studium

04/1994 – 06/98 Studium der Pharmazie an der FU Berlin
30.09.1996 Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
13.07.1998 Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
08.11.1999 Dritter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
13.12.1999 Erteilung der Approbation als Apotheker

Tätigkeiten

07/1998 – 06/1999	Pharmazie-Praktikum in der St. Georgius Apotheke, Bocholt
01/2000	Beginn der Tätigkeit als Apotheker in der Vincentius-Apotheke, Rees-Mehr
01/2000 – 02/2003	Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitäts- Klinikums, Münster

Dissertation

01/2000	Beginn der Dissertation am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitäts-Klinikums Münster unter der Betreuung von Prof. Dr. J. Neumann und in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. K. Müller am Institut für Pharmazeutische und Medizinische Chemie, Fachbereich Chemie und Pharmazie, der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster
---------	--