

Aus der
Universitätsklinik für Thorax-, Herz- und Gefäß-ChirurgieTübingen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. G. Ziemer

Gene-Silencing von Adhäsionsmolekülrezeptorproteinen an
Herzmuskelzellen zur transienten Myokardprotektion
während extrakorporaler Zirkulation

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Christian Bernd Walter
aus
Nürtingen

2009

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

Privatdozent Dr. H.P. Wendel

Privatdozent Dr. B. Nohé

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Herzinsuffizienz</i>	1
1.2	<i>Das Zytokin TNF α</i>	4
1.3	<i>Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)</i>	5
1.4	<i>Die kardiale Entzündungsreaktion</i>	6
1.5	<i>Kultivierung von Herzmuskelzellen</i>	8
1.6	<i>Der Aufbau des Herzens und der Herzmuskelzellen</i>	9
1.7	<i>Small interfering ribonucleic acids (siRNA)</i>	10
1.7.1	Molekularer Aufbau	10
1.7.2	Entwicklung	12
1.7.3	Transfektion der siRNA	13
1.7.4	Alternativen	17
1.7.5	Anwendungen	19
1.8	<i>Therapiealternative Stammzellen</i>	20
1.9	<i>Fragestellungen und Ziele der Arbeit</i>	22
2	Material und Methoden	24
2.1	<i>Material</i>	24
2.1.1	Geräte	24
2.1.2	Verwendete Reagenzien	24
2.1.3	Gewebe	28
2.2	<i>Methoden</i>	30
2.2.1	Zellisolation	30
2.2.2	Zellkultivierung	32
2.2.3	Kalzium-Konzentration	32
2.2.4	Adhärenz	33
2.2.5	Transfektion	34
2.2.6	Aktivierung mit TNF α	36
2.2.7	RNA-Isolation	36
2.2.8	cDNA-Synthese	38
2.2.9	Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)	39
2.2.10	PCR Auswertung	40
2.2.11	Durchflusszytometrie	41
2.2.12	Statistische Methoden	43
3	Ergebnisse	44
3.1	<i>Zellisolation</i>	44
3.1.1	Optimierung der Zellisolation	44
3.1.2	Humane Myokardzellen	46
3.1.3	Porcine Myokardzellen	48
3.2	<i>Zellkultur</i>	48
3.2.1	Langzeitüberleben	48
3.2.2	Adhärenz	49
3.2.3	Reinheit	50

3.3	<i>Sekundärkultur</i>	53
3.4	<i>Alternative Zellgewinnung</i>	54
3.4.1	Kommerzieller Erwerb	54
3.4.2	Immortalisierung von Myokardzellen.....	56
3.5	<i>Stimulation mit TNFα</i>	57
3.5.1	Stimulation humaner Myokardzellen	57
3.5.2	Stimulation porciner Myokardzellen.....	59
3.6	<i>Kationische Lipofektion</i>	60
3.7	<i>Messung der RNA-Menge</i>	61
3.8	<i>Genesilencing durch siRNA</i>	61
3.8.1	Konzentration der siRNA	62
3.8.2	Konzentration des Transfektionsmittels.....	64
3.8.3	Inkubationszeit der siRNA	65
3.9	<i>Statistische Auswertung der Transfektion</i>	65
4	Diskussion	67
4.1	<i>Die siRNA-Technologie</i>	68
4.2	<i>Transfektion</i>	71
4.3	<i>Herzmuskelzellkultur</i>	74
4.3.1	Gewinnung von Primärzellen.....	74
4.3.2	Differenzierung von Stammzellen.....	76
4.3.3	Immortalisierung	78
4.4	<i>ICAM-1</i>	80
4.5	<i>Methodenkritik</i>	84
4.6	<i>Therapeutische Applikation und Zukunftsausblick</i>	85
5	Zusammenfassung	90
6	Abbildungsverzeichnis	93
7	Abkürzungsverzeichnis	95
8	Literaturverzeichnis	96
9	Danksagung	106
10	Lebenslauf	108

1 Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen, die allein in Europa mit steigender Tendenz ca. 10 Millionen Menschen betrifft. Aber auch andere Industrienationen beschreiben seit Jahren bei beiden Geschlechtern einen Anstieg von Prävalenz und Inzidenz der Herzinsuffizienz. Dabei wird auch eine altersabhängige Verteilung beschrieben, sodass vor allem bei über 80 Jährigen die Prävalenz der Erkrankung bereits ca. 10 % beträgt (Siegenthaler and Blum, 2006). Ursächlich für eine Herzinsuffizienz können zahlreiche kardiale Erkrankungen sein, die zu Veränderungen am Myokard führen, wie z.B. die koronare Herzerkrankung (KHK), die arterielle Hypertonie, die primäre Kardiomyopathie, Medikamentennebenwirkungen von Zytostatika (v.a. Doxorubicin) oder Antiarrhythmika. Aber auch nach kardiochirurgischen Eingriffen unter Einsatz der Herz- Lungenmaschine kann eine temporäre oder auch persistierende Herzinsuffizienzsymptomatik auftreten.

Eine Herzinsuffizienz ist aktuell nach folgenden drei wesentlichen Kriterien der WHO und der European Society of Cardiology (1995) definiert (Siegenthaler and Blum, 2006).

1. Abnormale Funktion des Herzens
2. Typische Symptome (Leistungseinschränkung, Dyspnoe, Ödeme, Rhythmusstörungen)
3. Ansprechen auf Herzinsuffizienztherapie

Von diesen drei Hauptkriterien müssen nach der European Society of Cardiology mindestens zwei erfüllt sein. Traditionell wird der Grad der Symptomatik nach einer Klassifikation der New York Heart Association (NYHA) eingeteilt:

- NYHA 1: Herzerkrankung ohne körperliche Limitation; alltägliche körperliche Belastungen verursachen keine inadäquate Erschöpfung
- NYHA 2: Patienten mit Herzerkrankung und leichter Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit, Beschwerdefreiheit in Ruhe.
- NYHA 3: Patienten mit Herzerkrankung und höhergradiger Einschränkung: Beschwerdefreiheit in Ruhe. Geringe körperliche Belastungen führen zur Erschöpfung
- NYHA 4: Ruhebeschwerden

Die Definition einer Herzinsuffizienz hat sich im Verlauf der letzten 200 Jahre stark gewandelt. Zu Anfang beschrieb der britische Mediziner William Withering (1741–1799) die Therapie der Wassersucht mit Digitalispräparaten und legte damit bereits den Grundstein für die moderne Therapie der Herzinsuffizienz (Packer, 1993).

Davon ausgehend betrachtete auch die Medizin der 1940er bis 1960er Jahre die Herzinsuffizienz primär als Überwässerungsproblematik und schlug ein kardiorenales Erklärungsmodell vor, um die Natrium- und Wasserretention zu erklären. Später, in den 1970er und 1980er Jahren wurde die Erkrankung hauptsächlich hämodynamisch erklärt und ein zirkulatorisches Modell propagiert. Dies hatte zur Folge, dass vermehrt periphere Vasodilatoren in der Therapie zum Einsatz kamen. Seit den 1990er Jahren wird die Herzinsuffizienz durch das neurohumorale Konzept erklärt, was erstmals ermöglicht, nicht nur die Salz- und Wasserretention, sondern auch die Progression der Krankheit mit myokardialer Fibrosierung und dem Verlust von Kardiomyozyten in das Erklärungsmodell physiologisch nachvollziehbar zu integrieren (Werdan, 1998).

Eine in den letzten Jahrzehnten aufgetretene Erklärungslücke zwischen Neuroendokrinum und systemischen Entzündungszeichen im Rahmen der Herzinsuffizienz konnte aktuell durch die Zytokin-Hypothese geschlossen werden (Shan et al., 1997). Darin wird neben neurohumoralen Mechanismen

(z.B. Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (=RAAS)), eine wichtige Rolle der proinflammatorischen Zytokine (z.B. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-6(IL-6)) als bioaktive Moleküle der Herzinsuffizienz propagiert.

Diese Gruppe an Zytokinen wird bei vielen Formen der Herzschwäche überexprimiert und vermitteln dadurch eine weitere Progression des Krankheitsbildes, zum einen lokal am Herzen durch Vorantreiben der Zellapoptose und der Kardiodepression, zum anderen aber auch durch eine systemisch vermittelte Entzündungsreaktion. Diese vor allem durch das Zytokin TNF α -vermittelte, direkte Kardiodepression konnte gerade auch bei Reperfusionsschäden, wie sie nach herzchirurgischen Eingriffen stattfinden, gezeigt werden (Cain et al., 1999). Wichtig zu betonen ist dabei, dass die entzündliche Komponente nicht nur bei infektiösen Herzerkrankungen eine Rolle spielt. Vielmehr wiesen 70 % aller Herzinsuffizienzpatienten eine erhöhte Serumkonzentration des C-reaktiven Proteins (Hartford et al., 2006) auf, vor allem jedoch bei akuter Dekompensation (bis zu 300 %). Neben dem CRP-Anstieg konnte aber auch die ansteigende Plasmakonzentration der genannten proinflammatorischen Zytokine dokumentiert werden. Das in dieser Arbeit exemplarisch verwendete TNF α (siehe unten) beispielsweise zeigt sich je nach NYHA-Klassifikation bei 5 bis 42 % der Patienten erhöht.

Je nach Erkrankung fällt der Anstieg von TNF α allerdings unterschiedlich aus: So zeigen Patienten mit chronischer Herzinsuffizienz lediglich einen Anstieg auf 2-6 pg TNF α /ml Serum. Bei der inflammatorischen Antwort nach herzchirurgischen Eingriffen wurden jedoch Konzentrationen von ca. 50 pg TNF α /ml Serum gemessen und unmittelbar nach akutem Myokardinfarkt stieg der Spiegel sogar auf 1500 pg TNF α /ml Serum (Pilz et al., 1996). Der Normwert von TNF α bei gesunden Probanden liegt im Serum bei 1 pg TNF α pro ml.

Ergänzend muss noch auf das Vorhandensein von im Blut löslichen TNF α – Rezeptoren (sTNF-RI und sTNF-RII) hingewiesen werden, die im Zuge der Herzinsuffizienz ebenfalls erhöht sind. So konnte eine Erhöhung der sTNF-RII

bei 92 % (Shan et al., 1997) aller NYHA IV Patienten nachgewiesen werden. Diese Rezeptoren haben die Aufgabe zirkulierende Zytokine (in dieser Arbeit beispielhaft: TNF α) zu inaktivieren, indem sie eine hochaffine Bindung mit dem TNF α eingehen oder deren Halbwertszeit durch Umwandlung in stabile zirkulierende Komplexe erhöhen (Packer, 1995). Sie stellen somit eine Indikatorfunktion auf ein aktiviertes Zytokinsystem dar, weshalb es wichtig ist zwischen gebundener und aktiver Zytokinkonzentration zu unterscheiden.

1.2 Das Zytokin TNF α

Tumornekrosefaktoren zählen zur Klasse der Zytokine und sind ca. 10 – 25 kDa große Proteine, die während natürlicher und spezifischer Immunantwort von Zellen des Immunsystems gebildet werden.

Erste Hinweise auf die Existenz von TNF α wurden 1893 von dem Chirurgen William B. Coley erwähnt, der feststellte, dass es bei einer bakteriellen Infektion von Tumorpatienten gelegentlich zu einer Tumorrückbildung kam.

TNF α gehört neben Interferon Typ 1, Interleukin-1, 6 und 18 zur Untergruppe der proinflammatorischen Zytokine (Siegenthaler and Blum, 2006). Dabei ist TNF α Hauptmediator der Wirtsabwehr gegen gramnegative Bakterien und wichtig für die intrazelluläre Abtötung von Bakterien. TNF α wird vor allem von Makrophagen, aber auch von stimulierten T-Zellen, Mastzellen und zytotoxischen Zellen (*natural killer cells*) freigesetzt.

Die Wirkung von TNF α im Organismus ist konzentrationsabhängig: In geringer Konzentration ($< 10^{-9}$ mol/l) induziert TNF α die Aufregulierung von Adhäsionsmolekülen auf Endothelzellen, induziert Entzündungsprozesse im Herzen, (Tracey et al., 1988) stimuliert die Zytokinproduktion von Makrophagen (IL-1 und 6) und induziert die Aufregulation von HMC-Klasse1 Molekülen. In höheren Konzentrationen wirkt es pyrogen (über Stimulation des Hypothalamus), steigert die hepatische Produktion von Akute-Phase-Proteinen (z.B. CRP), wirkt gerinnungshemmend und unterdrückt die Bildung von

Stammzellen im Knochenmark. In extremen Konzentrationen wird die kardiale Kontraktilität reduziert, die glatte Muskulatur in den Gefäßen wird relaxiert, wodurch es zum Blutdruckabfall und zur peripheren Minderdurchblutung kommt.

1.3 Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)

ICAM-1 gehört zur Familie der Immunglobuline und wird neben den Herzmuskelzellen (Ballantyne et al., 1996; Ansari et al., 1994) auch auf anderen Zelltypen kontinuierlich exprimiert, wie z.B. Endothelzellen, Fibroblasten und Leukozyten (Niessen et al., 2002). Es handelt sich bei ICAM-1 um ein transmembranäres Glykoprotein, das ursprünglich in seiner Funktion als Adhäsionsmolekül zwischen verschiedenen Zellen entdeckt wurde. Später konnte gezeigt werden, dass auch nicht-zelluläre Strukturen (z.B. Viren) über ICAM-1 an Zellen binden. Als Liganden des Rezeptors sind im Laufe der Zeit sowohl β_2 -Integrine (LFA-1; Mac-1) auf Leukozyten (Rothlein et al., 1986; Staunton et al., 1988), als auch Rhinoviren (Greve et al., 1989) und Plasmodium falciparum-infizierte Erythrozyten (Ockenhouse et al., 1992) beschrieben worden. Später konnte zusätzlich gezeigt werden, dass ICAM-1 auch direkt Fibrinogen binden kann (Languino et al., 1995; Altieri et al., 1995), was bei intrakoronarer Thrombenbildung und letztlich beim Herzinfarkt relevant sein könnte. Die Anzahl der exprimierten ICAM-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ist abhängig von einem spezifischen Rezeptor-vermittelten Signal-Übertragungsweg (*transduction pathway*) und den Transduktionsfaktoren des ICAM-1 Promotors (Cornelius et al., 1993).

Ein enger Verwandter des ICAM-1 ist VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), das ebenfalls zur Familie der Immunglobuline gehört (Rothlein et al., 1986). Es weist zumeist sieben Domänen auf (Osborn et al., 1989) und spielt in der Leukozytentransmigration (siehe 1.4) eine entscheidende Rolle (Alon et al., 1995; Berlin et al., 1995). Ebenfalls zu dieser Familie gehört PECAM-1 (*platelet/endothelial cell adhesion molecule 1*), auch bekannt unter

der Bezeichnung CD 31, das in dieser Arbeit als Endothelzellmarker verwendet wird. Dieser Rezeptor ist vor allem an der Migration der Entzündungszellen durch die Gefäßwand beteiligt.

Weitere wichtige Adhäsionsmoleküle im Rahmen der Entzündungsreaktion sind die Selektine (P-Selektin, E-Selektin und L-Selektin), die v.a. das *rolling* (siehe 1.4) der Leukozyten initiieren. Außerdem spielen die Integrine, wie z.B. Integrin $\alpha 2/\beta 1$ oder Integrin $\alpha M/\beta 2$ usw. eine Rolle. Sie sind neben Endothelzellen auch auf Leukozyten zu finden und werden in der späten Phase der Entzündungsreaktion relevant.

1.4 Die kardiale Entzündungsreaktion

Vergleichbar mit anderen Geweben läuft auch im Herzen die Entzündungsreaktion nach einem definierten und bekannten Muster ab:

I. **Margination:**

Unter der Margination versteht man den Austritt der Entzündungszellen aus dem axialen Strom der Kapillaren in den Randbereich. Dort ist der Blutfluss in Folge von Mikrozirkulationsstörungen, bedingt durch die vaskuläre Begleitreaktion der Entzündung (Prästase und Stase), verlangsamt. Diese Störung wird im späteren Stadium der Entzündung durch eine Permeabilitätssteigerung der Endstrombahn ausgelöst, welche durch Leukotriene und Komplementfaktoren (C3a und C5a) vermittelt wird. Der Austritt von Blutplasma in das kardiale Interstitium wird begünstigt, was die Viskosität des Blutes ansteigen lässt und dadurch eine erhebliche Herabsetzung der Flussgeschwindigkeit (Prästase) auslöst (Colditz, 1985).

II. **Endothel-Leukozyten-Interaktion:**

Der nächste Schritt in der Entzündungskaskade ist die Adhäsion und Transmigration von Leukozyten durch die Endothelbarriere.

Voraussetzung für die Leukozytenadhäsion an das Endothel sind die bei der Herzinsuffizienz erhöhten Zytokine (z.B. TNF α , Interleukine) (Raines and Ross, 1996), welche eine Erhöhung der Expression von verschiedenen Adhäsionsmolekülen auf der Endothelzelloberfläche bewirken. Alternativ kann diese Aktivierung auch über Thrombin erfolgen, was eventuell die entzündliche Komponente bei thrombotischen Ereignissen bzw. beim Herzinfarkt erklärt (Kaplanski et al., 1998).

In der ersten Phase der Adhäsion gehen die Liganden der Leukozyten eine reversible Bindung mit den P- und E-Selektinen der Endothelzellen ein. Diese erste lockere Adhäsion wird auch *rolling* genannt. Im weiteren Verlauf kommt es nun auch zur Interaktion zwischen den ICAM-1- und VCAM-1-Oberflächenrezeptoren mit ihren leukozytären Liganden, welche die anfänglich lockere Bindung über die Selektine ablöst. Diese Adhäsion ist nun irreversibel (*sticking*) und ermöglicht den Monozyten neben einer festen Haftung an der Gefäßwand eine Ausbreitung (*spreading*) (Joseph-Silverstein and Silverstein, 1998). Dieser Mechanismus läuft bei einer chronischen inflammatorischen Reaktion, welche der Herzinsuffizienz in vielen Fällen zugrunde liegt, nach ähnlichem Muster ab wie bei der akuten Inflammation.

III. **Migration und Chemotaxis:**

Abschließend erfolgt die durch ICAM-1, VCAM-1 sowie β_2 -Integrine vermittelte Migration der Leukozyten, wobei es sich um einen aktiven Auswanderungsprozess handelt. Nach der Adhäsion erfolgt eine amöboide Bewegung der Zellen (*spreading*) zum nächsten interendothelialen Spalt, wodurch der Leukozyt das Interstitium erreicht. Dabei muss allerdings noch die Basalmembran überwunden werden, was durch den Einsatz lysosomaler Enzyme (Kollagenase, Elastase) ermöglicht wird (Böcker et al., 2004). Wenn die Zellen die Endothelbarriere passiert haben, folgen sie dem chemotaktischen Gradienten zum Ort der Inflammation (Carlos and Harlan, 1994). Dieser

Gradient kann von einem umschriebenen Entzündungsherd (z.B. bei der Myokarditis) oder auch von Kardiomyozyten ausgehen, die nach einer anoxischen Periode wieder reoxigeniert werden (z.B. nach einem Infarkt oder dem Einsatz der Herzlungenmaschine) (Rui et al., 2001).

1.5 Kultivierung von Herzmuskelzellen

Bereits 1912 wurden Herzmuskelzellkulturen durch M.T. Burrows (Burrows, 1912) als Myokardmodell eingeführt und haben sich seitdem in der experimentellen Kardiologie als geeignetes Untersuchungsobjekt von Zellstoffwechsel, Wirkungsmechanismen von Pharmaka und molekularen Ursachen von Herzerkrankungen bewährt (Wollenberger, 1985; Sperelakis and Pappano, 1983).

Nachdem Burrows 1912 erstmals spontan kontrahierende Myokardzellen außerhalb des Organismus beschrieb, gelang es 1955 Cavanaugh, Myokardgewebe enzymatisch zu dissoziieren und als Einzelzellschicht anzuzüchten (Cavanaugh, 1955). Diese Methode wurde in den folgenden Jahren optimiert, sodass die Anzucht von tierischen Myokardzellen in ausreichender Menge und Qualität möglich wurde (Lieberman et al., 1980). Dadurch wurde ab den 1960er Jahren eine Vielzahl von pharmakologischen, physiologischen und morphologischen Untersuchungen ermöglicht (Marsh, 1983), die überwiegend an Hühner- und neonatalen Rattenherzen durchgeführt wurden.

Vorteile der Herzmuskelzellkultur sind vor allem fehlende nervale Einflüsse und negative Beeinflussung des kardialen Bindegewebes auf den Versuchsablauf, die zum Teil erhebliche Störgrößen darstellen (Werdan and Reithmann, 1987). Andererseits muss noch endgültig geklärt werden, ob neonatale, tierische Zellen mit adulten, humanen Zellen vergleichbar sind, bzw. welche Rolle der unterschiedliche Entwicklungsstand und das artifizielle Milieu der Zellkultur spielen.

Aus diesem Grunde wurde von mehreren Forschergruppen versucht aus humanem Herzgewebe Zellen zu isolieren, wobei allerdings einige Probleme auftraten: Zum einen ist die Gewebemenge meist sehr begrenzt und zum anderen die Qualität/Vitalität des Probenmaterials oft eingeschränkt. Als potentielle Quellen für Gewebematerial kommen Myokardbiopsien (Bird et al., 2003) oder Gewebeabfälle bei Herzoperationen (z.B. Klappenersatz oder Abfälle am Vorhof bei Kanülierung zur extrakorporalen Zirkulation) in Frage.

1.6 Der Aufbau des Herzens und der Herzmuskelzellen

Das Myokard besteht aus einer dreidimensionalen Anordnung von quergestreiften Kardiomyozyten, die verbunden mit angrenzenden Myozyten zu Muskelfasern angeordnet sind. Neben diesen kontraktile Elementen finden sich auch interstitielle Fibroblasten, Blutgefäße und extrazelluläre Matrix, die mit einer aus Proteoglykanen bestehenden Gelmatrix durchsetzt ist (Bird et al., 2003).

Jeder Kardiomyozyt enthält als kontraktile Einheit ein Bündel von Myofibrillen, die in Sarkomere eingeteilt sind. Dabei unterscheidet man die dicken Filamente, aus Myosin bestehend und die dünnen Filamente, die aus Aktin, Tropomyosin und dem Troponinkomplex aufgebaut sind (Ohtsuki, 2007). Der Troponinkomplex besteht aus drei Genprodukten, welche in verschiedenen einzelnen Genkopien des menschlichen Genoms liegen: Troponin C (18-kD), das Calcium bindet, Troponin T (39,7-kD), das Troponin an Tropomyosin und das dünne Filament bindet, und Troponin I (22,5-kD), die inhibitorische Untereinheit, welche die Kontraktion in Abwesenheit von Kalzium unterbindet. Zur Funktion des Troponins:

Am Anfang der Systole bindet Kalzium an das N-terminale Ende des TroponinCs und bewirkt dadurch eine Konformationsänderung im Protein. Diese wiederum bewirkt eine Protein-Protein-Interaktion (vermittelt über Troponin T), die das dünne Filament aktiviert, wodurch nacheinander ein

crossbridge-cycling-Prozess, eine myofibrilläre Aktivierung und schließlich die Kontraktion des Herzens eingeleitet wird.

Eine Komponente dieses Komplexes, das Troponin T (alternativ: Troponin I), spielt eine wichtige Rolle in der Diagnostik des akuten Koronarsyndroms (ACS). Dieses Protein ist hoch spezifisch für Kardiomyozyten und kommt in anderen Zellen des Körpers nicht vor, eine Ausnahme bildet nur die regenerierende Skelettmuskulatur bei Poliomyositis oder Duchennescher Muskeldystrophie. Durch Schädigung der Kardiomyozyten (meist ischämisch) werden die Troponine frei und können dann wenige Stunden später im Blut nachgewiesen werden. Dabei kann nicht nur ein Myokardinfarkt diagnostiziert werden, sondern auch der sogenannten Graubereich beurteilt werden. Hierbei liegen die Werte zwischen dem oberen Referenzwert für Gesunde und dem Schwellenwert für einen Myokardinfarkt. Werte im Graubereich beinhalten einen Hinweis auf Mikronekrosen sogenannten MMD (*minor myocardial damage*), wie sie z.B. Bypass-Operationen oder PTCA (perkutane transluminale coronare Angiographie) regelmäßig vorkommen (Dörner, 2003). Aufgrund dieser enormen Spezifität und Popularität wurde Troponin-T auch in dieser Arbeit als myokardialer Marker verwendet.

1.7 Small interfering ribonucleic acids (siRNA)

1.7.1 Molekularer Aufbau

SiRNAs (Small interfering ribonucleic acids) sind kleine doppelsträngige Oligoribonukleotide mit einer Länge von 21 - 25 Nukleotiden. Sie spielen bei einem zellulären Signalweg, der als RNA Interferenz (Hutvagner and Zamore, 2002) zusammengefasst wird (Hamilton and Baulcombe, 1999; Elbashir et al., 2001), eine entscheidende Rolle.

Die RNA-Interferenz führt zum Abbau der zur siRNA komplementären mRNA, wobei auch die Expression der auf der mRNA kodierten Proteine unterbunden wird (Dorsett and Tuschl, 2004).

Zu Beginn wird ein RNA-Molekül als Zielsequenz benötigt. Dies kann neben siRNA auch miRNA (*microRNA*) oder piRNA (*piwi-interacting-RNA*) sein (Obbard and Finnegan, 2008). SiRNA entsteht dabei aus längerer freier dsRNA indem aus der dsRNA durch das Enzym Dicer, welches eine Typ III RNase ist (Bernstein et al., 2001), ca. 22 Nukleotide lange Fragmente herausgeschnitten werden. Die dsRNA kann z.B. von Viren stammen. Daraus erklärt sich eine wichtige physiologische Rolle der RNA Interferenz: Die Elimination von zellfremder doppelsträngiger RNA. Sie stellt somit einen Schutzmechanismus vor allem gegen Virus-RNA dar.

Die entstandene siRNA wird anschließend in einen Protein-Komplex namens RISC (=RNA-induced silencing complex) eingespeist (siehe Abb. 1-1, Step 1), wobei ein Strang (*passenger strand*) enzymatisch abgespalten und nur der andere Strang (*guide-strand*) in den RISC integriert wird. Der RISC bindet dann mit Hilfe der inkorporierten antisense-siRNA komplementär an die mRNA und wird mit seinen RNA-Helikase- und Nuklease-Aktivitäten räumlich in die Nähe der Ziel-mRNA gebracht. Durch die Enzym-Aktivitäten des RISCs wird dann die mRNA entwunden und gespalten und liegt in ungeschützter Form vor. In Folge dessen wird die mRNA nun schnell durch intrazelluläre Nukleasen abgebaut (siehe Abb. 1-1 Step 2).

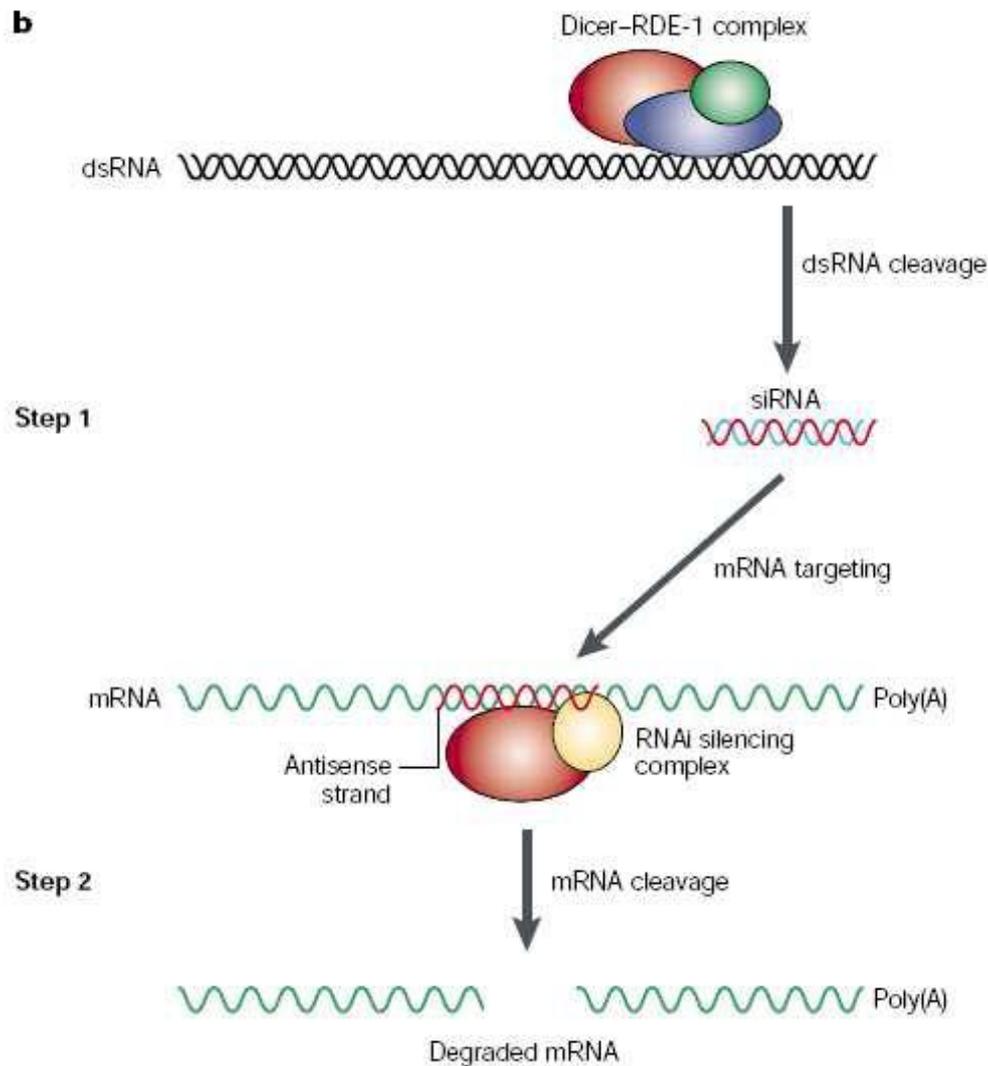


Abbildung 1-1: RNA-Interferenz (McManus and Sharp, 2002)

1.7.2 Entwicklung

Die RNA Interferenz wurde 1991 durch Andrew Fire (Cambridge, GB) entdeckt (Fire et al., 1991). Im Rahmen dieser Arbeit wurde bekannt, dass Gene-Silencing nicht nur auf der Ebene der Transkription möglich ist, sondern auch danach, indem die vorhandene mRNA schneller abgebaut wird. Dieser Prozess wurde PTGS (*post transcriptional gene silencing*) genannt. Zuvor war im Jahr 1990 bei Versuchen mit Pflanzen (Petunien), die inhibitorische Wirkung von

exogen zugeführter RNA (genauer: DNA-Kopien, die dann in RNA umgeschrieben wurden) gezeigt. Eine Forschergruppe versuchte die Produktion von Blütenfarbstoffen zu erhöhen, indem zusätzliche Kopien des dafür verantwortlichen Gens eingebracht wurden. Im Resultat zeigte sich allerdings, dass das Gegenteil der Fall war, die Färbung nahm ab oder war ganz verschwunden. Später konnte gezeigt werden, dass dieses Phänomen auf Grund von Genesilencing nach der Transkription und wurde entsprechend als *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) identifiziert (Napoli et al., 1990). Bereits im Jahre 1998 gelang es erstmals in dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* durch die Injektion von doppelsträngiger RNA, eine deutliche Sequenzspezifische Unterdrückung von zytoplasmatischer mRNA zu erwirken (Fire et al., 1998; Montgomery et al., 1998), wofür Andrew Fire und Craig Mello im Jahr 2006 den Nobelpreis für Physiologie oder Medizin erhielten. Beim Versuch die von Fire und Mello verwendete Strategie vom Modellorganismus auf Wirbeltiere zu übertragen, traten jedoch in der Folgezeit erhebliche Probleme auf. Die verwendeten langen RNA-Moleküle führten in Säugerzellen zu einer Interferon-Antwort und deren Folgen (Stark et al., 1998), sowie zu einer Aktivierung der Proteinkinase R, welche einen Zelluntergang (Apoptose) bewirkte. Die Lösung wurde 2001 durch Elbashir et al. gefunden: Die bisher verwendeten langen RNA-Moleküle wurden mittels der Ribonuclease III in kürzere (ca. 21 Basenpaare) Fragmente geschnitten (Elbashir et al., 2001). Dadurch konnte ein ausreichender Knockdown erzielt werden ohne eine Aktivierung der Proteinkinase R zu induzieren. Darüber hinaus konnte durch Caplen et al. gezeigt werden, dass auch synthetisch hergestellte siRNAs, wie sie auch in dieser Arbeit verwendet wurden, eine deutliche Unterdrückung der Proteinexpression bewirken (Caplen et al., 2001).

1.7.3 Transfektion der siRNA

„Gene silencing“ auf Basis der siRNA-Technologie kann mittels mehrerer Methoden erfolgen:

1. Transfektion exogener siRNA

Hier wird synthetisch hergestellte doppelsträngige siRNA in das Zytoplasma der Zelle transfiziert. Im Gegensatz zur physiologischen Verwendung des Pathways muss allerdings keine Endonuklease-Aktivität mehr erfolgen, da die eingesetzte siRNA bereits eine Länge von 21 Nukleotiden hat. Lediglich die Helikase-Aktivität des Enzyms Dicer tritt dabei auf.

Zur Transfektion stehen mehrere Methoden zur Verfügung:

- Calcium-Phosphat-Präzipitation

Hierbei wird zu einem Gemisch aus Kalziumchlorid und Natriumphosphat die zu übertragende RNA beigesetzt, die dann an ausfallendes Kalziumphosphat bindet. Die Kristalle werden nun der Zellkultur zugegeben und von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Diese altbekannte Methode wurde von Donze und Picard zur Transfektion von siRNA in Säugerzellen verwendet (Donze and Picard, 2002).

- Elektroporation

Bei diesem Verfahren wird die Zellmembran durch Spannungsimpulse für DNA permeabel gemacht. Vorteile dieses Systems sind, dass die Zellen nicht adhärent vorliegen müssen und sehr hohe Transfektionsraten von über 95 % erzielt werden. Diese Methode ist daher geeignet für Zellsysteme, die schwierig zu transfizieren sind. Allerdings muss für nennenswerte Transfektionserfolge das Absterben von über 50% der vorhandenen Zellen in Kauf genommen werden. Ein weiterer Nachteil ist die Begrenzung auf in-vitro-Modelle, sodass bisher keine in-vivo Therapie möglich ist (McManus and Sharp, 2002).

- Mikroinjektion

Bei diesem Verfahren wird die siRNA mittels Mikrokapillare direkt ins Zytoplasma der Zelle injiziert. Dieses Verfahren ist zum einen sehr anspruchsvoll und zeitaufwendig und andererseits werden kostenaufwendige Geräte benötigt (Mikrokapillaren, Mikroinjektor, Mikromanipulator und ein hochwertiges Inversionsmikroskop). Zudem können nur einzelne Zellen transfiziert werden, was die Anwendung zusätzlich einschränkt. Ein Vorteil ist jedoch die hohe Transfektionseffizienz von nahezu 100 % (Calegari et al., 2002).

- Liposomen

Die negativ geladene siRNA wird hierbei in positiv geladene Liposomen komplexiert, die aus Phospholipiden und DOTMA (N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride) oder ähnlichen Substanzen bestehen. Dabei entstehen größere Komplexe, die von den Zielzellen aufgenommen werden. Diese Behandlung muss allerdings sehr sorgfältig optimiert werden, da sonst der oxydative Stress für die Zellen enorm ist. Entscheidende Faktoren sind dabei das Verhältnis zwischen Transfektionsmittel und siRNA, die Konzentration der Komplexe sowie die Inkubationsdauer, welche sorgfältig eingestellt werden müssen (Caplen, 2002).

2. Endogene Transkription der siRNA

Diese Strategien wurden vor allem für Primärzellen oder andere schwierig zu transfizierende Zellkulturen entwickelt. Die Schlüsselrolle nimmt hierbei die short hairpin RNA (shRNA) ein, welche allerdings zunächst über ein Transportsystem (Plasmid- oder Virus-basiert) in die Zelle gebracht werden und dann stabil in das Genom der Zelle integriert werden muss. Wenn diese Voraussetzungen erfüllt sind, wird die shRNA nukleär transkribiert und kann dann im Zytoplasma mittels des Enzyms Dicer in

siRNA prozessiert werden. Die so entstandene siRNA bindet analog zu der in dieser Arbeit verwendeten synthetischen siRNA, an den RISC-Komplex und kann dadurch ihre Wirkung entfalten (Siehe Abbildung 1-2).

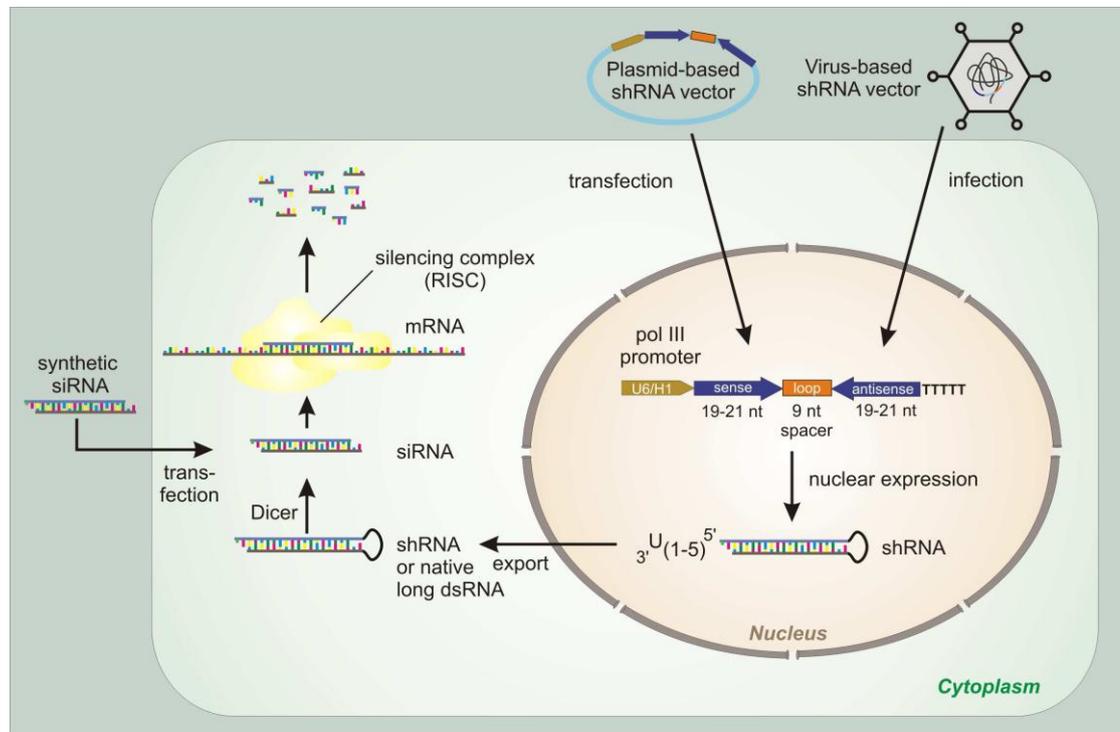


Abbildung 1-2: Übersicht über die Funktionsweise von synthetischer siRNA und shRNA

Durch die stabile Integration ins Genom der Zelle, wird bei dieser Anwendung ein permanentes Silencing erreicht, was beim Einsatz synthetischer SiRNA nicht der Fall ist.

Im Folgenden soll nun näher auf die molekularen Eigenschaften der shRNA eingegangen werden: Zunächst wird die shRNA in einen Transport-Vektor ligiert, der bereits einen geeigneten Promotor und einen Terminator besitzt. Die bei diesem Verfahren verwendeten Promotoren sind meist human H1 Promotor oder muriner U6 Promotor, diese sind in nahezu allen Säugerzellen aktiv. Dadurch kann die Expression der ins Genom integrierten shRNA sichergestellt werden.

Die Sequenz der shRNA besitzt einen typischen Aufbau: Nach dem vorgeschalteten Promotor folgt eine 19-23 Basenpaare lange kodierende Sequenz, dann eine sechs bis neun Basenpaare lange Spacer-Region

und zuletzt die zur Sequenz passende antisense-Sequenz. Nach der Transkription durch die zelleigene RNA-Polymerase III erfolgt die Anlagerung der komplementären sense und antisense Sequenz, wodurch eine typische, stabile Sekundärstruktur entsteht: ein doppelsträngiges Hairpin-ähnliches RNA-Molekül (Meister and Tuschl, 2004). Die Hairpin-Struktur entsteht dabei durch die nicht-kodierende Spacerregion.

Die Transfektion vektorbasierter shRNA bietet gegenüber der Transfektion mit exogener siRNA einige Vorteile. Sie ist stabiler und bedeutend länger anhaltend als die Transfektion mit siRNA, da die Sequenz für Promoter und shRNA fest integriert werden. Ein Nachteil des Verfahrens ist allerdings, dass das Einbringen der Gensequenz auf DNA-Ebene virale Gentransfersysteme benötigt, da die alternativ verwendete Lipotransfektion dabei nur eine geringe Transfektionseffizienz zeigt. Diese virale Transfektion benötigt allerdings Sicherheitsstandards, die bei der Erstellung dieser Arbeit nicht zur Verfügung standen.

1.7.4 Alternativen

Alternative Methoden zum „gene silencing via siRNA“ sind ODNs (oligodeoxyribonucleic acids), Ribozyme oder miRNA (*micro RNA*) (Zeng et al., 2002).

ODNs: (Antisense-Technologie)

Oligodesoxyribonuklein-Säuren (=DNA-Fragmente) sind ca. 20 Nukleotide lang und können an mRNA hybridisieren. Diese Kombination bildet ein Substrat für ein Enzym namens Ribonuklease H, welches den RNA-Strang des gebildeten RNA-DNA Komplexes spezifisch abbaut (Kurreck, 2003).

Andere Wirkmöglichkeiten sind sterische Hinderung der Translation oder Hemmung des Splicing-Vorganges der prä-mRNA (Lu et al., 2003).

Ribozyme:

Die Ribozyme binden über Watson-Crick-Basenpaarungen an RNA und zerstören diese, indem sie die Hydrolyse des Phosphodiestergerüsts der Ziel-RNA katalysieren (Doudna and Cech, 2002). Die am meisten erforschte Unterklasse dieser Enzyme sind die *hammerhead*-Ribozyme, die wie der Name schon besagt eine typische Sekundärstruktur bilden, wenn sie an die Ziel-RNA binden. Komplementäre Sequenzen an den jeweiligen Enden der Ribozyme und zweiwertige Ionen, wie z.B. Magnesium, sind Voraussetzung für die ribozymale Spaltung (Kuwabara et al., 2002).

miRNA:

miRNAs sind siRNA ähnliche nicht kodierende RNA-Moleküle, die physiologischerweise die Genexpression regulieren (Bartel, 2004). Diese Moleküle werden in einen Proteinkomplex eingebaut der mit den Ribosomen assoziiert ist (Nelson et al., 2004). Dadurch sind sie in der Lage, die Translation von mRNA-Molekülen, welche Sequenzen enthalten, die zum Teil in ihrer 3' *untranslated region (UTR)* (Ocker et al., 2005) zur Sequenz der miRNA komplementär sind, zu hemmen (Nelson et al., 2004). Bei ausreichender Übereinstimmung zwischen miRNA und mRNA, können diese miRNA-Moleküle mehrfach verwendet werden und dadurch mehrere Zyklen des mRNA-Abbaus bewirken (Hutvagner and Zamore, 2002).

Die endogen produzierten miRNAs sind bei vielen Erkrankungen über- oder auch unterreguliert, so z.B. bei Tumoren (Marquez and McCaffrey, 2008) oder kardialer Hypertrophie (Van Rooij et al., 2006). Therapeutisch könnte die Konzentration der miRNA durch Inhibition mit sogenannten *Anti-miRs* (Poy et al., 2004) oder die Zuführung von synthetischer miRNA (Liang et al., 2004) moduliert werden.

Synthetische siRNAs sind, wie oben diskutiert, so designet, dass sie absolut spezifisch für eine mRNA sind und damit die Expression von einem spezifischen Protein senken. Im Gegensatz dazu können manche miRNAs hunderte von mRNAs in ihrer Translation hemmen (Farh et al., 2005), wodurch es möglich wird nicht nur die Expression eines Protein, sondern ganze

pathways (aufeinanderfolgende Enzymsysteme) wie z.B. die Tumorgenese oder das Immunsystem bei der Virusabwehr, zu beeinflussen.

1.7.5 Anwendungen

Die Möglichkeiten der RNAi werden zurzeit intensiv erforscht und versprechen eine Vielzahl von diagnostischen und therapeutischen Anwendungen:

1. Erforschung der Genfunktion *in vivo*

SiRNA-Technologie stellt ein vielversprechendes Werkzeug zur Erforschung von Genfunktionen am Tiermodell dar. Dadurch können z.B. Knockdown-Mäuse entstehen, die im Vergleich zu klassisch (rekombinant) hergestellten Knockout-Mäusen einige Vorteile bieten. So dauert die Erzeugung von Knockdown-Mäusen mittels siRNA-Technologie nur wenige Wochen und ist somit wesentlich kürzer als die klassische Herstellung von Knockout-Mäusen, die bis zu mehreren Jahren dauern kann. Außerdem können mit Hilfe der siRNA-Technologie gleichzeitig zwei Gene oder sogar eine ganze Genfamilie ausgeschaltet werden (Dorsett and Tuschl, 2004).

2. Screening des gesamten Genoms

Beispielsweise wurden bei *Drosophila melanogaster* mit Hilfe von siRNA-Technologie Screenings durchgeführt, die zur Identifikation von Genen geführt haben, die an fundamentalen Zellprozessen beteiligt sind. So konnten wichtige zytologische Prozesse wie z.B. die Zellteilung oder Apoptose in ihrer Funktion weiter aufgeklärt werden (Carpenter and Sabatini, 2004).

3. siRNA basierte Therapieansätze

Der Mechanismus der RNA Interferenz mit dessen Hilfe sich einzelne Gene spezifisch ausschalten lassen, bietet auch ein enormes therapeutischen Potential. So wurden *in vitro* bereits vielversprechende Ergebnisse gewonnen, die den Einsatz der siRNA-Technologie als zukünftiges Therapeutikum hinweisen. Das Marburg Virus beispielsweise, dessen

Infektion bei Menschen häufig letal ausgeht und das bislang kaum zu therapieren ist, kann möglicherweise bald mit Hilfe der siRNA-Technologie behandelt werden. In der Zellkultur gelang es, die Expression viraler Proteine (z.B. VP 30, VP 35, NP) zu hemmen und dadurch die Virusreplikation zu verlangsamen (Fowler et al., 2005). Aber auch andere virale Infektionen wie z.B. HIV könnten in Zukunft effizienter therapiert werden (An et al., 2007). Ein weiterer Meilenstein in der Entwicklung einer siRNA basierten Therapie sind erste Erfolge im Tiermodell: In einem Mausmodell konnte gezeigt, dass eine systemische siRNA-Gabe vor einer fulminant verlaufenden Hepatitis (Zender et al., 2003), einer foudroyanten Sepsis (Sorensen et al., 2003), einer viralen Infektion (Song et al., 2003) oder raschem Tumorwachstum (Yang et al., 2003) schützen kann. Die systemische Applikation ist von siRNA allerdings mit einer Vielzahl von Nebenwirkungen verbunden, deren Reduktion Gegenstand aktueller Forschung ist.

Alternativ zur systemischen Therapie bieten sich auch die lokale Anwendung von siRNA an. Zum Beispiel könnten während herzchirurgischen Eingriffen Venenbypässe nach der Entnahme bis zum Wiedereinsetzen anstatt in Kochsalzlösung in siRNA-Lösung inkubiert werden. Dadurch ließe sich die Expression von ICAM-1 (siehe auch Kap. 1.3) auf Endothelzellen senken, wodurch die Leukozytenadhäsion, die Intimaverdickung und das Frühversagen des Bypasses reduziert werden können. *In vitro* gelang es bereits mittels Transfektion spezifischer siRNA die Expression von ICAM-1 und weiteren Adhäsionsmolekülen auf der Zelloberfläche von Endothelzellen signifikant zu senken (Walker et al., 2005; Walker et al., 2007).

1.8 Therapiealternative Stammzellen

Grundlage dieses Ansatzes ist die kritische Hinterfragung eines bisherigen Paradigmas: „Das Herz ist ein ausdifferenziertes, postmitotisches Organ“.

Dabei wird davon ausgegangen, dass ventrikuläre Myozyten nicht in der Lage sind, aus der G₀-Phase heraus wieder in den aktiven Teilungsmechanismus einzutreten, der unmittelbar nach der Geburt beendet wird. Diese Annahme wurde vor allem klinisch begründet: Es wurde keine signifikante funktionelle Regeneration des Myokards nach Erkrankungen oder Verletzungen, die mit dem Verlust von Herzmuskelzellen einhergingen, beobachtet. Ebenso sind primäre Tumoren des Herzmuskels eine echte Rarität (Soonpaa and Field, 1998).

Darüberhinaus kann das Herz auf Zelluntergang nur mit einer kompensatorischen Hypertrophie der noch vorhandenen Zellen reagieren, nicht wie zum Teil in anderen Geweben mit einer Hyperplasie (MacLellan and Schneider, 2000).

Im Widerspruch dazu stellten allerdings Linzbach und Mitarbeiter bereits gegen 1950 fest, dass ab einem Herzgewicht von mehr als 500 Gramm die Zellproliferation der vorherrschende Mechanismus bei einer Erhöhung der Muskelmasse ist (LINZBACH, 1950). Weitere Ergebnisse folgten, bis schließlich in den letzten Jahren mehrere Labore kardiale Progenitorzellen identifizieren konnten. Diese Zellen erwiesen sich *in vitro* als multipotent und bewirkten einen Anstieg von Kardiomyozyten und Koronargefäßen *in vivo*. Zusätzlich wiesen sie fundamentale Eigenschaften von Stammzellen auf (Linke et al., 2005).

Diese Zellen konnten sowohl im tierischen als auch im menschlichen Modell isoliert und expandiert werden. Als Marker wiesen sie sowohl Stammzell-typische (CD 34, c-kit, sca-1) als auch Endothelzell-Marker (KDR (human)/flk-1(mouse), CD-31) auf. Darüber hinaus sind die Zellen in der Lage, bei orthotoper Injektion bei Mäusen nach vorausgegangenem Infarkt sowohl die Muskelzellen als auch vaskuläre Zellen zu ersetzen bzw. in selbige auszudifferenzieren (Messina et al., 2004).

Diese Erkenntnis, dass Stammzellen direkt im menschlichen Herzen vorhanden sind kann evtl. die Möglichkeit bieten, diese Zellen zur Therapie der Herzinsuffizienz des Menschen zu nutzen (Dawn et al., 2005).

1.9 Fragestellungen und Ziele der Arbeit

Neuere Untersuchungen beschreiben die durch Zytokine vermittelte inflammatorische Begleitreaktion als wesentlichen Bestandteil in der Pathogenese der Herzinsuffizienz. Zytokine führen im Wesentlichen zu einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie z.B. ICAM-1, VCAM und E-Selektin an der Zelloberfläche vaskulärer und parenchymatöser Organe (z.B. Myokard), welche wiederum die Einwanderung von Leukozyten ins kardiale Gewebe modulieren.

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 spielt bei Endzündungsvorgängen im Herzen eine besonders wichtige Rolle. Zum Einen vermittelt es zusammen mit anderen Adhäsionsmolekülen (z.B. VCAM, E-Selektin, P-Selektin etc.) die Leukozyteneinwanderung in das kardiale Gewebe, woran der ICAM-1-Rezeptor auf den Endothelzellen beteiligt ist. Zum Anderen bewirkt die Bindung von Leukozyten oder anderen Liganden an ICAM-1 auf der Oberfläche von Kardiomyozyten eine Abnahme der Zellkontraktilität (Davani et al., 2004). Auf Grund dieser herzscheidenden Einflüsse soll ICAM-1 mittels der siRNA-Technologie supprimiert werden, um eine inflammatorisch begründete Herzinsuffizienz therapieren zu können. Diese Suppression von ICAM-1 ist an humanen Endothelzellen bereits gelungen (Walker et al., 2005). Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Wirksamkeit einer siRNA-basierten Suppression der ICAM-1-Expression, welche postoperativ nach Einsatz der HLM erhöht ist, in einer Kardiomyozytenkultur unter *in-vitro*-Bedingungen zu untersuchen.

Die visionäre Idee der vorliegenden Arbeit soll die Entwicklung einer siRNA-haltigen kardioplegischen Lösung sein, die im Rahmen von herzchirurgischen Eingriffen verwandt wird um einen ICAM-1 modulierten Reperfusionsschaden und die damit verbundene postoperative Herzinsuffizienz zu vermeiden.

- Erste Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es zunächst ein geeignetes Verfahren zur Isolation der Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband zu finden, bzw. bereits bekannte Verfahren für die Bedingungen der vorliegenden Arbeit zu modifizieren. Hierbei sollte es gelingen, mit einem

etablierten Tierversuchsmodell (Ratte) bewährte Verfahren auf humane und porcine Modelle zu übertragen. Nach der Isolation der Zellen aus dem Gewebeverband waren die frisch gewonnenen Kardiomyozyten von anderen im Herzen vorkommenden Zellen zu trennen und anschließend in ein Kulturmedium zu überführen.

- Bisherige Publikationen zeigen, dass Kardiomyozyten in Zellkultur nur eine geringe Überlebenszeit von wenigen Tagen aufweisen und kaum an artifiziellen Oberflächen adhäreren (Woodcock and Matkovich, 2005). Die Ergebnisse der einschlägigen Literaturmethoden sollten in dieser Arbeit überprüft und genau quantifiziert werden, da v.a. die Überlebenszeit der isolierten Kardiomyozyten entscheidend für die Durchführbarkeit von Transfektionsversuchen ist. Eine weitere Voraussetzung ist die Stimulierbarkeit mit TNF α . Nach der Isolationsprozedur musste zunächst gezeigt werden, dass die kultivierten Zellen auf einen Reiz durch TNF α mit einer vermehrten Expression von ICAM-1 reagieren.
- Den Schwerpunkt dieser Arbeit stellt die Transfektion der Zellen mit siRNA gegen ICAM-1 dar. Wichtige Fragestellungen waren dabei, welchen Effekt die Wahl des Transfektionsmittels, die Konzentration des Transfektionsmittels und die verwendete Konzentration der siRNA auf die Suppression von ICAM-1 haben.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Zentrifugen	Cryofuge 5500 i, Fa. Heraeus, Hanau, Deutschland
Brutschrank	Haereus 6000, Fa. Heraeus Hanau, Deutschland
Werkbank	HeraSafe HS 12, Fa. Kendro, Langenselbold, Deutschland
Inverses Mikroskop	Axiovert 135, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Waage	Sartorius Research, Fa. Sartorius, Göttingen, Deutschland
PCR-Gerät	Biorad iCycler, Fa. Biorad, Hercules, Kalifornien, USA
Photometer	Eppendorf Biophotometer, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.2 Verwendete Reagenzien

2.1.2.1 Lösungen

Kardioplege Lösung

Inhaltsstoffe	Konzentration [in mmol/l]	FW	mg pro l
KCl	20	74,56	1491,2
KH ₂ PO ₄	10	136,1	1361,0
Glucose	25	180,16	4504,0
Mannitol	40	182,17	7286,8
Albumin	2 mg /ml		2000,0
L-Glutaminsäure	70	147,13	10299,1
β-Hydroxy-Buttersäure	10	104,11	1041,1
Taurin	20	125,1	2502,0

EGTA	10	380,35	3803,5
------	----	--------	--------

Diese sehr saure Lösung wird mit KOH auf einen pH von 7,35 eingestellt.

Basallösung:

Inhaltsstoffe	Konzentration [in mmol/l]	FW	mg pro 1l
NaCl	137	58,4	8001
KH ₂ PO ₄	5	136,1	681
MgSO ₄	1	246,5	247
Glucose	10	180,2	1802
Hepes	5	260,3	1302
Taurin	10	125,1	1251

Nach der Lösung der Komponenten erfolgte die pH-Einstellung auf 7,35 mit NaOH.

2.1.2.2 Chemikalien

Die zur Herstellung der Lösungen verwendeten Chemikalien stammen von den Firmen Sigma, Merck und Serva.

2.1.2.3 Medium

Cardiac Myocyte Medium Art. Nr. 6201, Fa. Sciencell, Carlsbad,
Kalifornien, USA

Komponenten: 500 ml Basalmedium, 25 ml FBS, 5 ml Cardiac myocyte growth Supplement (CMGS) und 5 ml Penicillin-Streptomycin Lösung

2.1.2.4 Adhärenzien

Poly-L-Lysine	Produkt Nr. P4707, Fa. Sigma, Missouri, USA,
Laminin	Produkt Nr. L-2020, Fa. Sigma, Missouri, USA
Fibronektin	Produkt-Nr. L-7117, Fa. Biochrom, Berlin, Deutschland

2.1.2.5 Verdauungsenzyme

Kollagenase Typ II	Art. Nr. 17101-015, Fa. Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Art. Nr. 37290, Fa. Serva, Heidelberg, Deutschland

2.1.2.6 TNF α

TNF α	Art. Nr.340512 ,BD, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
--------------	--

2.1.2.7 siRNA ICAM-1 Sequenz

Nr. 179 (Fa. Quiagen, Hilden, Deutschland)

Target Sequence	ACC TGC AGT GGT GCC TGT GAT		
Sense	r(CUG CAG UGU UGC CUG UGA U dTdT	Batch	155112
Antisense	r(AUC ACA GGC AAC ACU GCA G) dTdT	No.	155113

2.1.2.8 Transfektionsmittel

INTERFERinTM Cat. No. 409-10, Fa. Polyplus Transfection, New York, USA

Lipofectamine™ 2000 Cat. No. 11668-019, Fa. Invitrogen, Karlsruhe,
Deutschland

2.1.2.9 qRT-PCR Primer Sequenzen

a. Mensch (Fa. Operon, Köln, Deutschland)

Name	Seq #	Seg Name	Seq 5' nach 3'
GAPDH	5249	humGAPDHsense	TCAACAGCGACACCCACTCC
	5250	humGAPDHantisen	TGAGGTCCACCACCCTGTTG
Troponin	5204	humantroponinTfw	TTCTCCGAAACAGGATCAACG
	5205	humantroponinTbw	AGCGAGGAGCAGATCTTTGGT
ICAM-1	5142	humICAM-1sense	CTTGAGGGCACCTACCTCTGTC
	5143	humICAM-1antisen	CGGCTGCTACCACAGTGATG

b. Schwein (Fa. Operon, Köln, Deutschland)

Name	Seq #	Seg Name	Seq 5' nach 3'
GAPDH	5188	sscrogapdhsense	GGTGAAGGTCGGAGTGAACG
	5189	sscrogapdhantisen	TGACTGTGCCGTGGAATTTC
Troponin	5272	pigtroponinTfw	AGATCCCCGATGGAGAGAGAG
	5273	pigtroponinTbw	CGATCCTGTCTTTGAGAGAGACC
ICAM-1	5186	lcam1senssscrofa	TGGCTGGGCATGTGCTATAC
	5187	lcam1asscrofa	GTCCAGTTTCCTGGGCAATC

2.1.2.10 RNA-Isolationskit

Aurum™ Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit Kat. Nr. 732-6830, Fa. Bio-Rad, Hercules,
Kalifornien, USA

2.1.2.11 cDNA-Synthese-Kit

iScript cDNA Synthesis Kit Kat. Nr. 170-8890, Fa. Bio-Rad, Hercules,
Kalifornien, USA

2.1.2.12 PCR-Mix

IQ™ SYBR® Green Supermix Kat. Nr. 170-8880, Fa. Bio-Rad, Hercules,
Kalifornien, USA

2.1.2.13 Antikörper

Mouse Anti Porcine CD 31 MCA1746, Fa. Serotec, Oxford, UK
Anti-Mouse IgG Prod. No. P9287, Fa. Sigma, Seelze,
Deutschland

2.1.3 Gewebe

a. Human

Kardiomyozyten:

Humane Kardiomyozyten wurden aus Geweberesten gewonnen, die bei Operationen am Herzen anfallen. Dieses Gewebe fällt bei Operationen an, bei denen die Herz-Lungen-Maschine (HLM) zum Einsatz kommt. Um Blut aus dem rechten Vorhof entnehmen zu können, wird eine Kanüle in den rechten Vorhof (genauer: über das rechte Herzohr) eingeführt. Dazu muss ein Stück der Vorhofwand entfernt werden, welches dann für die vorliegende Arbeit zur Isolation von Kardiomyozyten verwendet werden konnte. Die Patienten haben der Gewebespende zugestimmt und eine entsprechende Einverständniserklärung unterschrieben. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen lag vor. (Votum Nr.: 439/2007BO2)

Endothelzellen:

Die venösen humanen Endothelzellen wurden von Frau Dipl. Biol. C. Raabe (Labor der Klinik für THG-Chirurgie, Universitätsklinikum Tübingen) aus Venenstücken isoliert, kultiviert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie dienten als Negativ-Kontrolle der Troponin-Testung. Ein positives Votum der Ethikkommission der Universität Tübingen zur Gewebeentnahme lag ebenso vor (Votum Nr. 416/2003).

b. Porcines Zellmaterial**Kardiomyozyten:**

Zur Gewinnung von porcinen Kardiomyozyten wurden Herzpräparate von neugeborenen Schweinen (2-5 Tage alt) verwendet. Diese wurden vom Team des Tier-OP entnommen und dort abgeholt. Eine Erlaubnis zur Tötung der Tiere und anschließender Organentnahme nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz lag vor.

Endothelzellen:

Die porcinen Endothelzellen wurden ebenfalls von Frau Dipl. Biol. C. Raabe (THG Labor) aus Venenstücken isoliert, kultiviert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Eine Erlaubnis zur Tötung der Tiere und anschließender Organentnahme nach § 4 Abs. 3 Tierschutzgesetz lag vor.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation

Die Herzpräparate wurden direkt nach der Entnahme unter sterilen Bedingungen in gekühlter kardiopleger Lösung (Zusammensetzung siehe oben) ins Labor transportiert. Dort wurde parallel die Digestionslösung frisch hergestellt. Als Grundlage diente die Basallösung, zusätzlich wurden Kollagenase, Trypsin und 2 mg/ml Albumin hinzugegeben.

Anschließend wurde das Herzpräparat aus der Transportlösung entnommen, von nicht-myokardialen Resten (bei menschlichen Vorhofpräparaten: v.a. Fettablagerungen und Epikardresten, bei Schweineherzen: v.a. Gefäßstümpfe, Klappen und Vorhofgewebe) befreit und anschließend in ca. 1 mm große Würfel mazeriert. In der Folge wurden die Gewebewürfel nochmals sorgfältig abgespült, um Erythrozytenverunreinigungen in der späteren Kultur zu vermeiden.

Nun erfolgte die Isolation der Zellen durch die Verdauungsenzyme. Dazu wurde das mazerierte Gewebe in die Verdauungslösung gegeben, auf 37 °C im Wasserbad erhitzt und mit Hilfe eines Magnetrührers bei ca. 100 rpm durchgemischt. Nach 15 min wurde die Verdauungslösung abgesaugt und 1:2 mit gekühlter kardiopleger Lösung verdünnt. Dadurch werden der Verdauungslösung sämtliche Calcium-Ionen entzogen, was die Aktivität der Enzyme deutlich vermindert und so die Zellen vor weiterer enzymatischer Schädigung schützt. Darüber hinaus werden die Zellen durch die hohe Kalium-Konzentration vor schädlichen Kontraktionen geschützt (Brierley et al., 1986).

Anschließend wurden die Zellen bei 200 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in CM-Medium resuspendiert. Dabei wurde dem Medium 20 % FCS und 10 % kardioplege Lösung zugegeben (siehe Abbildung 2-1: Schritt 1). Der hohe Serumanteil wird hier zur Reduktion der Trypsinwirkung eingesetzt.

Anschließend wurden die Zellen in eine Zellkulturschale überführt und im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Dieser Prozess, d.h. der Wechsel der

Verdauung und die anschließende Überführung der Zellen in die Kultur, wurde ca. neun Mal wiederholt („fraktionierte Trypsinierung“) (Harary et al., 1974).

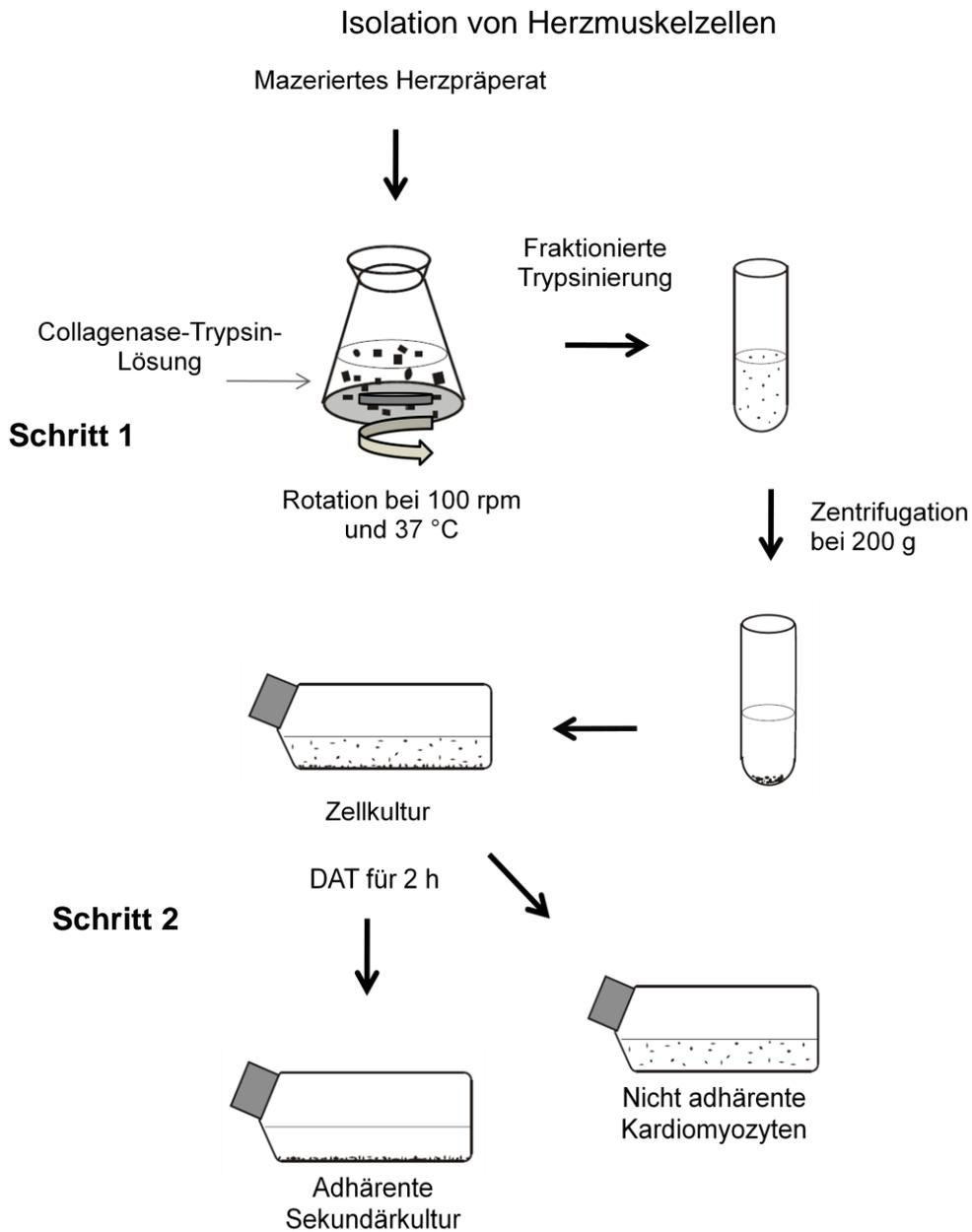


Abbildung 2-1: Isolation und Kultivierung von Herzmuskelzellen

2.2.2 Zellkultivierung

Die Isolation aus den Gewebepräparaten liefert immer eine Mischkultur an Zellen. Um diese nun wieder zu trennen, wurde das differente Adhärenzverhalten der verschiedenen Zelltypen ausgenutzt. Dazu wurden die Zellen für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert, wobei Fibroblasten („*fibroblastoid cells*“, die ca. 20 – 40% der Herzzellen ausmachen) weitgehend adhärent werden, die Kardiomyozyten allerdings in Lösung bleiben. Diese einfache Maßnahme wurde von Blondel entwickelt und nennt sich *Differential Attachment Technique* (DAT) (Blondel et al., 1971). Nach 2 Stunden werden die Myozyten abpipettiert und mit einer Anzahl von 300.000 Zellen pro well in 12-well Platten überführt.

Die Bestimmung der Zellzahl wurde mit Hilfe eines Hämozytometers durchgeführt. Dazu wurden die nicht-adhärenenten Kardiomyozyten von der Zellkulturschale abpipettiert und nochmals für 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 500 µl Medium resuspendiert. Von dieser Suspension wurden 20 µl entnommen und mit 80 µl Trypanblau-Lösung (0,4 % Fr. Sigma) vermischt.

Im Anschluss wurde das Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer) mit 70% Ethanol gereinigt, getrocknet und leicht angefeuchtet, um das Deckglas zu fixieren. Bei Erscheinen der sog. Newton-Ringen konnte von einem korrekten Abstand von 0,1 mm ausgegangen werden. Daraufhin konnte die Zell-Trypanblaumischung durch vorsichtiges Aufsetzen und Entleeren der Pipette am Rand des Deckglases aufgebracht werden.

Die so befüllte Kammer wurde nun unter dem Lichtmikroskop bei 10-facher Vergrößerung ausgezählt.

2.2.3 Kalzium-Konzentration

Im Anschluss erfolgte die Anhebung der Kalzium-Konzentration des bislang Kalzium-freien Mediums auf 1 mmol/l in 3 Schritten innerhalb von 2 Stunden.

Diese Maßnahme soll die Myozyten langsam an das Kalzium gewöhnen und eine Kalzium-Überladung und damit verbundene Kontraktionen verhindern.

2.2.4 Adhärenz

Nach der DAT sollte die Adhärenz der Kardiomyozyten auf der Oberfläche der Zellkulturschale getestet werden. Da bekannt ist, dass diese Zellen nicht auf unbeschichteten Kunststoffoberflächen adhären, sollte die Anhaftung mittels verschiedener Oberflächenbeschichtungen verbessert werden. Dazu wurden die Zellkulturplatten mit den vom Hersteller empfohlenen Konzentrationen beschichtet:

I. Poly-L-Lysine

Die Oberflächen wurden mit einer Konzentration von $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Poly-L-Lysine (MG: 150 000) beschichtet. Bei einer Oberfläche von $3,8 \text{ cm}^2$ (Herstellerangabe) wurden daher $7,6 \mu\text{g}$ verwendet, was einer Menge von $76 \mu\text{l}$ bei einer $0,01\%$ Lösung entspricht. Diese wurde in $250 \mu\text{l}$ PBS gelöst (= $0,15 \text{ nM}$), auf die Platten gegeben und über Nacht im Brutschrank inkubiert. Vor der Verwendung wurde die Lösung abgesaugt und die Platte zweimal mit PBS gespült.

II. Laminin

Da Laminin (MG: 900 000) für eine Vielzahl von Zell-Basalmembran-Interaktionen verantwortlich ist, wurde es hier eingesetzt. So soll Laminin die Adhäsion, Migration und Proliferation unterstützen, aber auch als Anheftungsfaktor für viele Zelltypen dienen. Darüberhinaus wurden auch morphologische Veränderungen, wie z.B. die Ausbreitung von Zellen, unter Verwendung von Laminin beobachtet (Terranova et al., 1980).

Es wurde eine Anwendungsmenge von $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ gewählt. Dazu wurde die gelieferte Laminin-Basislösung 1:10 mit PBS verdünnt und mit je $100 \mu\text{l}$ pro cm^2 (= $0,06 \text{ nM}$) auf die zu beschichtende Oberfläche aufgebracht. Diese wurde im Anschluss im Brutschrank für 45 Minuten inkubiert und konnte dann abgesaugt werden.

III. Fibronektin

Fibronektin (MG: ca. 230 000) besitzt die Eigenschaft, verschiedenste Zelltypen mit ihrer extrazellulären Matrix zu binden. Diese Eigenschaft hat dem Glykoprotein den Namen „Zellkleber“ eingebracht und wurde daher für diese Versuche verwendet.

Die gelieferte Lösung enthält eine Konzentration von 1 mg/ml humanem Fibronektin und wurde initial mit PBS auf 0,15 mg/ml verdünnt. Diese verdünnte Lösung wurde ebenfalls mit 100µl pro cm² (= 0,65 nM) aufgebracht und anschließend für 30 Minuten im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Lösung abgesaugt und die beschichtete Oberfläche einmal mit PBS gespült.

2.2.5 Transfektion

Nach der Zellisolation wurden die Zellen über Nacht (mindestens 12 h) inkubiert, sodass eine Erholung von dem Stress durch die Isolation möglich war. Wichtig war hierbei, dass das verwendete Medium kein Serum enthält, da dieses zu einer deutlichen Verschlechterung der Transfektionsrate auf Grund von elektrostatischen Interaktionen mit Serumproteinen wie z.B. Albumin führt (Simberg et al., 2005). Darüberhinaus wurden bei manchen Transfektionsmitteln Antibiotika-freie Medien verlangt, da diese ebenfalls Einfluss auf die Transfektionseffizienz haben.

Die Transfektion wurde mittels der Lipotransfektion durchgeführt, welche einfach und ohne große technische Apparatur möglich ist. Desweiteren wird bei dieser Methode bei optimaler Abstimmung von siRNA und Transfektionsmittel der Zellstress gering gehalten. Hier wurde eine Zellzahl von 300.000 Zellen pro Well (12-Well-Platte) verwendet.

Die praktische Durchführung der Transfektion weicht je nach Transfektionsmittel etwas ab. Allerdings wurde jeweils das Protokoll für Suspensionszellen verwendet, da die Zellen zum Zeitpunkt der Transfektion bestenfalls semiadhärent waren und sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass

die Transfektionseffizienz bei Verwendung von Protokollen für adhärenente Zellen sehr gering ist.

I. Lipofectamine™ 2000:

Bei diesen Versuchen wurden 12-Well Platten verwendet, auf die sich die folgenden Angaben beziehen. Zunächst wurde die 20 µM siRNA-Lösung mit 100 µl serumfreiem Medium angesetzt, im Anschluss in einem weiteren Ansatz 2 µl Lipofectamine-Transfektionsreagenz in 100 µl serumfreiem Medium (DMEM) verdünnt und bei Raumtemperatur unter RNase-freien Bedingungen für mindestens 5 Minuten inkubiert. Danach wurden beide Ansätze miteinander vermischt und erneut für 20 Minuten inkubiert. In dieser Zeit findet die Komplexierung der siRNA mit den Liposomen des Transfektionsmittels statt.

In der Folge wurden die Transfektionskomplexe zu den Zellen, die in 1 ml Antibiotika- und Serum-freien Medium kultiviert wurden, hinzugegeben (200 µl pro Well und für mindestens 4 Stunden im Brutschrank bei 37°C inkubiert) (Dalby et al., 2004).

Nach Ablauf dieser Zeit konnte das Medium gewechselt werden, um die Zellen vor der Toxizität der Transfektionskomplexe zu schützen. Allerdings war dieser Schritt nicht obligat, da die Zellen dadurch nicht wesentlich geschädigt wurden (siehe 3.8.3).

II. TRANSFERin

Auch hier wurde zunächst die 20 µM siRNA-Lösung in serumfreiem Medium gelöst, wobei hierbei eine Menge von 200 µl Medium gewählt wurde. Im Anschluss wurde die Suspension vorsichtig gevortext um eine gleichmäßige Verteilung der siRNA zu gewährleisten. Danach erfolgte, ohne weitere Inkubationszeit, die Zugabe des Transfektionsmittels (Menge je nach Versuch unterschiedlich) und eine rasche, weitere Durchmischung. Dies musste unbedingt beachtet werden, da sonst eine ungünstige, nur zum Teil reversible Komplexbildung eintreten kann. Auch bei diesem Transfektionsmittel war zur Bildung der Transfektionskomplexe eine

Inkubationszeit, von hier 10 Minuten, erforderlich. Im Anschluss wurden die Transfektionskomplexe auf die Zellen pipettiert, welche durch Verwirbelung (Vorsichtiges Schwenken der Platte) homogenisiert und in der Folge im Brutschrank inkubiert wurde. Bei diesem Transfektionsmittel war allerdings kein Wechsel des Mediums nach 4 bis 6 Stunden erforderlich.

Nach der Transfektion mussten die Zellen 24 Stunden im Brutschrank inkubiert, wobei die Transfektion stattfinden konnte (siehe Kap. 1.7).

2.2.6 Aktivierung mit TNF α

Nach der Transfektion mussten die Zellen mit TNF α aktiviert werden. Dies dient der Simulation von Entzündungsvorgängen in humanen bzw. porcinen Organismen und der daraus resultierenden Expression von ICAM-1. Dabei wurde eine je nach Versuch zwischen 1,25 (= 0,025 nM) und 20 ng (= 0,39 nM) TNF α auf 1ml Medium gegeben und die Zellen für 4 – 14 Stunden aktiviert (siehe auch Kap. 1.2).

2.2.7 RNA-Isolation

Zur Analyse der Transkriptmenge eines Gens benötigt man mRNA (Boten-RNA oder messenger RNA), welche eine direkte RNA Kopie eines zu einem Gen gehörigen Teilabschnitts der DNA ist.

Zur Extraktion von Gesamt-RNA aus den Zellen wurde der *AurumTM Total RNA Fatty and Fibrous Tissue Kit* der Fa. Biorad verwendet und erfolgte modifiziert nach Angaben des Herstellers, da vor allem bei der Untersuchung humaner Kardiomyozyten nur eine geringe Zellzahl vorhanden war. So wurde das Protokoll für geringe Zellzahlen optimiert.

I. Vorbereitung

Nach der TNF α -Aktivierung wurde das Medium abzentrifugiert (2 min bei 200g) und anschließend abgesaugt. In der Folge wurden die Zellen mit 500 μ l PBS gewaschen und erneut abzentrifugiert. Hierbei war nach dem Absaugen

auf eine möglichst geringe Restmenge an Überstand zu achten, um die später eingesetzte Lyselösung nicht unnötig zu verdünnen. Daher wurde nach dem Absaugen mit Hilfe eines Filterpapiers nochmals sorgfältig der Überstand entfernt.

II. Lyse-Prozess

Zu dem Zellpellet wurde nun in das Eppendorf-Reaktions-Gefäß (ERG) 350 µl Lyselösung hinzugegeben und im Anschluss mit Hilfe einer 1er-Kanüle 15 mal auf- und abpipettiert um die Lösung zu homogenisieren und die Zellen mit Hilfe der Scherkräfte auch mechanisch zu zerstören. Zu dem Lysat wurden dann im Anschluss 350 µl 70%ige Ethanol-Lösung zugegeben und die Lösung auf die Trennsäulen (*biorad columns*) pipettiert.

III. Aufreinigung und DNA-Verdau

Die Trennsäule wurde in ein deckellooses Eppendorf-Gefäß gestellt, die Lösung bei 12.000 g für 30 Sekunden abzentrifugiert und das Filtrat verworfen. Darauf hin wurden die Nukleinsäuren, die nun in der Membran der Säule gebunden waren, mit der mitgelieferten *Low-stringency-wash*-Lösung einmal gewaschen.

Nun erfolgte der DNA-Verdau mittels der zum Biorad-Kit gehörenden DNase. Dazu wurde auf die Membran 80 µl DNase-I-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Dies ist eigentlich nicht zwingend erforderlich, da die Primer in der späteren PCR genomische DNA nicht amplifizieren sollten. Dieses Vorgehen erhöht aber die Reinheit der RNA und dadurch die Aussagekraft des Endresultats. Anschließend wurde die Säule noch zweimal gespült, zunächst mit *High-stringency-wash*-Lösung und dann nochmals mit *Low-stringency-wash*-Lösung.

IV. Ablösen der RNA von der Membran

Nach den Reinigungsprozessen wurde die Säule nochmals trocken zentrifugiert, mit 50 µl auf 70 °C erhitzter *Elution*-Lösung für eine Minute inkubiert und dann für zwei Minuten bei 16.000 g zentrifugiert.

V. RNA-Konzentrationsmessung

Nach der RNA-Isolation wurden 5 µl RNA-Lösung mit 45 µl Aqua dest. gemischt. Diese 50 µl wurden dann im Eppendorf-Photometer auf ihren RNA-Gehalt gemessen.

2.2.8 cDNA-Synthese

Zur Untersuchung der Transkription eines Genes, muss die Menge der genspezifischen RNA gemessen werden. Diese Bestimmung ist mittels RT-PCR (siehe Kap. 2.2.9) möglich. Die dabei verwendeten spezifischen DNA-Polymerasen sind allerdings DNA-abhängig, d.h. sie sind nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Daher muss vor der PCR mit RNA-Proben als Matrize ein Enzym namens Reverse Transkriptase (=RNA-abhängige DNA-Polymerase) zum Einsatz kommen, die RNA in cDNA umschreibt. Zusätzlich werden zu diesem Syntheseprozess nur Oligo-dT-Primer verwendet, da diese spezifisch die poly-A-Schwänze der mRNA binden. So kann verhindert werden, dass tRNA oder rRNA ebenfalls in cDNA umgeschrieben wird. Außerdem sollten die RNA-Proben frei von DNA sein, was durch den oben beschriebenen DNase-Verdau sichergestellt wird. Die cDNA kann anschließend als Ausgangsprodukt in der qRT-PCR verwendet werden.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem Reaktionskit der Firma Biorad. Dazu wurden 4µl i-Script Reaction Mix, 1µl i-Script Reverse Transkriptase, Nuklease-freies Wasser und das RNA-Template gemischt. Das Volumen des RNA-Templates richtete sich nach der vorher gemessenen Konzentration und wurde so gewählt, dass 200 ng RNA pro Probe umgeschrieben wurden. Auch die Menge des Nuklease-freien Wassers war davon abhängig; damit wurde auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt.

Dieser Ansatz wurde entsprechend den Firmenangaben in einen PCR-Mastercycler mit folgendem Protokoll gegeben.

1. 5 Minuten bei 25°C
2. 30 Minuten bei 42°C

3. 5 Minuten bei 85°C

Durch diesen Vorgang wurde die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben, womit eine quantitative Auswertung mittels Real-time-PCR möglich war.

2.2.9 Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

Die quantitative RT-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Verfahren der herkömmlichen PCR (Polymerase-Kettenreaktion) basiert und zusätzlich die Möglichkeit bietet, eine Quantifizierung von Transkripten durchzuführen. Dazu werden Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Diese Quantifizierung während der PCR (daher der Name *real time*) unterscheidet sich von anderen quantitativen PCR-Methoden, die erst nach dem Ablauf der PCR ausgewertet werden können. Eine häufig verwendete Möglichkeit zur Quantifizierung der PCR-Produkte ist die Nutzung von DNA-Farbstoffen (in dieser Arbeit: SYBR[®] Green). Dieser Farbstoff lagert sich in die DNA ein (interkaliert), wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe ansteigt. Da diese Zunahme der Fluoreszenz mit der Zunahme der Ziel-DNA korreliert, kann über die Fluoreszenz-Zunahme eine Quantifizierung erfolgen.

Im Gegensatz zur herkömmlichen PCR, ist bei dieser Methode allerdings nicht die Menge eines PCR-Produkts nach einer bestimmten Anzahl von Zyklen entscheidend, sondern der Zeitpunkt im Verlauf der Zyklen, bei dem die Amplifikation eines PCR-Produkts erstmals detektiert wird. Dabei gilt: Je höher die Zahl der Kopien des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts zu Beginn der Reaktion ist, desto früher tritt ein exponentieller Anstieg der Fluoreszenz auf. Dieser Anstieg erfolgt in der zweiten Phase der PCR, da hier das Verhältnis Template zu Primer bzw. Polymerase optimal ist. In der ersten Phase hingegen ist die Templatemenge zu gering und damit auch die Wahrscheinlichkeit niedrig, dass sich Template, Primer und Polymerase treffen. In der dritten Phase ist die Template-Menge zu hoch und die zugegebenen Substrate weitgehend verbraucht.

Zunächst wurde die gewonnene cDNA mit Aqua dest. im Verhältnis 1:10 verdünnt. Schließlich wurde pro well 7,5 µl SYBR Green, 2,5 µl Primer-Mix und 5 µl cDNA eingesetzt. Dabei betrug die Endkonzentration der Primer 300 nM und die Menge der eingesetzten cDNA 5 ng pro 96-Well. Die PCR wurde in speziellen durchsichtigen Mikrotiterplatten durchgeführt, wobei die Detektion und Aufzeichnung der Fluoreszenz für jeden Zyklus durch den Deckel der Platte erfolgte.

Die Auswahl der Primer erfolgte mit Hilfe der Software 'Primer3' (Rozen and Skaletsky, 2000) und Primer Premier 5 (PREMIER Biosoft International). Es wurde besonders darauf geachtet, dass mindestens einer der beiden Primer an einer Position im Gen bindet, die einen Intron-Exon-Übergang beinhaltet, um so eine Anlagerung an genomische DNA zu verhindern und eine cDNA-spezifische Amplifikation zu gewährleisten.

2.2.10 PCR Auswertung

Die quantitative Bestimmung erfolgte, indem in den Fluoreszenzkurven (exponentieller Anstieg im Mittelteil) ein Schwellenwert (*threshold*) für den Fluoreszenzanstieg gesetzt und ermittelt wurde, nach wie vielen Zyklen die Fluoreszenzkurve diesen Wert überschritten hatte.

Dabei sollte die Fluoreszenz bei Festsetzung des Schwellenwerts deutlich über der Hintergrund-Fluoreszenz liegen, aber lediglich so hoch, dass sich der Anstieg bei Erreichen des Wertes noch in der exponentiellen Phase befindet. Die entscheidende Größe für die Quantifizierung dieser Methode ist die Zyklusnummer, bei der der vorgegebene Schwellenwert erreicht wird. Dieser Wert wird als C_T -Wert (*threshold cycle*) bezeichnet und muss keine natürliche Zahl sein.

Um unterschiedliche Proben miteinander vergleichen zu können, wird zusätzlich ein endogenes Referenzgen benötigt. Dazu wurde in diesen Versuchen ein Haushaltsgen (GAPDH) verwendet. Alternativ kann aber auch ein Strukturgen (z.B. Actin) oder RNA, von der eine gleichstarke Expression in allen untersuchten Proben bekannt ist, verwendet werden. Unumgänglich bei dieser

Methode ist, dass dieses Referenzgen in allen Proben mitbestimmt wird. Indem man den C_T -Wert des Housekeeping-Gens von dem des zu untersuchenden Gens subtrahiert, ist es möglich, eine Normierung zu bilden.

Die relative Expression eines Gens wird wie folgt berechnet:

Delta C_T - Wert: $\Delta C_T (\text{Zielgen}) = C_T(\text{Zielgen}) - C_T(\text{Housekeeping-Gen})$

Daraus ergibt sich die relative Expression:

$$\text{Rel. Expression} = 2^{-\Delta C_T(\text{Zielgen})}$$

Die in dieser Formel eingesetzte Zahl 2 steht für die Primereffizienz, was bedeutet dass die Templatemenge pro PCR-Zyklus jeweils verdoppelt wird.

Zur endgültigen Datenauswertung ist zusätzlich eine Negativ-Kontrolle erforderlich, dessen relative Expression mit dem Wert 1 festgesetzt wird. Die relative Expression aller weiteren Proben wird dann als Vielfaches dessen angegeben.

2.2.11 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde angewandt, um den Endothelzellmarker CD 31 auf der Zelloberfläche zu ermitteln. Die Proben wurden mit porcinen Endothelzellen verglichen, auf deren Oberfläche die Expression dieses Markers bekannt ist. Auf Myokardzellen hingegen ist dieses Oberflächenprotein nicht beschrieben, sodass die Präsenz dieses Markers auf der Zelloberfläche eine Unterscheidung zwischen Kardiomyozyten und Endothelzellen ermöglicht.

Bei der Durchflusszytometrie werden einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom mithilfe eines FACS-Gerätes (Fluorescence Activated Cell Sorter) analysiert und gezählt. Dabei wird ein Laserstrahl mit 488 nm Wellenlänge verwendet, der auf den Zellstrom einstrahlt und getrennt in verschiedenen Winkeln zum Strahl detektiert wird. Die Streuung in Einstrahlrichtung des Laserlichtes (*Forward Scatter*, *FSC*) gibt Auskunft über die Größe der detektierten Zellen, während die Seitwärtsstreuung (*Side Scatter*, *SSC*) Aussagen über die Granularität der Zellen ermöglicht.

Zusätzlich lassen sich durch eine intra- (z.B. durch Transfektion fluoreszierender DNA-Plasmide) oder extrazelluläre Färbung (z.B. mit spezifischen, Fluoreszenz-markierter Antikörpern gegen Oberflächenproteine) und anschließendes Anregen dieser Floreszenzen weitere Charakteristika der eingesetzten Zellpopulation ermitteln.

Häufig verwendete Fluoreszenzfarbstoffe sind Fluoresceinisothiocyanat (FITC), das vorwiegend im grünen Spektralbereich emittiert und im Messkanal FL-1 detektiert wird, und Phycoerythrin (PE), dessen Emission im Gelben liegt und im Messkanal FL-2 gemessen wird.

Zunächst wurden am Vortag des Experiments porcine Endothelzellen in einer vorher mit Laminin beschichteten 12-well-Platte mit je 200.000 Zellen pro Well angezüchtet. Diese wuchsen über Nacht an und lagen dann als adhärenente Kultur vor. Am Versuchstag wurden frisch isolierte, porcine Kardiomyozyten ebenfalls mit je 200.000 Zellen pro Well angezüchtet.

Die Zellen wurden zu Beginn des Versuchs zunächst mit 1 ml Medium und im Anschluss mit 1ml 0,5 % PBS gewaschen. Dabei wurde bei den adhärenenten Endothelzellen die Lösung in die Wells pipettiert und wieder abgesaugt. Bei den nicht adhärenenten Kardiomyozyten hingegen mussten die Zellen wieder mit 120 g für 5 min abzentrifugiert werden, um diese wieder von dem Waschmittel zu trennen.

Nach den Waschschritten wurden die Zellen mit 1 ml 5 % FCS + 10 µl mouse-Anti-CD31-Antikörper bei 4° C für 45 Minuten inkubiert. Da dieser Antikörper keinen gekoppelten Fluoreszenz-Marker besaß, mussten im Anschluss nochmals zwei Waschschriffe mit 0,5% igem FCS durchgeführt werden. Die Zellen wurden anschließend mit PE-markierten AntiMouse IgG-Antikörpern (10 µl auf 1 ml 5%ige FCS) für 30 min bei 4°C inkubiert.

Nach dieser Antikörper-Markierung wurden die Kardiomyozyten nochmals abzentrifugiert und in 125 µl FACS-Lösung (= PBS + 2,5% Formaldehyd) fixiert. Die Endothelzellen wurden hingegen erst von der Kulturplatte abgelöst, was mittels eines Trypsin-Kits geschah. Dazu wurden die Zellen mit 800 µl HEPES gewaschen und anschließend mit 450 µl Trypsin bei 37°C für 2 Minuten

inkubiert. Schließlich wurde das Trypsin mit TNS neutralisiert und die Zellen nach Abzentrifugation ebenfalls in FACS-Lösung fixiert. Nun konnten die Zellen mit Hilfe des FACS-Gerätes analysiert werden.

2.2.12 Statistische Methoden

Die Daten in den folgenden Diagrammen werden angegeben als Mittelwerte +/- Standardabweichung ($M \pm SD$), sofern nicht anderweitig gekennzeichnet. Zur Auswertung wurden die Daten der Versuche zum Genesilencing (siehe 3.8) logarithmisch transformiert, eine Varianzanalyse durchgeführt und die Proben paarweise mit Hilfe des Tukey-Kramer-Tests verglichen. Die Schätzwerte der logarithmierten Beobachtungen wurden zur Interpretation der Ergebnisse wieder delogarithmiert.

3 Ergebnisse

3.1 Zellisolation

Die Isolation von Kardiomyozyten aus Gewebeproben mittels Verdauungsenzymen wurde bereits 1955 (Cavanaugh, 1955) publiziert und stellt in vielen Tiermodellen (z.B. Ratte, Kaninchen etc.) ein Standardverfahren dar. Diese Methode wurde in der vorliegenden Arbeit auf humane und porcine Herzmuskelzellen übertragen und im Anschluss optimiert.

3.1.1 Optimierung der Zellisolation

Die Konzentration der Kollagenase stellte sich als entscheidender Parameter zur Gewinnung der Herzmuskelzellen dar. Dabei war zu beobachten, dass bei zu niedriger Konzentration die enzymatische Gewebszersetzung zu gering ausfiel und kaum Zellen im Überstand zu finden waren. Bei zu hoher Kollagenase-Konzentration wurden enorm viele Zellen aus dem Gewebsverband gelöst, allerdings war die Qualität minderwertig und es wurde ein Großteil der Zellen in der Trypanblaufärbung angefärbt und galt dadurch als nicht mehr vital.

Zur Optimierung der Isolationsprozedur wurde die Anzahl quergestreifter Myozyten im Zeitverlauf der Isolation mit der Konzentration der Kollagenase verglichen. Dabei stellte sich eine Lösung von 2,5 mg/ml Kollagenase als optimale Konzentration heraus (siehe Diagramm 3-1), da hier die höchste Anzahl quergestreifter Myozyten zu sehen war. Bei höherer Konzentration stieg zwar die Gesamtzahl der Zellen, allerdings war die Mehrzahl ischämisch und erschien im morphologischen Bild sphärisch und mit vielen zytoplasmatischen Granula durchsetzt.

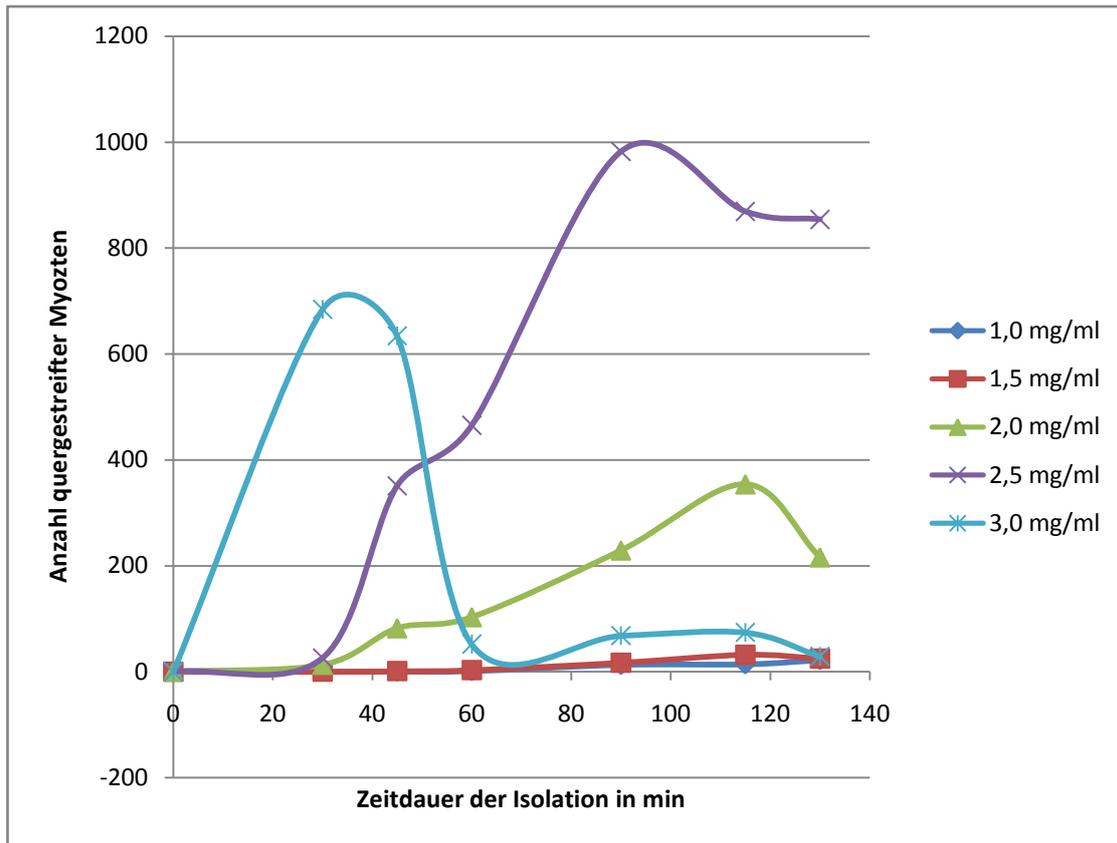


Diagramm 3-1: Effektivität der Zellisolation mit unterschiedlichen Kollagenase-Konzentrationen bei humanen Herzpräparaten. Angegebene Werte sind Mittelwerte aus 3 Zählungen.

Analog zur ermittelten Kollagenase-Konzentration wurde die Trypsin-Konzentration mit ebenfalls 2,5 mg/ml gewählt, wobei Konzentrationsänderungen dieses Enzyms deutlich weniger Auswirkung auf die Zellmenge bzw. Zellqualität hatte.

Ein weiterer wichtiger Parameter zur Aktivität der Verdauungsenzyme ist die Kalzium-Konzentration. Dabei stellte sich heraus, dass die Aktivität der Kollagenase mit der Ca^{2+} -Konzentration steigt. Allerdings ist bei der Isolation eine möglichst geringe Ca^{2+} -Konzentration zu wählen, da Kalzium zu Kontraktionen der Zellen führt. Diese Bewegungen verbrauchen viel Energie, was die Zelle nach wenigen Minuten absterben lässt. So wurden mehrere Kollagenasen von verschiedenen Firmen getestet, mit der Fragestellung, welche davon mit geringster Ca^{2+} -Konzentration auskommt. Dabei wurde die Kollagenase der Firma Gibco gewählt, da deren Enzym eine ausreichende Aktivität ohne exogene Ca^{2+} -Zufuhr aufwies.

3.1.2 Humane Myokardzellen

Die Isolation von humanen Kardiomyozyten stellte sich als schwierig heraus, da das Gewebe zumeist schon an der kardialen Grunderkrankung des Patienten gelitten hatte. Die makroskopische Morphologie der Präparate lieferte aufschlussreiche Hinweise auf das spätere Ergebnis der Zellisolation. So konnte bei sichtbarer Fibrosierung des Herzgewebes eine spätere Häufung von Fibroblasten in der Kultur, bei Verfettung eine geringere Enzymaktivität oder bei Dilatation der Vorhofwand eine geringere Gesamtzellzahl festgestellt werden. Bei der späteren Betrachtung der Myozyten in der Durchlichtmikroskopie ließen sich folgende Befunde feststellen: Die ersten beiden Fraktionen der Zellisolation konnten für weitere Versuche nicht verwendet werden, da diese zu viele Verunreinigungen an Erythrozyten, Zell-Trümmer und Endothelzellen enthielten (siehe Abbildung 3-1 und Abbildung 3-2).

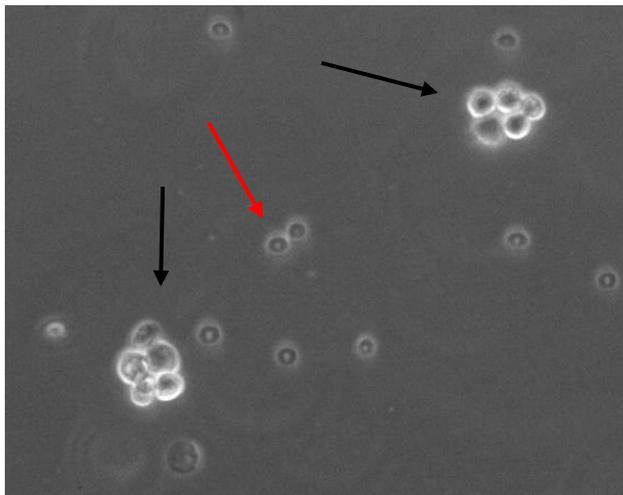


Abbildung 3-1: Isolation von humanen Myozyten, Fraktion 1, 20-fache Vergrößerung
Schwarzer Pfeil: Endothelzellnester
Roter Pfeil: Erythrozyten

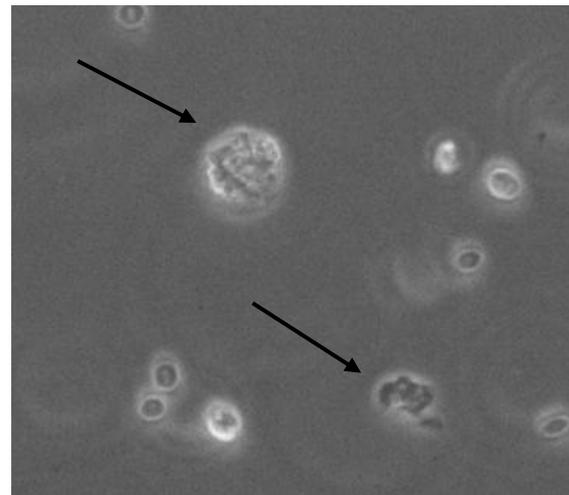


Abbildung 3-2: Isolation von humanen Myozyten, Fraktion 1, 20-fache Vergrößerung
Pfeile: Zelltrümmer

In den Fraktionen 3+4 ließen sich bereits einzelne quergestreifte Kardiomyozyten finden. (siehe Abbildung 3-3 und Abbildung 3-4)

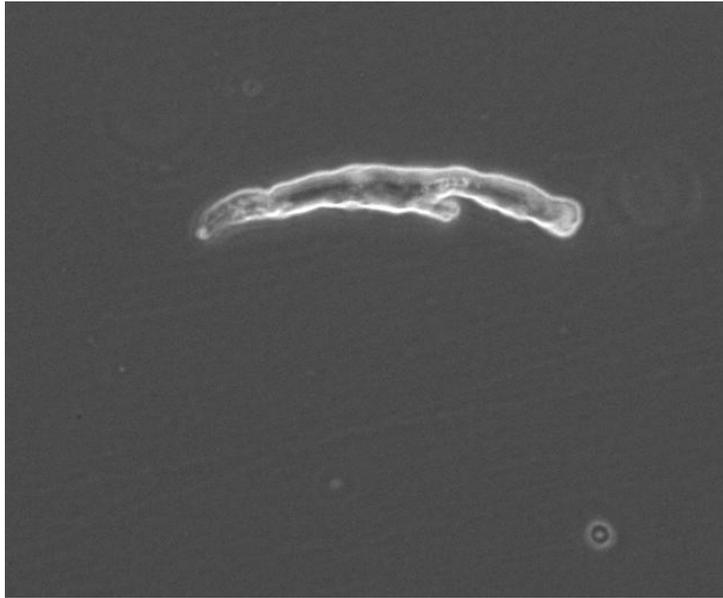


Abbildung 3-3: Isolation von humanen Myozyten, Fraktion 3, 20-fache Vergrößerung



Abbildung 3-4: Isolation von humanen Myozyten, Fraktion 3, 40-fache Vergrößerung, Auflichtmikroskop; Pfeil: Querstreifung

In den folgenden 5 Fraktionen zeigte sich nun eine höhere Anzahl an Kardiomyozyten, wobei auch der Prozentsatz, sphärischer Zellen zunahm (siehe Abbildung 3-5).

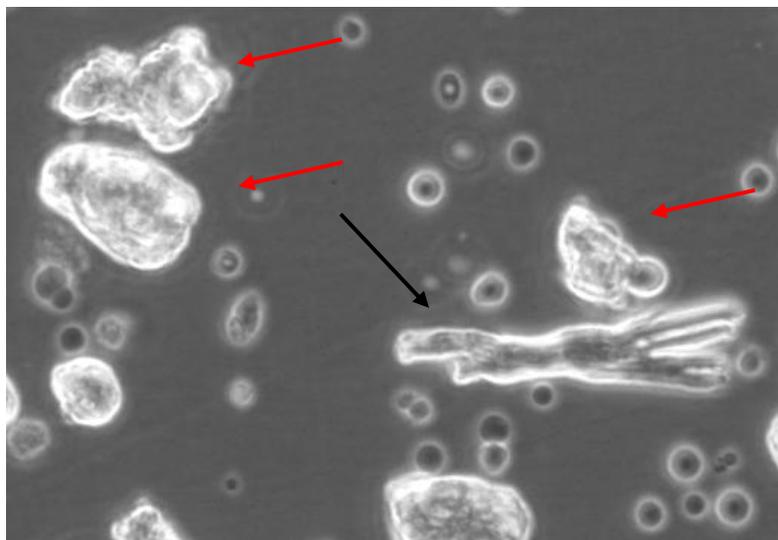


Abbildung 3-5: Isolation von humanen Myozyten, Fraktion 5, 20-fache Vergrößerung
Schwarzer Pfeil: Quergestreifte Myozyten
Roter Pfeil: Sphärische Myozyten

3.1.3 Porcine Myokardzellen

Die porcinen Zellen erwiesen sich als einfacher zu isolieren, da hier im Gegensatz zu den menschlichen Proben, keine kardiale Grunderkrankung vorlag.

Die Enzymkonzentrationen wurden analog zu den menschlichen Präparaten gewählt. Auf Grund der höheren eingesetzten Gewebemasse lieferten die porcinen Proben allerdings eine höhere Zellzahl und zu dem einen höheren Anteil an vitalen Myozyten.

Zusätzlich erwies es sich als positiv, die Schweine vor der Herzentnahme zu heparinisieren, da dadurch eine intrakardiale und vor allem intrakoronare Thrombenbildung und in Folge dessen eine Verunreinigung der Kultur durch Erythrozyten verhindert werden konnte.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Langzeitüberleben

Zu Beginn der Versuche musste eine ausreichende Menge an vitalen Zellen zur Verfügung stehen. Daher wurde zunächst die Anzahl vitaler Zellen mit Hilfe der Trypanblaufärbung im Verlauf der Isolation gemessen.

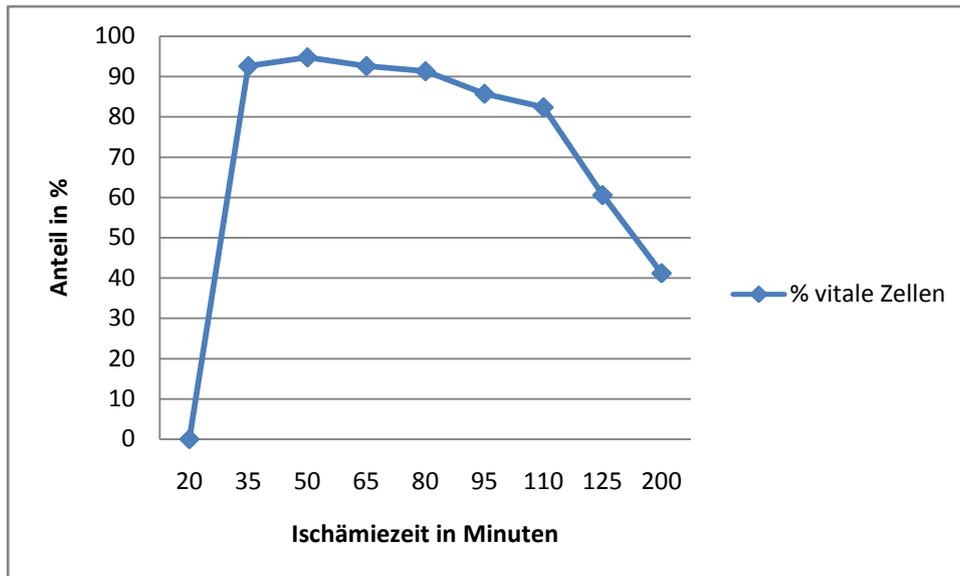


Diagramm 3-2: Anteil vitaler porciner Kardiomyozyten im Verlauf der Isolation. Angegebene Werte sind Mittelwerte aus 3 Zählungen.

Dabei zeigte sich, dass die Ausbeute vitaler Kardiomyozyten nach 100 Minuten optimal war, da hier noch ein ausreichend hohe Vitalität, aber auch eine hohe Gesamtzellausbeute (vgl. Diagramm 3-2) vorhanden war. Diese Zellpopulation wurde für weitere Versuche verwendet, da hier eine gute Zellausbeute und eine ausreichende Reinheit (siehe auch 3.2.3) gegeben waren.

Die Vitalität im zeitlichen Verlauf der Kultur wurde ebenfalls mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Weitere Kriterien waren die mikroskopisch sichtbare Querstreifung bei >50% der Zellen, außerdem sollte die Troponin-Expression in der RT-PCR höher, als die Kontrolle (Myokardbiopsie) liegen.

Diese Kriterien erfüllten die humanen Kardiomyozyten bis ca. 15 Stunden nach der Isolation; bei den porcinen Kardiomyozyten wurden sogar durchschnittlich 60 Stunden erreicht.

3.2.2 Adhärenz

Um die Überlebensdauer der Kardiomyozyten zu verbessern, wurde versucht die Adhärenz der Zellen zu unterstützen. Dazu wurden die Kulturgefäße mit

verschiedenen Beschichtungsproteinen versetzt und im Anschluss die Adhäsion getestet.

Dazu wurden ungefähr 200 humane Kardiomyozyten pro Well auf einer beschichteten 24-well-Platte für 6 h inkubiert, anschließend wurden unter permanenter Bewegung die adhärenen Zellen unter dem Phasen-Kontrast-Mikroskop ausgezählt.

Tabelle 3-1: Ergebnisse der Adhärenz-Versuche

Material	Adhärenz
unbeschichtet	-
Fibronektin	+
Poly-L-Lysine	+
Laminin	++

(Legende: - = < 5 Zellen, += 5-15 Zellen, +++= 15-20 Zellen pro well sind adhärenent)

In diesem Versuch zeigte sich eine positive Tendenz der Zellen auf Laminin zu adhärenen. Trotzdem beträgt die Adhärenz hier weniger als 10 % der eingesetzten Zellen.

Daher lässt sich zusammenfassend sagen, dass durch die Verwendung beschichteter Kulturgefäße keine wesentliche Besserung der Adhärenz von humanen Kardiomyozyten und damit auch des Langzeitüberlebens erreicht werden konnte. Daher wurde dieser Weg wieder verlassen und fortan mit nicht-adhärenen Kulturen weitergearbeitet.

3.2.3 Reinheit

3.2.3.1 Kulturreinheit der humanen Myokardzellen

Durch den enzymatischen Verdau des Myokardgewebes werden neben Kardiomyozyten auch andere Zellen, die im Herzen physiologisch vorhanden sind aus dem Gewebeverband herausgelöst. Dies sind z.B. Fibroblasten, Perizyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen. Eine besondere Rolle spielen in diesen Experimenten die Endothelzellen, deren Vorkommen in der

Kultur unbedingt ausgeschlossen werden muss, da diese ebenso nach TNF α -Stimulation ICAM-1 in hohem Maß exprimieren (Bernot et al., 2005).

Ebenfalls eine große Gefahr sind Myofibroblasten, die in der Zellkultur durch die hohe Serumkonzentration gute Proliferationsbedingungen vorfinden und daher die nicht teilungsaktiven Kardiomyozyten überwuchern können. Allerdings adhären diese Zellen sehr gut an unbeschichteten Oberflächen und können daher mittels der oben beschriebenen DAT gut eliminiert werden.

Trotzdem wurde, um die Reinheit der Kultur zu gewährleisten, in jeder Probe die Expression von Troponin mitbestimmt und mit der Troponinexpression einer Myokardbiopsie verglichen.

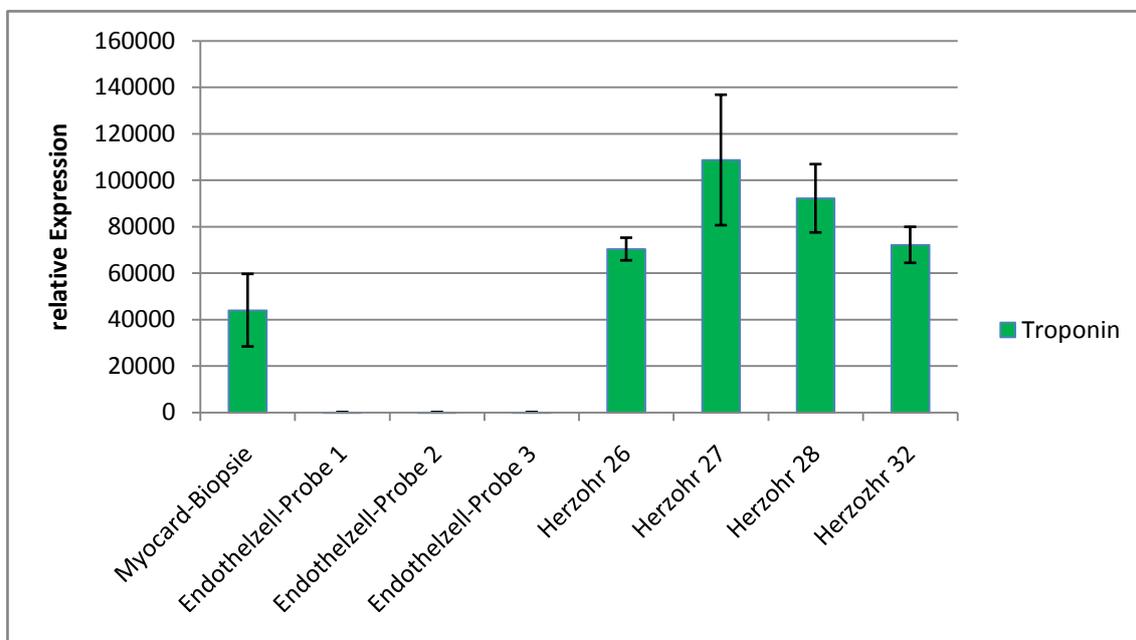


Diagramm 3-3: Relative Expression von Troponin

Nur wenn die Troponinexpression im Vergleich zur Kontrolle signifikant höher war, wurden die Ergebnisse aus der Zellkultur in die Auswertung einbezogen. Als Negativ-Kontrollen dienten Endothelzellen, die kein Troponin exprimieren (siehe Diagramm 3-3).

3.2.3.2 Kulturreinheit der porcinen Myokardzellen

Zusätzlich zur Untersuchung der Genexpression von Troponin, ermöglichte die Isolation porciner Kardiomyozyten eine FACS-Analyse, da diese Isolation eine höhere Zellzahl lieferte.

Daher wurde neben der oben beschriebenen Troponinkontrolle per qRT-PCR zusätzlich per FACS-Analyse getestet ob eine Verunreinigung durch Endothelzellen in der Kultur messbar ist. So wurde hier die Ausprägung des Oberflächenmarkers CD31 auf der Zelloberfläche der Kardiomyozytenkultur mit der einer Endothelzellkultur verglichen.

Für diesen Vergleich wurden zunächst Endothelzellen mit CD 31-Antikörpern markiert und im FACS ausgewertet. Zur Analyse wurde ein Gate gesetzt, in dem 96,16% (n=5000) aller Zellen gezählt wurden. Anschließend wurden zwei weitere Proben mit je 5000 Zellen ausgezählt, wobei im Mittel 95,37% der gezählten Zellen in das Gate fielen. Die Standardabweichung betrug dabei 0,76 (siehe Diagramm 3-4 und Diagramm 3-5).

Zum Vergleich wurden drei Proben Kardiomyozyten untersucht, wobei jeweils 5000 Zellen gezählt wurden. Wichtig war, dass die Einstellungen des Gates und des FACS-Geräts während der Messung der Endothelzellen und der Myokardzellen nicht verändert werden durften. Als Ergebnis fielen im Mittel 3,70% der Myokardzellen in das Gate, bei einer Standardabweichung von 0,25 (siehe Diagramm 3-6 und Diagramm 3-7).

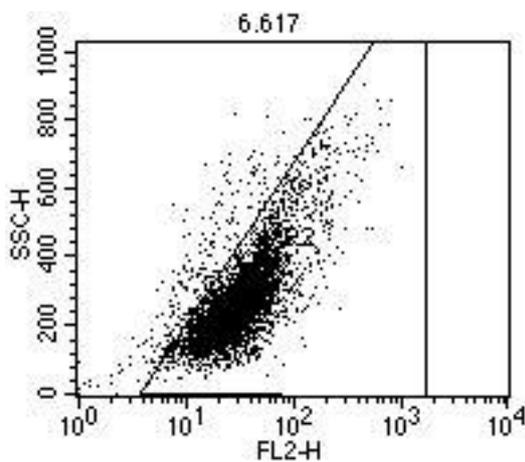


Diagramm 3-4: Positiv-Kontrolle Nr. 1:
Porcine Endothelzellen

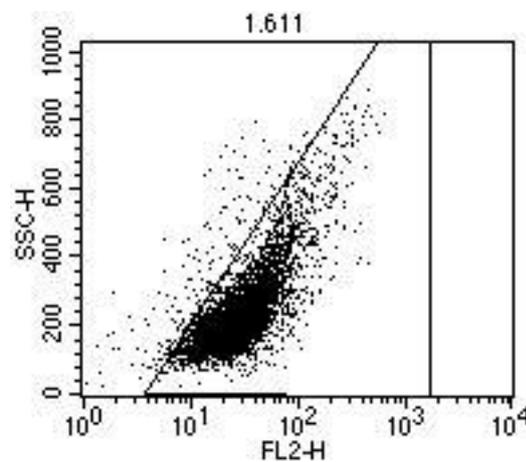


Diagramm 3-5: Positiv-Kontrolle Nr. 2:
Porcine Endothelzellen

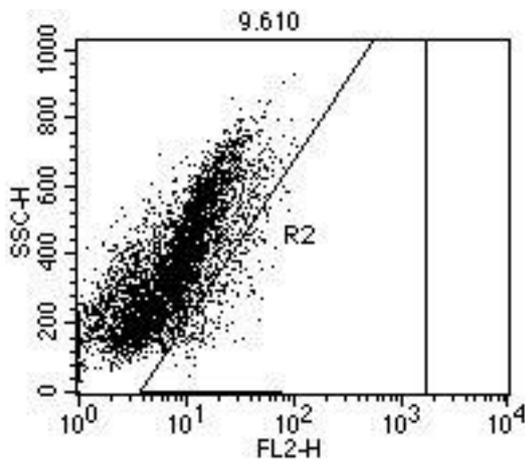


Diagramm 3-6: Probe 1: Porcine Kardiomyozytenkultur

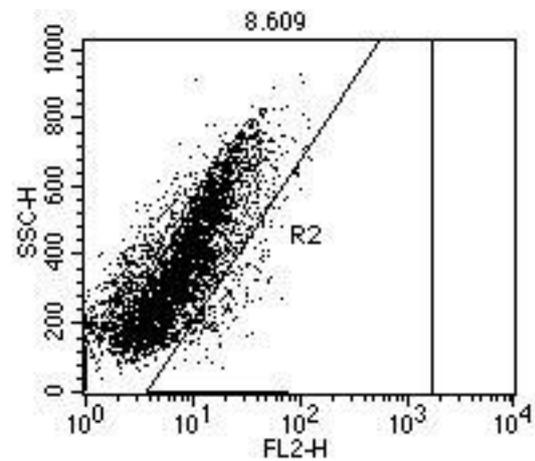


Diagramm 3-7: Probe 2: Porcine Kardiomyozytenkultur

3.3 Sekundärkultur

Nach Entnahme der nicht-adhärennten quergestreiften porcinen Myozyten, bleiben auf Laminin-beschichteten Kulturschalen adhärennte vitale Zellen übrig. Diese sogenannte Sekundärkultur enthält proliferierende Zellen (siehe Abbildung 3-6 und Abbildung 3-7), deren Troponinexpression zwar signifikant über der der Endothelzellen liegt, allerdings immer noch deutlich niedriger, als die Positiv-Kontrolle in Form einer Myokardbiopsie.

Diese Zellkultur besteht aller Wahrscheinlichkeit nach aus fibroiden Zellen, wodurch die relativ schnelle Proliferationsgeschwindigkeit erklärt werden könnte und aus dedifferenzierten Kardiomyozyten, wie aus der Restproduktion an Troponin T hervorgeht.

Diese adhärennten Zellen konnten nicht für die Hauptversuche verwendet werden, da sie die 3.2.3 beschriebenen Reinheitskriterien nicht erfüllten. Lediglich für Vorversuche, wie z.B. in Kapitel 3.4.2 (Immortalisierung) beschrieben, fanden die Kulturen Verwendung.

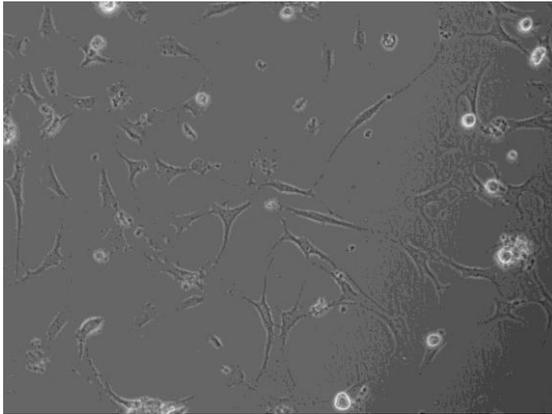


Abbildung 3-6: Sekundärkultur nach 24 Stunden

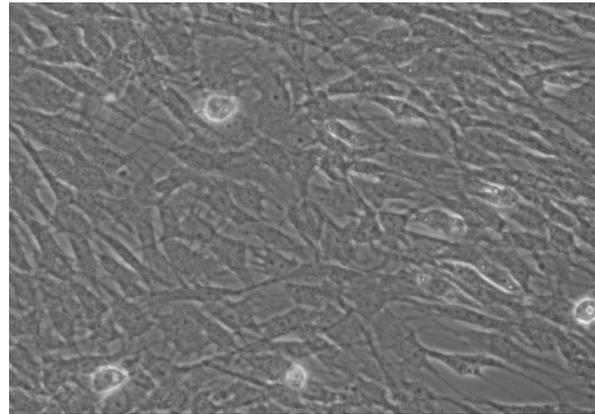


Abbildung 3-7: Sekundärkultur nach 7 Tagen

3.4 Alternative Zellgewinnung

3.4.1 Kommerzieller Erwerb

Zur Gewinnung einer Herzmuskelzellkultur können neben der Isolation von Primärzellen auch Zellen kommerziell erworben werden. So bietet unter anderem die Firma ScienCell™ humane Kardiomyozyten zum Kauf an. Diese Zellen sind teilungsaktiv und können daher über mehrere Passagen kultiviert werden. Das hat vor allem den Vorteil, dass interindividuelle Unterschiede der Proteinexpression sowie Aktivierung von Entzündungsprozessen durch die Zellisolation wegfallen und die Messungen daher weniger Fehlerquellen ausgesetzt sind.

Die Zellen wurden entsprechend den Firmenangaben aufgetaut, auf einer Poly-L-Lysine beschichteten 75 cm² Kulturflasche angezchtet und in CMM unter Zugabe von 5 % FBS und CMGS (=Cardiac Myocytes Groth Supplement) kultiviert. Die Zellen wiesen bei täglichem Mediumswechsel eine enorm hohe Wachstumsgeschwindigkeit auf und konnten bereits nach zwei Tagen gesplittet werden.

Morphologisch beobachtete man keine typische Querstreifung und es fanden sich längliche Zellfortsätze (Retentionsfasern), wie sie typischerweise in Fibroblasten-Kulturen auftreten. Auch das schnelle Wachstum sprach gegen die Typisierung der Zellen als Kardiomyozyten. (Siehe Abbildung 3-8: "Kardiomyozyten" der Fa. ScienCell™)

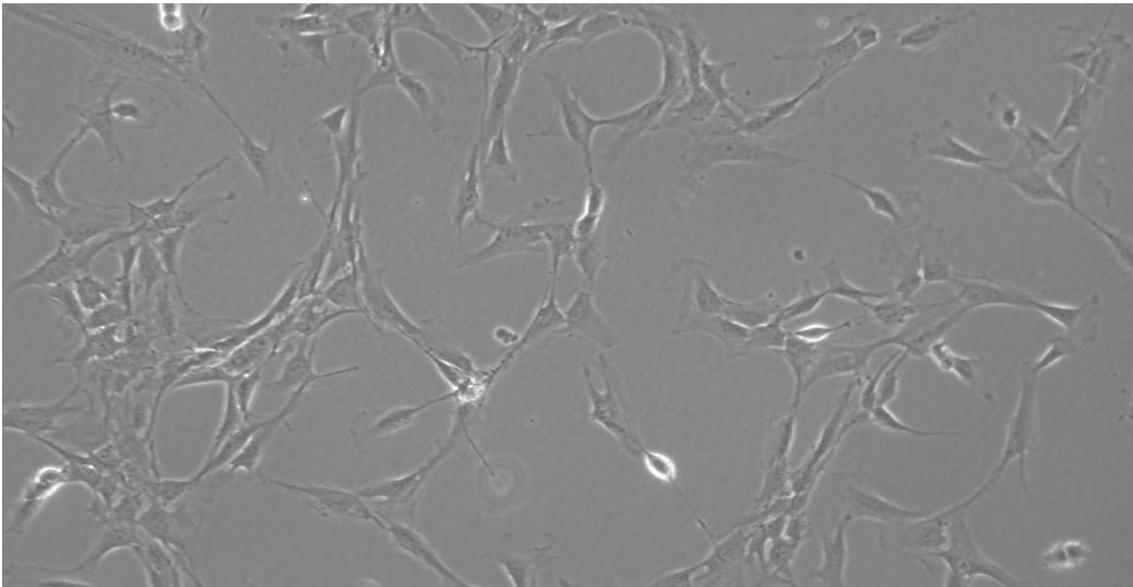


Abbildung 3-8: "Kardiomyozyten" der Fa. ScienCell™

Anhand dieser Beobachtungen wurde ein Troponin-Test durchgeführt, bei dem sich herausstellte, dass die Expression von Troponin nicht signifikant über der Negativ-Kontrolle (humane Endothelzellen) und weit unter der Positiv-Kontrolle (Myokard-Biopsie) lag, sodass von keiner Myokardzellkultur (bzw. von einer stark veränderten Zellkultur) ausgegangen werden konnte (siehe Diagramm 3-8).

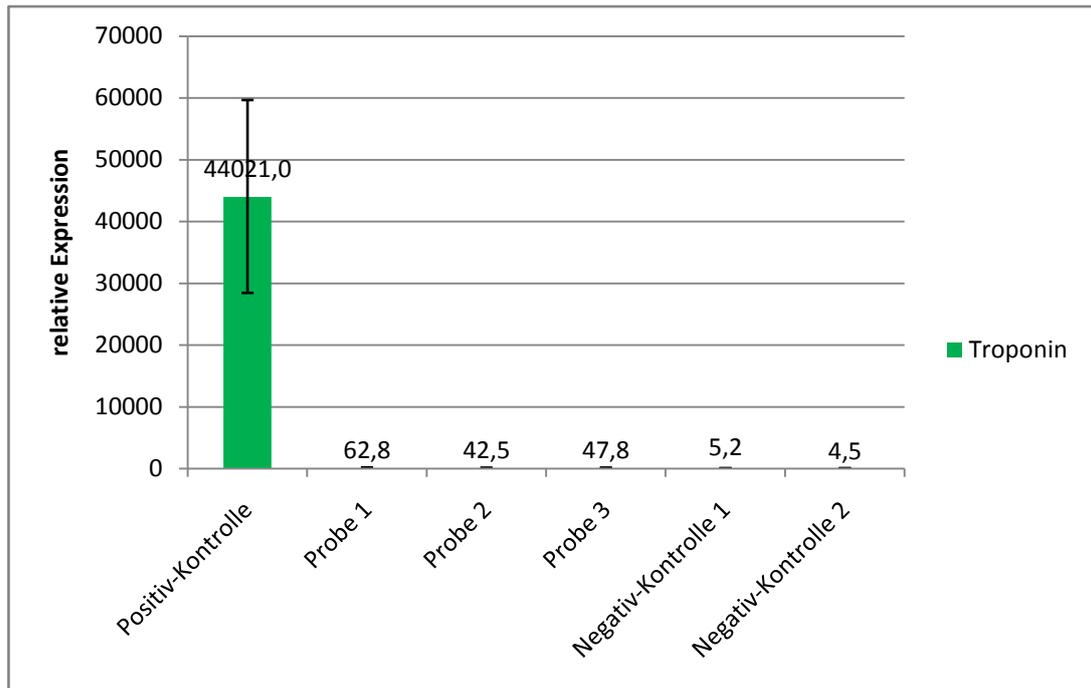


Diagramm 3-8: Auswertung der Troponin-Expression

3.4.2 Immortalisierung von Myokardzellen

Eine weitere Alternative zur Gewinnung einer lange lebenden Herzmuskelzellkultur stellt die Immortalisierung mittels dem SV40 large-t-Antigen dar. Dieses Virusprotein hat durch seine spezifische Interaktion mit nukleären Proteinen, wie z.B. p53, DNA-Polymerase α , Topoisomerase etc. (Brodsky and Pipas, 1998), eine enorme onkogene Potenz. So konnte bereits gezeigt werden, dass das große SV40 T-Antigen in der Lage ist den Zellzyklusarrest von terminal differenzierten Skelettmuskelzellen aufzuheben. Auch die SV-40 induzierte Proliferation von Kardiomyozyten im Mausmodell wurde bereits beschrieben.

Die Transfektion des Plasmids, das das SV40 large-t-Antigen trug, wurde zunächst mit den vorher beschriebenen adhärennten Zellen auf die Effizienz getestet. Zusätzlich trug das Plasmid das Reportergen GFP (*green fluorescence protein*), wodurch es mittels Fluoreszenzmikroskopie möglich war die Expression des Proteins zu beobachten. Das Plasmid wurde

freundlicherweise von Frau Dr. Anja Zimmermann (Labor der Klinik für THG-Chirurgie, Universitätsklinikum Tübingen) zur Verfügung gestellt.

Je 200.000 Zellen wurden in einem Laminin-beschichteten Well einer 12-Well-Platte angezüchtet und mit einem Komplex aus Plasmid und Lipofectamine transfiziert. Dabei wurden bis zu 16 % der Zellen erfolgreich transfiziert und zeigten nach 12 Stunden eine deutliche Fluoreszenz (siehe Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10).



Abbildung 3-9:

Transfizierte Zellen mit deutlicher Anfärbung des Kernbereichs und des Zytoskeletts. Fluoreszenzmikroskop bei 20-facher Vergrößerung

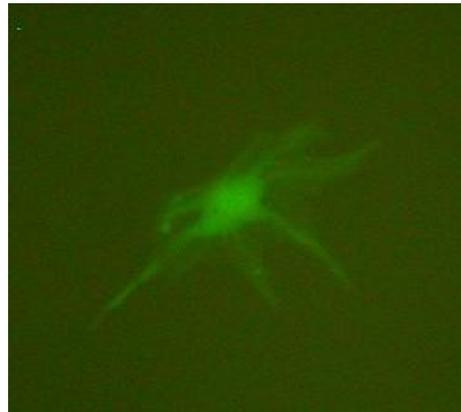


Abbildung 3-10:

Im weiteren Beobachtungsverlauf nahm allerdings die Intensität der Fluoreszenz stark ab, bis nach 5 Tagen keine fluoreszierenden Zellen mehr zu sehen waren. Um zu zeigen, dass die Fluoreszenz mit der Expression von SV40 korreliert, wurde eine PCR auf die SV40-DNA durchgeführt. Diese zeigte erwartungsgemäß keine Bande, wohingegen eine mitgeführte Positiv-Kontrolle (Plasmid-DNA) eine deutliche Bande zeigte.

Auf Grund dessen konnte eine stabile Transfektion von Kardiomyozyten mit den verwendeten Methoden nicht erreicht werden.

3.5 Stimulation mit TNF α

3.5.1 Stimulation humaner Myokardzellen

Um die Reaktion der Myokardzellen auf einen Entzündungsreiz zu untersuchen, wurden die Zellen mit dem Zytokin TNF α aktiviert.

Dabei sollte zunächst die Zeit untersucht werden, welche die Zellen benötigen um den Reiz des inflammationsinduzierenden Zytokins in Form einer höheren ICAM-1-Expression zu zeigen.

Dazu wurde die ICAM-1-Expression von Zellen nach 4, 6, 8, 10, 12 und 14 Stunden Aktivierung mit 5 ng (= 0,1 nM) TNF α pro ml Medium mit der Expression einer unstimulierten Kontrolle verglichen. Zu jedem Zeitintervall wurden Zellen in drei gleichen, unabhängigen Experimenten behandelt und gemessen. Dabei zeigt sich bei der ersten Probe entnommen nach 4 Stunden keine wesentliche Änderung zur unstimulierten Kontrolle. In der nächsten Messung (6h Aktivierung) zeigte sich allerdings ein signifikanter Anstieg. Hier war die relative Expression von ICAM-1 annähernd doppelt so hoch. Im weiteren Verlauf der Messungen zeigte sich kein relevanter Anstieg mehr, sodass die Zeitdauer von 6 Stunden als minimale Stimulationsdauer für eine annähernd maximale Stimulation der ICAM-1-Expression festgehalten werden konnte (siehe Diagramm 3-9).

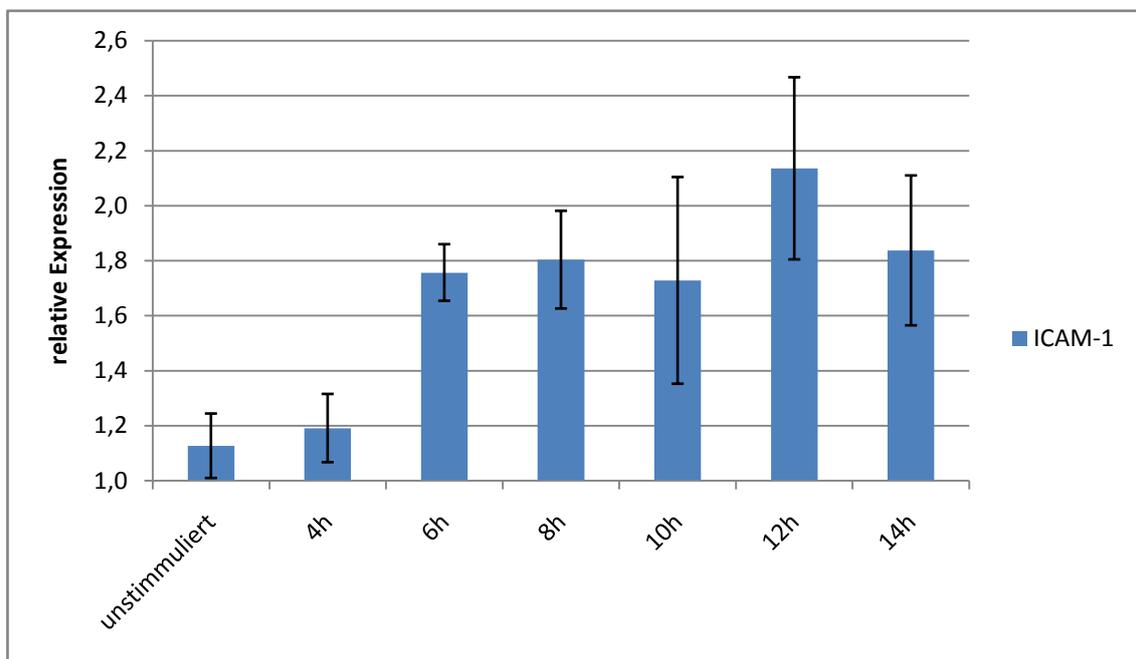


Diagramm 3-9: ICAM-1 Expression im zeitlichen Verlauf bei Aktivierung mit 10 ng TNF α pro ml Medium

Ebenso wurde die Abhängigkeit der Expression von der eingesetzten TNF α -Konzentration untersucht. Daher wurden hier mit einer sehr geringen Konzentration von 1,25 ng (0,025 nM) TNF α pro ml Medium begonnen und diese jeweils verdoppelt, sodass folgende Konzentrationen untersucht wurden: 1,25; 2,5 (0,05 nM); 5 (0,1 nM); 10 (0,2 nM) und 20 (0,4 nM) ng TNF α pro ml Medium. Diese wurden jeweils 6 Stunden lang mit den jeweils angegebenen TNF α -Konzentrationen inkubiert und anschließend mittels qRT-PCR die relative Expression von ICAM-1 ermittelt.

Hier zeigte sich, dass eine Konzentration von 5 ng TNF α pro ml Medium ausreichend ist, um eine annähernd maximale Stimulation von ICAM-1 zu erreichen.

3.5.2 Stimulation porciner Myokardzellen

Im Fall der porcinen Herzmuskelzellen, wurde die gleiche Zeit- und Konzentrationsreihe angewendet, um eine optimale Kombination zur maximalen Stimulation bei minimalem Zeit- und TNF α -Aufwand zu finden.

Die minimale Stimulationsdauer der porcinen Zellen lag mit 10 Stunden deutlich höher als die der humanen Zellen, allerdings überstieg die Stimulationsfähigkeit der porcinen Zellen, die der humanen Zellen deutlich. So konnte die hier gemessene relative Expression von ICAM-1 im Vergleich zur unstimulierten Probe im Einzelfall um mehr als das Zehnfache erhöht sein.

Ebenso wurde eine Konzentrationsreihe durchgeführt, wobei sich ein deutlicher Anstieg zwischen der 1,25 und 2,5 ng/ml TNF α Konzentration erkennen lies (vgl. Diagramm 3-10). So konnten die optimalen Stimulationsbedingungen für die porcinen Herzmuskelzellen mit einer TNF α -Konzentration von 2,5 ng/ml und 10 Stunden Stimulationsdauer festgehalten werden.

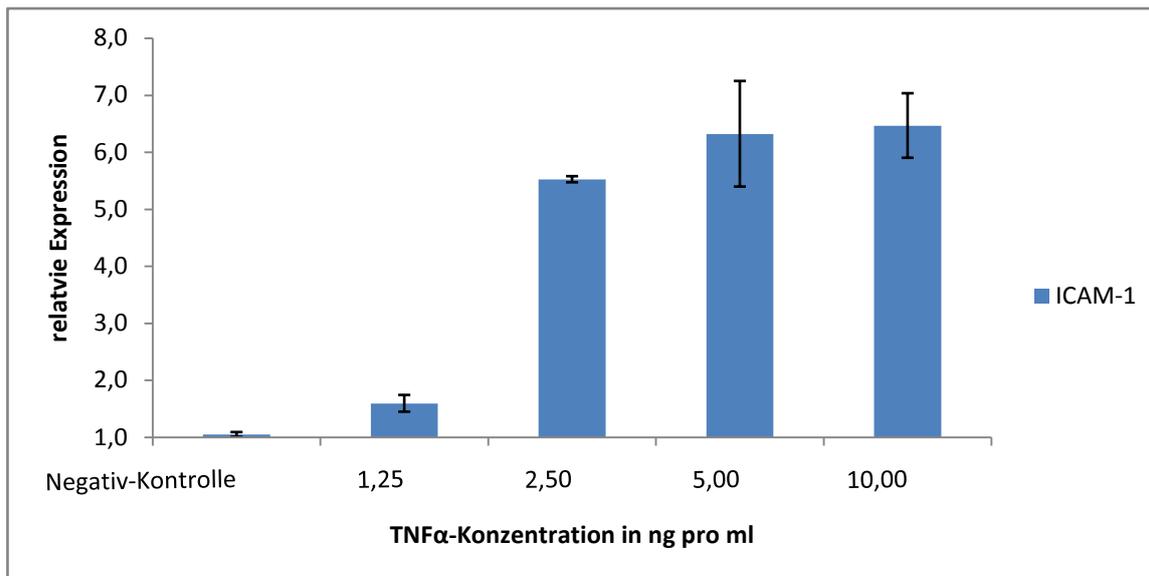


Diagramm 3-10: ICAM-1 Expression porciner Kardiomyozyten in Abhängigkeit zur TNFα-Konzentration

3.6 Kationische Lipofektion

Um dem Ziel, eine Herzmuskelzelle optimal zu transfizieren, näher zu kommen, wurde zunächst untersucht welches Lipidkation sich am besten zur Transfektion eignet. Dazu wurden zwei Mittel auf lipidkationischer Basis ausgewählt, die sich laut Herstellerangaben sehr gut zur Transfektion von siRNA eignen und sich auch im Einsatz mit schwer zu transfizierenden Zellkulturen bewährt haben.

Die Transfektion wurde mit INTERFERin und Lipofectamine 2000 (wie in Kap. 2.2.5. beschrieben) mit einer Kultur frisch isolierter porciner Kardiomyozyten durchgeführt. Als Ergebnis zeigten beide Transfektionsmittel eine deutliche Reduktion der ICAM-1-Expression im Vergleich zur Positiv-Kontrolle, allerdings ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Transfektionsmitteln (Siehe Diagramm 3-11). Trotzdem wurden alle weiteren Versuche mit INTERFERin durchgeführt, da dieses Transfektionsmittel zwei entscheidende Vorteile bietet: Zum einen muss INTERFERin nicht nach 4 bis 6 Stunden abgesaugt werden, was einen weiteren Zentrifugationsschritt notwendig machen und sich daher negativ auf die Zellvitalität auswirken würde. Zum anderen kann INTERFERin auch in Gegenwart von Antibiotika verwendet werden, was die Gefahr einer Kontamination der Zellkultur reduziert.

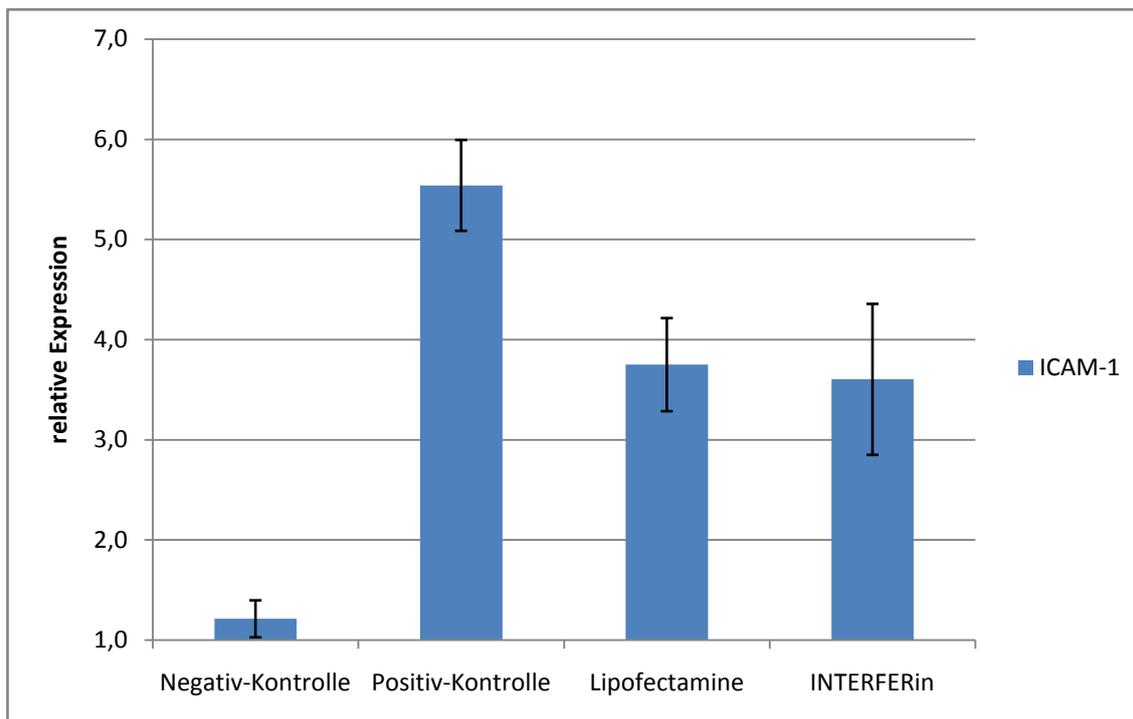


Diagramm 3-11: Vergleich der Transfektionsmittel Lipofectamine und INTERFERin

3.7 Messung der RNA-Menge

Nach der RNA-Isolation wurde die Menge und Reinheit der Gesamt-RNA mit Hilfe des Photometers bestimmt.

Dabei zeigte sich eine geringe Menge von RNA von durchschnittlich 12,3 µg/ml. Allerdings sprachen die Parameter für eine hohe Reinheit. So war die Extinktion bei 320 nm (E_{320}) bei durchschnittlich 0,026 (Sollwert: 0,000). Die beiden Ratios E_{260}/E_{280} und E_{260}/E_{230} lagen bei durchschnittlich 1,81 (Sollwert: nahe an 2) und 2,23 (Sollwert: größer 2).

3.8 Genesilencing durch siRNA

Die Optimierung des Gene-Silencings durch siRNA hängt von vielen Faktoren ab. Entscheidend sind aber hier sowohl die siRNA in ihrer Sequenz und als auch die Menge an siRNA, die in die Zelle gelangt.

Punkt eins kann als Anwender kaum beeinflusst werden, hier ist auf die Kompetenz der anbietenden Firmen zu vertrauen. Was durchaus beeinflusst werden kann, ist die im Zytosol der Zelle letztendlich ankommende siRNA-Menge, mit anderen Worten die Transfektionseffizienz. Technisch exakt das Verhältnis der siRNA zum Transfektionsmittel (siehe auch 1.7.3). Dieses wurde mit Hilfe zweier Testreihen, d.h. verschiedenen siRNA-Konzentrationen und verschiedenen Mengen des Transfektionsmittels ermittelt.

3.8.1 Konzentration der siRNA

Zunächst wurde sowohl die vom Hersteller empfohlene siRNA-Konzentration eingesetzt als auch jeweils die halbe und doppelte Konzentration, sodass die am Ende eingesetzten siRNA-Konzentrationen 13,3; 26,6 und 50 nM betragen. Zum Vergleich wurden mehrere Kontrollen mit untersucht.

I. Negativ-Kontrolle

Die Zellen wurden, da als Kontrolle dienend nicht behandelt, d.h. sie wurden weder mit TNF α aktiviert noch fand eine Transfektion statt. Diese Kontrolle diene lediglich zur Ermittlung der für das Individuum typischen basalen ICAM-1-Expression.

II. Positiv-Kontrolle

Diese Zellen wurden mit der oben ermittelten TNF α Konzentration von 2,5 ng pro ml für 10 Stunden aktiviert, aber nicht transfiziert. Dieser Wert diene zur Ermittlung der maximalen ICAM-1-Expression und wurde zur Berechnung des Knockdowns verwendet.

III. Proben behandelt

Diese Zellen wurden mit 8 μ l INTERFERin (Herstellerangabe) und den oben angegebenen siRNA Konzentrationen transfiziert und dann ebenfalls mit 2,5 ng pro ml TNF α für 10 Stunden aktiviert (Angaben gelten pro 12-Well)

IV. Scrambled (engl. durcheinander)

Diese Zellen wurden ebenfalls mit 8µl INTERFERin und 26,6 nM siRNA transfiziert und dann mit 2,5 ng pro ml TNFα für 10 Stunden aktiviert. Die siRNA *scrambled* enthält die gleichen Basenpaare, wie die siRNA gegen ICAM-1, allerdings waren hier die Basenpaare in einer anderen Reihenfolge angeordnet und sollten damit keinen Einfluss auf die ICAM-1 Expression der Kardiomyozyten haben. Durch diese Kontrolle konnte belegt werden, dass die erzielten und beobachteten Effekte tatsächlich durch die spezifische siRNA-Wirkung begründet waren und nicht auf unspezifischen oder toxischen Transfektionseffekten basierten.

Im Ergebnis lies sich in der 13,3 nM-Probe ein Knockdown von 13,87% (gegen Scrambled: 12,98%) gegenüber der Positiv-Kontrolle, in der 26,6 nM-Probe ein Knockdown von 19,64% (gegen Scrambled: 18,81%) und in der 50 nM-Probe ein Knockdown von 40,01% % (gegen Scrambled 39,39%) feststellen (siehe Diagramm 3-12). Daher lies sich tendenziell eine lineare Abhängigkeit von Knockdown und eingesetzter Konzentration feststellen. Der Knockdown war aber auf Grund zu großer Standardabweichungen statistisch nicht signifikant.

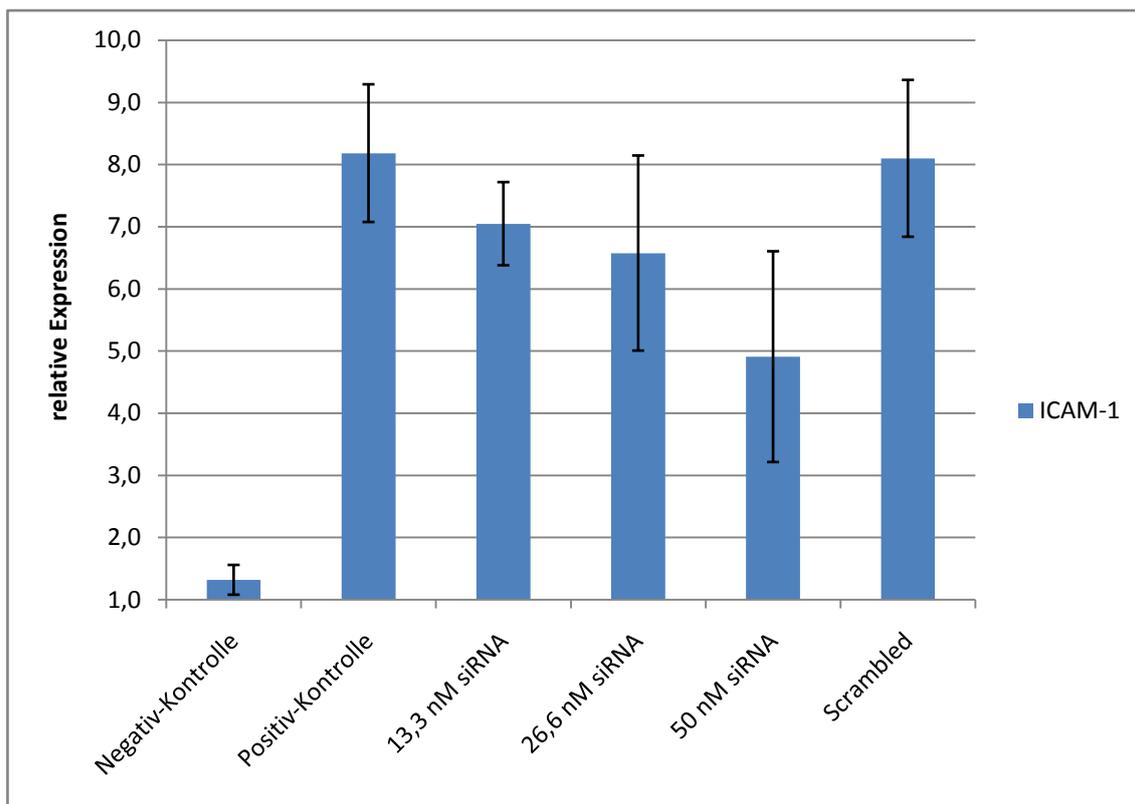


Diagramm 3-12: Vergleich der Expression von ICAM-1 nach Transfektion mit verschiedenen siRNA-Konzentrationen

3.8.2 Konzentration des Transfektionsmittels

Analog zum oben beschriebenen Versuch wurde auch die Konzentration des Transfektionsmittels untersucht. Hier wurde die vom Hersteller empfohlene Konzentration für nicht-adhärenente Zellen von 16 μ l pro Well einer 12-Well-Platte, jeweils halbiert und verdoppelt. Ebenso wurden wieder die vorher beschriebenen Kontrollen mit untersucht.

Die Ergebnisse dieses Versuches ergaben in der 8 μ l Probe einen Knockdown von 23,84% gegenüber der Positiv-Kontrolle (gegen Scrambled: 22,79%), in der 16 μ l Probe ein Knockdown von 27,78% (gegen Scrambled: 26,78%) und in der 32 μ l Probe ein Knockdown von 41,02% (gegen Scrambled: 40,21%) (siehe Diagramm 3-13). Auch hier deutete das Resultat auf eine ebenfalls statistisch nicht signifikante Tendenz zur linearen Abhängigkeit hin.

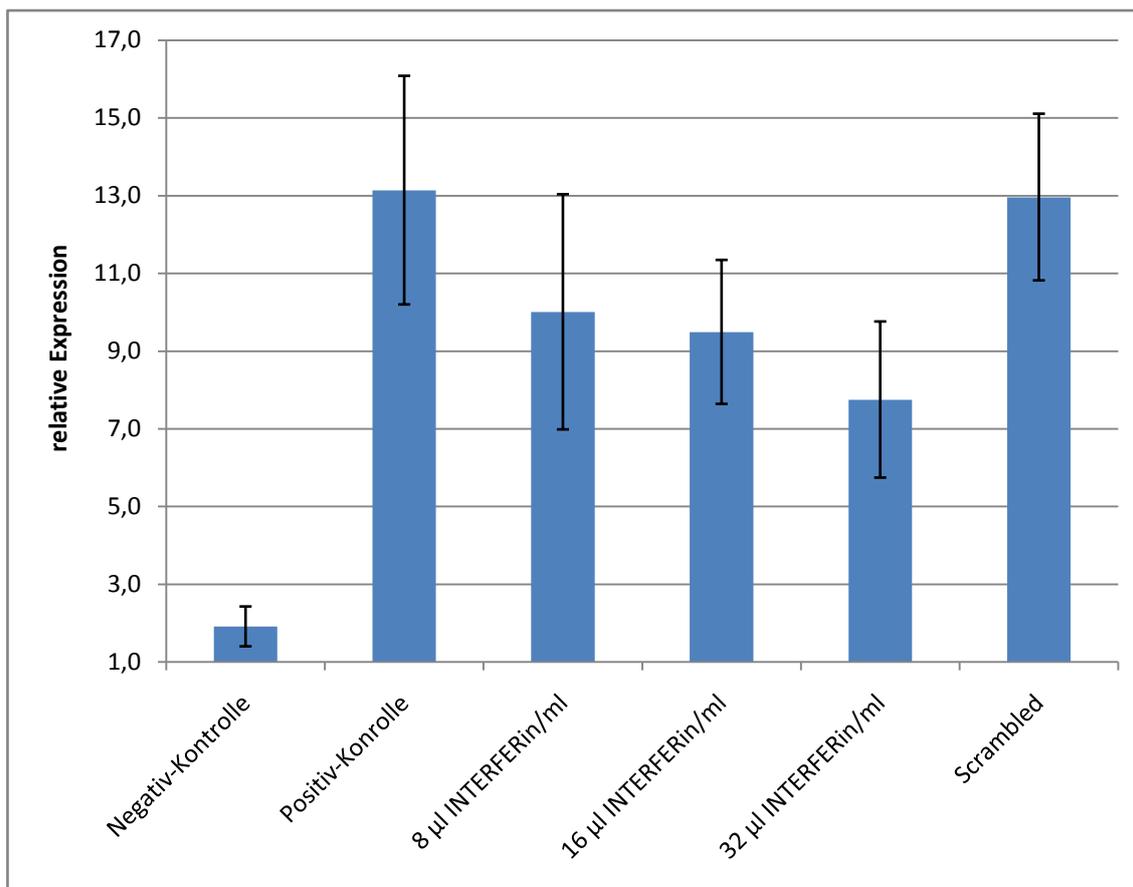


Diagramm 3-13: Vergleich verschiedener Transfektionsmittelkonzentration

3.8.3 Inkubationszeit der siRNA

Die Inkubationszeit der siRNA-Transfektionsmittelkomplexe wird häufig als wichtiger Parameter zur Transfektionseffizienz aufgeführt, spielt aber bei der Anwendung von INTERFERin keine Rolle mehr. Durch den immer weiter voranschreitenden Entwicklungsfortschritt ist es gelungen, die Toxizität des Reaktionskomplexes soweit zu senken, dass dieses Mittel nicht mehr abgesaugt werden muss und somit 24 Stunden auf der Zellkultur bleiben kann.

3.9 Statistische Auswertung der Transfektion

Durch den Vergleich mehrerer Versuche wurde die Aussagekraft der Ergebnisse erhöht. Dazu wurden 3 unabhängige Versuche mit 3 identischen

Proben, die wiederum 3-mal gemessen wurden, zu jeweils gleichen Bedingungen durchgeführt. Hierbei wurde eine siRNA-Konzentration von 26,6 nM und eine INTERFERin-Konzentration von 16 µl pro ml verwendet (siehe Diagramm 3-14).

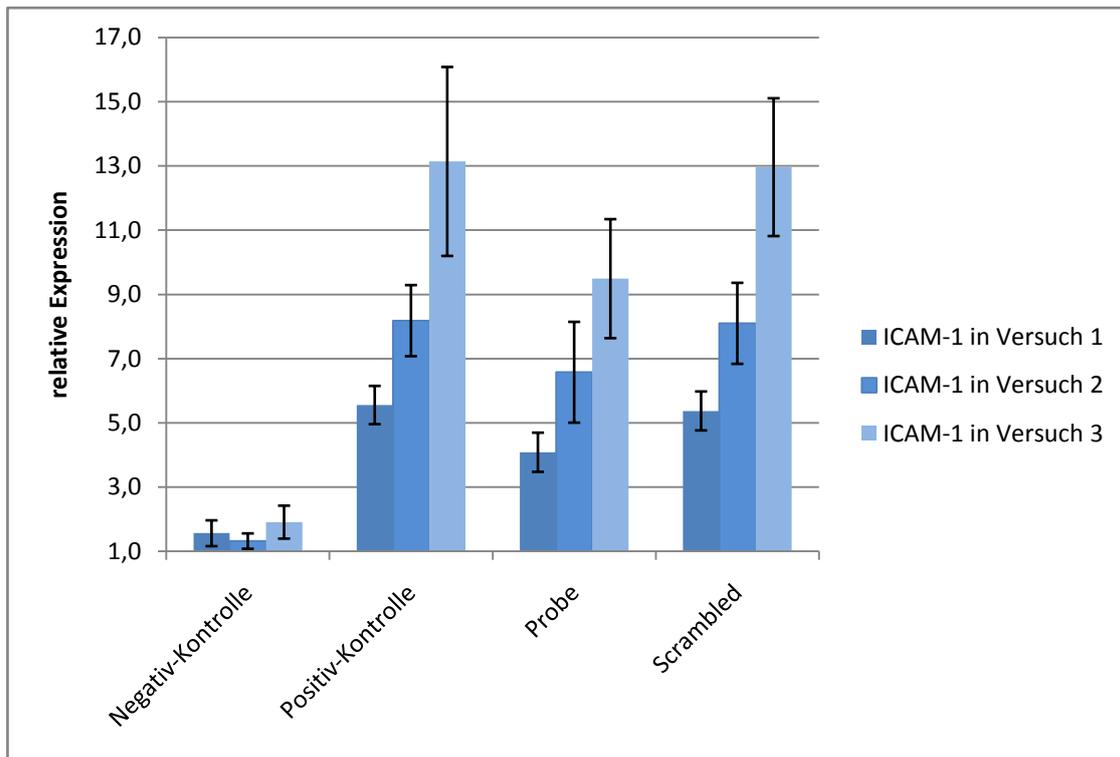


Diagramm 3-14: Zusammenfassung der Transfektionsversuche

Als Ergebnis lassen sich im Durchschnitt mit 33,3% Knockdown gegenüber der Positiv-Kontrolle und mit 31,2 % gegenüber der Scrambled-Kontrolle festhalten. Der Knockdown ist somit mit $p < 0,05$ statistisch signifikant.

4 Diskussion

Eine Herzinsuffizienzsymptomatik ist definiert als klinischer Zustand, bei dem der Herzmuskel trotz ausreichenden venösen Blutangebots nicht in der Lage ist, den Organismus seinen Bedürfnissen entsprechend mit arterialisiertem Blut zu versorgen. Um bei ungenügender Förderleistung des Herzens die Perfusion der inneren Organe zu gewährleisten, treten endogene Kompensationsmechanismen in Kraft. Dazu gehört unter anderem der Frank-Starling Mechanismus, die Katecholaminausschüttung, sowie die Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Riede et al., 2004).

Neben den genannten Mechanismen ist seit den 1990er Jahren eine weitere Komponente der Herzinsuffizienz beschrieben worden: Die Beteiligung der proinflammatorischen Zytokine am Fortschreiten der Herzinsuffizienz (Shan et al., 1997). Vor allem nach Operationen bei denen ein Einsatz der Herzlungenmaschine (HLM) notwendig wird, spielt parallel zum Operationstrauma die Aktivierung der Entzündungskaskade eine wichtige Rolle, die zu einem akuten systemischen Entzündungsreaktions-Syndrom (SIRS) mit weitreichenden Folgen wie z.B. einem Multiorgan-Dysfunktion-Syndrom (MODS) oder gar einem Multiorganversagen mit tödlichem Ausgang führen kann. Im Allgemeinen wird die durchschnittliche Letalität nach Operationen mit HLM-Einsatz mit ca. 3 % angegeben, wobei die beschriebene Entzündungsreaktion eine gewichtige Komponente darstellt.

Die Entzündungskaskade beinhaltet im wesentlichen eine Komplementaktivierung (C3a, C5a), die Degranulierung von neutrophilen Granulozyten mit Freisetzung von Leukotrienen, Myeloperoxidase und reaktiven Sauerstoffverbindungen, sowie der Induktion von Zytokinen, wie TNF α und Interleukinen. Dadurch kommt es auch zu einer myokardialen Entzündungsreaktion die sich vor allem durch Sequestration von aktivierten neutrophilen Granulozyten, einem Anstieg von chemotaktischen Faktoren und einer Hochregulation von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 und E-Selektin manifestiert (Prondzinsky et al., 1997).

Auf Grund dieser Erkenntnisse soll als Vision der vorliegenden experimentellen Dissertation ein Therapiekonzept entwickelt werden, das auf einer Unterdrückung der Expression von Adhäsionsmolekülen basiert. Dadurch könnte verhindert werden, dass Leukozyten ins Gewebe einwandern und dort das Myokard progredient schädigen. Die Suppression der Adhäsionsmoleküle soll mit Hilfe der siRNA-Technologie gelingen, die bereits intraoperativ während des Herzstillstandes appliziert werden könnte.

4.1 Die siRNA-Technologie

Während der Erstellung dieser Arbeit wurde im Jahr 2006 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an Andrew Fire und Craig Mello für ihre Entdeckung der RNA Interferenz verliehen. Dieser in pflanzlichen und tierischen Zellen natürlich vorkommende Mechanismus ermöglicht es, die Expression eines Gens spezifisch zu inhibieren. Ebenso kann dieser Prozess durch die Einschleusung von synthetisch hergestellter siRNA in die Zelle induziert werden, um einen Knockdown des Genprodukts zu erreichen.

In den letzten Jahren hat die siRNA-Technologie, die auf dem natürlich in Zellen vorkommenden Mechanismus der RNA Interferenz basiert, eine Vielzahl von neuen Möglichkeiten in der zellbiologischen Forschung eröffnet. Neben neuen Erkenntnissen beim Verständnis von Genfunktionen und anderen Anwendungen, verbirgt sich in der siRNA-Technologie auch ein großes therapeutisches und prophylaktisches Potential.

Alternativ zu der in der vorliegenden Arbeit verwendeten siRNA-Technologie, stehen weitere Gene-Silencing-Verfahren zur Verfügung, mit denen selektiv Gene ausgeknockt werden können. Ein älteres Verfahren ist die Antisense-Technologie, welche ebenfalls unter anderem für diese Anwendungen entwickelt worden ist (siehe auch Abbildung 4-1 und 1.7.4).

Der Vergleich dieser beiden Technologien ist, wie generell bei Gene-Silencing-Versuchen, schwierig, da die Effektivität sehr stark vom Zelltyp, dem verwendeten Transfektionsmechanismus und dem untersuchten Zielabschnitt auf der mRNA abhängig ist. So konnte auch in dieser Arbeit gezeigt werden,

dass die Transfektionseffizienz stark von der Konzentration der siRNA und dem Transfektionsmittel abhängt. Um eine umfassende Auswertung durchführen zu können müssten alle Parameter in Betracht gezogen werden, was aber bisher in keiner der vorliegenden Studien berücksichtigt wurde.

Trotzdem haben einige Studien ergeben, dass die siRNA-Technologie potenter und länger andauernd in der Wirkung ist im Vergleich zur Antisense-Technologie (Xu et al., 2003).

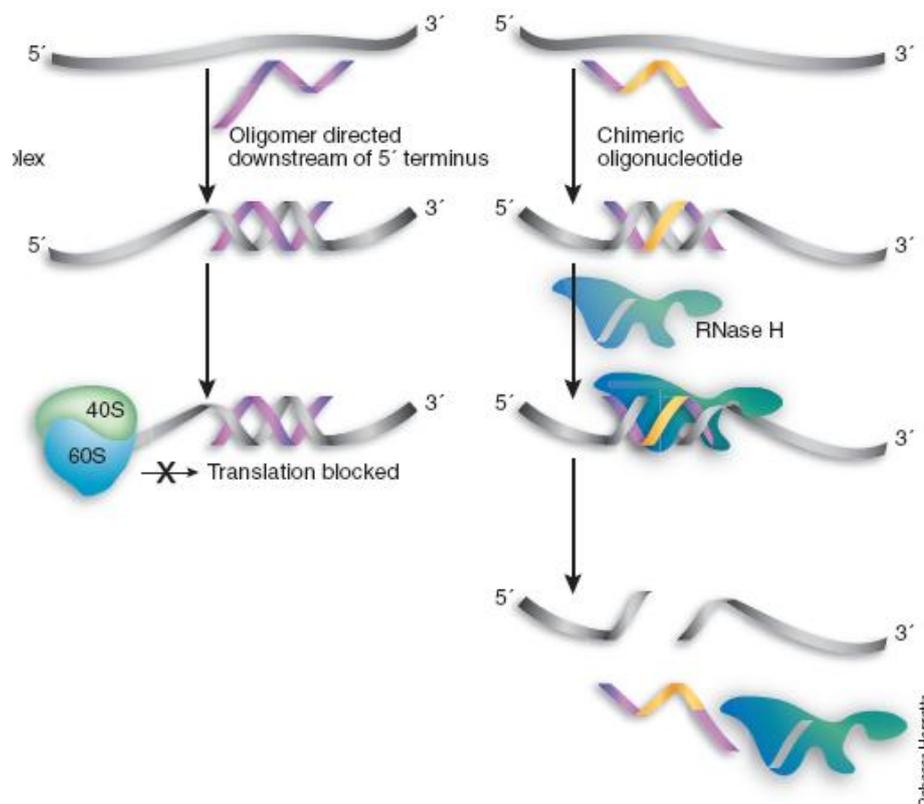


Abbildung 4-1: Funktionsweise der Antisense-Technologie; links: sterische Interaktion rechts: Aktivierung der RNase H (Corey, 2007)

Ein Vorteil der siRNA-Technologie ist die Funktion des RISC-Komplexes, in den die RNA-Moleküle zügig inkorporiert werden. So gelangen sie schnell zu ihrer Zielsequenz, wodurch niedrigere Konzentrationen als im Bereich der Antisense-Anwendungen notwendig werden, um denselben Silencing-Effekt zu erzielen. Dies wird im sogenannten IC_{50} -Wert (halbmaximaler Inhibitionslevel) ausgedrückt, der bei der siRNA 100- bis 1000-fach niedriger liegt.

Ein weiterer wichtiger Punkt sind Nebeneffekte, sogenannte *off target effects*, die potentiell bei beiden Methoden auftreten können. Vermehrt treten diese Nebeneffekte allerdings bei den Antisense ODNs auf, da diese in höheren Konzentrationen eingesetzt werden müssen und daher eher dazu neigen, an zelleigene Proteine zu binden. SiRNA-Moleküle hingegen sind durch die schnelle Aufnahme in den RISC-Komplex gebunden und weisen weniger Nebeneffekte auf. Dies wird durch die, in der Arbeit mit untersuchte *Scrambled*-Probe deutlich: Hier war die Expression kaum niedriger als in der Positiv-Kontrolle, was für sehr geringe Nebeneffekte spricht.

Ein weiteres Problem bei den Antisense-Anwendungen, aber in geringerem Maße auch im siRNA-Bereich, ist die Induktion einer Immunantwort (über Interferon) durch die Bindung an Toll-Like-Rezeptoren (TLRs). Diese Effekte sind bei der siRNA auf Grund wesentlich geringerer eingesetzter Konzentrationen aber auch wegen der raschen Bindung an den RISC bedeutend weniger ausgeprägt, als bei der Antisense-Technologie (Jackson et al., 2003). Allerdings kann diese Interferon-induzierte Immunantwort durch Antisense-ODNs auch therapeutisch zur Behandlung von Virus-Infektionen genutzt werden (Dorsett and Tuschl, 2004).

Trotz der Unterschiede zwischen ODNs und siRNA gibt es auch viele Gemeinsamkeiten: So gehören beide Moleküle derselben Stoffklasse an (kurze Nukleinsäuren), wirken durch ihren zur mRNA komplementären Aufbau und sind beide in der Lage, die Ziel-RNA zu zerstören und damit die Translation zu unterdrücken (Paroo and Corey, 2004).

Die Expression des in dieser Arbeit untersuchten Adhäsionsmoleküls ICAM-1 wurde bereits erfolgreich mit Hilfe der Antisense-Technologie supprimiert. Korrespondierend zu dieser Arbeit wurde ein liposomales Transfektionssystem verwendet und anschließend mit TNF α (5 ng/ml) aktiviert. Allerdings handelt es sich hier um HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*), nicht um Kardiomyozyten. Dabei konnte ein Knockdown von ca. 50 % erzielt werden, ebenfalls bei einer eingesetzten Konzentration von 50 nM ODN (Baker et al., 1997). Trotzdem können die Ergebnisse nicht ohne Einschränkung verglichen

werden. So zeigen sich in der genannten Arbeit von Baker unter ähnlichen Transfektionsbedingungen korrespondierende Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit, obwohl es sich bei den dort verwendeten HUVECS um eine adhärente Zellkultur handelte, die deutlich besser zu transfizieren ist.

4.2 Transfektion

Die Transfektion der siRNA, also das Einschleusen der si-RNA-Stränge in das Zytoplasma, spielt bei der Anwendung der siRNA-Technologie eine große Rolle, da die negativ geladene, nackte siRNA die Lipidmembran von Zellen kaum durchdringen kann. Aus diesem Grunde wird wohl die der Transfektionseffizienz, aber auch der Transfektionssicherheit ein entscheidendes Thema bei der weiteren Entwicklung der siRNA-Technologie sein.

Aktuell werden verschiedene Transfektionsmethoden eingesetzt, die sich grob in virale und non-virale trennen lassen. Ein wichtiger Punkt bei der Auswahl eines Systems muss auch die *in-vivo*-Applizierbarkeit sein, um die siRNA im späteren Stadium auch therapeutisch nutzen zu können. So soll in Zukunft eine systemische Gabe von siRNA-basierten Therapeutika möglich sein. Dies ist allerdings durch Elektroporation, Calcium-Phosphat-Präzipitation oder auch Mikroinjektion (siehe Kap. 1.7.3) *in vivo* nicht realisierbar. Somit scheiden diese Systeme für die hier verwendeten Versuche aus, da langfristig eine therapeutische Nutzung angestrebt wird.

Im Bereich der non-viralen Vektorsysteme, zu der auch die in dieser Arbeit verwendete Lipofektion gehört, gibt es eine Vielzahl von Möglichkeiten.

Dazu gehört die Verwendung von siRNA ohne Transfektionsmittel, wobei derzeit keine rationale Erklärung besteht, wie die siRNA in die Zelle gelangt. Ebenso unklar ist, wie die siRNA den ubiquitär (auch im Serum) vorkommenden RNAsen standhalten kann. Trotzdem gelang es bei Pankreastumoren von Mäusen einen Benefit durch Injektion von nackter siRNA zu erreichen (Ocker et al., 2005). Da hier kein plausibles theoretisches Modell dargelegt werden kann

und enorme Mengen an siRNA benötigt werden, wurde die Verwendung von siRNA ohne Transfektionsmedium in der vorliegenden Arbeit nicht verfolgt.

Ein sehr häufig verwendetes Vektorsystem ist im Bereich der siRNA-Technologie die Transfektion mittels Liposomen (Walker et al., 2005). Diese Technik erwies sich *in vitro* als effizient und gut durchführbar. So gelang es in der vorliegenden Arbeit primäre Kardiomyozyten, die im Allgemeinen als schwierig zu transfizieren gelten, eine ausreichende Menge an siRNA in die Zelle zu transportieren um einen signifikanten Knockdown des ICAM-1 Gens zu erzielen. Auch der Vergleich verschiedener liposomaler Transfektionsmittel zeigte, dass es sich hier um einen Gruppeneffekt handelte und verschiedene moderne Lipofektionsmittel in der Lage waren, eine gute Effizienz bei geringer Zellschädigung zu erreichen (siehe auch 3.6).

Einen weiteren Vorteil der Lipofektion versprechen erste Tests bei einer systemischen Applikation von siRNA. Hier konnte der rasche Abbau von unbehandelter siRNA im Serum innerhalb einer Stunde sowie die renale Elimination durchbrochen werden und erste Erfolge in der systemischen Transfektion gesehen werden. Gerade bei der Bekämpfung von inflammatorischen Reaktionen, zu der im weiteren Sinne auch die Thematik dieser Arbeit zählt, konnte mit Hilfe von Lipofectamine-vermittelter Transfektion gute Ergebnisse erzielt werden. So gelang es Flynn et al. in einer Lipopolysaccharid (=LPS) induzierten Entzündungsreaktion, die Expression von IL12-p40 (Interleukin 12) durch intraperitoneale Applikation von an Liposomen gekoppelter siRNA zu senken. Gezeigt werden konnte hier die signifikante Abnahme der Immunreaktion durch eine verminderte IL-12-Produktion in Makrophagen (Flynn et al., 2004).

Virale Vektoren stellen ebenfalls ein geeignetes und interessantes Vektorsystem zur Transfektion von siRNA dar. Vor allem Retroviren, Lentiviren und Adenoviren werden hier verwendet. Sie unterscheiden sich in Effizienz, Sicherheit und Anwendungsgebiet. Alle viralen Systeme haben jedoch ein erhöhtes Risiko bezüglich der Mutagenität und erfordern daher die Verwendung eines S2-Labors.

Die Retroviren stellen das älteste virale Transfektionssystem dar und konnten im Bereich der Tumorthherapie für eine stabile Suppression von Onkogenen sorgen (Brummelkamp et al., 2002). Allerdings haben diese Viren die Eigenschaft, eigene DNA in das Wirtsgenom einzubauen, was zu einem mutagenen Potential und damit zur Gefährdung des Patienten führt. Weitere Probleme sind hier eine mangelhafte Effizienz in *in vivo* Versuchen sowie die Unfähigkeit ruhende Zellen effektiv zu transfizieren.

Die Lentiviren stellen eine Subklasse der Retroviren dar, an denen einige der erwähnten Methodenlimitationen nicht beobachtet werden. So können diese Viren auch ruhende Zellen transfizieren und haben dabei ein sehr viel geringeres mutagenes Potential. Ein weiterer Vorteil dieser Virengruppe ist, dass sie in der Lage sind große Mengen an siRNA zu transportieren und gewebsspezifisch agieren zu können (MacKenzie et al., 2002).

Der populärste Virustyp zur Verwendung in der Gentherapie sind die Adenoviren, wobei die Anwendungsgebiete eher in der Tumorthherapie liegen. Dieses Virus wurde ebenfalls bereits erfolgreich in der systemischen Applikation getestet (Chen et al., 2006). Auch an Zellen des Herzens wurde dieses Verfahren bereits erfolgreich eingesetzt. So gelang es Kashara Kardiomyozyten, glatte Muskelzellen und Endothelzellen mit Hilfe dieses Virus zu transfizieren. Dabei wurde siRNA gegen GAPDH verwendet und ein deutlicher Knockdown von bis zu 90 % beobachtet (Kasahara and Aoki, 2005).

Im Gesamtvergleich lässt sich noch nicht sagen, ob sich ein virales oder non-virales Verfahren durchsetzen wird. Liposomale Verfahren können zurzeit noch nicht zellspezifisch agieren, sodass hier Nebenwirkungen zu erwarten sind (Li et al., 2006). Außerdem ist die Transfektionseffizienz im Vergleich zu viralen Anwendungen noch etwas geringer. Gegen die viralen Verfahren in der *in vivo*-Anwendung spricht allerdings der Sicherheitsaspekt. Da mutagene Gefahren bei allen bislang verwendeten Viren nicht ausgeschlossen werden können, sind hier besonders schwerwiegende Nebenwirkungen zu erwarten. Daher darf eine hohe Patientenakzeptanz einer solchen Therapieform in Frage gestellt werden.

4.3 Herzmuskelzellkultur

4.3.1 Gewinnung von Primärzellen

Primäre Kardiomyozyten, die aus vitalem Herzgewebe isoliert wurden, stellen seit der Entwicklung des Isolationsverfahrens ein wichtiges Modell zur Erforschung von Eigenschaft und Funktion, aber auch für die assoziierten Pathologien diesen Zelltyps dar. Bisher sind keine anderen Zelllinien bekannt, die die einzigartige quergestreifte Morphologie und die damit assoziierte Proteinexpression in der Form beibehalten können (Sambrano et al., 2002).

Allerdings wird der Umgang mit Kardiomyozyten während der Isolation und später in der Zellkultur von jeher als schwierig beschrieben. Vor allem zwei Gründe werden hierfür genannt: Zum einen gehen die Zellen im Gegensatz zu anderen Zellkulturen keine Zellteilungen mehr ein, wodurch es zu keiner Zunahme der Zellzahl in der Kultur kommt. Zum anderen gehen die Kardiomyozyten *in vivo* eine enge Bindung über sog. *gap-junctions* ein, die einen Austausch von Ionen und kleineren Molekülen erlauben. Da bei der Zellgewinnung diese Strukturen (*intercalated discs*) notwendigerweise zerstört werden müssen, kommt es durch Kalzium-Überladung zu einer Hyperkontraktur und damit zum Zelluntergang (Woodcock and Matkovich, 2005).

Aus diesem Grund stellt auch die Kalzium-Einstellung während der Kultivierung eine entscheidende Maßnahme zur Verlängerung der Kulturdauer dar. Durch die Isolation werden partiell Löcher in die Zellmembran gerissen wodurch eine permeable Membran entsteht. In Folge dessen kann die Kalzium-Konzentration in der Kultur erst angehoben werden, nachdem die Reparatur der Membranschäden abgeschlossen ist (Thum and Borlak, 2000).

Im Verlauf der Untersuchung von humanen Myokardzellen stellten sich einige deutliche Einschränkungen heraus, die einen Umstieg auf ein nicht-humanes Zellsystem erforderte. So war zunächst die gewonnene Zellzahl zu gering, um statistisch handfeste Untersuchungsergebnisse zu gewinnen. Später erwies sich darüber hinaus auch die Langzeit-Vitalität für aufwendige

Transfektionsversuche als nicht ausreichend, da bei der beschriebenen Versuchsserie allein für die Inkubation der siRNA in der Zelle 24 Stunden benötigt werden und die humanen Zellen lediglich eine Überlebenszeit von durchschnittlich zirka 15 Stunden erreichen konnten.

Als tierisches Modell wurde hier das Schwein gewählt, obwohl viele Arbeiten Ratten (Fontana et al., 2007) oder Kaninchen (Loughrey et al., 2004) bevorzugen. Eindeutige Vorteile für das Schweinmodell sind aber die hohe anatomische und genetische Übereinstimmung zum menschlichen Herzen (Karsenty et al., 2003). Grundsätzlich ermöglichte der Umstieg auf das Tiermodell einerseits die Verwendung von ventrikulärem Gewebe, das bei gleicher Isolationsmethode im Vergleich zu den atrialen Myozyten der humanen Gewebeproben weniger nekrotische und apoptotische Zellen, dagegen mehr quergestreifte Myozyten ergibt (Bird et al., 2003). Andererseits handelte es sich um neonatale Zellen, die durch ihr Adhäsionspotential unter anderem auch eine bessere Langzeitvitalität erreichen (Woodcock and Matkovich, 2005).

In diesem Bereich der tierischen Kardiomyozyten gibt es ein alternatives Verfahren zur Zellgewinnung: die Perfusion nach Langendorff. Dieses Modell wird immer wieder modifiziert und ermöglicht heute die Isolation einer großen Menge von Primärzellen. Der prinzipielle Unterschied zur hier verwendeten Methode ist die Perfusion der Koronarien mit der Verdauungslösung. Zusätzlich kann hier durch Oxygenierung und optimale Temperatureinstellung die Zellqualität und Quantität verbessert werden (Neumann et al., 2007). Das Perfusionsverfahren ist allerdings nur für komplette Herzen geeignet, da einzelne Gewebestücke, wie sie z.B. im Rahmen von Bypass-Operationen anfallen, nicht perfundierbar sind. Ein weiterer Nachteil ist, dass durch die Perfusion der Gefäße notwendigerweise zunächst die Gefäßwand verdaut wird und somit sämtliche verunreinigende Zellen, wie Endothelzellen oder glatte Muskelzellen obligat mit in der Kultur vorhanden sind.

Daher kam die Perfusions-Methode für die Isolation humaner Zellen nicht in Frage. Ebenso wurde auf Grund der besseren Vergleichbarkeit bei der Isolation von porcinen neonatalen Zellen auf dieses Verfahren verzichtet.

Unter Beobachtung der gewonnenen Kardiomyozyten-Primärkulturen konnte die von Woodcock aufgestellte These, in der die geringe Überlebenszeit von wenigen Tagen Kardiomyozyten und die geringe Adhärenz an artifiziellen Oberflächen postuliert wird, erneut belegt werden (siehe auch 1.9 Punkt 2). So wiesen humane Kardiomyozyten im Mittel eine Überlebenszeit von nur 15 Stunden auf. Die neonatalen, porcinen Zellen wiesen dagegen eine Überlebenszeit von 60 Stunden auf. Diese längere Überlebenszeit ist auch in der Literatur beschrieben, allerdings wird dort von einer Überlebenszeit von maximal 48 Stunden ausgegangen (Woodcock and Matkovich, 2005).

Ebenso konnte auch die geringe Adhärenz an artifizielle Oberflächen bestätigt werden, wobei eine Beschichtung der Kulturschalen mit Adhärenzien keine wesentliche Verbesserung des Adhärenzverhaltens von humanen Kardiomyozyten darstellte. In dieser Arbeit wurde Laminin als wirkungsvollstes Protein zur Anhaftung der Kardiomyozyten ermittelt, was auch andere Autoren bestätigen (Bird et al., 2003). Anders verhielt es sich bei den porcinen Kardiomyozyten: Diese Zellen sind in der Lage zu adhären und bilden daher eine Sekundärkultur (siehe Kap. 3.3). Dabei geht allerdings der typische Phänotyp verloren und die Troponinexpression lässt nach. Desweiteren wird diese adhärente Kultur sehr schnell von Fibroblasten überwuchert und dann in Folge der zunehmenden Verunreinigung unbrauchbar.

4.3.2 Differenzierung von Stammzellen

Neben der Verwendung von Primärzellen ist auch die Differenzierung von embryonalen Stammzellen zu Kardiomyozyten ein denkbarer Weg zur Gewinnung eines geeigneten Untersuchungsmodells.

Dazu müssen zunächst die Stammzellen aus gespendeten präimplantierten Embryos (Blastozysten), die durch in vitro-Fertilisation entstanden sind, isoliert werden. Diese Zellen haben das Differenzierungspotential in alle drei primären Keimblätter und sind sehr kulturstabil, da sie eine starke Telomeraseaktivität besitzen (Thomson et al., 1998). Außerdem tragen sie typische Marker, wie z.B. OCT-3/4 oder CD9. Um diese Zellen stabil kultivieren zu können, bedarf es

einer Cokultur von embryonalen Fibroblasten (Mensch und Maus) oder der Zugabe von LIF (leukaemia inhibitory factor, Maus-Modell), ansonsten kommt es spontan zur Ausdifferenzierung. Um allerdings hier die Effizienz zu erhöhen können Wachstumsfaktoren (z.B. IGF I = Insulin-like growth factor), mechanische Reize oder dreidimensionale Matrices (Evans et al., 2003) verwendet werden (Wei et al., 2005).

Die Zellen durchlaufen dabei einen typischen Differenzierungsprozess: Zunächst werden die Stammzellen in hängenden *drops* kultiviert und bilden dabei Zellaggregate (sog. ESCAs), welche 5 Tage in Suspensionskultur gehalten und dann in 24-Well-Platten überführt werden. Dort bilden sich nach weiteren zwei Tagen Kardiomyozyten heraus, die als solche durch eine schlagende Zellhäufung sichtbar werden (Sachinidis et al., 2003).

Um zu beweisen, dass diese Kulturen Strukturen von Kardiomyozyten aufweisen, wurden zahlreiche Zellbestandteile untersucht und identifiziert. So konnten z.B. mittels IgG-Antikörper neben Myosin und Desmin auch Troponin I nachgewiesen werden (Kehat et al., 2001). Darüber hinaus wurden Reaktionen des Schlagverhaltens auf β -adrenerge Stimulation, sarkomere Strukturen mit diskreten A- und I-Banden und typische Natrium-Ionenkanäle entdeckt.

Trotz dieser beachtlichen Erfolge darf die Tauglichkeit dieser Zellen als Myokardmodell in Frage gestellt werden. So wird häufig eine geringe Differenzierungseffizienz beschrieben, wobei nur 8 % aller Zellen nach 30 Tagen ein schlagendes Areal aufweisen (Kehat et al., 2001). Außerdem werden kardiale Proteine nur in Spuren nachgewiesen und gleichen keinesfalls den in Primärzellkulturen gemessenen Konzentrationen.

Anders jedoch stellt sich die therapeutische Applikation von Stammzellen dar. Dieses Verfahren, das wie die in dieser Arbeit beschriebene siRNA-Technologie, ebenfalls auf die Therapie der Herzinsuffizienz abzielt, zeigt ein hohes therapeutisches Potential. So konnten bei den Stamm- bzw. Progenitorzellen mehrere protektive Effekte nachgewiesen werden, wie z.B. der Schutz von Kardiomyozyten vor der Apoptose, die Rekrutierung von lokalen Stammzellen und die Freisetzung von angiogenetischen Faktoren (Kocher et al.,

2001). Die beschriebenen Mechanismen führen zu einer Verbesserung der kardialen Funktion und Perfusion sowie zu einer Abnahme der Herzinsuffizienz und der pektanginösen Beschwerden. Zur Applikation kommen neben den oben beschriebenen embryonalen Stammzellen auch skelettale Myoblasten, mesenchymale Stammzellen oder endotheliale Progenitorzellen in Frage (Wollert and Drexler, 2005).

4.3.3 Immortalisierung

Eine weitere Möglichkeit zur Gewinnung einer Herzmuskelzellkultur ist die Immortalisierung von primären Zellen. Zur Immortalisierung von Muskelzellen wird in vielen Arbeiten (Sindermann et al., 2002; Endo and Nadal-Ginard, 1998) das SV40-large-T-Antigen verwendet, da es neben seinen geeigneten Transformationseigenschaften eines der bestuntersuchten viralen Proteine ist.

Als Möglichkeit zur permanenten Transfusion von Herzmuskelzellen wurde eine Methode verwendet, die auf die Einschleusung der SV40-kodierenden Sequenz beruht. Die Versuchsreihe wurde mit Schweinezellen durchgeführt, da die kontinuierliche Expression von SV40 nicht für die Immortalisierung von humanen Zellen ausreicht, sehr wohl hingegen für primäre Nagerzellen (Tooze, 1981).

Leider gelang es nicht das SV40-large-T-Antigen stabil in das Genom der Zellen zu integrieren, obwohl die Nukleinsäuren vermutlich nukleär vorlagen. Dafür spricht zum einen die Tatsache, dass das eingeschleuste T-Antigen ein Kerntransportsignal (NLS, *nuclear localisation signal*) exprimiert und zum anderen auf den oben gezeigten Bildern deutliche nukleäre Anfärbungen zu erkennen sind. Die stabile Integration wäre allerdings Voraussetzung für eine permanente Expression und damit für die Immortalisierung der Zellen.

Darüber hinaus ist noch unklar, wie lange eine solche mit SV-40 erfolgreich transfizierte Kultur passagierbar wäre. Zwar könnte das SV40-large-T-Antigen die Proliferation der Zellen anregen, allerdings ist die dadurch induzierte Teilungsfähigkeit durch den Abbau der Telomere begrenzt. Die postulierte

„mitotische“ Uhr wurde in der Länge der Chromosomenenden, d.h. in der Telomerlänge, gefunden. Erste Hinweise darauf lieferte die Beobachtung, dass die Länge telomerischer DNA mit zunehmender Passagenzahl von primären humanen Fibroblasten immer mehr abnimmt, sowie die Tatsache, dass in den meisten Krebszellen das Telomer-verlängernde Enzym Telomerase exprimiert wird (Greider, 1999). Um die Kardiomyozyten im eigentlichen Sinne zu immortalisieren, d.h. eine unbegrenzte Zellteilungskapazität zu erreichen, müsste daher zusätzlich auch die endogene Bildung der Telomerase induziert werden.

Auch in der Literatur findet sich keine Zelllinie bei der es gelungen wäre, ventrikuläre Kardiomyozyten permanent mit SV40 zu transfizieren und dadurch unter Beibehaltung des Phänotyps zu immortalisieren. Es existiert allerdings eine Reihe von Zelllinien, die als immortalisierte Kardiomyozyten gelten. Dabei sind die AT-1-Zellen, die aus einem atrialen Tumor der Maus etabliert wurden (Steinhilber et al., 1990) und mit SV40 transfizierte fetale Kardiomyozyten (Wang et al., 1991) zu nennen. Diese Zelllinien ließen sich allerdings nur sehr begrenzt passagieren, de-differenzierten bereits nach kurzer Zeit oder es fehlte der typische Phänotyp, was entscheidende Nachteile darstellten.

Ein weiterer interessanter Ansatz wurde von Davidson vorgestellt. Dabei wurden humane ventrikuläre Kardiomyozyten mit SV40 transfizierten Fibroblasten fusioniert. Im Anschluss wurden mehrere Zellklone isoliert und auf SV40, β -Myosin heavy chain und Connexin-43 getestet. Klone, die alle drei Marker exprimierten, wurden weiterverwendet. Zusätzlich konnte durch Reduktion des SV40-Proteins mittels SiRNA-Technologie ein verlangsamtes Wachstum und weitere Re-Differenzierungsmerkmale beobachtet werden (Davidson et al., 2005).

Zusammenfassend lässt sich aktuell nicht beurteilen, welcher Ansatz das beste Myokardmodell darstellt. Je nach Fragestellung ist individuell zu entscheiden welches Modell dem Anforderungsprofil am ehesten entspricht.

In dieser Arbeit wurden hauptsächlich Versuche durchgeführt, die keine Langzeitkultur voraussetzten. Daher ist die Isolation von Primärzellen,

trotz der eingeschränkten Lebensdauer das geeignetste Modell, weil es am engsten mit der *in vivo*-Situation einhergeht und deshalb die aussagekräftigsten Ergebnisse liefert. Darüber hinaus spricht auch die hohe Reinheit der Kultur für dieses Zellsystem. Die gemessenen hohen Troponinkonzentrationen, die obligat höher lagen als in der Myokardbiopsie, deuten auf eine gute Zellqualität und wenig Dedifferenzierungsaktivität der Zellen hin. Ebenfalls sehr gering war die Endothelzellverunreinigung von unter 5 %, wobei diese fluoreszierenden Zellen evtl. auch durch unspezifisch bindende Antikörper zu erklären sind.

Kritisch zu hinterfragen ist allerdings der ethische Aspekt, da in den Versuchen mit Primärzellen unter Umständen eine große Anzahl an Versuchstieren notwendig ist. Von daher ist die benötigte Probenzahl genau zu planen und eventuell auf proliferierende Zellsysteme auszuweichen.

4.4 ICAM-1

Das in dieser Arbeit supprimierte Oberflächenprotein ICAM-1 wurde ursprünglich als Adhäsionsprotein zwischen Zellen entdeckt. Im Laufe der 1980er und 90er Jahre wurden allerdings weitere Liganden publiziert (siehe auch Kap. 1.3).

ICAM-1 spielt daher pathogenetisch bei den unterschiedlichsten Erkrankungen eine Rolle, die jedoch letztendlich alle in dem Symptom der Herzinsuffizienz enden.

Eine häufige Erkrankung ist die Koronare Herzkrankheit (KHK), deren Entstehung unter anderem auf arteriosklerotischen Veränderungen der herzversorgenden Gefäße beruht. In den vergangenen Jahren wurde die Verbindung zwischen Entzündungsreaktion und der Gefäßerkrankung zunehmend erkannt (Ross, 1999).

Bereits in der Frühphase der Atherosklerose werden Entzündungszellen aus dem zirkulierenden Blutstrom rekrutiert und adhären an der koronaren Endothelschicht. Im Anschluss erfolgt die Transmigration durch die Endothelzellschicht und schließlich die Ablagerung in der Lamina media der Gefäßschicht, woraus im Verlauf der Erkrankung die Bildung von

atherosklerotischen Plaques resultiert. Diese Plaques stellen Risikobereiche für eine Gefäßeinengung oder gar einen Verschluss dar.

Der Prozess der Transmigration (siehe auch Kap. 1.4) wird vorwiegend von Adhäsionsmolekülen beeinflusst, wozu auch ICAM-1 gehört. Verstärkt wird die Einwanderung der Entzündungszellen noch durch eine Überexpression von ICAM-1 im Bereich der oben beschriebenen Plaques, was ein weiteres Fortschreiten der Erkrankung nach sich zieht. Dieser Mechanismus spielt neben der KHK auch bei anderen Erkrankungen eine Rolle. So zeigt sich die Transmigration der Leukozyten z.B. bei der endothelialen Dysfunktion eines venösen Bypasses als Ursache.

Auf Grund der hohen Relevanz der Endothelzellen bei diesem Prozess ist auch an diesen Zellen die Suppression von ICAM-1 in Zellkultursystemen untersucht worden. Im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten, nicht-adhärenen Kardiomyozyten, sind primäre Endothelzellen allerdings adhären und daher per se besser zu transfizieren. Auf Grund dessen wird an den Endothelzellen ein höherer Knockdown der mRNA von ca. 85 % im Vergleich zu maximal 40 % in dieser Arbeit beobachtet (Walker et al., 2005). Auffällig ist aber ein wesentlich erhöhter unspezifischer Nebeneffekt, der durch die *Scrambled*-Probe deutlich wurde. So findet sich bei Endothelzellen eine Abnahme der ICAM-1-Expression in der *Scrambled*-Probe von ca. 40 % im Vergleich zur Positiv-Kontrolle. Im Vergleich dazu betrug der Nebeneffekt in der vorliegenden Arbeit nur ca. 5 %.

Neben Endothelzellen exprimieren auch Kardiomyozyten ICAM-1 als Oberflächenprotein, was durch inflammatorische Zytokine stimulierbar ist. Klinisch geschieht die Zytokinstimulation bei intramyokardialen Entzündungen wie sie z.B. nach Reperfusion bei der entzündlichen Kardiomyopathie (Wojnicz et al., 1998) oder bei der Sepsis-bedingten Herzinsuffizienz auftreten.

Die Expression von ICAM-1 bewirkt neben anderen Adhäsionsproteinen die Bindung von polymorphkernigen Leukozyten (PMN) und Makrophagen an Kardiomyozyten. Diese Bindung führt bei hoher Aktivität der PMNs innerhalb von Minuten zum Zelltod der Herzmuskelzellen, welche durch die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen abgetötet werden (Dun et al., 2002). Wenn

Makrophagen bzw. Monozyten, die eine relativ geringe Aktivität aufweisen, an Kardiomyozyten binden führt dies zu einer reduzierten Kontraktilität, ohne dass die Kardiomyozyten absterben. So konnte Simms zeigen, dass Kardiomyozyten der Ratte bei Bindung von Makrophagen eine um 20 % geringere Verkürzung aufweisen als Zellen, die nicht an Makrophagen binden (Simms and Walley, 1999).

Weitere interessante Beobachtungen schildert Davani: Durch die Zugabe von mit Paraformaldehyd-fixierten PMNs zu kultivierten Rattenkardiomyozyten wurde ebenfalls eine Abnahme der Kontraktilität bei den Muskelzellen beobachtet. Daraus lässt sich schließen, dass nicht nur die Abgabe von Sauerstoffradikalen durch gebundene PMNs für die Kontraktilitätsabnahme der Kardiomyozyten verantwortlich ist, sondern bereits die bloße Bindung an ICAM-1 eine Abnahme der Kontraktilität bewirkt. Der Signalweg von der Bindung an ICAM-1 zur Abnahme der Kontraktilität ist noch nicht genau geklärt, allerdings wird eine Beteiligung des Aktin Zytoskeletts angenommen (Davani et al., 2004).

ICAM-1 könnte zukünftig auch in der Diagnostik wichtig werden. Denn neben der bekannten membranständigen Form, existiert auch noch eine im Serum gelöste Form des ICAM-1-Transmembranproteins, welche aus dem extrazellulären Anteil des ICAM-Moleküls besteht (Witkowska, 2005). Die Konzentration des löslichen ICAM-1 zeigte eine gute Korrelation mit der intramyokardialen ICAM-1-Expression (Noutsias et al., 2003) und der intramyokardialen Lymphozyteninfiltration. Dieser Parameter, der durch eine einfache Blutentnahme und anschließenden ELISA-Test (Reich et al., 2003) relativ wenig invasiv bestimmt werden kann, eignet sich daher möglicherweise als diagnostischer Marker für die inflammatorische Aktivität im Rahmen einer Herzmuskelerkrankung. Andere Untersuchungen gehen noch weiter und sehen in sICAM einen Lifestyle-Marker, der eine Aussage über das Zusammenspiel von protektiven Faktoren, wie z.B. Diät und sportliche Aktivität sowie kontraproduktiven Faktoren, wie z.B. Rauchen und Alkohol treffen kann (Witkowska, 2005).

Als besonderes Indiz für die klinische Relevanz des Knockdowns von ICAM-1, gilt die von Graciano vorgestellte Arbeit, in der die Relevanz des Intercellular Adhesion Molecule-1 für das Überleben bei chronischer Herzinsuffizienz im Mäuseexperiment verdeutlicht werden konnte: In dem beschriebenen Experiment wurden transgene Mäuse verwendet, die eine starke Überexpression des Tumor Nekrose Faktors α unter Kontrolle des Promoters der schweren Kette des α -Myosins zeigten. Diese Mäuse entwickelten eine zu erwartende Herzinsuffizienz, im Rahmen einer transmuralen Myokarditis mit deutlicher Leukozyteninfiltration. Außerdem wurde ein starker Anstieg der mRNA und des Proteins der ICAM-1-Rezeptoren detektiert. Im Anschluss wurde einigen Mäuse zusätzlich das ICAM-1-Gen ausgeknockt (ICAM-1 (-/-)) und mit den initial beschriebenen Mäusen verglichen, wobei die ICAM-1 (-/-) Tiere in einer Kaplan-Meier-Kurve ein signifikant längeres Überleben zeigten. Somit konnte die Korrelation der ICAM-1-Expression mit der kardialen Dysfunktion in einem *in vivo*-Modell bewiesen werden (Graciano et al., 2001). Ein Nachteil des Modells ist allerdings die fehlende Unterscheidung zwischen Kardiomyozyten und Endothelzellen. So wäre es theoretisch denkbar, dass das längere Überleben der ICAM (-/-)-Mäuse allein durch die fehlende Expressierung von ICAM-1 auf der Oberfläche der Endothelzellen zu erklären ist und die Rolle der verringerten Kontraktilität von Kardiomyozyten eher gering ist. Wahrscheinlicher ist jedoch eine Kombination beider genannter Effekte.

Bei der Wahl des zu blockenden Proteins gibt es sicher auch andere Alternativen, die potentiell zur Therapie der Herzinsuffizienz geeignet sind.

So gelang es Arnold den β_1 -adrenergen Rezeptor mit Hilfe spezifischer siRNA zu blocken. Dies hat im Vergleich zu herkömmlichen, selektiven, aber nicht spezifischen β -Blockern potentiell einen Vorteil im Nebenwirkungsprofil (Arnold et al., 2007).

Eine andere Arbeit hat die Apoptose-Pathways mit Hilfe der siRNA beeinflusst. Dabei gelang es durch Suppression von ROCK-1 (*Rho-associated coiled-coil protein kinase 1*) einem Substrat der Caspase 3, in Kardiomyozyten der Ratte die Apoptoserate dieser Zellen zu senken (Chang et al., 2006).

Im heutigen noch experimentellen Stadium lässt sich noch nicht endgültig klären, welches Protein sich am besten zur Suppression und zur Therapie der Herzinsuffizienz eignet. Diese Aussage können im weiteren Verlauf erst randomisierte klinische Studien treffen.

Allerdings ist auch bei optimaler Suppression von ICAM-1 nicht mit einer kompletten Abschaltung der kardialen Entzündungsreaktion bzw. der Leukozyten-Transmigration (siehe 1.4) zu rechnen. Denn auch andere Adhäsionsmoleküle (z.B. VCAM-1, E-Selektin etc.) spielen in diesem komplexen Prozess eine Rolle und müssen daher in zukünftige Therapieformen mit eingebunden werden.

4.5 Methodenkritik

Einige Aspekte der verwendeten Methoden sollen an dieser Stelle kritisch betrachtet werden.

Zunächst muss auf die möglicherweise eingeschränkte Aussagekraft der Herzmuskelzellkultur hingewiesen werden. Diese Zellen bilden *in vivo* durch Zellzellkontakte ein dreidimensionales Netzwerk, das in der nicht-adhären Kultur nicht nachzubilden ist. Darüberhinaus fehlt die physiologisch-mechanische Stimulation, wie sie am schlagenden Herzen auf die Zellen einwirkt. Eine weitere Fehlerquelle könnte durch die Isolation entstehen, indem durch die Einwirkung der Kollagenase zelluläre Proteine abgebaut werden (Koh et al., 1998).

Trotz der weiten Verbreitung und des großen Stellenwerts in der genetischen Forschung bietet auch die RT-PCR einige mögliche Fehlerquellen. So können durch die Umschreibung von RNA auf cDNA Ungenauigkeiten entstehen, aber auch die indirekte Quantifizierung birgt Risiken. Vor allem durch inkonstante Expression des Housekeeping-Gen GAPDH oder durch mögliche Wechselwirkungen mit der siRNA können fehlerhafte Ergebnisse entstehen. Dieser Fehler kann jedoch durch die *Scrambled*-Probe, die im Vergleich zur Positiv-Kontrolle kaum Abweichungen zeigte, als minimal angesehen werden.

Eine Fragestellung, welche die vorliegende Arbeit offen lässt, ist die Expression des Proteins ICAM an der Oberfläche, die z.B. über Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern und anschließender FACS-Analyse nachgewiesen werden könnte. Diese Methode ist, bei den in dieser Arbeit verwendeten humanen Kardiomyozyten, auf Grund zu geringer Zellzahl nicht durchführbar gewesen. Da die Isolation porciner Kardiomyozyten eine höhere Anzahl an Zellen liefert, wäre hier eine FACS-Analyse denkbar. Diese würde allerdings eine hohe Anzahl an Versuchstieren erfordern und wäre daher diesbezüglich kontrovers zu diskutieren. Weiterhin ist auch der klinische Erfolg dieses Knockdowns von maximal 40% kritisch zu hinterfragen. Es blieb bisher ungeklärt, inwieweit diese Reduktion der relativen Expression klinisch ins Gewicht fällt und ob dadurch eine Besserung für den Patienten resultieren könnte. Auch hier kann nur auf zukünftige *in vivo*-Studien verwiesen werden, um diesen Sachverhalt zu prüfen.

4.6 Therapeutische Applikation und Zukunftsausblick

In Zukunft wird sich das Augenmerk der siRNA-Forschung zunehmend auf die therapeutische Umsetzung der gewonnenen Erkenntnisse richten. Hauptprobleme der siRNA-Entwicklung von der Zellkultur zur klinischen Routine werden sicherlich die Applikationstechnik (lokal, systemisch, über *targeting*, etc.) und die Nebenwirkungsrate sein. Die Applikation ist deshalb entscheidend, da der Abbau der siRNA beim *in vivo*-Einsatz durch im Blut vorkommende RNAsen und andere Abbauenzyme droht. Die Nebenwirkungsrate ist bestimmt durch Interaktion mit Blutkomponenten, unspezifischer Aufnahme durch die Zellen und einer drohenden Immunreaktion auf die siRNA (Kawakami and Hashida, 2007). Eine Übersicht möglicher Probleme der intravenösen Gabe zeigt Abbildung 4-2 :

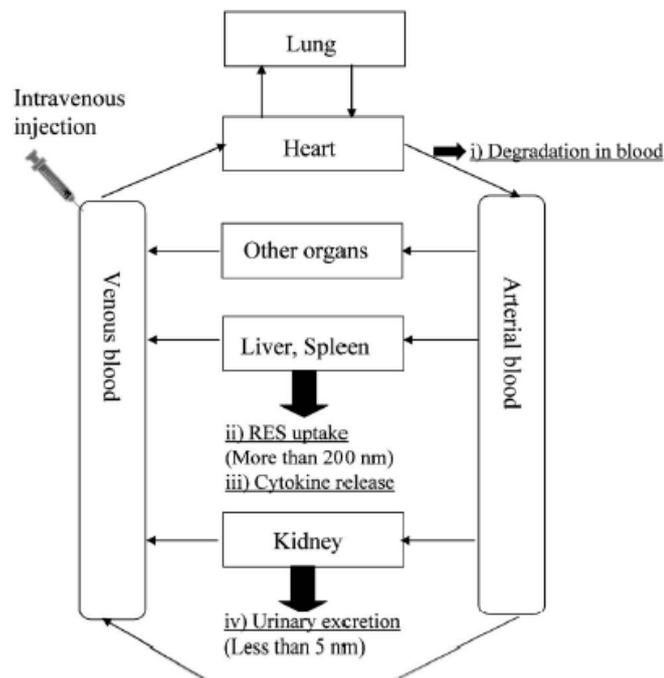


Abbildung 4-2: mögliche Probleme der systemischen siRNA-Gabe:
 i.) vorzeitiger Abbau im Blut ii.) Aufnahme durch Kupfer-Zellen und Makrophagen v.a. in der Leber iii.) Immunantwort iv.) Rasche Ausscheidung durch die Niere (Kawakami and Hashida, 2007)

Zur Lösung der beschriebenen Probleme stehen verschiedene Verfahren zur Diskussion: Neben Modifikationen an der siRNA (z.B. Chemische Modifikation durch Bindung an LNA (*locked nucleic acid*) oder Verpackung in Liposomen) kann die siRNA-Transfektionslösung auch lokal appliziert werden. Diese lokale Gabe ist in klinischen Phase-I-Studien bereits getestet worden. So soll in Zukunft zur Therapie der Makuladegeneration siRNA gegen VEGF (*vaskular endothelial growth factor*) intraokular injiziert werden und zur Therapie des RSV-Virus (*respiratory syncytial virus*) siRNA zur Bekämpfung des Virus inhalierbar sein (Corey, 2007).

Neben den genannten lokalen Therapieformen bietet auch die Herzchirurgie einige interessante Anwendungsgebiete für die siRNA-Technologie. Auf diesem operativen Gebiet wird häufig ein Einsatz der Herzlungenmaschine notwendig, um die Vitalfunktionen des Patienten intraoperativ aufrechtzuerhalten. Diese extrakorporale Zirkulation induziert die Freisetzung verschiedener

inflammatorischer Zytokine, die wie unter anderem in dieser Arbeit gezeigt werden konnte wiederum einen starken Stimulus auf die Expression von ICAM-1 darstellt. Diese Expression führt, wie in Kapitel 4.3 erklärt, zu einer postoperativen Herzinsuffizienz. Um dieser Entwicklung vorzubeugen, könnte über die üblicherweise verwendete Kardioplegielösung die siRNA appliziert werden. Diese Lösung wird intrakoronar injiziert, um die Kontraktion des Herzens während der Operation zu stoppen. Dieser Lösung beigemischt, würde die siRNA in hoher Konzentration auf das Zielorgan treffen und erst später in verdünntem Zustand den Systemkreislauf erreichen, was das Ausmaß der Nebeneffekte beträchtlich reduzieren würde. Ebenfalls denkbar wäre eine *ex-vivo*-Anwendung in der Bypass-Chirurgie. In diesem Fall könnte ein venöser Bypass von der Entnahme bis zur Wiedereinsetzung anstatt mit Kochsalz-Lösung mit einer siRNA-Lösung zur Suppression von ICAM-1 inkubiert werden (Walker et al., 2005). Diese lokale Applikation führt zu einer deutlichen Verringerung der Nebeneffekte und erlaubt die Verwendung von höheren Konzentrationen.

Eine weitere Reduktion der Nebeneffekte durch die siRNA, vor allem die unspezifische Aufnahme in unterschiedlichste Zellen, kann erreicht werden, indem in Liposomen verpackte siRNA nur gewebespezifisch aufgenommen wird. Diese gewebs- oder zellspezifische Aufnahme (*drug targeting*) z.B. in Krebszellen oder durch inflammatorische Zytokine aktivierte Zellen, kann durch Anbringen von Liganden für spezifische Rezeptoren oder von Antikörpern, die gegen zellspezifische Oberflächenmarker gerichtet sind, erreicht werden. Die „Beschichtung“ der Liposomen könnte mit Hilfe des *pegylated immunoliposome (PIL)* gelingen, das Zhang entwickelt hat. Dazu wird ein Polyethylenglycol-Strang auf ein Liposom aufgebracht, auf dem die Antikörper angeheftet werden können (Zhang et al., 2003).

Einen weiteren Ansatz der zellspezifischen siRNA-Applikation konnte McNamara publizieren: Dazu wurde ein Aptamer (=kurzes RNA-Oligonukleotid mit 25–70 Basen, das ein spezifisches Molekül über seine 3D-Struktur binden kann) gegen den Oberflächenmarker PSMA (*prostate-specific membrane antigen*) von Prostatazellen mit der Ziel-siRNA gegen PLK1 (*polo-like kinase 1*)

gekoppelt. Diese Verbindung, die auch Aptamer-siRNA Chimer genannt wird, bindet zunächst über den Aptamerteil an die Zelloberfläche und wird mittels Endozytose aufgenommen. Nach dem Verlassen des Endosoms kann das Chimer über den siRNA-Teil an den RISC-Komplex binden und seine Gene-silencing-Funktion ausführen (McNamara et al., 2006).

Durch die beschriebenen Anwendungen gelingt es die Effizienz, die Spezifität und in der Konsequenz auch die Sicherheit der siRNA-Applikation zu verbessern und dem therapeutischen Einsatz dieser Technologie näherzukommen.

Ein weiterer Vorteil, den die siRNA-Technologie gegenüber anderen Gene-silencing-Verfahren bietet, ist die sogenannte *Cocktail*-Anwendung. Dabei können mehrere Zielgene gleichzeitig supprimiert werden, um so eine Potenzierung des Effekts zu erreichen (Mohapatra et al., 2005). Dies ist z.B. bei Virusinfektionen denkbar, um mehreren Genen des Virus gleichzeitig entgegenzuwirken, aber auch im Bereich der kardialen Entzündungsreaktion könnte durch Suppression mehrerer Adhäsionsproteine (z.B. VCAM, E-Selektin etc.) der therapeutische Nutzen verbessert werden. Allerdings muss bei dieser Polytherapie die Gesamt-siRNA-Konzentrationen beachtet werden, um toxische Nebenwirkungen zu vermeiden (Walker et al., 2007).

Ein bisher ungelöstes Problem für die siRNA-Gabe stellen die Endothelbarrieren in einigen Organen wie z.B. dem Herzen oder dem Gehirn dar. Allerdings ist seit langem bekannt, dass die Endothelschicht der Gefäße in entzündlich verändertem Gewebe im Allgemeinen gut permeabel ist, sodass die siRNA im Rahmen der oben genannten Fragestellung relativ gut zu den Herzmuskelzellen gelangen könnte. Trotzdem ist noch nicht klar, ob die siRNA-Moleküle in ausreichender Konzentration die Endothelbarriere durchdringen können, eine gute Gewebegängigkeit besitzen und eine adäquate Wirkung an den Zielzellen im Parenchym des Organs erreichen können.

Zusammenfassend können der siRNA-Technologie hohe Chancen für die Zukunft eingeräumt werden. Diese Technik enthält viele hoffnungsvolle Vorteile und bietet eine Vielzahl von Möglichkeiten. Allerdings werden noch mehrere Jahre intensivster Forschungsarbeiten nötig sein, bis der klinische Einsatz

beginnen kann, da die in der Zellkultur gewonnen Erkenntnisse zunächst in tierexperimentellen Untersuchungen validiert werden müssen.

5 Zusammenfassung

Das Erklärungsmodell der Herzinsuffizienz wurde in den 1990er Jahren durch eine weitere Komponente, die Zytokinhypothese, ergänzt. In vielen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass herzinsuffiziente Patienten eine höhere Serumkonzentration von biologisch aktiven Molekülen, den Zytokinen, aufweisen als die Normalbevölkerung. Besonders bei Patienten nach herzchirurgischen Eingriffen unter Verwendung der Herzlungenmaschine (HLM) ließen sich sehr hohe Konzentrationen der Zytokine TNF α , Interleukin 1 und Interleukin 6 feststellen. Diese Zytokine bewirken neben einer direkten Myokardschädigung eine Hochregulation der Expression von Adhäsionsproteinen an Endothelzellen wie z.B. ICAM-1, VCAM und den Selektinen, welche für die Einwanderung von Leukozyten in das kardiale Gewebe verantwortlich sind. Neuere Erkenntnisse belegen auch die vermehrte Expression von ICAM-1 an Kardiomyozyten, nach Stimulation mit TNF α oder anderen Zytokinen. An den kardialen Muskelzellen bewirkt ICAM-1 eine Bindung von hochaktiven Leukozyten, die zum Absterben der Kardiomyozyten führt. Zudem führt die bloße Besetzung des ICAM-1-Rezeptors auf der Oberfläche von Herzmuskelzellen zu einer Abnahme der Kontraktilität um 20 %. Basierend auf diesen Erkenntnissen soll eine neue Therapiemethode der postoperativen Herzinsuffizienz auf Grundlage der siRNA-Technologie entwickelt werden.

Die siRNA-Technologie stellt eine vielfältig einsetzbare Gene-Silencing-Methode dar, womit die Expression einzelner Proteine spezifisch gehemmt werden kann. Besonders deutlich wird das Potential dieser jungen Technologie durch die Verleihung des Nobelpreises für Medizin im Jahr 2006 an Andrew Fire und Craig Mello nur wenige Jahre nach der Publikation.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es spezifische siRNA gegen ICAM-1 mittels kationischer Lipofektion in Kardiomyozyten zu bringen, wo die siRNA durch Anlagerung an mRNA deren Abbau induzieren und somit die Expression des Proteins auf der Zelloberfläche verhindern kann.

Die Versuche wurden an mittels Kollagenase-Verdau isolierten Kardiomyozytenkulturen durchgeführt, da diese Primärkulturen die *in-vivo*-Situation am besten simulieren und eine spätere Umsetzung als Therapeutikum im Tiermodell oder im Patienten erleichtern.

Die so erlangte Zellkultur wurde zunächst mit TNF α aktiviert. Nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese erfolgte die quantitative Auswertung der relativen ICAM-Expression mit der qRT-PCR.

Bei den porcinen Kardiomyozyten konnte durch Zytokin-Stimulation eine bis zu 12-fach erhöhte ICAM-1 Expression im Vergleich zur Negativ-Kontrolle gemessen werden. Bei den humanen Zellen hingegen wurde zweifach erhöhte ICAM-1 Expression im Vergleich zur Negativ-Kontrolle gemessen. Im zweiten Schritt wurde vor der TNF α -Aktivierung zusätzlich eine Lipofektion mit siRNA gegen ICAM-1 durchgeführt. Bei den porcinen Zellen zeigte sich hierbei ein durchschnittlicher Knockdown von ICAM-1 um 33%. Zusätzlich zeigte sich im Trend, dass durch höhere Konzentrationen des Transfektionsmittels und der siRNA eine weitere Reduktion der ICAM-1 mRNA auf maximal 41 % gemessen werden konnte.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die, auf Grund ihrer bescheidenen Adhärenz schwierig zu transfizierenden, Kardiomyozyten in ihrer Genexpression durch die siRNA-Technologie beeinflussbar sind, auch wenn die Erfolgsrate noch unter anderen Zellsystemen wie z.B. Endothelzellen liegt.

In Zukunft soll die siRNA-Technologie in der Herzchirurgie zur Myokardprotektion, aber auch in anderen Disziplinen *in vivo* einsetzbar werden, wozu mehrere Ansätze zur Verfügung stehen. Zum einen kann die siRNA systemisch appliziert werden, wobei hier besondere Modifikationen der siRNA notwendig sind um eine gute Verträglichkeit zu garantieren. So können zum Beispiel die siRNA Moleküle in Liposomen verpackt werden, die mit Antikörpern gegen Oberflächenstrukturen der Zielzelle besetzt sind (*drug targeting*), um eine unspezifische Aufnahme in Körperzellen zu verhindern. Zum anderen kann die siRNA auch lokal appliziert werden, wobei vor allem in der

Herzchirurgie vielversprechende Ansätze bestehen. So kann die siRNA zur Protektion des Herzmuskels beispielsweise der kardioplegen Lösung während des Herzstillstandes beigemischt werden, um die in dieser Arbeit gezeigte Suppression von ICAM-1 zu bewirken und damit die Schädigung des Myokardgewebes zu verhindern und der postoperativen Herzinsuffizienz vorzubeugen.

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: RNA-Interferenz (McManus and Sharp, 2002)	12
Abbildung 1-2: Funktionsweise von synthetischer siRNA und shRNA	16
Abbildung 2-1: Isolation und Kultivierung von Herzmuskelzellen	31
Diagramm 3-1: Effektivität der Zellisolation	45
Abbildung 3-1: Isolation von humanen Myozyten, Fraktion 1	46
Abbildung 3-2: Isolation von humanen Myozyten, Fraktion 1	46
Abbildung 3-3: humane Myozyten, Fraktion 3	47
Abbildung 3-4: humane Myozyten, Fraktion 3 Auflichtmikroskop	47
Abbildung 3-5: Isolation von humanen Myozyten, Fraktion 5	47
Diagramm 3-2: Anteil vitaler Kardiomyozyten	49
Tabelle 3-1: Ergebnisse der Adhärenz-Versuche	50
Diagramm 3-3: Relative Expression der Troponin-RNA	51
Diagramm 3-4: Positiv-Kontrolle Nr. 1	52
Diagramm 3-5: Positiv-Kontrolle Nr. 2	52
Diagramm 3-6: Probe 1: Adhärente porcine Kardiomyozytenkultur	53
Diagramm 3-7: Probe 2: Adhärente porcine Kardiomyozytenkultur	53
Abbildung 3-6: Sekundärkultur nach 24 Stunden	54
Abbildung 3-7: Sekundärkultur nach 7 Tagen	54
Abbildung 3-8: "Kardiomyozyten" der Fa. ScienCell™	55
Diagramm 3-8: Auswertung der Troponin-Expression	56
Abbildung 3-9: Transfizierte Zellen 1	57

<u>Abbildungsverzeichnis</u>	<u>94</u>
Abbildung 3-10: Transfizierte Zellen 2.....	57
Diagramm 3-9: ICAM Expression im zeitlichen Verlauf	58
Diagramm 3-10: ICAM Expression in Abhängigkeit zur TNF α -Konzentration ..	60
Diagramm 3-11: Vergleich der Transfektionsmittel	61
Diagramm 3-12: Vergleich verschiedener siRNA-Mengen	64
Diagramm 3-13: Vergleich verschiedener Transfektionsmittelmengen	65
Diagramm 3-14: Zusammenschau der Versuche	66
Abbildung 4-1: Funktionsweise der Antisense-Technologie (Corey, 2007)	69
Abbildung 4-2: Probleme der systemischen siRNA-Gabe	86

7 Abkürzungsverzeichnis

cDNA	complementary DNA
CM	cardiac myocytes
CMM	Cardiac myocyte medium
DAT	Different Attach Technique
DNA	deoxyribonucleic acid
FACS	fluorescence activated cell sorter
g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	green fluorescence protein
HLM	Herzlungenmaschine
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
Il	Interleukin
LPS	Lipopolyssacharid
miRNA	Mikro-RNA
ODN	Oligodeoxyribonukleinsäuren
PBS	phosphate buffered saline
RNA	ribonucleic acid
RNAi	RNA Interference
RT-PCR	Real-time polymerase chain reaction
S2	Sicherheitsstufe 2
Scr.	Scrambled
siRNA	Small interferring RNA
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
sTNF-R	Soluble TNF- Receptor
TNF α	Tumor Nekrose Faktor α
VCAM-1	Vascular adhesion molecule

8 Literaturverzeichnis

1. Alon,T., Hemo,I., Itin,A., Pe'er,J., Stone,J., and Keshet,E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat. Med.* *1*, 1024-1028.
2. Altieri,D.C., Duperray,A., Plescia,J., Thornton,G.B., and Languino,L.R. (1995). Structural recognition of a novel fibrinogen gamma chain sequence (117-133) by intercellular adhesion molecule-1 mediates leukocyte-endothelium interaction. *J. Biol. Chem.* *270*, 696-699.
3. An,D.S., Donahue,R.E., Kamata,M., Poon,B., Metzger,M., Mao,S.H., Bonifacino,A., Krouse,A.E., Darlix,J.L., Baltimore,D., Qin,F.X., and Chen,I.S. (2007). Stable reduction of CCR5 by RNAi through hematopoietic stem cell transplant in non-human primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *104*, 13110-13115.
4. Ansari,A.A., Sundstrom,J.B., Runnels,H., Jensen,P., Kanter,K., Mayne,A., and Herskowitz,A. (1994). The absence of constitutive and induced expression of critical cell-adhesion molecules on human cardiac myocytes. Its role in transplant rejection. *Transplantation* *57*, 942-949.
5. Arnold,A.S., Tang,Y.L., Qian,K., Shen,L., Valencia,V., Phillips,M.I., and Zhang,Y.C. (2007). Specific beta1-adrenergic receptor silencing with small interfering RNA lowers high blood pressure and improves cardiac function in myocardial ischemia. *J. Hypertens.* *25*, 197-205.
6. Baker,B.F., Lot,S.S., Condon,T.P., Cheng-Flournoy,S., Lesnik,E.A., Sasmor,H.M., and Bennett,C.F. (1997). 2'-O-(2-Methoxy)ethyl-modified anti-intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) oligonucleotides selectively increase the ICAM-1 mRNA level and inhibit formation of the ICAM-1 translation initiation complex in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* *272*, 11994-12000.
7. Ballantyne,C.M., Masri,B.M., Clubb,F.J., Jr., Radovancevic,B., Smith,C.W., Hawkins,H.K., Frazier,O.H., and Willerson,J.T. (1996). Increased expression of ICAM-1 in a case of accelerated coronary artery disease after heart transplantation. *Tex. Heart Inst. J.* *23*, 293-295.
8. Bartel,D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* *116*, 281-297.
9. Berlin,C., Bargatze,R.F., Campbell,J.J., von Andrian,U.H., Szabo,M.C., Hasslen,S.R., Nelson,R.D., Berg,E.L., Erlandsen,S.L., and Butcher,E.C. (1995). alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* *80*, 413-422.
10. Bernot,D., Peiretti,F., Canault,M., Juhan-Vague,I., and Nalbone,G. (2005). Upregulation of TNF-alpha-induced ICAM-1 surface expression by adenylate cyclase-dependent pathway in human endothelial cells. *J. Cell Physiol* *202*, 434-441.
11. Bernstein,E., Caudy,A.A., Hammond,S.M., and Hannon,G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363-366.

12. Bird, S.D., Doevendans, P.A., van Rooijen, M.A., Brutel de la, R.A., Hassink, R.J., Passier, R., and Mummery, C.L. (2003). The human adult cardiomyocyte phenotype. *Cardiovasc. Res.* 58, 423-434.
13. Blondel, B., Roijen, I., and Cheneval, J.P. (1971). Heart cells in culture: a simple method for increasing the proportion of myoblasts. *Experientia* 27, 356-358.
14. Böcker, W., Denk, H., and Heitz, Ph.U. (2004). *Pathologie*. Urban & Fischer).
15. Brierley, G.P., Wenger, W.C., and Altschuld, R.A. (1986). Heart myocytes as models of the cellular response to ischemia. *Adv. Exp. Med. Biol.* 194, 303-314.
16. Brodsky, J.L. and Pipas, J.M. (1998). Polyomavirus T antigens: molecular chaperones for multiprotein complexes. *J. Virol.* 72, 5329-5334.
17. Brummelkamp, T.R., Bernards, R., and Agami, R. (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus-mediated RNA interference. *Cancer Cell* 2, 243-247.
18. Burrows, M. T. Rhythmische Kontraktionen der isolierten Herzmuskelzelle außerhalb des Organismus. 27, 1473-1475. 1912. *MMW*.
Ref Type: Generic
19. Cain, B.S., Meldrum, D.R., Dinarello, C.A., Meng, X., Joo, K.S., Banerjee, A., and Harken, A.H. (1999). Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med.* 27, 1309-1318.
20. Calegari, F., Haubensak, W., Yang, D., Huttner, W.B., and Buchholz, F. (2002). Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 14236-14240.
21. Caplen, N.J. (2002). A new approach to the inhibition of gene expression. *Trends Biotechnol.* 20, 49-51.
22. Caplen, N.J., Parrish, S., Imani, F., Fire, A., and Morgan, R.A. (2001). Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrate and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9742-9747.
23. Carlos, T.M. and Harlan, J.M. (1994). Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101.
24. Carpenter, A.E. and Sabatini, D.M. (2004). Systematic genome-wide screens of gene function. *Nat. Rev. Genet.* 5, 11-22.
25. Cavanaugh, M. P. Pulsation, migration, and division in dissociated duck embryo heart cells in vitro. *J. Exp. Zool.* 128, 573-589. 1955.
Ref Type: Abstract
26. Chang, J., Xie, M., Shah, V.R., Schneider, M.D., Entman, M.L., Wei, L., and Schwartz, R.J. (2006). Activation of Rho-associated coiled-coil protein kinase 1 (ROCK-1) by caspase-3 cleavage plays an essential role in cardiac myocyte apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 14495-14500.
27. Chen, Y., Chen, H., Hoffmann, A., Cool, D.R., Diz, D.I., Chappell, M.C., Chen, A.F., and Morris, M. (2006). Adenovirus-mediated small-

- interference RNA for in vivo silencing of angiotensin AT1a receptors in mouse brain. *Hypertension* 47, 230-237.
28. Colditz, I.G. (1985). Margination and emigration of leucocytes. *Surv. Synth. Pathol. Res.* 4, 44-68.
 29. Corey, D.R. (2007). RNA learns from antisense. *Nat. Chem. Biol.* 3, 8-11.
 30. Cornelius, L.A., Taylor, J.T., Degitz, K., Li, L.J., Lawley, T.J., and Caughman, S.W. (1993). A 5' portion of the ICAM-1 gene confers tissue-specific differential expression levels and cytokine responsiveness. *J. Invest Dermatol.* 100, 753-758.
 31. Dalby, B., Cates, S., Harris, A., Ohki, E.C., Tilkins, M.L., Price, P.J., and Ciccarone, V.C. (2004). Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 33, 95-103.
 32. Davani, E.Y., Dorscheid, D.R., Lee, C.H., van, B.C., and Walley, K.R. (2004). Novel regulatory mechanism of cardiomyocyte contractility involving ICAM-1 and the cytoskeleton. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 287, H1013-H1022.
 33. Davidson, M.M., Nesti, C., Palenzuela, L., Walker, W.F., Hernandez, E., Protas, L., Hirano, M., and Isaac, N.D. (2005). Novel cell lines derived from adult human ventricular cardiomyocytes. *J. Mol. Cell Cardiol.* 39, 133-147.
 34. Dawn, B., Stein, A.B., Urbanek, K., Rota, M., Whang, B., Rastaldo, R., Torella, D., Tang, X.L., Rezazadeh, A., Kajstura, J., Leri, A., Hunt, G., Varma, J., Prabhu, S.D., Anversa, P., and Bolli, R. (2005). Cardiac stem cells delivered intravascularly traverse the vessel barrier, regenerate infarcted myocardium, and improve cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 3766-3771.
 35. Donze, O. and Picard, D. (2002). RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 30, e46.
 36. Dörner, K. (2003). *Klinische Chemie und Hämatologie*. Thieme-Verlag).
 37. Dorsett, Y. and Tuschl, T. (2004). siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 318-329.
 38. Doudna, J.A. and Cech, T.R. (2002). The chemical repertoire of natural ribozymes. *Nature* 418, 222-228.
 39. Dun, Y., Zhi, J.M., Sun, H.Y., Zhao, R.R., and Zhao, Z.Q. (2002). Activated polymorphonuclear leukocytes induce cardiomyocyte apoptosis and the protective effects of carvedilol. *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 24, 403-412.
 40. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
 41. Endo, T. and Nadal-Ginard, B. (1998). Reversal of myogenic terminal differentiation by SV40 large T antigen results in mitosis and apoptosis. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 8), 1081-1093.

42. Evans,H.J., Sweet,J.K., Price,R.L., Yost,M., and Goodwin,R.L. (2003). Novel 3D culture system for study of cardiac myocyte development. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 285, H570-H578.
43. Farh,K.K., Grimson,A., Jan,C., Lewis,B.P., Johnston,W.K., Lim,L.P., Burge,C.B., and Bartel,D.P. (2005). The widespread impact of mammalian microRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310, 1817-1821.
44. Fire,A., Albertson,D., Harrison,S.W., and Moerman,D.G. (1991). Production of antisense RNA leads to effective and specific inhibition of gene expression in *C. elegans* muscle. *Development* 113, 503-514.
45. Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
46. Flynn,M.A., Casey,D.G., Todryk,S.M., and Mahon,B.P. (2004). Efficient delivery of small interfering RNA for inhibition of IL-12p40 expression in vivo. *J. Inflamm. (Lond)* 1, 4.
47. Fontana,M., Olschewski,H., Olschewski,A., and Schluter,K.D. (2007). Treprostinil potentiates the positive inotropic effect of catecholamines in adult rat ventricular cardiomyocytes. *Br. J. Pharmacol.* 151, 779-786.
48. Fowler,T., Bamberg,S., Moller,P., Klenk,H.D., Meyer,T.F., Becker,S., and Rudel,T. (2005). Inhibition of Marburg virus protein expression and viral release by RNA interference. *J. Gen. Virol.* 86, 1181-1188.
49. Graciano,A.L., Bryant,D.D., White,D.J., Horton,J., Bowles,N.E., and Giroir,B.P. (2001). Targeted disruption of ICAM-1, P-selectin genes improves cardiac function and survival in TNF-alpha transgenic mice. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280, H1464-H1471.
50. Greider,C.W. (1999). Telomerase activation. One step on the road to cancer? *Trends Genet.* 15, 109-112.
51. Greve,J.M., Davis,G., Meyer,A.M., Forte,C.P., Yost,S.C., Marlor,C.W., Kamarck,M.E., and McClelland,A. (1989). The major human rhinovirus receptor is ICAM-1. *Cell* 56, 839-847.
52. Hamilton,A.J. and Baulcombe,D.C. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286, 950-952.
53. Harary,I., Hoover,F., and Farley,B. (1974). The isolation and cultivation of rat heart cells. *Methods Enzymol.* 32, 740-745.
54. Hartford,M., Wiklund,O., Mattsson,H.L., Perers,E., Person,A., Herlitz,J., Hurt-Camejo,E., Karlsson,T., and Caidahl,K. (2006). CRP, interleukin-6, secretory phospholipase A2 group IIA, and intercellular adhesion molecule-1 during the early phase of acute coronary syndromes and long-term follow-up. *Int. J. Cardiol.* 108, 55-62.
55. Hutvagner,G. and Zamore,P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056-2060.
56. Jackson,A.L., Bartz,S.R., Schelter,J., Kobayashi,S.V., Burchard,J., Mao,M., Li,B., Cavet,G., and Linsley,P.S. (2003). Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21, 635-637.
57. Joseph-Silverstein,J. and Silverstein,R.L. (1998). Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest* 16, 176-182.

58. Kaplanski,G., Marin,V., Fabrigoule,M., Boulay,V., Benoliel,A.M., Bongrand,P., Kaplanski,S., and Farnarier,C. (1998). Thrombin-activated human endothelial cells support monocyte adhesion in vitro following expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; CD54) and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1; CD106). *Blood* 92, 1259-1267.
59. Karsenty,E., Barillot,E., Tosser-Klopp,G., Lahbib-Mansais,Y., Milan,D., Hatey,F., Cirera,S., Sawera,M., Jorgensen,C.B., Chowdhary,B., Fredholm,M., Wimmers,K., Ponsuksili,S., Davoli,R., Fontanesi,L., Braglia,S., Zambonelli,P., Bigi,D., Neuenschwander,S., and Gellin,J. (2003). The GENETPIG database: a tool for comparative mapping in pig (*Sus scrofa*). *Nucleic Acids Res.* 31, 138-141.
60. Kasahara,H. and Aoki,H. (2005). Gene silencing using adenoviral RNAi vector in vascular smooth muscle cells and cardiomyocytes. *Methods Mol. Med.* 112, 155-172.
61. Kawakami,S. and Hashida,M. (2007). Targeted delivery systems of small interfering RNA by systemic administration. *Drug Metab Pharmacokinet.* 22, 142-151.
62. Kehat,I., Kenyagin-Karsenti,D., Snir,M., Segev,H., Amit,M., Gepstein,A., Livne,E., Binah,O., Itskovitz-Eldor,J., and Gepstein,L. (2001). Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J. Clin. Invest* 108, 407-414.
63. Kocher,A.A., Schuster,M.D., Szabolcs,M.J., Takuma,S., Burkhoff,D., Wang,J., Homma,S., Edwards,N.M., and Itescu,S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nat. Med.* 7, 430-436.
64. Koh,K.N., Kang,M.J., Frith-Terhune,A., Park,S.K., Kim,I., Lee,C.O., and Koh,G.Y. (1998). Persistent and heterogenous expression of the cyclin-dependent kinase inhibitor, p27KIP1, in rat hearts during development. *J. Mol. Cell Cardiol.* 30, 463-474.
65. Kurreck,J. (2003). Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. *Eur. J. Biochem.* 270, 1628-1644.
66. Kuwabara,T., Warashina,M., and Taira,K. (2002). Cleavage of an inaccessible site by the maxizyme with two independent binding arms: an alternative approach to the recruitment of RNA helicases. *J. Biochem. (Tokyo)* 132, 149-155.
67. Languino,L.R., Duperray,A., Joganic,K.J., Fornaro,M., Thornton,G.B., and Altieri,D.C. (1995). Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 1505-1509.
68. Li,C.X., Parker,A., Menocal,E., Xiang,S., Borodyansky,L., and Fruehauf,J.H. (2006). Delivery of RNA interference. *Cell Cycle* 5, 2103-2109.
69. Liang,Z., Wu,T., Lou,H., Yu,X., and Taichman,R.S. (2004). Inhibition of breast cancer metastasis by selective synthetic polypeptide against CXCR4. *Cancer Res.* 64, 4302-4308.

70. Lieberman,M., Adam,W.J., and Bullock,P.N. (1980). The cultured heart cell: problems and prospects. *Methods Cell Biol.* 21A, 187-203.
71. Linke,A., Muller,P., Nurzynska,D., Casarsa,C., Torella,D., Nascimbene,A., Castaldo,C., Cascapera,S., Bohm,M., Quaini,F., Urbanek,K., Leri,A., Hintze,T.H., Kajstura,J., and Anversa,P. (2005). Stem cells in the dog heart are self-renewing, clonogenic, and multipotent and regenerate infarcted myocardium, improving cardiac function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 8966-8971.
72. LINZBACH,A.J. (1950). [The muscle fiber constant and the law of growth of the human ventricles.]. *Virchows Arch.* 318, 575-618.
73. Loughrey,C.M., Seidler,T., Miller,S.L., Prestle,J., MacEachern,K.E., Reynolds,D.F., Hasenfuss,G., and Smith,G.L. (2004). Over-expression of FK506-binding protein FKBP12.6 alters excitation-contraction coupling in adult rabbit cardiomyocytes. *J. Physiol* 556, 919-934.
74. Lu,Q.L., Mann,C.J., Lou,F., Bou-Gharios,G., Morris,G.E., Xue,S.A., Fletcher,S., Partridge,T.A., and Wilton,S.D. (2003). Functional amounts of dystrophin produced by skipping the mutated exon in the mdx dystrophic mouse. *Nat. Med.* 9, 1009-1014.
75. MacKenzie,T.C., Kobinger,G.P., Kootstra,N.A., Radu,A., Sena-Esteves,M., Bouchard,S., Wilson,J.M., Verma,I.M., and Flake,A.W. (2002). Efficient transduction of liver and muscle after in utero injection of lentiviral vectors with different pseudotypes. *Mol. Ther.* 6, 349-358.
76. MacLellan,W.R. and Schneider,M.D. (2000). Genetic dissection of cardiac growth control pathways. *Annu. Rev. Physiol* 62, 289-319.
77. Marquez,R.T. and McCaffrey,A.P. (2008). Advances in MicroRNAs: Implications for Gene Therapists. *Human Gene Therapy* 19.
78. Marsh,J.D. (1983). The cultured heart cell: a useful model for physiological and biochemical investigation. *Int. J. Cardiol.* 3, 465-468.
79. McManus,M.T. and Sharp,P.A. (2002). Gene silencing in mammals by small interfering RNAs. *Nat. Rev. Genet.* 3, 737-747.
80. McNamara,J.O., Andrechek,E.R., Wang,Y., Viles,K.D., Rempel,R.E., Gilboa,E., Sullenger,B.A., and Giangrande,P.H. (2006). Cell type-specific delivery of siRNAs with aptamer-siRNA chimeras. *Nat. Biotechnol.* 24, 1005-1015.
81. Meister,G. and Tuschl,T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343-349.
82. Messina,E., De,A.L., Frati,G., Morrone,S., Chimenti,S., Fiordaliso,F., Salio,M., Battaglia,M., Latronico,M.V., Coletta,M., Vivarelli,E., Frati,L., Cossu,G., and Giacomello,A. (2004). Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ. Res.* 95, 911-921.
83. Mohapatra,J.K., Sanyal,A., Hemadri,D., Tosh,C., Kumar,R.M., and Bandyopadhyay,S.K. (2005). Evaluation of in vitro inhibitory potential of small interfering RNAs directed against various regions of foot-and-mouth disease virus genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329, 1133-1138.
84. Montgomery,M.K., Xu,S., and Fire,A. (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15502-15507.

85. Napoli,C., Lemieux,C., and Jorgensen,R. (1990). Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279-289.
86. Nelson,P.T., Hatzigeorgiou,A.G., and Mourelatos,Z. (2004). miRNP:mRNA association in polyribosomes in a human neuronal cell line. *RNA*. 10, 387-394.
87. Neumann,B., Guo,K., Paul,A., Greiner,T.O., Graessle,A., Walter,C., Walker,T., Scheule,A., Ziemer,G., and Wendel,H.P. (2007). Perfusionists in the world of tissue engineering--a quick and easy method for safe isolation of huge quantities of porcine cardiomyocytes. *Perfusion* 22, 137-142.
88. Niessen,H.W., Krijnen,P.A., Visser,C.A., Meijer,C.J., and Hack,C.E. (2002). Intercellular adhesion molecule-1 in the heart. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 573-585.
89. Noutsias,M., Hohmann,C., Pauschinger,M., Schwimmbeck,P.L., Ostermann,K., Rode,U., Yacoub,M.H., Kuhl,U., and Schultheiss,H.P. (2003). sICAM-1 correlates with myocardial ICAM-1 expression in dilated cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 91, 153-161.
90. Obbard,D.J. and Finnegan,D.J. (2008). RNA Interference: Endogenous siRNAs Derived from Transposable Elements. *Curr. Biol.* 18, R561-R563.
91. Ockenhouse,C.F., Betageri,R., Springer,T.A., and Staunton,D.E. (1992). Plasmodium falciparum-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell* 68, 63-69.
92. Ocker,M., Neureiter,D., Lueders,M., Zopf,S., Ganslmayer,M., Hahn,E.G., Herold,C., and Schuppan,D. (2005). Variants of bcl-2 specific siRNA for silencing antiapoptotic bcl-2 in pancreatic cancer. *Gut* 54, 1298-1308.
93. Ohtsuki,I. (2007). Troponin: structure, function and dysfunction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 592, 21-36.
94. Osborn,L., Hession,C., Tizard,R., Vassallo,C., Luhowskyj,S., Chi-Rosso,G., and Lobb,R. (1989). Direct expression cloning of vascular cell adhesion molecule 1, a cytokine-induced endothelial protein that binds to lymphocytes. *Cell* 59, 1203-1211.
95. Packer,M. (1993). How should physicians view heart failure? The philosophical and physiological evolution of three conceptual models of the disease. *Am. J. Cardiol.* 71, 3C-11C.
96. Packer,M. (1995). Is tumor necrosis factor an important neurohormonal mechanism in chronic heart failure? *Circulation* 92, 1379-1382.
97. Paroo,Z. and Corey,D.R. (2004). Challenges for RNAi in vivo. *Trends Biotechnol.* 22, 390-394.
98. Pilz,G., Fraunberger,P., Appel,R., Kreuzer,E., Werdan,K., Walli,A., and Seidel,D. (1996). Early prediction of outcome in score-identified, postcardiac surgical patients at high risk for sepsis, using soluble tumor necrosis factor receptor-p55 concentrations. *Crit Care Med.* 24, 596-600.
99. Poy,M.N., Eliasson,L., Wuwajima,S., Krutzfeld,J., Ma,X., Macdonald,P.E., Pfeffer,S., and Tuschl,T. (2004). A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 432, 226-230.

100. Prondzinsky,R., Muller-Werdan,U., Pilz,G., Witthaut,R., Stabenow,I., Werdan,K., and Zerkowski,H.R. (1997). [Systemic inflammatory reactions to extracorporeal therapy measures (II): Cardiopulmonary bypass]. *Wien. Klin. Wochenschr.* 109, 346-353.
101. Raines,E.W. and Ross,R. (1996). Multiple growth factors are associated with lesions of atherosclerosis: specificity or redundancy? *Bioessays* 18, 271-282.
102. Reich,S.J., Fosnot,J., Kuroki,A., Tang,W., Yang,X., Maguire,A.M., Bennett,J., and Tolentino,M.J. (2003). Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.* 9, 210-216.
103. Riede,U.-M., Schaefer,H.-E., and Werner,M. (2004). Allgemeine und spezielle Pathologie.
104. Ross,R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126.
105. Rothlein,R., Dustin,M.L., Marlin,S.D., and Springer,T.A. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J. Immunol.* 137, 1270-1274.
106. Rozen,S. and Skaletsky,H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.* 132, 365-386.
107. Rui,T., Cepinkas,G., Feng,Q., Ho,Y.S., and Kvietys,P.R. (2001). Cardiac myocytes exposed to anoxia-reoxygenation promote neutrophil transendothelial migration. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 281, H440-H447.
108. Sachinidis,A., Fleischmann,B.K., Kolossov,E., Wartenberg,M., Sauer,H., and Hescheler,J. (2003). Cardiac specific differentiation of mouse embryonic stem cells. *Cardiovasc. Res.* 58, 278-291.
109. Sambrano,G.R., Fraser,I., Han,H., Ni,Y., O'Connell,T., Yan,Z., and Stull,J.T. (2002). Navigating the signalling network in mouse cardiac myocytes. *Nature* 420, 712-714.
110. Shan,K., Kurrelmeyer,K., Seta,Y., Wang,F., Dibbs,Z., Deswal,A., Lee-Jackson,D., and Mann,D.L. (1997). The role of cytokines in disease progression in heart failure. *Curr. Opin. Cardiol.* 12, 218-223.
111. Siegenthaler and Blum. *Klinische Pathophysiologie* 9.Auflage. 2006. Ref Type: Serial (Book,Monograph)
112. Simberg,D., Weiss,A., and Barenholz,Y. (2005). Reversible mode of binding of serum proteins to DOTAP/cholesterol Lipoplexes: a possible explanation for intravenous lipofection efficiency. *Hum. Gene Ther.* 16, 1087-1096.
113. Simms,M.G. and Walley,K.R. (1999). Activated macrophages decrease rat cardiac myocyte contractility: importance of ICAM-1-dependent adhesion. *Am. J. Physiol* 277, H253-H260.
114. Sindermann,J.R., Babij,P., Klink,J.C., Kobbert,C., Plenz,G., Ebbing,J., Fan,L., and March,K.L. (2002). Smooth muscle-specific expression of SV40 large TAg induces SMC proliferation causing adaptive arterial remodeling. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 283, H2714-H2724.
115. Song,E., Lee,S.K., Dykxhoorn,D.M., Novina,C., Zhang,D., Crawford,K., Cerny,J., Sharp,P.A., Lieberman,J., Manjunath,N., and Shankar,P.

- (2003). Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J. Virol.* 77, 7174-7181.
116. Soonpaa, M.H. and Field, L.J. (1998). Survey of studies examining mammalian cardiomyocyte DNA synthesis. *Circ. Res.* 83, 15-26.
117. Sorensen, D.R., Leirdal, M., and Sioud, M. (2003). Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J. Mol. Biol.* 327, 761-766.
118. Sperelakis, N. and Pappano, A.J. (1983). Physiology and pharmacology of developing heart cells. *Pharmacol. Ther.* 22, 1-39.
119. Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H., and Schreiber, R.D. (1998). How cells respond to interferons. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 227-264.
120. Staunton, D.E., Marlin, S.D., Stratowa, C., Dustin, M.L., and Springer, T.A. (1988). Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell* 52, 925-933.
121. Steinhilber, M.E., Lanson, N.A., Jr., Dresdner, K.P., Delcarpio, J.B., Wit, A.L., Claycomb, W.C., and Field, L.J. (1990). Proliferation in vivo and in culture of differentiated adult atrial cardiomyocytes from transgenic mice. *Am. J. Physiol* 259, H1826-H1834.
122. Terranova, V.P., Rohrbach, D.H., and Martin, G.R. (1980). Role of laminin in the attachment of PAM 212 (epithelial) cells to basement membrane collagen. *Cell* 22, 719-726.
123. Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147.
124. Thum, T. and Borlak, J. (2000). Isolation and cultivation of Ca²⁺ tolerant cardiomyocytes from the adult rat: improvements and applications. *Xenobiotica* 30, 1063-1077.
125. Tooze, J. (1981). International and European regulation of recombinant DNA research. *Univ Toledo. Law Rev.* 12, 869-890.
126. Tracey, K.J., Wei, H., Manogue, K.R., Fong, Y., Hesse, D.G., Nguyen, H.T., Kuo, G.C., Beutler, B., Cotran, R.S., Cerami, A., and . (1988). Cachectin/tumor necrosis factor induces cachexia, anemia, and inflammation. *J. Exp. Med.* 167, 1211-1227.
127. Van Rooij, E., Sutherland, L.B., Liu, N., and Williams, A.H. (2006). A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 18255-18260.
128. Walker, T., Wendel, H.P., Tetzloff, L., Heidenreich, O., and Ziemer, G. (2005). Suppression of ICAM-1 in human venous endothelial cells by small interfering RNAs. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 28, 816-820.
129. Walker, T., Wendel, H.P., Tetzloff, L., Raabe, C., Heidenreich, O., Simon, P., Scheule, A.M., and Ziemer, G. (2007). Inhibition of adhesion molecule expression on human venous endothelial cells by non-viral siRNA transfection. *J. Cell Mol. Med.* 11, 139-147.

130. Wang, Y.C., Neckelmann, N., Mayne, A., Herskowitz, A., Srinivasan, A., Sell, K.W., and hmed-Ansari, A. (1991). Establishment of a human fetal cardiac myocyte cell line. *In Vitro Cell Dev. Biol.* 27, 63-74.
131. Wei, H., Juhasz, O., Li, J., Tarasova, Y.S., and Boheler, K.R. (2005). Embryonic stem cells and cardiomyocyte differentiation: phenotypic and molecular analyses. *J. Cell Mol. Med.* 9, 804-817.
132. Werdan, K. (1998). The activated immune system in congestive heart failure--from dropsy to the cytokine paradigm. *J. Intern. Med.* 243, 87-92.
133. Werdan, K. and Reithmann, C. Neonatale und embryonale Herzmuskelzellen als Myokard-Modell: Regulation kardialer Rezeptoren. Georg Thieme Verlag Stuttgart New York . 1987.
Ref Type: Abstract
134. Witkowska, A.M. (2005). Soluble ICAM-1: a marker of vascular inflammation and lifestyle. *Cytokine* 31, 127-134.
135. Wojnicz, R., Nowalany-Kozielska, E., Wodniecki, J., Szczurek-Katanski, K., Nozynski, J., Zembala, M., and Rozek, M.M. (1998). Immunohistological diagnosis of myocarditis. Potential role of sarcolemmal induction of the MHC and ICAM-1 in the detection of autoimmune mediated myocyte injury. *Eur. Heart J.* 19, 1564-1572.
136. Wollenberger, A. (1985). Isolated heart cells as a model of the myocardium. *Basic Res. Cardiol.* 80 Suppl 2, 9-13.
137. Wollert, K.C. and Drexler, H. (2005). Clinical applications of stem cells for the heart. *Circ. Res.* 96, 151-163.
138. Woodcock, E.A. and Matkovich, S.J. (2005). Cardiomyocytes structure, function and associated pathologies. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 37, 1746-1751.
139. Xu, Y., Zhang, H.Y., Thormeyer, D., Larsson, O., Du, Q., Elmen, J., Wahlestedt, C., and Liang, Z. (2003). Effective small interfering RNAs and phosphorothioate antisense DNAs have different preferences for target sites in the luciferase mRNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 712-717.
140. Yang, G., Thompson, J.A., Fang, B., and Liu, J. (2003). Silencing of H-ras gene expression by retrovirus-mediated siRNA decreases transformation efficiency and tumorgrowth in a model of human ovarian cancer. *Oncogene* 22, 5694-5701.
141. Zender, L., Hutker, S., Liedtke, C., Tillmann, H.L., Zender, S., Mundt, B., Waltemathe, M., Gosling, T., Flemming, P., Malek, N.P., Trautwein, C., Manns, M.P., Kuhnel, F., and Kubicka, S. (2003). Caspase 8 small interfering RNA prevents acute liver failure in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 7797-7802.
142. Zeng, Y., Wagner, E.J., and Cullen, B.R. (2002). Both natural and designed micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs when expressed in human cells. *Mol. Cell* 9, 1327-1333.
143. Zhang, Y., Boado, R.J., and Pardridge, W.M. (2003). In vivo knockdown of gene expression in brain cancer with intravenous RNAi in adult rats. *J. Gene Med.* 5, 1039-1045.

9 Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei:

- Prof. Dr. med. Dr. h.c. G. Ziemer für die freundliche Bereitstellung des Themas.
- Dr. H.P. Wendel und Dr. T. Walker für die gute Beratung und Betreuung der Arbeit und die hervorragende Unterstützung bei allen Fragen während meiner Arbeit im Labor.
- Bernd Neumann, Tim Greiner, Angelika Gräßle vom Tier-OP für die Herzpräparate, den guten Kaffee und die einzigartige Arbeitsatmosphäre.
- Claudia Raabe und Liane Spranger für die freundliche Bereitstellung humaner und porciner Endothelzellen, die vielen hilfreichen Ratschläge, die Krisengespräche und das ausgezeichnete Miteinander.
- Andrea Nolte fürs Probelesen und die zahlreichen Anregungen.
- Michaela Braun, die mich in die vielen verschiedenen Arbeitstechniken und in die PCR-Thematik eingeführt hat und dabei immer eine geduldige Anlaufstelle für alle meine Fragen und Probleme war.
- Fridolin Treindl für die Hilfe bei der RT-PCR und den zahlreichen gemeinsamen Kurzpausen auf dem Balkon.
- Dr. Anja Zimmermann für die freundliche Bereitstellung des SV40-large-T-Antigen kodierenden Plasmids.
- Dr. Perikles Simon für die Hilfe bei der Auswahl der PCR-Primer
- Den Operateuren der THG Chirurgie Tübingen für die Bereitstellung der Herzohren, die gute Kooperation und das Interesse an meiner Arbeit.
- Dr. Roman Laszlo und Dr. Tahsin Bulgan für die Einführung in die Isolation von Kardiomyozyten.
- Prof. Dr. K. Dietz vom Institut für Medizinische Biometrie für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

- Beim gesamten Team des THG-Labors für die tolle Zeit und natürlich die wunderbaren Feste.

Vor allem bedanke ich mich bei meiner Familie: Meiner Frau Ina, meinen Eltern und meinen Geschwistern Carina und Stephan, die mich auf meinem bisherigen Lebensweg stets unterstützt haben und mir dieses Studium ermöglichten.

10 Lebenslauf

- Name:** Christian Bernd **Walter**
- Geburtsdatum:** 8. Juni 1982 in Nürtingen
- Eltern:** Gerhard Walter, Diplom-Ingenieur
Rosmarie Walter, Hausfrau
- Schulausbildung:** 1988 bis 1992 Uhland-Grundschule, Dettingen
1992 bis 2001 Dietrich–Bonhoeffer–Gymnasium, Metzingen
- Schulabschluss:** 2001 Allgemeines Abitur
- Zivildienst:** 2001 bis 2002 beim Bund der Katholischen Jugend in Wernau
- Studium:** WS 2002 bis SS 2004 Medizinstudium (Vorklinik) an der Eberhard Karls Universität Tübingen
Ab WS 2005 Medizinstudium (Klinik) an der Eberhard Karls Universität Tübingen
- Examen:** 2004 Physikum in Tübingen
31.10.2008 Ärztliche Prüfung (2. Abschnitt)
- Publikationen:** Neumann,B., Guo,K., Paul,A., Greiner,T.O., Graessle,A., Walter,C., Walker,T., Scheule,A., Ziemer,G., and Wendel, H.P. (2007). Perfusionists in the world of tissue engineering - a quick and easy method for safe isolation of huge quantities

of porcine cardiomyocytes. Perfusion 22, 137-142.