

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologe Martin Andreas Vogel
aus Zwickau

Tag der mündlichen Prüfung:

AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in der Behandlung des kardialen Remodellings

Gutachter: Prof. Dr. Peter Angel
Prof. Dr. Markus Hecker

Ma il cielo è sempre più blu
(Rino Gaetano)

Danksagung

Ich möchte allen danken, die zum Entstehen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Markus Hecker für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten, seiner kontinuierlichen Unterstützung sowie für die vielen hilfreichen wissenschaftlichen Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. Peter Angel gilt mein besonderer Dank für die Bereitschaft zur Übernahme des Erstgutachtens sowie der Teilnahme am Doktorandenprogramm des DKFZ, welches er mir erst ermöglicht hat. Darüber hinaus danke ich Ihm sowie Herrn Prof. Dr. Markus Hecker und Prof. Dr. Martin Müller für die anregenden Diskussionen im Rahmen des Doktorandenprogramms.

Für die exzellente Betreuung und inspirative Begeisterung zur präklinischen Forschung danke ich meinem Betreuer PD Dr. Derk Frank. Prof. Dr. Norbert Frey danke ich für die Möglichkeit diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen.

PD Dr. Oliver J. Müller danke ich ebenfalls für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes in seinem Labor. Auch bei Ihm möchte ich mich für seine kontinuierliche Unterstützung danken sowie sein immer offenes Ohr und seiner Hilfe.

Weiterhin gilt mein besonderer Dank Frau Barbara Leuchs für die Unterstützung bei der Titrierung der AAV-Produktionen, Herrn Dr. Emmanuel Chorianopoulos für die Durchführung der in dieser Studie essentiellen Ultraschalluntersuchungen und Frau Anja Feldner für die Blutdruckmessungen.

Dem Team der Interfakultären Biomedizinischen Forschungseinrichtung, insbesondere Frau Ulrike Gärtner und Frau Bianca Heil, gilt mein Dank für die Durchführung der i.v. Injektionen und der Betreuung während der versuchstierkundlichen Arbeiten.

Diese Arbeit wurde auch erst durch ein gutes Team ermöglicht, das mir im Labor zur Seite stand. In schwierigen Situationen ward ihr immer da, habt mich unterstützt und hattet immer ein offenes Ohr. Sehr oft denke ich an unsere gemeinsame Zeit auch außerhalb des Labors zurück, die ich nicht mehr missen möchte. Mein Dank gilt Andreas, Stefanie Mareen, Helene, Antje, Michael, Dominic, Karl, Jutta, Ulrike, Susann, Kai und Victor.

Bei Bettina und Lars möchte ich mich für eine wundervolle und ereignisreiche WG-Zeit in Heidelberg bedanken. Ihr habt einen in schwierigen Zeiten bei einem guten Essen und Glas Wein immer wieder aufgebaut. Nicht zu vergessen sind auch meine Freunde, die all die Jahre an mich geglaubt haben und mit denen ich eine wunderbare Zeit verbringen durfte.

Meinem Freund Sebastian danke ich von Herzen, dass er an mich glaubt und mir in dieser Zeit immer tatkräftig zur Seite stand. Mit Dir gemeinsam durchs Leben zu gehen ist einfach wunderbar und gibt mir viel Kraft.

Ganz besonders aber möchte ich den Menschen danken, die mich mein Leben lang unterstützt haben: meinen wundervollen Eltern und meiner Schwester Elian. Ihr habt nie an mir gezweifelt, mir immer den Rückhalt gegeben, den ich gebraucht habe und diesen Weg erst ermöglicht.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Zusammenfassung	X
Summary	XI
1. Einleitung	1
1.1 Kardiomyopathie	1
1.1.1 Primäre Kardiomyopathien mit genetischen Ursachen	1
1.1.2 Primäre Kardiomyopathien mit gemischten Ursachen	3
1.1.3 Primäre Kardiomyopathien mit erworbenen Ursachen	4
1.2 Das Sarkomer	5
1.3 Calcineurin-NFAT-Signalweg	7
1.4 Calsarcin-1	9
1.5 Kardiale Gentherapie	11
1.5.1 Nichtvirale kardiale Gentherapie	11
1.5.2 Virale Vektoren zur kardialen Gentherapie	12
1.5.2.1 Adenoviren	12
1.5.2.2 Adeno-assoziierte Viren (AAV)	13
1.6 Zielsetzung der Arbeit	16
2. Material	17
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel	17
2.1.1 Allgemeine Chemikalien	17
2.1.2 Spezielle Materialien	18
2.1.3 Verbrauchsmittel	18
2.1.4 Komplettsysteme	19
2.1.5 Geräte	19
2.2 Molekularbiologische Arbeiten	20
2.2.1 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten	20
2.2.2 Medien und Zusätze für Bakterienkulturen	21
2.2.3 DNA-Längenstandards	21
2.2.4 Plasmide	22
2.2.5 Oligonukleotide	22
2.2.6 Enzyme und Restriktionsenzyme	23
2.3 Zellbiologische Arbeiten	23

2.3.1	Lösungen und Medien für Zellkulturen	23
2.3.2	Transfektionsreagenzien	23
2.3.3	Virusproduktion	23
2.4	Proteinbiochemische Arbeiten	24
2.4.1	Proteinextraktion	24
2.4.2	Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot	24
2.4.3	SDS-Polyacrylamidgele	25
2.4.4	Protein-Längenstandards	25
2.4.5	Primärantikörper	25
2.4.6	Sekundärantikörper	25
2.5	Organismen	26
2.5.1	Bakterienstämme	26
2.5.2	Eukaryontische Zelllinien	26
2.6	Versuchstierkundliche Arbeiten	26
2.6.1	<i>Mus musculus</i> – Versuchstiere	26
2.6.2	Lösungen, Materialien und Medikamente für versuchstierkundliche Arbeiten	26
2.6.3	Bestimmung des systolischen Blutdrucks	26
2.6.4	Histologische Analysen	27
3.	Methoden	28
3.1	Molekularbiologische Arbeiten	28
3.1.1	Präparation von Nukleinsäuren	28
3.1.1.1	Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen	28
3.1.1.2	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und Enzymreaktionen	28
3.1.1.3	Isolierung von totaler RNA aus Gewebe	29
3.1.1.4	Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien	29
3.1.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	29
3.1.2	cDNA-Synthese	30
3.1.3	Polymerasekettenreaktion	30
3.1.3.1	Standard-PCR	31
3.1.3.2	Genotypisierungs-PCR	31
3.1.4	Quantitative Real-Time PCR-Analyse (qRT-PCR)	32
3.1.5	Agarosegelelektrophorese	32
3.1.6	Restriktionsverdau	33
3.1.7	Sequenzierung	33
3.1.8	Klonierung und Transformation	33

3.1.8.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien	33
3.1.8.2 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien	34
3.1.8.3 Ligation doppelsträngiger DNA	34
3.1.8.4 Klonierung des pds-CMV _{enh} -MLC0.26-Calsarcin-1 Konstrukts	35
3.1.8.5 Kontrollkonstrukt pds-CMV _{enh} -MLC0.26-hrLuc	36
3.2 Zellbiologische Arbeiten	37
3.2.1 Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen	37
3.2.2 Transfektion eukaryontischer Zellen	38
3.2.3 Virenproduktion	38
3.2.3.1 Transfektion eukaryontischer HEK293T-Zellen zur Virusproduktion	38
3.2.3.2 Ernte und Aufreinigung rekombinanter AAVs	39
3.2.3.3 Quantifizierung rekombinanter AAVs	40
3.3 Proteinbiochemische Arbeiten	40
3.3.1 Aufreinigung von Proteinen aus Zelllysaten	40
3.3.2 Aufreinigung von Proteinen aus Gewebe	40
3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	41
3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	41
3.3.5 Western-Blot	41
3.4 Versuchstierkundliche Arbeiten am Modell <i>Mus musculus</i>	42
3.4.1 Haltung und Zucht von <i>Mus musculus</i>	42
3.4.2 Behandlungen und Versuchsdurchführung	42
3.4.2.1 <i>in vivo</i> Injektion der rekombinanten AAVs	42
3.4.2.2 Subkutane Implantation osmotischer Minipumpen	42
3.4.2.3 Extrakardiale Messungen	43
3.4.2.4 Bestimmung des systolischen Blutdrucks	44
3.4.2.5 Euthanisierung und Organentnahme	44
3.5 Histologische Analyse	44
3.5.1 Anfertigung von Dünnschnittpräparaten aus kryokonserviertem Herzgewebe	44
3.5.2 Masson-Trichrom-Färbung	44
3.6 Statistische Auswertungen und <i>in silico</i> Analysen	45
4 Ergebnisse	46
4.1 Generierung eines AAV9-exprimierenden Calsarcin-1 Vektors	46

4.2 AAV9-Calsarcin1 Genterapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen bei einer viralen Dosis von 2×10^{11} vG/Tier (Niedrigdosis-Studie)	47
4.2.1 Studiendesign	47
4.2.2 Morphometrische Analyse	48
4.2.3 Inhibierung des Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms	50
4.2.4 Inhibierung der Calcineurinaktivität durch eine AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Überexpression	52
4.2.5 Reduktion der Fibrose nach AAV9-Calsarcin-1 Behandlung	53
4.2.6 Nachweis der AAV9-vermittelten Überexpression von Calsarcin-1	55
4.3 AAV9-Calsarcin1 Genterapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen bei einer viralen Dosis von 1×10^{12} vG/Tier (Hochdosis-Studie)	57
4.3.1 Morphometrische Analyse	58
4.3.2 Inhibierung des Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms	59
4.3.3 Inhibierung der Calcineurinaktivität durch eine AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Überexpression	61
4.3.4 Reduktion der Angiotensin II-vermittelten Fibrose nach AAV9-Calsarcin-1 Behandlung	61
4.3.5 Nachweis der AAV9-vermittelten Überexpression von Calsarcin-1	63
4.4 AAV9-Calsarcin1 Genterapie in mit Angiotensin II-behandelten CS1-KO-Mäusen bei einer viralen Dosis von 1×10^{12} vG/Tier	65
4.4.1 Morphometrische Analyse	65
4.4.2 Analyse des hypertrophen Genprogramms	68
4.4.3 Inhibierung der Calcineurinaktivität durch eine AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Überexpression	70
4.4.4 Reduktion der Kollagen III mRNA-Expression nach AAV9-Calsarcin-1 Behandlung	71
4.4.5 Nachweis der AAV9-vermittelten Überexpression von Calsarcin-1	72
5 Diskussion	74
5.1 Generierung eines AAV9-exprimierenden Calsarcin-1 Vektors	74
5.2 AAV9-Calsarcin-1 Genterapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen	75
5.2.1 Morphometrische Analyse	75

5.2.2 AAV9-Calsarcin-1 Überexpression inhibiert das Angiotensin II-induzierte hypertrophe Genprogramm sowie den Calcineurin-NFAT-Signalweg	76
5.2.3 Reduktion der Angiotensin II-induzierten Fibrose nach AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie	78
5.3 AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten CS1-KO-Mäusen	79
5.3.1 Morphometrische Analyse	79
5.3.2 Aktivierung des hypertrophen Genprogramms sowie des Calcineurin-NFAT-Signalwegs in CS1-KO-Mäusen	80
5.3.3 Reduktion der Angiotensin II-induzierten Fibrose nach AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie	81
5.4 AAV9-Calsarcin-1 als Gentherapievektor	81
5.4.1 AAV9-Calsarcin-1 Expressionsniveau	81
5.4.2 Therapeutische Relevanz einer AAV9-basierten Calsarcin-1 Gentherapie	83
6 Literaturverzeichnis	84

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Einteilung der primären Kardiomyopathien nach ihren Ursachen	1
Abb. 1.2	Vergleich eines hypertrophierten und dilatierten mit einem normalen Herzen	2
Abb. 1.3	Fibrosezunahme und Veränderung der Zellarchitektur beim hypertrophen Herzen	2
Abb. 1.4	Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme eines kardialen Sarkomers	5
Abb. 1.5	Schematische Darstellung des Calciumzyklus in Kardiomyozyten	6
Abb. 1.6	Schematische Darstellung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin	7
Abb. 1.7	Schematische Darstellung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs	8
Abb. 1.8	Myokardhypertrophie-Entwicklung in Calcineurin-transgenen Mäusen sowie Calcineurin-transgenen Calsarcin-1-KO-Mäusen	10
Abb. 3.1	Vektorkarte pds-CMV _{enh} -MLC0.26-Calsarcin-1	36
Abb. 3.2	Vektorkarte pds-CMV _{enh} -MLC0.26-hrLuc	37
Abb. 4.1	Nachweis der AAV9-basierten <i>in vivo</i> Calsarcin-1 Expression im Myokard von CS1-KO-Mäusen	46
Abb. 4.2	Studiendesign zur AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen bei einer injizierten viralen Dosis von je 2×10^{11} vG/Tier	48
Abb. 4.3	Echokardiographische Analyse der fraktionellen Verkürzung sowie des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen	49
Abb. 4.4	Analyse des Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnisses in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)	50
Abb. 4.5	Real-Time PCR-Analyse des durch Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)	51
Abb. 4.6	Analyse der Calcineurinaktivität über RCAN1-4 bei kontinuierlicher Angiotensin II-Infusion im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)	52
Abb. 4.7	Analyse der durch Angiotensin II-induzierten Fibrose in mitventrikulären Gewebsschnitten des Herzens von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)	54
Abb. 4.8	Real-Time PCR-Analyse der Kollagen III mRNA-Expression im Herzmuskelgewebe von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)	55
Abb. 4.9	Analyse einer AAV9-vermittelten Calsarcin-1 Überexpression im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)	56

Abb. 4.10	Studiendesign zur AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen bei einer injizierten viralen Dosis von je 1×10^{12} vG/Tier	57
Abb. 4.11	Bestimmung des systolischen Blutdrucks der mit osmotischen Minipumpen versehenen Versuchsgruppen in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)	58
Abb. 4.12	Analyse des Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnisses in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)	59
Abb. 4.13	Real-Time PCR-Analyse des durch Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)	60
Abb. 4.14	Analyse der Calcineurinaktivität über RCAN1-4 im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen unter chronischer Angiotensin II-Infusion	61
Abb. 4.15	Analyse der durch Angiotensin II-induzierten Fibrose in mitventrikulären Gewebsschnitten des Herzens von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)	62
Abb. 4.16	Real-Time PCR-Analyse der Kollagen III mRNA-Expression im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)	62
Abb. 4.17	Analyse der AAV9-vermittelten Calsarcin-1 Überexpression im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)	64
Abb. 4.18	Bestimmung des systolischen Blutdrucks der mit osmotischen Minipumpen versehenen Versuchsgruppen in CS1-KO-Mäusen	65
Abb. 4.19	Echokardiographische Analyse der fraktionellen Verkürzung, des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels sowie der Hinterwanddicke des linken Ventrikels in CS1-KO-Mäusen	67
Abb. 4.20	Analyse des Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnisses in CS1-KO-Mäusen	68
Abb. 4.21	Real-Time PCR-Analyse des hypertrophen Genprogramms im Myokard von CS1-KO-Mäusen	69
Abb. 4.22	Real-Time PCR-Analyse der Calcineurinaktivität über RCAN1-4 im Myokard von CS1-KO-Mäusen unter chronischer Angiotensin II-Infusion	70
Abb. 4.23	Real-Time PCR-Analyse der Kollagen III mRNA-Expression im Myokard von CS1-KO-Mäusen	71
Abb. 4.24	Analyse der AAV9-vermittelten Calsarcin-1 Expression im Myokard von CS1-KO-Mäusen	72

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
Abb.	Abbildung
ANF	atrialer natriuretischer Faktor
Ang-II	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II-Rezeptor Subtyp 1
β -MHC	β -Untereinheit der schweren Myosinkette
BNP	natriuretisches Peptid Typ B
bp	Basenpaar(e)
C	Cytidin
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMV	Cytomegalovirus
Cn	Calcineurin
CS1	Calsarcin-1
DCM	dilatative Kardiomyopathie
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESGCT	Europäische Gesellschaft für Gen- und Zelltherapie
et al.	und andere (et alii)
for	vorwärts (forward)
FS	fraktionelle Verkürzung
G	Guanosin
H ₂ O	Wasser
HCM	hypertrophe Kardiomyopathie
ITR	inverted terminal repeats
kb	Kilobase(n)
KO	Knockout
LB-Medium	Wachstumsmedium nach Luria und Bertani
LVEDD	linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser
miR	microRNA
MLC	leichte Myosinkette

MLP	muscle LIM-protein
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
mRNA	messenger RNA
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
OD	optische Dichte
rev	rückwärts (reverse)
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SEM	Standardfehler
T	Thymidin
vG	virale Genome
WHO	Weltgesundheitsorganisation

Zusammenfassung

Die Ursache für die Entwicklung einer Myokardhypertrophie ist häufig auf eine anhaltende biomechanische Belastung des Herzens (z.B. durch Bluthochdruck) zurückzuführen. Bei der Vermittlung einer pathologischen Hypertrophie spielt dabei die Calcium/Calmodulin-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin eine zentrale Rolle.

Frey et al. (2004) zeigten, dass Mäuse mit einem genetischen Knockout für Calsarcin-1 (CS1-KO), einem Calcineurin-interagierenden Protein, für eben diesen Signalweg sensibilisiert sind. Eine Überexpression von CS1 in transgenen Mäusen hingegen führt bei einer chronischen Infusion von Angiotensin II (Ang-II) nicht zu einer signifikanten Ausbildung einer kardialen Hypertrophie.

Um diesen potentiell schützenden Effekt von CS1 in einer kardialen Gentherapie *in vivo* zu nutzen, wurde ein adeno-assoziiierter viraler Vektor (AAV) vom Serotyp 9 (AAV9) generiert, der die kodierende murine CS1-Sequenz unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus-verstärkten verkürzten Myosinleichtkettenpromotors (CMV_{enh}-MLC0.26) exprimiert. Dieser und ein entsprechender Kontrollvektor, der eine Renilla-Luciferase exprimiert (AAV9-Ren) wurde dann in acht Wochen alte C57BL/6-Wildtyp (WT)- bzw. CS1-KO-Mäuse systemisch über die Schwanzvene mit einer viralen Dosis von 2×10^{11} und 1×10^{12} vG/Tier injiziert. Anschließend wurden die Mäuse durch osmotische Minipumpen für zwei Wochen einer chronischen Ang-II- (1000 ng/kg Körpergewicht pro min) bzw. 0,9%NaCl-Infusion ausgesetzt.

AAV9-Ren kontrollbehandelte WT- und CS1-KO-Mäuse zeigen unter Ang-II-Infusion eine kontraktile Dysfunktion mit einer signifikanten Reduktion der fraktionellen Verkürzung, eine Dilatation des linken Ventrikels sowie eine signifikante Zunahme im Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis. In WT-Mäusen führte die AAV9-basierte CS1-Überexpression zu einer signifikanten Abschwächung der linksventrikulären Dysfunktion und Fibrose sowie zur Reduktion des durch Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms (ANF, BNP, β -MHC). In CS1-KO-Mäusen konnte hingegen durch die Reexpression von CS1 lediglich eine Verbesserung der Fibrose (Reduktion der Kollagen III-mRNA-Expression) erreicht werden.

Schlussfolgernd konnte das erste Mal gezeigt werden, dass eine AAV9-basierte Expression von CS1 *in vivo* möglich ist. Die jedoch nur sehr moderate Expressionsrate (10%) von CS1 im Vergleich zum WT muss jedoch für eine erfolgreiche gentherapeutische Anwendung, z.B. durch den Einsatz von alternativen und kardialspezifischeren Promotoren weiter gesteigert werden. Ebenso sind weitere Analysen in anderen Hypertrophie-Modellen notwendig, um das Potential einer CS1-Gentherapie umfassend zu evaluieren.

Summary

Cardiac remodelling caused by sustained pressure and/or volume overload leads to the development of cardiac hypertrophy. One important molecular pathway involved in hypertrophic growth is mediated by the calcium- and calmodulin-dependent serine-threonine phosphatase calcineurin, which plays a key role in transducing calcium-dependent signals from the cytosol to the nucleus.

In previous studies Frey et al. (2004) showed that mice lacking Calcineurin-1 (CS1-KO), a calcineurin-interacting protein, are sensitized to calcineurin signaling. Conversely, mice overexpressing CS1 revealed blunted hypertrophic growth when exposed to chronic angiotensin II-infusion.

To use the protective effect of CS1, we generated an adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) containing the CS1 full length coding sequence under the control of the 0.26kb cardiac myosin light chain promoter fused to the cytomegalovirus immediate-early enhancer (CMV_{enh}-MLC0.26). AAV9-CS1 or a Renilla-luciferase control-AAV9 (AAV9-Ren) were systemically injected via the tail vein (dose 2×10^{11} and 2×10^{12} vg/animal, respectively) in 8-weeks-old male C57BL/6 wild type (WT) and CS1-KO mice. After intravenous AAV9 injection mice were subjected to long-term stimulation with angiotensin II (1000 ng/kg bodyweight per min) or 0.9% NaCl respectively using subcutaneous minipumps for two weeks.

Angiotensin II-stimulated and AAV9-Ren treated WT and CS1-KO mice showed a contractile dysfunction with a significant reduction of the fractional shortening (FS) and a dilation of the left ventricle (assessed by echocardiography) as well as an increase in heart weight/body weight ratio. In WT mice the AAV9-mediated overexpression of CS1 significantly attenuated LV-dysfunction, fibrosis and blunted the induction of the typical hypertrophic gene program (ANF, BNP, β -MHC). However, in CS1-KO mice the (low level) re-expression of CS1 only causes an improvement in fibrosis as measured by collagen III mRNA-expression. The hypertrophic gene program as well as the LV-dysfunction could not be ameliorated.

In conclusion, this is the first report of an AAV-based expression of CS1 *in vivo* with a moderate expression level of about 10% compared to WT. However, for a successful application in gene therapy, this low expression level has to be enhanced e.g. by the use of an alternative and more cardiac specific promoter. In addition, further analyses in other models of cardiac hypertrophy are necessary to estimate the potential role of CS1 as a tool for cardiac gene therapy.

1. EINLEITUNG

1.1 Kardiomyopathie

Während die Weltgesundheitsorganisation 1980 die Kardiomyopathie noch als Herzmuskelerkrankung mit unbekannter Ursache definierte (WHO, 1980), präzisierte die *American Heart Association* diese zuletzt 2006 als eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Myokards, die mit einer mechanischen und/oder elektrischen Dysfunktion assoziiert sind. Diese können auf das Herz alleine begrenzt (primäre Kardiomyopathien) oder aber auch Teil einer systemischen Erkrankung sein (sekundäre Kardiomyopathien), die dann ihrerseits zu einer fortschreitenden Herzinsuffizienz oder zum Herztod führen kann (Maron et al., 2006).

Primäre Kardiomyopathien

Die primären Kardiomyopathien können in ihren Ursachen noch weiter unterteilt werden in solche mit genetischer, gemischter (sowohl genetische als auch nicht genetische) sowie mit erworbener Ursache (siehe Abb. 1.1 (Maron et al., 2006)).

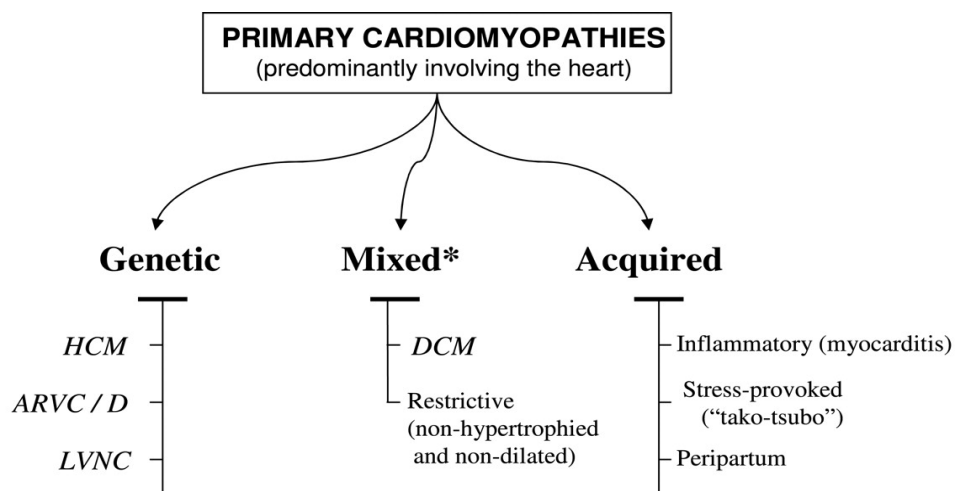


Abb. 1.1: Einteilung der primären Kardiomyopathien nach ihren Ursachen

Primäre Kardiomyopathien werden unterteilt in solche mit genetischen Ursachen, solche mit sowohl genetischen als auch nicht genetischen Ursachen (gemischt) und in diejenigen mit erworbenen Ursachen. HCM: Hypertrophe Kardiomyopathie. ARVC/D: Arrhythmogene rechtsventrikuläre Kardiomyopathie / Dysplasie. LVNC: linksventrikuläre (LV) *noncompaction*. DMC: Dilatative Kardiomyopathie. *: überwiegend nicht genetische Ursachen. Entnommen und verändert aus Maron et al. (2006).

1.1.1 Primäre Kardiomyopathien mit genetischen Ursachen

Eine zu den primären Kardiomyopathien zählende Erkrankung mit genetischer Ursache ist die **hypertrophe Kardiomyopathie (HCM)**, die autosomal-dominant vererbt wird und eine Inzidenz von 1:500 aufweist (Maron et al., 1995). Klinisch ist diese Erkrankung durch ausgeprägte anatomische und histologische Veränderungen gezeichnet. So kommt es zu einer

Zunahme des Herzgewichtes verursacht durch eine zumeist asymmetrische Verdickung des linken Ventrikels bei gleichzeitiger Volumenabnahme ((Fatkin et al., 2000); siehe Abb. 1.2A).

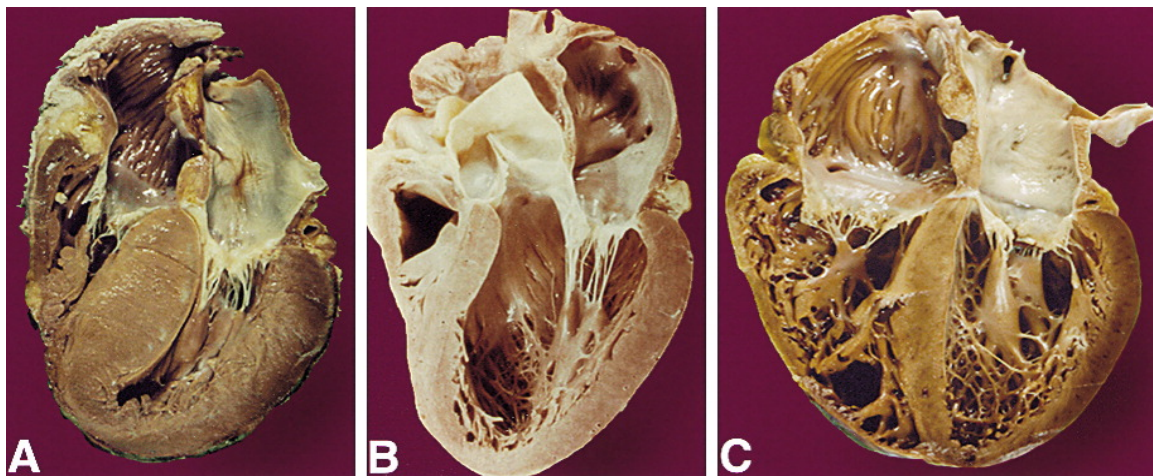


Abb. 1.2: Vergleich eines hypertrophierten und dilatierten mit einem normalen Herzen

In **B** ist ein gesundes Herz dargestellt. **A** zeigt ein hypertrophiertes Herz, bei dem es zu einer starken Zunahme der linksventrikulären Wanddicke kommt. Ein dilatiertes Herz (**C**) ist durch eine Vergrößerung des linken Ventrikels bei gleichzeitig unveränderter Wanddicke gekennzeichnet. (Seidman and Seidman, 2001).

Die hypertrophierten Myozyten zeigen auf histologischer Ebene keine regelmäßige parallele Anordnung mehr. Gleichzeitig kommt es zu einer Zunahme an fibrotischem Gewebe, was zusätzlich zu einer abnormalen Zellarchitektur der Myozyten führt (Abb. 1.3).

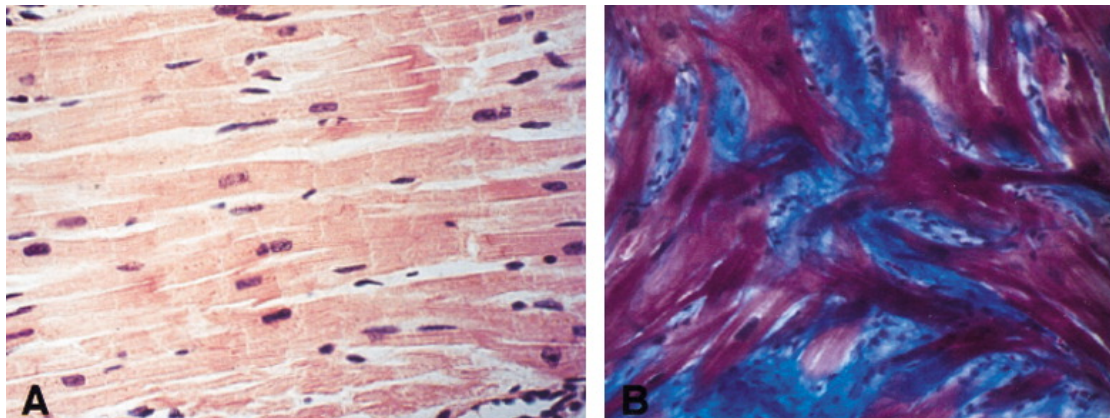


Abb. 1.3: Fibrosezunahme und Veränderung der Zellarchitektur beim hypertrophen Herzen

In **A** ist der histologische Zustand eines gesunden Herzens dargestellt, bei dem die Myozyten eine parallele Anordnung aufweisen (Hämatoxylin-Eosin-Färbung). Im erkrankten, hypertrophierten Herzen (**B**) kommt es allerdings zu einer abnormalen Zellarchitektur sowie zu einer Zunahme an fibrotischen Gewebe (blau dargestellt; Masson-Trichrom-Färbung). (Seidman and Seidman, 2001).

Während die systolische Herzfunktion meist unverändert ist, zeigt sich jedoch eine Einschränkung in der Pumpfunktion während der Diastole durch eine fehlerhafte Relaxierung des linken Ventrikels (Frey et al., 2012).

Auf molekularer Ebene fand man heraus, dass die Krankheit mit verschiedenen chromosomalen Loci und damit Gendefekten assoziiert ist, die überwiegend für Sarkomerproteine kodieren wie z.B. β -MHC (β -Untereinheit der schweren Myosinkette) auf

Chromosom 14q12 (Jarcho et al., 1989), kardiales Troponin T auf 1q32 (Watkins et al., 1993), das kardiale myosinbindende Protein C (Carrier et al., 1993) auf Chromosom 11p11 sowie das auf Chromosom 15q12 codierte α -Tropomyosin (Thierfelder et al., 1993). Dabei kann es durch Mutationen in den jeweiligen chromosomalen Loci sowohl zu einer reduzierten Menge des funktionellen Proteins kommen (Haploinsuffizienz) oder zur Bildung von fehlerhaften Proteinen (dominant-negative Mutationen). Letzteres wurde insbesondere für Mutationen des Troponin T (Oberst et al., 1998; Tardiff et al., 1998), des myosinbindenden Proteins C (Yang et al., 1998) sowie der β -Untereinheit der schweren Myosinkette (Geisterfer-Lowrance et al., 1996) in Tierversuchen gezeigt, bei denen die humane Mutation in das Genom von Mäusen und Ratten eingebracht wurde (Marian et al., 1999). Dabei korrelierte die Menge des mutierten Proteins mit der Stärke der Fehlfunktion der Myozyten (Yang et al., 1998).

1.1.2 Primäre Kardiomyopathien mit gemischten Ursachen

Die Gruppe der gemischten primären Kardiomyopathien umfasst Krankheiten, deren Ursachen sowohl erworben als auch genetisch bedingt sein können. Eine der häufigsten Formen umfasst dabei die **dilatative Kardiomyopathie (DCM)**, die mit einer Prävalenz von 1:2500 auftritt und damit zu einer der häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz zählt. Die DCM ist durch eine Vergrößerung des linken Ventrikels bei einer meist gleichbleibenden oder gar abnehmenden linksventrikulären Wanddicke gekennzeichnet (siehe Abb. 1.2C), was zu einer systolischen Dysfunktion führt (Fatkin et al., 2010). Neben der Ausbildung einer Herzinsuffizienz führt die DCM u.a. zu Arrhythmien und Thromboembolien (Cohn et al., 1997).

Der Anteil der genetisch bedingten Ursachen bei einer DCM wird auf 35% geschätzt (Grünig et al., 1998), wobei eine autosomal-dominante Vererbung am häufigsten anzutreffen ist (Seidman and Seidman, 2001). Einige dieser Mutationen finden sich in Genen wieder, die auch bei einer HCM betroffen sind: die β -Untereinheit der schweren Myosinkette, das kardiale Troponin T (Kamisago et al., 2000) sowie das kardiale Aktin (Olson et al., 1998). Beim Aktin führen dabei zwei bekannte Mutationen zu einer fehlgefalteten Proteinstuktur, die die Interaktion von Aktin mit dem Zytoskelett stört (Olson et al., 1998). Die beschriebenen Missense-Mutationen der β -Untereinheit der schweren Myosinkette führen zu einer verringerten Kraftübertragung des kontraktilen Apparates. Die Mutationen selbst sind dabei an anderen Positionen lokalisiert als diejenigen, die zu einer HCM führen (Dominguez et al., 1998; Rayment et al., 1995). Auch die für das kardiale Troponin T beschriebene Mutation

befindet sich an einer anderen Stelle als die zur HCM führende Mutation (Filatov et al., 1999).

Das Rückgrat der kardialen sarkomeren Z-Scheibe wird von α -Actinin 2 gebildet und stellt einen Verankerungspunkt für die Aktinfilamente dar. Eine bekannte Missense-Mutation in diesem Gen, die zu einem Aminosäureaustausch im N-Terminus des Proteins führt, verursacht durch eine verminderte Interaktion mit MLP (muscle LIM protein) eine DCM (Mohapatra et al., 2003). Für MLP selbst wurde 1997 das erste KO-Mausmodell für eine DCM generiert (Arber et al., 1997). Wie von Knöll et al. (2002) gezeigt wurde, nimmt MLP eine wichtige Funktion in der Mechanotransduktion über die N-terminale Verknüpfung mit Telethonin / T-Cap ein. Eine Zerstörung dieser Interaktion, verursacht z.B. durch eine Missense-Mutation, führt beim Menschen zur Ausbildung einer DCM (Knöll et al., 2002). Auch bekannte Mutationen im Interaktionspartner Telethonin / T-Cap selbst, führen zur Entwicklung einer DCM beim Menschen (Hayashi et al., 2004; Knöll et al., 2002).

Neben Mutationen, die den kontraktilen Apparat in seiner Funktion beeinträchtigen, sind auch solche bekannt, die das Zytoskelett betreffen wie z.B. Dystrophin und andere Sarkoglykane (Straub and Campbell, 1997). Das Dystrophin stellt strukturell eine Verbindung zwischen dem intrazellulärem Aktingerüst der Zelle und der extrazellulären Matrix her (Campbell and Kahl, 1989). Die mit einem mutierten Dystrophin assoziierte muskuläre Dystrophie wird X-chromosomal rezessiv vererbt (Xp21.2) und mündet je nach Schweregrad in die milde Becker Muskeldystrophie oder die schwere Duchenne Muskeldystrophie (Biggar et al., 2001; England et al., 1990; Metules, 2002; Wagner, 2002).

1.1.3 Primäre Kardiomyopathien mit erworbenen Ursachen

Zur dritten Gruppe der primären Kardiomyopathien zählen die Erkrankungen, deren Ursachen erworben sind. Die am häufigsten vorkommende ist dabei die Myokarditis, die auf akute oder chronische Entzündungsprozesse des Myokards zurückzuführen ist. Diese wiederum werden u.a. durch Toxine und Drogen (Interleukin-2, Kokain) oder auch durch virale Infektionen mit Adenoviren, HIV u.a. hervorgerufen (Maron et al., 2006).

Auch die stressbedingte Kardiomyopathie („Tako-Tsubo“) zählt zur dritten Gruppe der primären Kardiomyopathien. Klinisch wurde diese Krankheit 1991 durch eine (reversible) linksventrikuläre systolische Dysfunktion beschrieben (Dote et al., 1991). Endogener Stress, der u.a. durch eine starke emotionale und physische Belastung ausgelöst werden kann, führt dabei zu einer exzessiven Freisetzung von Katecholaminen (Nef et al., 2010; Pilgrim and Wyss, 2008; Wittstein et al., 2005).

1.2 Das Sarkomer

Das Sarkomer bildet die funktionelle Einheit der quergestreiften Muskulatur und besteht aus einem hochspezialisierten Proteinnetzwerk (siehe Abb. 1.4).

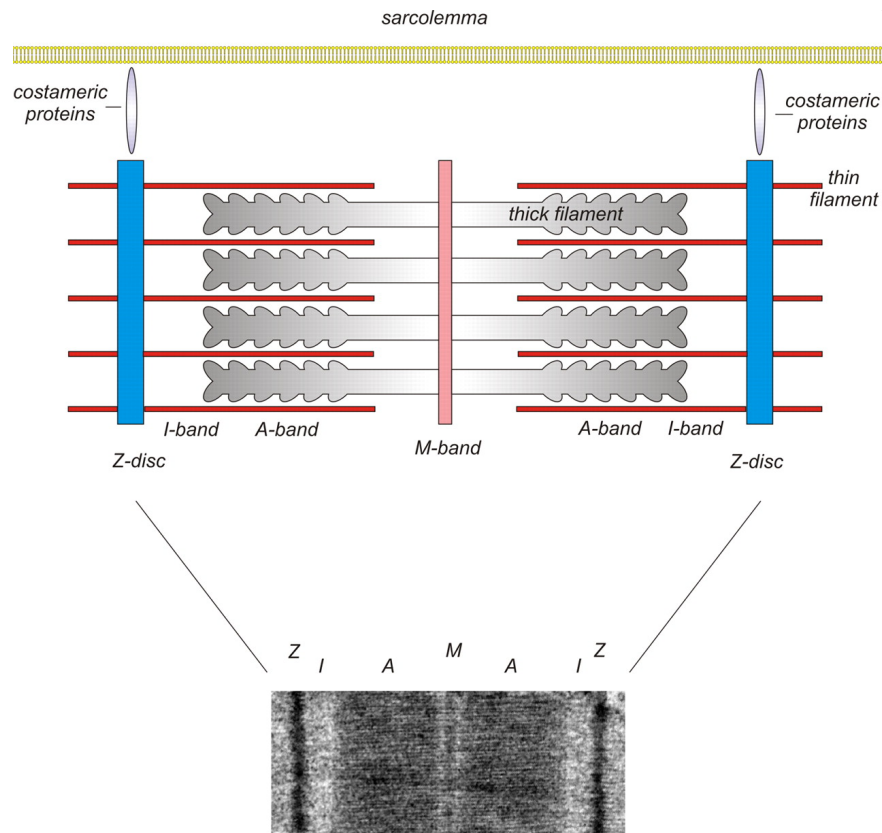


Abb. 1.4: Schematische Darstellung und elektronenmikroskopische Aufnahme eines kardialen Sarkomers

Die Z-Scheibe, als laterale Begrenzung des Sarkomers, besteht zum größten Teil aus α -Actinin und dient der Verankerung von Aktinfilamenten (*thin filament*), die ihrerseits wiederum mit Myosinfilamenten (*thick filament*) interagieren um eine Verkürzung des Sarkomers zu bewerkstelligen. Z: Z-Bande. I: I-Bande. A: A-Bande. M: M-Bande. (Frank and Frey, 2011)

Für die Krafterzeugung sind dabei hauptsächlich die dünnen Aktinfilamente (F-Aktin) und die dicken Myosinfilamente verantwortlich, während die Kraftübertragung auf das Zytoskelett hauptsächlich über Titin, Nebulin und Dystrophin bewerkstelligt wird (Rayment et al., 1993; Schiaffino and Reggiani, 1996). Untereinander werden die in Reihe angeordneten Sarkomere von der Z-Scheibe begrenzt, die überwiegend aus α -Actinin besteht. Dieses wiederum dient als Verankerungspunkt für die dünnen Aktinfilamente. Die Breite eines Sarkomers reicht dabei von 30-50 nm (Luther, 1991; Luther, 2000) in schnell kontrahierenden Skelettmuskelfibrillen bis hin zu 100-140 nm in langsamen Skelettmuskelfibrillen sowie im Herzen (Luther et al., 2002; Yamaguchi et al., 1985).

In den letzten Jahren verdichteten sich die Hinweise darauf, dass es sich beim Sarkomer nicht nur um eine rein „passive“ Funktionseinheit handelt. Man geht nun vielmehr davon aus, dass es als Vermittler bei der Wahrnehmung von biomechanischer Belastung eine wichtige Rolle

einnimmt, die dann auf molekulare Ebene weitergeleitet wird. So ist es auch nicht verwunderlich, dass die Z-Scheibe einen „Hotspot“ für Kardiomyopathien bildet, da Mutationen in den Sarkomerproteinen zu strukturellen und/oder funktionellen Veränderungen führen können (Frank et al., 2006; Frank et al., 2007; Pyle and Solaro, 2004).

Zur Ausbildung einer Herzinsuffizienz kommt es auch, wenn eine veränderte Calciumkinetik vorliegt, die z.B. durch Mutationen in Calciumrezeptoren und Pumpen verursacht werden kann (Hasenfuss and Pieske, 2002). Calcium, das intrazellulär in den Kardiomyozyten im Sarkoplasmatischen Retikulum gespeichert wird, steuert die Kontraktion der Herzmuskelzellen (siehe Abb. 1.5). Der intrazelluläre Speicher dient dabei vor allen Dingen dazu, die Konzentration an freiem Calcium zu kontrollieren. Die Freisetzung der Ca^{2+} -Ionen aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum erfolgt über die Ryanodinrezeptoren (RyR in Abb. 1.5), die ihrerseits durch über L-Typ Calciumkanäle einströmendes Calcium aktiviert werden. Nach der Muskelkontraktion pumpt die Ca^{2+} -abhängige ATPase (SERCA2) das zuvor freigesetzte Calcium wieder zurück ins Sarkoplasmatische Retikulum (MacKrell, 1999).

Murine Kardiomyozyten zeigen eine verringerte Kontraktilität, wenn ein Allel des SERCA2-Gens mutiert ist (Ji et al., 2000). Die Aktivität der ATPase wird über Phospholamban, ein integrales Membranprotein, reguliert. Mutationen im Phospholamban-kodierenden Gen führen u.a. dazu, dass es zu einem reduzierten Rücktransport des Calciums ins Sarkoplasmatische Retikulum kommt, was in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz resultiert (Schmitt et al., 2003). Eine andere von Haghghi et al. (2003) beschriebene Mutation führt zur vollständigen Inaktivierung des Phospholambans und damit zu einer fehlenden Inaktivierung der ATPase SERCA2, was eine Hyperkontraktilität des Herzens zur Folge hat (Haghghi et al., 2003).

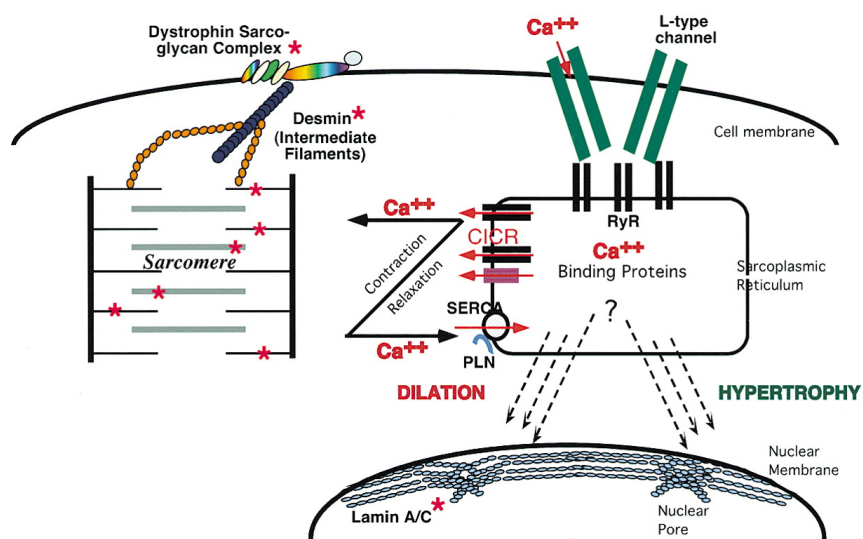


Abb. 1.5: Schematische Darstellung des Calciumzyklus in Kardiomyozyten

Schematische Darstellung des Calciumkreislaufes in Kardiomyozyten (Seidman and Seidman, 2001).

1.3 Calcineurin-NFAT-Signalweg

Calcium ist im Herzen nicht nur an der Steuerung der Kontraktilität beteiligt, sondern reguliert auch wichtige Signalmoleküle wie die Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin. Calcineurin nimmt eine wichtige Schlüsselstellung bei der Vermittlung einer pathologischen Myokardhypertrophie ein (Bueno et al., 2002; Molкетин et al., 1998). Als Serin-Threonin Phosphatase ist Calcineurin im Tierreich evolutionär konserviert. Sie besteht aus einer 57-61 kDa großen katalytischen Untereinheit (CnA), die zusätzlich über zwei EF-Hand Bindedomänen mit den calciumbindenden Proteinen Calcineurin B (CnB) sowie Calmodulin verbunden ist ((Klee et al., 1998), Abb. 1.6). Die katalytische Untereinheit CnA wird in Säugern von drei verschiedenen Genen codiert, die regulatorische Untereinheit CnB von zwei (Rusnak and Mertz, 2000), wobei im Herzen vor allem die katalytischen Formen CnA α und CnA β sowie die regulatorische Form CnB1 exprimiert werden (Molкетин, 2000).

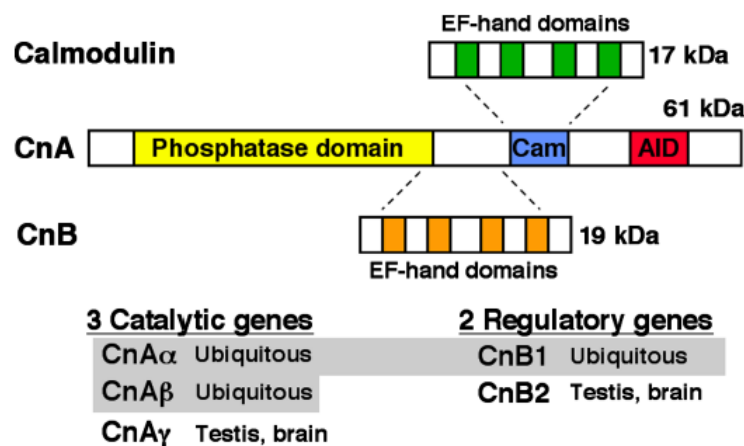


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin

Calcineurin, als Calcium/Calmodulin-abhängige Serin-Threonin-Phosphatase, besteht aus einer katalytischen Untereinheit (CnA) sowie einer regulatorischen Untereinheit CnB, die über ein EF-Hand Bindemotiv verknüpft ist. Zusätzlich ist das calciumbindende Calmodulin ebenfalls über eine EF-Hand mit CnA verbunden. In Säugetieren wird die katalytische Untereinheit von drei Genen, die regulatorische von zwei Genen codiert. Cam: Calmodulin-bindende Domäne. AID: Autoinhibitorische Domäne. (Wilkins and Molкетин, 2004).

Bei einer geringen intrazellulären Calciumkonzentration wird die katalytisch aktive Region durch die autoinhibitorischen Domäne blockiert. Steigt die Calciumkonzentration an, so bindet Calmodulin an die Calmodulin-bindende Domäne und bewirkt damit eine Konformationsänderung, bei der die katalytische Domäne sterisch nicht mehr blockiert wird (Klee et al., 1998).

Calcineurin als Phosphatase dephosphoryliert Transkriptionsfaktoren der NFAT (Nuclear Factor of activated T-cells)-Familie (NFATc1-c4) (Hogan et al., 2003). Im phosphorylierten Zustand befinden sich diese überwiegend im Zytoplasma, translozieren jedoch nach

Dephosphorylierung mehrerer konservierter Serin-Reste im N-Terminus in den Zellkern (Clipstone and Crabtree, 1992; Okamura et al., 2000). Dort interagieren sie mit anderen Transkriptionsfaktoren wie MEF-2 (Myoocyte enhance factor-2), GATA-4 (GATA-binding protein 4) oder auch AP-1 (activator protein 1)(Hogan et al., 2003), Abb. 1.7).

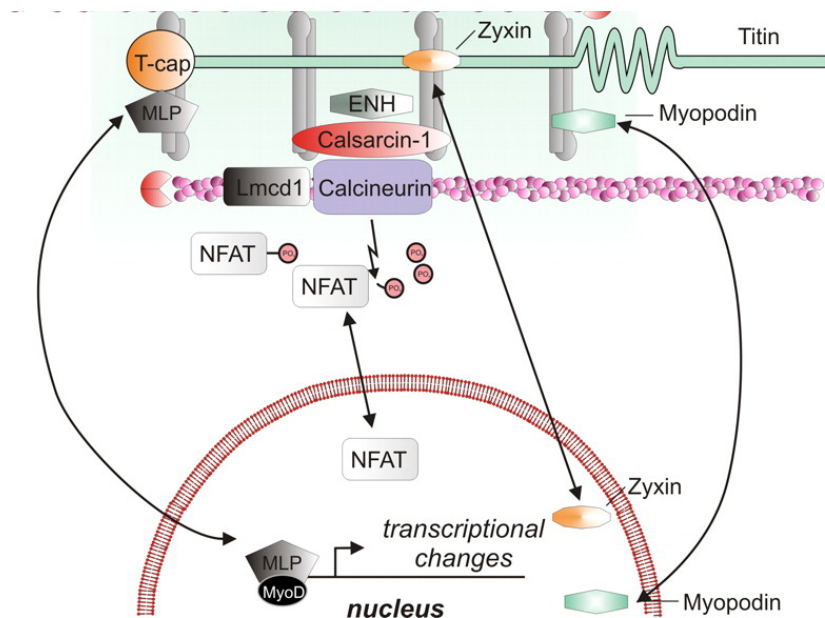


Abb. 1.7: Schematische Darstellung des Calcineurin-NFAT-Signalwegs

Dargestellt ist der Calcineurin-regulierte NFAT-Signalweg. Calcineurin als Serin-Threonin-Phosphatase dephosphoryliert Transkriptionsfaktoren der NFAT-Familie, die daraufhin in den Zellkern translozieren und dort zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren zur Aktivierung des hypertrophen Genprogramms führen. Entnommen und verändert aus Frank und Frey (2011).

Auf molekularer Ebene kommt es dann in adulten Kardiomyozyten zur Reaktivierung des hypertrophen (fötalen) Genprogramms, d.h. der Expression von β -MHC, ANF (atrialem natriuretischem Faktor) und BNP (natriuretischem Peptid Typ B) bei gleichzeitiger Expressionsabnahme von SERCA-2 und α -MHC (Braunwald and Bristow, 2000; Chien et al., 1993; Molkenin et al., 1998; Sadoshima and Izumo, 1997).

In vivo führt die konstitutive Aktivierung von Calcineurin zur Bildung einer pathologischen Hypertrophie mit der Entwicklung einer dilatativen Kardiomyopathie und Herzinsuffizienz. Im Vergleich zu unbehandelten Tieren ist die Herzgröße ca. zwei- bis dreimal so hoch (Molkenin et al., 1998).

Eine Aktivierung von Calcineurin und einer damit verbundenen Anschaltung des hypertrophen Genprogramms erfolgt auch unter den vasoaktiven Substanzen Angiotensin II, Endothelin-1 und Phenylephrin. Diese binden an $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren in der Zellmembran von Kardiomyozyten und führen zur Aktivierung der Phospholipase $C\beta$. Diese bewirkt im weiteren Verlauf (über Inositoltriphosphat IP_3) eine Zunahme der intrazellulären

Calciumkonzentration und einer damit verbundenen Aktivierung von Calcineurin (Ito et al., 1997; Sadoshima et al., 1993; Schunkert et al., 1995; Shubeita et al., 1990; Taigen et al., 2000)

Eine genetische Inaktivierung der katalytischen Untereinheit von Calcineurin im Herzen (CnA β) hingegen führt unter biomechanischer Belastung bei transaortaler Konstriktion nicht zur Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie (Bueno et al., 2002), was darauf hindeutet, dass Calcineurin für die Ausbildung der Hypertrophie notwendig zu sein scheint. Auch die Inhibierung von Calcineurin durch pharmakologische Agenzien wie Cyclosporin A oder FK506 (Tacrolimus) führen *in vivo* zu einem Ausbleiben der hypertrophen Effekte (Frey and Olson, 2003; Molkentin et al., 1998; Wilkins and Molkentin, 2004).

1.4 Calsarcin-1

Da die Phosphatase Calcineurin ubiquitär in verschiedenen Zelltypen exprimiert wird, wurde über einen Yeast-two-hybrid Screen nach Modulatoren im Herz- bzw. Skelettmuskel gesucht. Dabei fand man eine Familie Calcineurin-bindender Proteine, die als Calsarcine bezeichnet wurden (Frey and Olson, 2002; Frey et al., 2000b). Diese Familie umfasst drei Gene: Calsarcin-1 (Calcineurin-binding sarcomeric protein-1), das als einzige Isoform im adulten Herzen exprimiert wird und in langsam kontrahierenden Skelettmuskeln vom Typ I (Frey et al., 2000b) sowie Calsarcin-2 und Calsarcin-3, die im adulten Organismus ausschließlich in schnell kontrahierenden Muskelfasern vom Typ IIa und IIb vorkommen (Frey et al., 2008; Frey and Olson, 2002). Lokalisiert sind die Calsarcine an der Z-Scheibe des Sarkomers ((Frey et al., 2000b), siehe auch Abb. 1.7). Neben der Bindung von Calcineurin interagiert Calsarcin-1, auch als Myozenin-2 bekannt, u.a. auch mit dem Hauptbestandteil der Z-Scheibe α -Actinin (Frey et al., 2000b; Heineke et al., 2005; Zou et al., 2001) sowie mit Myotilin (Gontier et al., 2005) oder Mitgliedern der Enigma-Familie (von Nandelstadh et al., 2009).

Um die Rolle von Calsarcin-1 besser zu verstehen, generierten Frey et al. (2004) ein Calsarcin-1 Knockout-Mausmodell (CS1-KO-Maus). Unter basalen Bedingungen zeigen diese Tiere keine Hypertrophieentwicklung (gleichbleibendes Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis) oder Fibroseausbildung. Echokardiographische Analysen bestätigen eine Abnahme in der fraktionellen Verkürzung in CS1-KO-Mäusen bei gleichbleibendem linksventrikulärem enddiastolischem Durchmesser im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen. Auf molekularer Ebene fand sich im KO-Mausmodell eine verstärkte Expression der prohypertrophen Marker ANF und BNP sowie eine Zunahme der RCAN (regulator of calcineurin)-Expression. Eine Zunahme der Expression von RCAN korreliert dabei mit einer

verstärkten Calcineurinaktivität (Yang et al., 2000). Gleichzeitig wirkt RCAN negativ regulierend auf Calcineurin und blockt dessen Aktivität durch Bindung an die katalytische Untereinheit (Chan et al., 2005; Vega et al., 2002). Wurden jedoch CS1-KO-Mäuse in einen calcneurintransgenen Hintergrund eingekreuzt, kam es zu einer stark ausgeprägten Myokardhypertrophie (Abb. 1.8). Spätestens nach vier Wochen verstarben die Tiere. Vergleichbare hypertrophe Effekte konnten auch im CS1-KO-Modell mit transaortaler Konstriktion (Drucküberlastung) gezeigt werden (Frey et al., 2004).

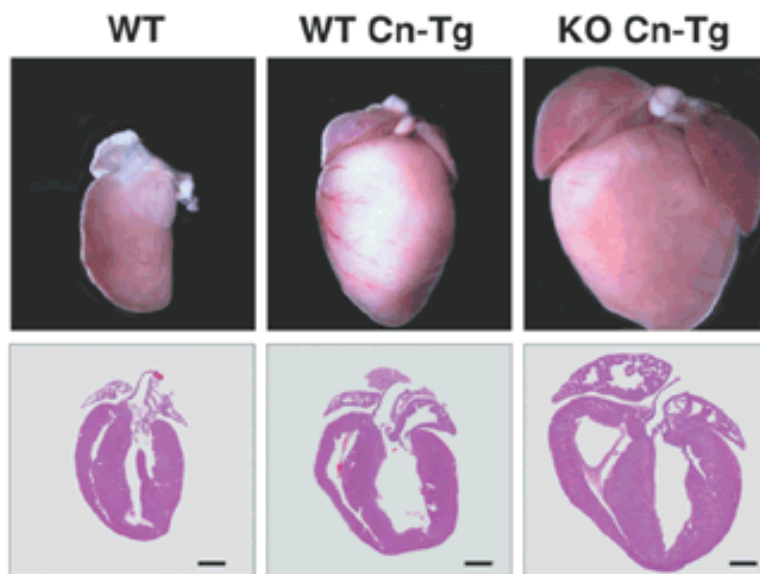


Abb. 1.8: Myokardhypertrophie-Entwicklung in Calcineurin-transgenen Mäusen sowie Calcineurin-transgenen Calsarcin-1-KO-Mäusen

Calcineurin-transgene Mäuse zeigen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine Zunahme des Herzgewicht-Körpergewichts-Verhältnisses um das Dreifache. Werden diese Tiere noch weiter in einen Calsarcin-1-KO-Hintergrund eingekreuzt kommt es zu einer noch stärkeren Myokardhypertrophie. WT: Wildtyp-Maus. WT Cn-Tg: Calcineurin-transgene Maus. KO Cn-TG: Calcineurin-transgene Maus mit gleichzeitigem Calsarcin-1 KO. (Frey et al., 2004).

Calsarcin-1 scheint damit ein negativer Modulator der Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin zu sein. Durch die fehlende Hemmung dieser Phosphatase im CS1-KO-Modell kommt es zu einer gesteigerten Aktivität von Calcineurin. Dies wird durch die Arbeit von Frank et al. (2007) bestätigt. Durch eine adenoviral-vermittelte Überexpression von Calsarcin-1 in neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte die Entstehung einer zellulären Hypertrophie *in vitro*, verursacht durch Stimulation mit Angiotensin II, Endothelin-1 oder Phenylephrin, vollständig verhindert werden. Für weitere *in vivo* Untersuchungen wurde eine Calsarcin-1-transgene Maus generiert. Diese zeigte auf Proteinebene eine Überexpression an Calsarcin-1 im Vergleich zum Wildtyp von 140% bei gleichbleibender endogener Expression.

Unter basalen Bedingungen zeigten Calsarcin-1-transgene Mäuse keine Unterschiede auf molekularer oder histologischer Ebene gegenüber Wildtyp-Mäusen. Unter einer chronischen Angiotensin-II Behandlung entwickelten dann jedoch unbehandelte Wildtyp-Mäuse eine kardiale Hypertrophie, während die transgenen Calsarcin-1-Mäuse diese Entwicklung nicht zeigten (Frank et al., 2007).

Mutationen im Calsarcin-1 Gen als Ursache für humane Kardiomyopathien sind bis jetzt nur in wenigen Fällen bekannt. Bei einer durch HCM betroffenen Familie zeigten die Erkrankten eine Punktmutation im N-terminalen Bereich (Aminosäureposition 48). Eine weitere Punktmutation, die zu einer veränderten Aminosäure führt, findet sich im C-terminalen Bereich von Calsarcin-1, die auch hier zur Entstehung einer HCM führte (Osio et al., 2007). Bisher unveröffentlichte Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Norbert Frey zeigen auch Mutationen des Calsarcin-1, die zur Entwicklung einer schweren DCM führen.

1.5 Kardiale Gentherapie

Die Europäische Gesellschaft für Gen- und Zelltherapie (ESGCT) beschreibt die Gentherapie mit dem Ziel, genetische Defekte durch zielgerichteten Transport von DNA- oder RNA-Molekülen in menschliche Zellen, Gewebe oder auch Organe zu beheben (ESGCT, 2002). Erste Gentherapiestudien wurden schon früh (ab 1990) durchgeführt, die jedoch zunächst Rückschläge u.a. durch den Tod von behandelten Patienten in Kauf nehmen mussten (Check, 2005; Hacein-Bey-Abina et al., 2003; Lehrman, 1999; Rosenberg et al., 1990) bevor sich dann im beginnenden 21. Jahrhundert erste Erfolge einstellten (Morgan et al., 2006). In den letzten vier Jahren hat sich dabei die Zahl der erfolgreich verlaufenden Gentherapiestudien stetig weiter erhöht (Mingozzi and High, 2011). Zuletzt wurde sogar die erste Gentherapie für die Behandlung eines Mangels an Lipoproteinlipase offiziell zugelassen (Gaudet et al., 2010).

1.5.1 Nichtvirale kardiale Gentherapie

Bei der nichtviralen Gentherapie kommt es zur direkten Applikation nackter Plasmid-DNA in den Skelettmuskel. Bei der Behandlung einer ausgeprägten Myokardischämie wurden dabei im Tiermodell sowie am Patienten Erfolge berichtet (Kastrup et al., 2005; Losordo et al., 2002; Losordo et al., 1998). Trotz der Vorteile dieser Form der kardialen Gentherapie durch geringe Produktionskosten, geringe Toxizität des Transgens sowie geringer Immunantwort und einer nahezu unbegrenzten Transgengröße, ist diese Therapieform jedoch für das Myokard nicht effektiv genug. Neben der geringen Transfektionseffizienz der nackten Plasmid-DNA für Kardiomyozyten wird diese schnell im Zytoplasma der Zielzellen

degradiert und nur zu einem geringen Anteil in den Zellkern transportiert (Sarkar et al., 2002; Wright et al., 2001). Verbesserungen in der Transfektionsrate konnten u.a. durch Komplexierung der nackten DNA mit Liposomen erreicht werden, was jedoch nicht zu einer Erhöhung der Myozytenspezifität führte (Miyagawa et al., 2002; Rutanen et al., 2004). Mit einem Ultraschall-gestütztem Applikationsverfahren, bei dem die DNA an sogenannte Mikrobubbles gekoppelt wurde, konnte abermals eine gesteigerte Transfektionseffizienz erreicht werden (Bekeredjian et al., 2003; Tsunoda et al., 2005). Zusammenfassend kann man sagen, dass die nichtvirale Gentherapie zwar kostengünstig ist, aber nicht die Methode der Wahl ist, um eine effektive kardiale Gentherapie durchzuführen.

1.5.2 Virale Vektoren zur kardialen Gentherapie

1.5.2.1 Adenoviren

Der Einsatz von Viren in der kardialen Gentherapie kann die Nachteile einer Plasmid-DNA gestützten Therapie umgehen. Die ersten entwickelten und verwendeten viralen Vektoren für den kardialen Gentransfer waren Adenoviren (French et al., 1994; Guzman et al., 1993). Sie besitzen ein doppelsträngiges DNA-Genom und weisen eine hohe Expressionseffizienz im Zellkern von sich teilenden und nicht teilenden Zellen auf (Volpers and Kochanek, 2004). Innerhalb der transduzierten Zellen liegt das Genom des Adenovirus in episomaler Form vor, das bereits wenige Tage nach Applikation exprimiert wird. Zu den weiteren Vorteilen der Adenoviren zählt ihre Genomgröße von über 30 kb, die es ermöglicht eine Vielzahl von therapeutischen Genen zu transportieren, sowie der verhältnismäßig geringe Aufwand hohe Virusgenomtiter zu produzieren. Dabei zeigen die Adenoviren vom Serotyp 2 und 5 einen natürlichen Tropismus für das humane Myokard (Martin et al., 1994; Pauschinger et al., 1999).

Das natürliche Vorkommen von Adenoviren als pathogene Viren hat zur Folge, dass es zu einer schnell einsetzenden Immunantwort (sowohl angeboren als auch erworben) beim Kontakt mit ihnen kommt. Als Folge dessen kommt es zur Zerstörung von mit adenoviralen Vektoren transduzierten Zellen, was im Herzen die Entwicklung einer Myokarditis bewirken kann (Calabrese and Thiene, 2003). In Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass die Effekte einer Gentherapie im Herzen daher auf 10-14 Tage begrenzt sind (Guzman et al., 1993). Die Immunantwort wird dabei vor allem durch die viralen Proteine E2, E3 und E4 ausgelöst, die mittlerweile in der dritten Generation von Adenoviren nicht mehr im Virusgenom kodiert sind (Schiedner et al., 1998). Einen weiteren Nachteil stellt der breite Tropismus der Adenoviren für viele menschliche Gewebetypen (Herz, Pankreas, Testis,

Lunge, Leber, Darm) dar, die den Coxsackie-Adenovirus Rezeptor (CAR) als primären Rezeptor für die Zelltransduktion verwenden (Tomko et al., 2000; Walters et al., 1999; Wickham et al., 1995).

1.5.2.2 Adeno-assoziierte Viren (AAV)

Die bestgeeigneten viralen Vektoren für eine kardiale Gentherapie basieren auf Adeno-assoziierten Viren (AAV), die 1965 zunächst als Kontamination von Adenoviren beschrieben wurden (Atchison et al., 1965; Mayor et al., 1965). Aufgrund ihrer Defizienz zur selbstständigen Replikation wurden sie dem Genus der Dependoviren in der Familie der Parvoviren zugeordnet (Siegl et al., 1985). Das Genom der AAVs besteht aus einer 4,7 kb umfassenden einzelsträngigen DNA, die an ihren Enden jeweils ein ITR (inverted terminal repeat) von 145 bp trägt (Bohenzky et al., 1988). Diese Strukturen sind insbesondere für die Verpackung eines rekombinanten AAVs (rAAV) von Bedeutung (McLaughlin et al., 1988). Ein Wildtyp-AAV besitzt drei codierende Bereiche. Am 5' Ende des Genoms werden dabei die zur Replikation notwendigen Rep-Gene codiert (Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40). Die Expression der beiden größeren Proteine erfolgt dabei unter dem p5-Promotor. Sie vermitteln die zielgerichtete Integration eines Wildtyp-AAVs im Menschen auf Chromosom 19q13. Die Expression der beiden kleineren Proteine erfolgt unter Nutzung des p19-Promotors. Sie besitzen beide eine Helikaseaktivität. Die Nutzung alternativer Splicingstellen ermöglicht dabei in beiden Fällen die Bildung von zwei unterschiedlich großen Transkripten (King et al., 2001; Kotin et al., 1991; Samulski et al., 1991; Tratschin et al., 1984; Weitzman et al., 1994). Ein weiterer Leserahmen findet sich am 3' Ende des Genoms und codiert für die drei Kapsiduntereinheiten VP1, VP2 und VP3, die über den p40-Promotor kontrolliert werden. Auch hier entstehen durch die Nutzung alternativer Splicingstellen und alternativer Startcodons unterschiedlich große Kapsidproteine. Das AAV-Kapsid an sich besteht aus insgesamt 60 Kapsiduntereinheiten, wobei diese im Verhältnis 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) vorkommen und eine ikosaedrische Struktur mit einem Durchmesser von 20-25 nm bilden (Gao et al., 2005; Wang et al., 2011). Kürzlich wurde in einem alternativen Leserahmen von AAV2 (AAV Serotyp 2) und anderen Serotypen ein weiteres Gen gefunden. Dieses codiert für ein zur Virusverpackung notwendiges Protein (AAP = Assembly-Activating Protein; (Sonntag et al., 2011; Sonntag et al., 2010)). Der Mechanismus zur Infektion von AAVs ist am besten für AAV2 beschrieben. Dieses nutzt als primären Rezeptor den Heperansulfat-Proteoglykan-Rezeptor zusammen mit weiteren Korezeptoren (Qing et al., 1999; Summerford et al., 1999; Summerford and Samulski, 1998). Die Internalisierung erfolgt dann in Clathrin-

umhüllten Vesikeln. Der niedrige pH-Wert in den Endosomen trägt dazu bei, dass das Virus den endosomalen Kreislauf wieder verlassen kann (Bartlett et al., 2000). Der exakte Mechanismus mit dem das Virus in seinem letzten Schritt in den Zellkern gelangt, ist noch nicht abschließend geklärt. Vermutungen legen jedoch nahe, dass es nach dem Verlassen des endosomalen Kreislaufes zu einer Exposition von drei basischen Aminosäuren der beiden Kapsiduntereinheiten VP1 und VP2 kommt, die die Translokation in den Zellkern vermitteln und damit dem Mechanismus in anderen Parvoviren ähnelt. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass es nach Injektion spezifischer AAV2- Kapsidantikörper zu einer Inhibierung der Transduktion kommt (Sonntag et al., 2006; Suikkanen et al., 2003; Vihinen-Ranta et al., 1997; Vihinen-Ranta et al., 2002).

AAVs besitzen einen breiten Tropismus. Zurzeit sind insgesamt 12 verschiedene Serotypen bekannt (AAV1-AAV12; (Daya and Berns, 2008; Srivastava, 2008)). Den höchsten Tropismus für das Myokard hat dabei AAV9, das eine mehr als 200% bessere Transduktionseffizienz als das ebenfalls kardiotrope AAV1 besitzt (Pacak et al., 2006).

Die im Gegensatz zu den anderen Viren lang anhaltende Genexpression stellt einen weiteren positiven Gesichtspunkt der Nutzung von AAVs zur kardialen Gentherapie dar. Für AAV2 wurde in einem Primatenmodell nach einmaliger intramuskulärer Injektion nach acht Jahren immer noch eine Expression des Transgens nachgewiesen (Jiang et al., 2006). Diese lange Expression ist mit einer fehlenden Immunantwort erklärbar, da die replikationsdefizienten AAVs weder toxisch noch pathogen sind (Jiang et al., 2006; Wang et al., 2004). So ist es auch nicht verwunderlich, dass AAVs sowohl in Kleintier- wie auch in Großtiermodellen zur Anwendungen kommen und dort eine stabile lang anhaltende Genexpression zeigen (Cao et al., 2007; Franco et al., 2005; Viiala et al., 2009; Woo et al., 2005).

Nach AAV-Transduktion ist die anfängliche Expression des jeweiligen Transgens zunächst noch sehr gering. Nach zwei bis vier Wochen kommt es erst zur maximalen Expression im Herzen. Grund dafür ist die zunächst stattfindende Zweitstrangsynthese der einzelsträngigen viralen DNA, die Voraussetzung zur Transgenexpression ist (Chu et al., 2003; Wright et al., 2001). Um diesen limitierende Schritt zu verbessern wurden AAVs mit doppelsträngigem Genom (selbstkomplementäre AAVs) entwickelt, die eine bis zu 100fache Verbesserung in der Transduktion durch die nicht mehr notwendige Zweitstrangsynthese zeigen. Diese Verbesserung reduziert aber die maximale Verpackungskapazität von 4,7 kb auf ca. 2,5 kb und ist daher nur für kleine Transgene geeignet (McCarty et al., 2003; McCarty et al., 2001; Wang et al., 2003).

Für einen therapeutischen Einsatz der AAVs ist die zielgerichtete Expression des Transgens wichtig. Dies wird zum einen durch den Tropismus des jeweiligen AAV-Serotyps gesteuert. Auf der anderen Seite kann man durch transkriptionelle Regulationsmechanismen ebenfalls eine Expression im gewünschten Zielgewebe erreichen. Dies ist insbesondere dann wichtig, wenn der eingesetzte AAV mit einem bestimmten Prozentsatz auch nicht erwünschte Gewebe (z.B. die Leber) transduziert. Am häufigsten werden zur Maximierung der Genexpression virale Promotoren, wie der CMV (Cytomegalovirus)-Promotor, verwendet. Durch seine konstitutive Aktivität hat dieser jedoch den Nachteil, dass er zu einer sehr unspezifischen Expression führt. Mit dem Einsatz von herzspezifischen Promotoren (z.B. Myosinleichtketten 2v-Promotor) wird die Spezifität erhöht, jedoch ist die Genexpression durch diese eher schwachen Promotoren stark reduziert (Aikawa et al., 2002; Brooks et al., 2004; Franz et al., 1993; Lee et al., 1992; Phillips et al., 2002; Qin et al., 1997). Um eine hohe gewebsspezifische Expression zu erreichen, kann man heterologe Promotoren nutzen, die aus einem viralen Element (CMV) und einem herzspezifischen Element (z.B. der Myosinleichtketten 2v-Promotor) bestehen (Boshart et al., 1985; Frey et al., 2000a; Müller et al., 2003; Müller et al., 2006).

Durch die genannten Vorteile einer AAV-vermittelten Genexpression sind mittlerweile eine Vielzahl an klinischen Studien auf den Weg gebracht worden, um verschiedenste Krankheiten zu therapieren. Die US-amerikanische Gesundheitsbehörde FDA hatte bis 2008 insgesamt 38 klinische Studien (u.a. für Cystische Fibrose, Hämophilie B und Muskeldystrophie) zugelassen (Daya and Berns, 2008). Mingozi und High (2011) berichteten letztes Jahr von aktuell 16 AAV-Genstudien, darunter auch eine zur Reexpression von SERCA2 über AAV1. Bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz im Endstadium nimmt die Aktivität der Ca^{2+} -abhängigen ATPase SERCA2 drastisch ab (Hasenfuss et al., 1994). In einer klinischen Gentherapiestudie von Jaski et al. (2009) erhielten insgesamt neun Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz (*New York Heart Association* Klassifizierung III/IV) eine einmalige intrakoronare Injektion von AAV1-SERCA2. Sieben dieser Patienten zeigten im Untersuchungszeitraum von sechs Monaten deutliche Verbesserungen (z.B. in der fraktionellen Verkürzung sowie im endsystolischen Volumen des linken Ventrikels). Bei den beiden verbleibenden Patienten ohne Verbesserungen konnten bereits vor Studienbeginn neutralisierende anti-AAV1-Antikörper nachgewiesen werden (Jaski et al., 2009).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, einen AAV-basierten kardialen Gentherapieansatz von Calsarcin-1 als Modulator der am hypertrophen Signalweg beteiligten Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphate Calcineurin zu entwickeln. In Wildtyp-Mäusen sollte dabei untersucht werden, inwieweit eine AAV9-vermittelte Überexpression von Calsarcin-1 eine durch chronische Angiotensin II-Infusion induzierte Linksherzhypertrophie hemmen kann.

Aus den dabei gewonnenen Erkenntnissen sollte eine weitere Gentherapiestudie entwickelt werden, um die im Calsarcin-1 Knockout-Mausmodell auftretende Hypertrophie durch eine AAV9-gestützte Reexpression zu verhindern.

2. MATERIAL

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmittel

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien des höchsten Reinheitsgrades (*pro analysi*) verwendet.

2.1.1 Allgemeine Chemikalien

Chemikalie	Firma
Aceton	Merck, Darmstadt
Agar	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
Ampicillin-Natriumsalz	Carl-Roth, Karlsruhe
Bacto-Hefeextrakt	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Bacto-Trypton	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Benzonase Nuclease	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
CaCl ₂ (Calciumchlorid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Chloroform	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DEPC (Diethylpyrocarbonat)	SERVA GmbH, Heidelberg
DMSO (Dimethylsulfoxid)	SERVA GmbH, Heidelberg
DTT (Dithiotreitol)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA (Ethylendinitroltetraessigsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe
Ficoll 400	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Formaldehyd (37%)	JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA
Formamid	VWR, Darmstadt
Fötales Rinderserum (FCS)	Biochrom AG, Berlin
L-Glutamin (200 mM)	Invitrogen, Karlsruhe
Glycerin	Carl-Roth, Karlsruhe
HCl (Salzsäure)	VWR, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
K-Acetat (Kaliumacetat)	Grüssing, Filsum
KCl (Kaliumchlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck, Darmstadt
MnCl ₂ (Mangandichlorid)	Grüssing, Filsum
Methanol	JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na-Acetat (Natriumacetat)	Sigma-Aldrich Taufkirchen

NaCl (Natriumchlorid)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na-Deoxycholat (Natriumdeoxycholat)	Carl-Roth, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphat)	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaOH (Natriumhydroxid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NP40 (Nonidet P40)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Optimem	Invitrogen, Karlsruhe
OptiPrep (Iodixanol)	Progen, Heidelberg
PEI (Polyethylenimin)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Penicillin-Streptomycin-Mix (10.000 U/ml:10 mg/ml)	Invitrogen, Karlsruhe
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Carl-Roth, Karlsruhe
Phenolrot	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Proteaseinhibitoren (Cocktail complete)	Roche, Mannheim
RNAse Exitus Plus	AppliChem, Darmstadt
Roti-Histokitt	Carl-Roth, Karlsruhe
RbCl ₂ (Rubidiumchlorid)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
SDS (Natriumdodecylsulfat)	SERVA GmbH, Heidelberg
Taurin	Merck, Darmstadt
TBE (Tris-Borat-EDTA) (10x)	Carl-Roth, Karlsruhe
Tris (hydroxymethyl-aminomethan; Tris-Cl)	Carl-Roth, Karlsruhe
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin 0,25% (mit EDTA)	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Xylencyanol	Fluka Chemicals, St. Gallen, Schweiz
Xylol	Carl-Roth, Karlsruhe

2.1.2 Spezielle Materialien

Material	Firma
Polystyrene CellSTACK 10 chamber	Corning, Lowell, MA, USA
Quick-Seal Tubes (10x76 mm)	Beckman-Coulter, FL, USA
Quick-Seal Tubes (25x89 mm)	Beckman-Coulter, FL, USA
Super Frost Plus Objektträger	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen
Tissue Tek	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Zentrifugenbecher konisch 250 ml	Corning, Lowell, MA, USA
Zentrifugenbecher 500 ml	Beranek Laborgeräte, Weinheim

2.1.3 Verbrauchsmittel

Material	Firma
Aqua ad iniectabilia	Braun, Melsungen
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Nerbe Plus, Winsen
Gewebekulturflaschen (T-75, T-175) mit Filter-Top	Sarstedt, Nürnberg
Kryoröhrchen	Nunc, Darmstadt
Filter (0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Optically Clear Adhesive Seal Sheets	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

PCR-Reaktionsgefäße	Biozym, Oldendorf
Pasteurpipetten	WU, Mainz
Petrischalen	Greiner, Frickenhausen
Pipettenspitzen (10 µl – 1000 µl)	Steinbrenner, Wiesbaden
Pipettenspitzen gestopft (10 µl – 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße Safe Look (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Schraubdeckelgefäße	Sarstedt, Nürnberg
Skalpell	Feather, Osaka, Japan
Thermo-Fast 96 Detection Plate	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA

2.1.4 Komplettsysteme

Komplettsystem	Firma
Expand High Fidelity PCR System (#11732641001)	Roche, Mannheim
nexttec Genomic DNA Isolation Kit for Tissues and Cells (#10.250)	nexttec, Hilgertshausen
Protein Assay Dye Reagent Kit (#500-0006)	BioRad, Hercules, CA, USA
SuperScript III First-Strand Synthesis System (#18080051)	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR GreenER qPCR Supermix for ABI (#11760500)	Invitrogen, Karlsruhe
Trichrom Stain Kit (#HT15)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
QIAGEN Plasmid Maxi Kit (#12163)	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Giga Kit (#12191)	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep Kit (#27106)	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit (#28706)	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit (#28106)	Qiagen, Hilden

2.1.5 Geräte

Gerät	Firma
ABI PRISM ® 7700	Applied Biosystems, Darmstadt
Alpha Digidoc 1000	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Blotkammer „Transblot-Mini-Cell“	BioRad, Hercules, CA, USA
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Cordless Tube Topper Modell	Beckman-Coulter, FI, USA
Digital-Kamera PowerShot A710 IS	Canon, Krefeld
Elektrophoresekammer Nukleinsäuren	Carl-Roth, Karlsruhe
Elektrophoresekammer Proteine	Invitrogen, Karlsruhe
Feinwaage ARJ 120-4M	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Gefrierschrank -20°C	Liebherr, Bieberach an der Riss
Gefrierschrank -80°C (Ultra Low TemperatureFreezer)	Sanyo, San Diego, CA, USA
Heizblock Accu Block	Labnet International, Woodbringe, NJ, USA
Homogenisator Ultra Turrax T8	IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA
ImagerGelDoc 2000	BioRad, Hercules, CA, USA
Infrared Imaging System Odyssey	LI-COR, Lincoln, NB, USA

Kugelmühle MM301	Qiagen, Hilden
Kühltisch EG 1150C	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Kryotom CM3050S	Leica Microsystems GmbH, Wetzlar
Mikroskop Eclipse 90i mit DS-Ri1	Nikon, Düsseldorf
Mikroskop Axioskop 2 plus	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
pH-Meter HI 221	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer-ND-1000 Spectrophotometer	peqlab, Erlangen
Power Pac 300 - Spannungsggerät	BioRad, Hercules, CA, USA
Präzisionswaage 440-47	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Rotoren für Ultrazentrifuge (T-1270 und 50.2Ti)	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Schüttelinkubator	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Sonos 5500	Philips, Eindhoven, Niederlande
Spectra	Tecan, Männedorf, Schweiz
Thermocycler "ep gradient S"	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermosealer ALPSTM50V	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Ultraschallkopf S12 Transducer	Philips, Eindhoven, Niederlande
Ultrazentrifuge Discovery 90SE	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Zentrifuge - Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge - GS-6KR	Beckman-Coulter, FL, USA
Zentrifuge - Kühlzentrifuge Fresco 17	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Zentrifuge - Multifuge 3 S-R	Heraeus Instruments GmbH, Hanau

2.2 Molekularbiologische Arbeiten

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Reinstwasser (*PureLab*, Siemens, München) angesetzt und anschließend durch Filtration oder im Autoklaven für 20 min bei 121°C sterilisiert.

2.2.1 Lösungen für molekularbiologische Arbeiten

10x TBE	Tris	2 M
	Borsäure	1,6% (v/v)
	EDTA	10 mM
Agarosegel	entsprechende Menge an Agarose in 1x TBE lösen aufkochen	
6x DNA-Probenpuffer	Ficoll 400	15% (w/v)
	Bromphenolblau	0,25% (w/v)
	Xylencyanol	0,25% (w/v)

RNA-Gelladepuffer	Formamid 100%	100 µl
	Formaldehyd 37%	40 µl
	5x MOPS (pH 7,0)	20 µl
	Ethidiumbromid (10 mg/ml)	1 µl
5x MOPS-Puffer	MOPS	100 mM
	Na-Acetat	50 mM
	pH 7,0	
DEPC-H ₂ O	pro 1l dH ₂ O 1ml (1%) DEPC, über Nacht rühren lassen autoklavieren	
dNTP-Mischung	#110011	Bioron, Ludwigshafen
1x PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	8 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
	pH 7,4	

2.2.2 Medien und Zusätze für Bakterienkulturen

LB-Medium	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	ad 1l dH ₂ O, autoklavieren	
LB-Agar	Bacto-Trypton	10 g
	Hefeextrakt	5 g
	NaCl	5 g
	Agar	16 g
ad 1l dH ₂ O, autoklavieren		
Ampicillin-Lösung	Ampicillin-Natriumsalz in dH ₂ O lösen c=100 mg/ml	
Tfb1-Lösung	K-Acetat	30 mM
	RbCl ₂	100 mM
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	10 mM
	MnCl ₂ * 4H ₂ O	50 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	pH 5,8	
Tfb2-Lösung	MOPS	10 mM
	CaCl ₂	75 mM
	RbCl ₂	10 mM
	Glycerin	15% (v/v)
	pH 6,5	

2.2.3 DNA-Längenstandards

100 bp DNA-Ladder	#N3231	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
2-log DNA-Ladder	#N3200	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.2.4 Plasmide

Plasmidtyp	Antibiotika-Resistenz	Herkunft
Klonierungsvektor pds-CMV _{enh} -MLC0.26-EGFP	Ampicillin	Labor PD Dr. Oliver Müller (Müller et al., 2008)
Reportergenvektor pds-CMV _{enh} -MLC0.26-hrLuc	Ampicillin	Labor PD Dr. Oliver Müller
Transgenvektor pds-CMV _{enh} -MLC0.26-Calsarcin-1	Ampicillin	in dieser Arbeit erstellt
Produktionsplasmid pDP9rs	Ampicillin	Labor Prof. Dr. Kleinschmidt, DKFZ (Sonntag et al., 2010)

2.2.5 Oligonukleotide

Alle synthetisierten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Eurofins hergestellt. Die in den Klonierungsprimern vorhandenen Restriktionsschnittstellen wurden fett hervorgehoben.

Bezeichnung	Sequenz
Klonierungsprimer für pds-CMV_{enh}-MLC0.26-Calsarcin-1	
#4Calsarcin-BsrGI-rev	TGT ACA TCA CAG GTC ATC TGA TTC CG
#5Calsarcin-BamHI-f	GGA TCC ACC GGT CGC CAC CAT GCT ATC ACA TAG TGC CAT
Sequenzierungsprimer für pds-CMV_{enh}-MLC0.26-Calsarcin-1	
CS1_for1_1928	TGA TCA CAA CTG AGC CTA CAG
CS1_rev1_1209	GCT GTT TCC TTT GCT TCA CC
CS1_rev2_920	TGC CTC ACG ACC AAC TTC TG
CS1-BsrGI-rev	TGT ACATCA CAG GTC ATC TGA TTC CG
CS1-BamHI-for	GCC ACC ATG CTA TCA CAT AGT GCC AT
Genotypisierungsprimer für CS1-KO-Mäuse	
#6CS1neoF1	GAT GCG GTG GGC TCT ATG GCT TCT GAG GC
#7CS1genoF1	CAG TGT GTT CTA TTA CCC AGG CTG TC
#8CS1genoR2	GTC CTC ACA ACT AAT TCA TGT ACA GAT G
qRT-PCR-Primer (quantitative Real-Time-PCR)	
m18S_RT_F	TCA AGA ACG AAA GTC GGA GG
m18S_RT_R	GGA CAT CTA AGG GCA TCA C
mANF_RT_F	ACC TGC TAG ACC ACC TGG AGG AG
mANF_RT_R	CCT TGG CTG TTA TCT TCG GTA CCG G
mBNP_RT_F	GCT GCT TTG GGC ACA AGA TAG
mBNP_RT_R	GGT CTT CCT ACA ACA ACT TCA G
mbetaMHC_RT_F	GCC AAC ACC AAC CTG TCC AAG TTC
mbetaMHC_RT_R	TGC AAA GGC TCC AGG TCT GAG GGC
mRCAN14_RT_F	TCC AGC TTG GGC TTG ACT GAG
mRCAN14_RT_R	ACT GGA AGG TGG TGT CCT TGT C
mCol3a1_RT_F	TGG CCC AGC TGG TGA CAA GG
mCol3a1_RT_R	CAG CAG GGC CCT TTC CTC CC
mCS1_RT_F	TCA ACT CCG CCC AAC ACC CC
mCS1_RT_R	TCC AAA TGG AGT GGC AAC CCT GT

2.2.6 Enzyme und Restriktionsenzyme

Antarctic Phosphatase	#M0289	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
T4 DNA Ligase	#M0202	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
Taq-Polymerase (5 U/ μ l)	#10342	Invitrogen, Karlsruhe
BamHI	#R0316	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA
BsrGI	#R0575	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.3 Zellbiologische Arbeiten

2.3.1 Lösungen und Medien für Zellkulturen

DMEM (+++)	Fötales Rinderserum	10% (v/v)
	200 mM L-Glutamin	1% (v/v)
	Penicillin 10.000 U/ml	1% (v/v)
	Streptomycin 10 mg/ml	1% (v/v)
	mit DMEM unter der Sterilwerkbank mischen	
DMEM (++Ø)	Fötales Rinderserum	10% (v/v)
	200 mM L-Glutamin	1% (v/v)
	mit DMEM unter der Sterilwerkbank mischen	
Einfriermedium	DMSO	10% (v/v)
	mit DMEM (+++) unter der Sterilwerkbank mischen	
1x PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2,7 mM
	Na ₂ HPO ₄	8 mM
	KH ₂ PO ₄	2 mM
	pH 7,4	
	autoklavieren	
0,25% Trypsin-EDTA	#25200-056	Invitrogen, Karlsruhe
Opti-MEM ® I	#11058-021	Invitrogen, Karlsruhe

2.3.2 Transfektionsreagenzien

Lipofectamin™ 2000	#11668	Invitrogen, Karlsruhe
GeneJuice ®	#70967	Novagen, Darmstadt

2.3.3 Virusproduktion

PEI (Polyethylenimin)	PEI	0,323 g/l
	sterilfiltrieren	
	dreimaliger Frier-Tau-Zyklus	
Lysispuffer	Tris-HCl	50 mM (w/v)
	NaCl	150 mM (w/v)
	pH 8,5	
	sterilfiltrieren	

Benzonase-Nuclease	#E1014-25KU	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Iodixanol – Optiprep	#1114542	Progen, Heidelberg
PBS-MK	MgCl ₂	1 mM (w/v)
	KCl	2,5 mM (w/v)
	in 1x PBS lösen, steril filtrieren	
PBS-MKN	NaCl	1 M (w/v)
	in PBS-MK lösen, steril filtrieren	
Phenolrot-Lösung	Phenolrot	0,5% (w/v)
	steril filtrieren	

Iodixanol- Stufengradient

Iodixanol-Lösung (%)	60% Iodixanol	PBS-MK	PBS-MKN	Phenolrot- Lösung
15	25 ml	-	75 ml	-
25	41,6 ml	58,4 ml	-	bis zur Rotfärbung
40	66,6 ml	34,4 ml	-	-
60	100 ml	-	-	bis zur Gelbfärbung

2.4 Proteinbiochemische Arbeiten

Alle Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in Reinstwasser (*PureLab*, Siemens, München) angesetzt.

2.4.1 Proteinextraktion

RIPA	1 M Tris (pH7,5)	500 µl	
	0,5 M EDTA	1,5 ml	
	100% NP40	500 µl	
	Na-Deoxycholat	0,25 g	
	10% SDS	500 µl	
	H ₂ O	ad 50 ml	
	frisch dazu geben:		
Proteaseinhibitor 25x	2 ml		
DTT	50 µl		
4x Protein-Probenpuffer	1 M Tris-HCl (pH6,8)	10 ml	
	SDS	4 g	
	100% Glycerol	20 ml	
	Bromphenolblau	200 mg	
	H ₂ O	ad 40 ml	
	frisch dazu geben:		
	β-Mercaptoethanol	1,2 ml	

2.4.2 Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western-Blot

Anodenpuffer	Tris	12 g
	H ₂ O	ad 1 l

Kathodenpuffer	Tris	12 g
	SDS	1 g
	Taurin	12,5 g
	H ₂ O	ad 1 l
Transferpuffer	Tris	1,8 g
	Taurin	1,9 g
	H ₂ O	ad 800 ml
	frisch dazu geben: Methanol	200 ml
PBS-T	Tween20	1 ml
	PBS	1 l
Odyssey-Blocking-Puffer	#927-40000	LI-COR, Lincoln, NB, USA
PVDF-Membran Immobilon®-P, Porgengröße 0,45 µm #IPVH00010	Millipore, Eschborn	
Whatmanpapier Mini Trans-Blot® Filter Paper #1703932	BioRad, Hercules, CA, USA	

2.4.3 SDS-Polyacrylamidgele

Novex® 4-20% Tris-Glycin-Gele
#EC6028BOX Invitrogen, Karlsruhe

2.4.4 Protein-Längenstandard

Prestained Protein Marker Broad Range (7-175 kDa)
#P7709 New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

2.4.5 Primärantikörper

Monoclonal Anti-GAPDH, Clone GAPDH-71.1 (1: 20.000 eingesetzt)
#G8795 Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Rabbit Anti-Mouse **Calsarcin-1** (1:1000 eingesetzt)
#CAL511-A Alpha Diagnostic Int., San Antonio, TX, USA

Rabbit Anti-DSCR1 (**RCAN1-4**) (1:500 eingesetzt)
#D6694 Sigma-Aldrich, Taufkirchen

2.4.6 Sekundärantikörper

IRDye® 680LT Goat anti-Mouse IgG (1:10.000 eingesetzt)
#926-68020 LI-COR, Lincoln, NB, USA

IRDye® 800CW Goat anti-Mouse IgG (1:10.000 eingesetzt)
#926-32210 LI-COR, Lincoln, NB, USA

IRDye® 680LT Goat anti-Rabbit IgG (1:10.000 eingesetzt)
#926-68021 LI-COR, Lincoln, NB, USA

IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit IgG (1:10.000 eingesetzt)
#926-32211 LI-COR, Lincoln, NB, USA

2.5 Organismen

2.5.1 Bakterienstämme

One Shot ® TOP10 chemisch kompetente *E.coli* (#C4040; Invitrogen, Karlsruhe)

Genotype: F *mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) ϕ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74recA1 araD139 Δ (*ara-leu*) 7697 *galUgalK*rpsL (Str^R) *endA1 nupG* λ -*

2.5.2 Eukaryontische Zelllinien

HEK293T/17 - Humane embryonale Nierenzelle mit Expression des SV-40 T-Antigen
#CRL-11268 ATCC, Teddington, Middlesex, UK

2.6 Versuchstierkundliche Arbeiten

2.6.1 Mus musculus – Versuchstiere

C57BL/6 Wildtyp-Mäuse im C57BL/6-Hintergrund
Charles River, Wilmington, MA, USA
Janvier, Le Genest.Saint-Isle, Frankreich

CS1-KO Calsarcin-1 Knockout-Mäuse im C57BL/6-Hintergrund
(Frey et al., 2004)

2.6.2 Lösungen, Materialien und Medikamente für versuchstierkundliche Arbeiten

Autoclip-Wundklammern 9 mm
#427631 BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA

Omnican F-Spritze 1 ml mit integrierter Kanüle
#9161502 Braun, Melsungen

ALZET® Micro-Osmotic Pumps Model 1002; 0,25 μ l/h; 14 days
#1002 Durect Corporation, Cupertino, CA, USA

Isotone Kochsalzlösung 0,9% NaCl- Zulassungsnummer: 6697366.00.00
Braun, Melsungen

Angiotensin II, Human
#05-23-0101 Merck, Darmstadt

Isofluran CP ® -Zulassungsnummer: 400806.00.00
CP-Pharma, Burgdorf

Bepanthen ® Augen- und Nasensalbe -Zulassungsnummer: 6029009.00.00
Bayer, Leverkusen

Temgesic (Wirkstoff: Buprenorphin) 1ml (entspricht 0,3 mg Buprenorphin) – PZN: 345928
Reckitt Benckiser, Berkshire, UK

2.6.3 Bestimmung des systolischen Blutdrucks

Narkosegerät für Kleintiere
HNG6 H. Hözel GmbH, Wörth

2.7 Histologische Analysen

TissueFreezing Medium

#14020108926

Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Superfrost® Plus Objektträger

#J1800AMNZ

Menzel, Braunschweig

Accustain® Trichrom Farbstoffe (Masson)

#HT15

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Roti®-Histokitt

#6638

Carl-Roth, Karlsruhe

Bouins-Lösung

#HT10132

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Weigerts Eisen-Hämatoxilin-Set

#HT1079

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

3. METHODEN

3.1 Molekularbiologische Arbeiten

Alle Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Bei Arbeiten mit Mikroorganismen wurden ausschließlich sterile Lösungen, Medien, Gefäße sowie Pipetten und Pipettenspitzen verwendet. Die Sterilisation erfolgte durch Sterilfiltration (0,22 µm Filter) oder im Autoklaven bei 120°C für 20 min mit einem Überdruck von 1 Bar.

3.1.1 Präparation von Nukleinsäuren

3.1.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen

Für die Präparation von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen wurden je nach benötigter DNA-Menge folgende Systeme der Firma Qiagen benutzt:

verwendetes System	Maximalausbeute an Plasmid-DNA	Kulturvolumen
QIAprep Spin Miniprep Kit (#27106)	bis zu 20 µg	5 ml
QIAGEN Plasmid Maxi Kit (#12163)	bis zu 500 µl	250 ml
QIAGEN Plasmid Giga Kit (#12191)	bis zu 10 mg	5 l

Für die Trennung der Plasmid-DNA von der genomischen Bakterien-DNA macht man sich deren unterschiedliches Verhalten bei alkalischem pH-Wert zu Nutze. Durch die superhelikale Struktur der Plasmid-DNA denaturiert diese später als die genomische DNA der Bakterienzelle. Eine anschließende Renaturierung bewirkt, dass die genomische DNA zusammen mit anderen Zellbestandteilen (u.a. Proteine) ein Präzipitat bildet, das durch Zentrifugation sedimentiert werden kann. Diese Methode wird angewandt, um Fremd-DNA, die zuvor in einen geeigneten Vektor ligiert und in einen kompetenten Bakterienstamm transformiert wurde (siehe 3.1.8.2) zu amplifizieren und anschließend zu isolieren. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte nach Herstellerangaben.

3.1.1.2 Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen und Enzymreaktionen

Für die Klonierung und Sequenzierung von DNA-Fragmenten aus präparativen TBE-Agarosegelen oder PCR-Reaktionen (Enzymreaktionen) müssen diese zunächst von u.a. störenden Ionen und dNTPs gereinigt werden. Entsteht bei der PCR-Reaktion nur ein Amplifikat, kann dessen Aufreinigung direkt aus dem Reaktionsansatz erfolgen. Entstehen hingegen mehrerer Amplifikate, muss das entsprechende Fragment aus dem Agarosegel (vorher mit Ethidiumbromid gefärbt) mit einem sterilen Skalpell unter UV-Licht isoliert werden. Folgende Komplettsysteme der Firma Qiagen wurden verwendet:

verwendetes System	Aufreinigung von DNA aus...
QIAquick PCR Purification Kit (#28106)	PCR- Reaktionen / Enzymreaktionen
QIAquick Gel Extraction Kit (#28706)	Agarosegele

3.1.1.3 Isolierung von totaler RNA aus Gewebe

Die Isolierung muriner totaler RNA aus Gewebe erfolgte nach der Methode von Chomczynski und Sacchi (1987). Das Gewebe wurde dazu in 1 ml TRIzol (Invitrogen) aufgenommen und mittels eines Ultra Turrax auf Eis homogenisiert und anschließend für 5 min bei RT inkubiert. Das im TRIzol enthaltene Guanidiniumthiocyanat inaktiviert die in den Zellen vorhandenen RNasen und Enzyme. Das Homogenisat wurde dann in ein RNA-freies Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform gemischt und für 10 min mit 14.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase, in der sich die RNA befindet, wurde dann in ein neues RNA-freies Reaktionsgefäß überführt. Die Interphase enthält DNA und die untere Phenolphase Proteine. Im nächsten Schritt wurde die wässrige Phase mit 500 µl Isopropanol versetzt und gemischt, für 15 min bei -20°C inkubiert und anschließend 15 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Pellet mit 500 µl 75% Ethanol (in DEPC-H₂O) gewaschen und für 5 min bei 14.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde wiederum verworfen und das Pellet für ca. 10 min bei RT getrocknet und abschließend in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mittels Nanodrop ND-1000 (siehe 3.1.1.5).

3.1.1.4 Isolierung genomischer DNA aus Schwanzbiopsien

Die Isolation genomischer DNA aus Schwanzbiopsien von *Mus musculus* erfolgte mit dem „nexttec Genomic DNA Isolation Kit for Tissues and Cells“ (nexttec). Die Bestimmung des Genotyps erfolgte mittels einer Genotypisierungs-PCR (siehe 3.1.3.2).

3.1.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren sowie die Messung der optischen Dichte von Bakteriensuspensionen wurde das Nanodrop ND-1000 (peqlab) nach Herstellerangaben verwendet.

Alle Lösungen wurden unverdünnt gemessen, wobei folgende Faktoren gelten:

$$OD_{260}=1 \triangleq 50 \mu\text{g doppelsträngige DNA}$$

$$OD_{260}=1 \triangleq 40 \mu\text{g einzelsträngige RNA oder DNA}$$

$$OD_{600}=1 \triangleq 10^8 \text{ Zellen/ml (Bakteriensuspension)}$$

Um die Reinheit der gemessenen RNA bzw. DNA zu bestimmen, wurde der Quotient aus den Absorptionen bei 260 nm und 280 nm (Verhältnis Nukleinsäure / Proteingehalt) bzw. 260 nm und 230 nm (Verhältnis Nukleinsäure / Salzgehalt) gebildet. Dieser sollte unter idealen Bedingungen einen Wert von 1,8 bis 2,0 aufweisen.

3.1.2 cDNA-Synthese

Bei der cDNA-Synthese (copy DNA bzw. komplementäre DNA) wird aus RNA (Template) mittels bestimmter Primer DNA hergestellt. Um nur die polyadenylierte mRNA einer Zelle umzuschreiben, nutzt man oligo(dT)-Primer. Soll hingegen der gesamte RNA-Pool einer Zelle in cDNA transkribiert werden, dann nutzt man sogenannte Random-Hexamer-Primer. Durch sequenzspezifische Primer hat man weiterhin noch die Möglichkeit die RNA eines spezifischen Gens und damit RNA-Transkripts umzuschreiben. Die Synthese der cDNA erfolgte mit dem SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR System der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben.

3.1.3 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (engl. *polymerase chain reaction*: PCR) dient dazu *in vitro* DNA-Bereiche aus geringen Ausgangsmengen exponentiell zu amplifizieren. Die PCR beruht im Wesentlichen auf der Wiederholung dreier Schritte:

1. **Denaturierung:** Die doppelsträngige DNA wird bei 94°C in zwei Einzelstränge getrennt, so dass jeder dieser Einzelstränge als Template für die Synthese dienen kann.
2. **Annealing:** Zwei Primer (forward und reverse), die den zu amplifizierenden Sequenzabschnitt begrenzen (und zu ihm komplementär sind) binden an die einzelsträngige DNA und dienen damit als Ausgangspunkt zur Kettenverlängerung für die DNA-Polymerase, die *de novo* keine Synthese starten kann. Die Hybridisierung der Primer bezeichnet man als Annealing und findet bei Temperaturen zwischen 55-65°C statt. Diese lässt sich näherungsweise durch folgende Formel bestimmen:

$$T_A = 4x (\text{Anzahl G bzw. C}) + 2x (\text{Anzahl A bzw. T}).$$

Zur Bestimmung der exakten Annealing-Temperatur ist die Durchführung einer Gradienten-PCR erforderlich.

3. **Elongation:** Die Kettenverlängerung (Verlängerung der Primer) erfolgt bei 72°C durch die Expand High Fidelity Polymerase (Roche).

Die Länge der Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes. Für eine Länge von 1000 bp rechnet man etwa 1 min ein. Nach jedem Zyklus

(Schritte 1-3) verdoppelt sich die Anzahl der entstehenden DNA-Fragmente (exponentielle Vervielfältigung), wobei erst nach dem zweiten Zyklus DNA-Fragmente entstehen, die von beiden eingesetzten Primern begrenzt werden.

3.1.3.1 Standard-PCR:

Zur Durchführung von PCR-Reaktionen wurde das Expand High Fidelity PCR System (Roche) nach folgendem Standard-PCR-Protokoll und –Programm eingesetzt:

PCR-Protokoll:

H ₂ O	19,55 µl
10x PCR Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	3,50 µl
25 mM dNTP-Mischung	0,25 µl
Primer forward (10 pmol/µl)	0,20 µl
Primer reverse (10 pmol/µl)	0,20 µl
Expand High Fidelity Polymerase (3,5 U/µl)	0,30 µl
DNA Template (c=100 ng/µl)	<u>1,00 µl</u>
	25,00 µl

PCR-Programm:

(1)	initiale Denaturierung	94°C	5 min	1 Zyklus
(2)	Denaturierung	94°C	30 sek	} 35 Zyklen
	Annealing	x°C	30 sek	
	Elongation	72°C	1 min/1 kb	
(3)	finale Elongation	72°C	5 min	1 Zyklus
(4)	Reaktionsende	4°C		

x = Annealingtemperatur des Primerpaares

3.1.3.2 Genotypisierungs-PCR

Zur Bestimmung des Genotyps der in dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurde eine Genotypisierungs-PCR mit zwei verschiedenen Primerpaaren durchgeführt (Sequenzen siehe Abschnitt 2.2.5), mit denen unterschieden werden konnte, ob es sich um Wildtyp-Mäuse oder homozygote bzw. heterozygote CS1-KO-Mäuse handelt. Beide Primerpaare haben den gleichen reverse Primer, unterscheiden sich jedoch im forward Primer, der entweder im CS1-Exon 2 (PCR I) oder bei Deletion in einer neo-Expressionskassette bindet (PCR II). Das PCR-Produkt beider PCRs ist ca. 250 bp groß. Zeigen beide PCRs jeweils ein Amplifikat, dann liegt ein heterozygoter Genotyp vor, bei dem nur ein Allel den KO für CS1 trägt. Im Falle von Wildtyp-Mäusen ist nur in PCR I ein Amplifikat nachweisbar und bei einem homozygoten KO nur in PCR II.

Die zuvor isolierte genomische DNA wurde für die PCR 1:10 mit H₂O verdünnt.

		PCR I	PCR II
H ₂ O	6,30 µl		
10x PCR Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	1,00 µl		
25 mM dNTP-Mischung	0,10 µl		
Primer forward (10 pmol/µl)	0,50 µl	#7genoF1	#6neoF1
Primer reverse (10 pmol/µl)	0,50 µl	#8genoR2	#8genoR2
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,10 µl		
DNA Template (1:10 verdünnt)	<u>1,00 µl</u>		
	10,00 µl		

3.1.4 Quantitative Real-Time PCR-Analyse (qRT-PCR)

Zur Bestimmung des relativen Expressionsniveaus verschiedener mRNAs wurden qRT-PCRs mit dem ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems) und dem SYBR GreenER™ qPCR SuperMix for ABI PRISM® instruments (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Diese Methode basiert im Wesentlichen auf dem Prinzip einer normalen PCR, bei der zusätzlich noch die Menge an DNA (cDNA) durch den Einbau von fluoreszierenden Farbstoffen quantifiziert wird. Einer dieser Farbstoffe ist z.B. SYBR Green, der doppelsträngige DNA (z.B. PCR-Produkte) bindet und im Komplex Fluoreszenzeigenschaften zeigt (Zipper et al., 2004). Die zunehmende Fluoreszenz (gemessen am Ende der Elongation) nach jedem einzelnen PCR-Zyklus geht mit der Zunahme der PCR-Produktmenge einher. Der Punkt, bei dem die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert überschreitet, wird als Ct (Cycle threshold)-Wert bezeichnet und zur relativen Quantifizierung mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode herangezogen (Livak and Schmittgen, 2001). Zur Normalisierung wurde die ubiquitär exprimierte 18S rRNA verwendet. Die Angabe der quantifizierten Expressionsniveaus erfolgte als n-fache Expression \pm Standardfehler. Eine Liste der verwendeten Primer und deren Sequenzen findet sich in Abschnitt 2.2.5.

3.1.5 Agarosegelelektrophorese

Um die Größe von DNA- und RNA-Fragmenten zu bestimmen, können diese im Agarosegel unter Anlegung eines elektrischen Feldes aufgetrennt werden. Nukleinsäuren wandern dabei durch die negativ geladenen Phosphatreste zur Anode. Kleinere Fragmente migrieren, bedingt durch die Siebstruktur der Agarose, schneller als größere Fragmente und laufen damit im Agarosegel weiter. Je nach Größe der aufzutrennenden Fragmente wurden 1-2%ige Gele verwendet.

Zur Herstellung der Agarosegele wurde die entsprechende Menge an Agarose in 1x TBE-Puffer in einer Mikrowelle aufgekocht, abgekühlt und dann mit 0,4 µg/ml Ethidiumbromid versetzt, was später in die aufzutrennende DNA bzw. RNA interkaliert und somit eine

Visualisierung unter dem UV-Licht ermöglicht. Nach Polymerisation des Gels wurde dieses in eine Elektrophoresekammer gegeben, mit TBE-Puffer überschichtet und anschließend mit den zu analysierenden Proben (in DNA- bzw. RNA-Ladepuffer) bzw. 5 µl des 100 bp DNA-Markers (NEB) oder 2-log DNA Markers (NEB) beladen. Die Auftrennung der Nukleinsäuren erfolgte bei einer Spannung von 6-8 Volt /cm². Die Analyse erfolgt dann unter UV-Licht ($\lambda = 245$ nm).

Bei Herstellung eines RNA-Agarosegels wurde zusätzlich darauf geachtet, dass die Elektrophoresekammer vorher gründlich mit DEPC-H₂O gespült wurde um eine Degradierung der RNA zu verhindern.

3.1.6 Restriktionsverdau

Restriktionsenzyme (Restriktionsendonukleasen) sind Enzyme, die auf doppelsträngiger DNA (dsDNA) eine Abfolge von vier bis acht Basenpaaren erkennen und diese enzymatisch spalten. Sie wurden in bakteriellen Zellen gefunden und dienen dort dem Schutz vor Fremd-DNA, in dem diese an den Erkennungsstellen geschnitten und damit abgebaut wird. Methylierungen der bakteriellen DNA dienen als Schutzmechanismus, damit die eigene DNA von den Restriktionsenzymen nicht gespalten wird (Restriktions-Modifikations-System). Restriktionsenzyme können beim Schneiden überhängende Enden (sticky ends) durch versetztes Schneiden produzieren (z.B. BamHI), oder aber auch glatte Enden (blunt ends) erzeugen. Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma NEB bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

3.1.7 Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung beruht auf dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger et al., 1977). Das Grundprinzip der Sequenzierung ähnelt dabei einer normalen PCR-Reaktion bei der jedoch zusätzlich zu den dNTPs auch ddNTPs (sog. Terminatorkleotide) eingesetzt werden. Diese Nukleotide sind 2',3'-Dideoxyribosen (ddNTP) und dadurch gekennzeichnet, dass ihnen zusätzlich die Hydroxylgruppe am 3'Ende fehlt. Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins MWG GmbH durchgeführt.

3.1.8 Klonierung und Transformation

3.1.8.1 Herstellung chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Herstellung von chemisch-kompetenten *E.coli* TOP10 (siehe 2.5.1) wurde eine bei -80°C gelagerte Kultur aufgetaut, auf eine antibiotikafreie LB-Agarplatte ausgestrichen und

anschließend bei 37°C im Brutschrank über Nacht inkubiert. In 5 ml antibiotikafreiem LB-Medium wurde am nächsten Tag eine Einzelkolonie überführt und über Nacht bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Von der Suspension wurde am darauffolgenden Tag 1 ml in 100 ml warmes LB-Medium (37°C) gegeben und solange bei 37°C und 200 rpm inkubiert, bis eine OD₆₀₀ von 0,45 erreicht wurde. Die Bakteriensuspension wurde dann für 15 min auf Eis abgekühlt und die Bakterien anschließend pelletiert (3000 rpm für 15 min bei 4°C). Das Pellet wurde in 30 ml kalter, steriler Tfb1-Lösung aufgenommen, resuspendiert und dann erneut pelletiert. Die *E. coli* TOP10 Bakterien wurden dann in 5 ml kalter, steriler Tfb2-Lösung aufgenommen, in 100 µl Portionen aliquotiert und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Um die Transformationskompetenz der hergestellten Bakterien zu testen, wurde ein eingefrorenes Aliquot aufgetaut und mit einer Plasmid-DNA transformiert (siehe 3.1.8.2).

3.1.8.2 Transformation chemisch-kompetenter Bakterien

Zur Transformation von chemisch-kompetenten Bakterien wurde ein 100 µl Aliquot auf Eis aufgetaut und danach mit der entsprechenden Plasmid-DNA vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42°C und nach kurzer Abkühlung (2 min) auf Eis die Zugabe von 1 ml warmen LB-Medium. Die Suspension wurde nun 1 h bei 37°C sowie 800 rpm im Thermomixer (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Von der Suspension wurden abschließend 150-200 µl auf eine LB-Agarplatte, versetzt mit dem für das Plasmid entsprechendem Antibiotikum, ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.1.8.3 Ligation doppelsträngiger DNA

Um eine Religation von einzelnen DNA-Fragmenten zu verhindern, wird bei einem der zu ligierenden Fragmente (meist der Zielvektor) die 5'-Phosphatgruppe durch Dephosphorylierung (Antarctic Phosphatase) entfernt, wodurch diese nicht mehr mit der 3' OH-Gruppe des gleichen Fragments reagieren kann.

Die Ligation der DNA-Fragmente mit kohäsiven Enden erfolgte mit der T4-DNA-Ligase (NEB) nach Herstellerangaben bei 16°C über Nacht. Vektor und Insert wurden dabei in einem molaren Verhältnis von 1:1 bis 1:3 eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde dann zur Transformation mit chemisch-kompetenten Bakterien verwendet.

3.1.8.4 Klonierung des pds-CMV_{enh}-MLC0.26-Calsarcin-1 Konstrukts

Ziel der Klonierung war es, die kodierende Sequenz (CDS) des murinen Calsarcin-1 (myozenin 2; Accession Number NM_021503, Pos. 182-976) in das Konstrukt pds-CMV_{enh}-MLC0.26-EGFP unter der Entfernung des EGFPs (720 bp) zu klonieren. Dazu wurde die CDS von Calsarcin-1 mit dem Expand High Fidelity PCR System (Roche) aus einer mit oligo(dT)-Primern hergestellten murinen C57BL/6 cDNA Bibliothek amplifiziert (Labor Prof. Dr. Frey). Die verwendeten Primer wurden zusätzlich so modifiziert, dass sowohl am 5' wie auch am 3'-Ende Restriktionsschnittstellen (5' BamHI, 3' BsrGI) eingefügt wurden. Darüber hinaus enthielt der forward Primer direkt vor dem ATG-Startcodon noch eine Kozak-Sequenz (Kozak, 1987).

Die Amplifikation erfolgt nach folgendem PCR-Protokoll:

H ₂ O	39,10 µl
10x PCR Puffer (inkl. 15 mM MgCl ₂)	7,00 µl
25 mM dNTP-Mischung	0,50 µl
Primer forward #5 (10 pmol/µl)	0,40 µl
Primer reverse #4 (10 pmol/µl)	0,40 µl
Expand High Fidelity Polymerase (3,5 U/µl)	0,60 µl
C57Bl/6 cDNA Template (c=100 ng/µl)	<u>2,00 µl</u>
	50,00 µl

Alle Komponenten wurden auf Eis pipettiert. Die Amplifikation des ca. 800 bp großen PCR-Produkts erfolgte mit folgendem PCR-Programm:

(1)	initiale Denaturierung	94°C	5 min	1 Zyklus
(2)	Denaturierung	94°C	30 sek	} 35 Zyklen
	Annealing	60°C	30 sek	
	Elongation	72°C	1 min	
(3)	finale Elongation	72°C	5 min	1 Zyklus
(4)	Reaktionsende	4°C		

Danach wurde der Gesamt-PCR-Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und das PCR-Produkt aufgereinigt (siehe 3.1.1.2). Im Anschluss wurde sowohl der Zielvektor pds-CMV_{enh}-MLC0.26-EGFP wie auch das aufgereinigte PCR-Produkt mit den Restriktionsendonukleasen BamHI und BsrGI (NEB) nach Herstellerangaben über Nacht bei 37°C inkubiert (siehe 3.1.6). Der geschnittene Zielvektor wurde nun ebenfalls über ein 1%iges Agarosegel aufgereinigt, um das herausgeschnittene EGFP (720 bp) vom restlichen Konstrukt pds-CMV_{enh}-MLC0.26 (5320 bp) zu trennen und aufzureinigen. Der Zielvektor wurde zusätzlich noch mit der Antarctic Phosphatase (NEB) behandelt um eine

Rezirkularisierung während der Ligation mit dem PCR-Produkt zu verhindern (siehe 3.1.8.3). Der komplette Ligationsansatz wurde abschließend in *E.coli* TOP10 transformiert (siehe 3.1.8.2). Das entstandene Konstrukt pds-CMV_{enh}-MLC0.26-Calsarcin-1 hat eine Größe von 6174 bp (Abb. 3.1). Zur Kontrolle wurde das klonierte Konstrukt nochmals einem Kontrollverdau unterzogen und sequenziert (MWG Eurofins).

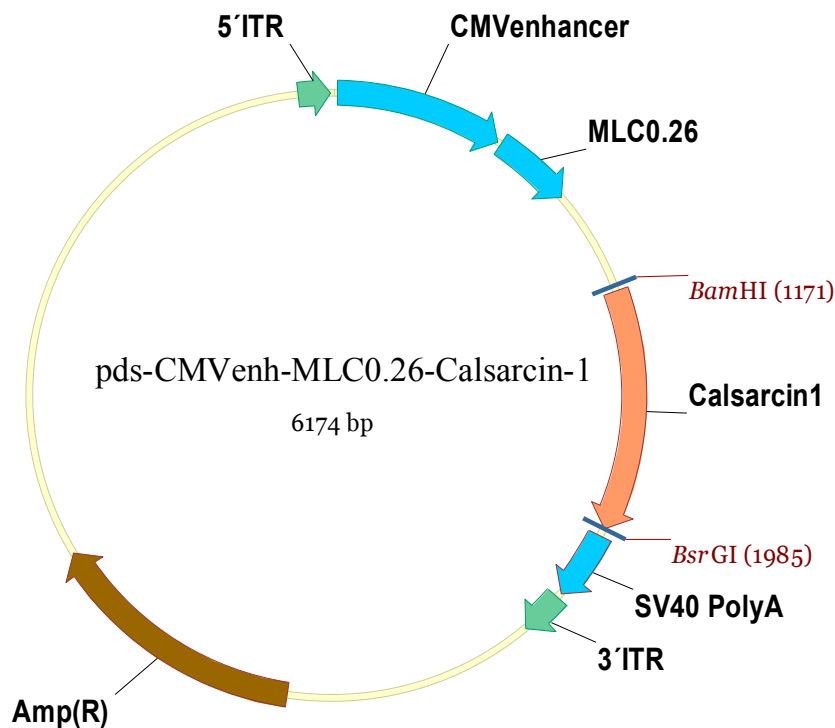


Abb. 3.1: Vektorkarte pds-CMV_{enh}-MLC0.26-Calsarcin-1

3.1.8.5 Kontrollkonstrukt pds-CMV_{enh}-MLC0.26-hrLuc

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen und Versuche wurde ein Kontrollkonstrukt gewählt, das anstatt der CDS von Calsarcin-1 die der rekombinanten Renilla-Luciferase trägt. Dieses Reportergen wird transkriptionell ebenfalls durch den CMV-verstärkten Myosinleichtkettenpromotor (CMV_{enh}-MLC0.26) exprimiert (Abb.3.2). Das Konstrukt war bereits in der Arbeitsgruppe von PD Dr. Oliver Müller vorhanden.

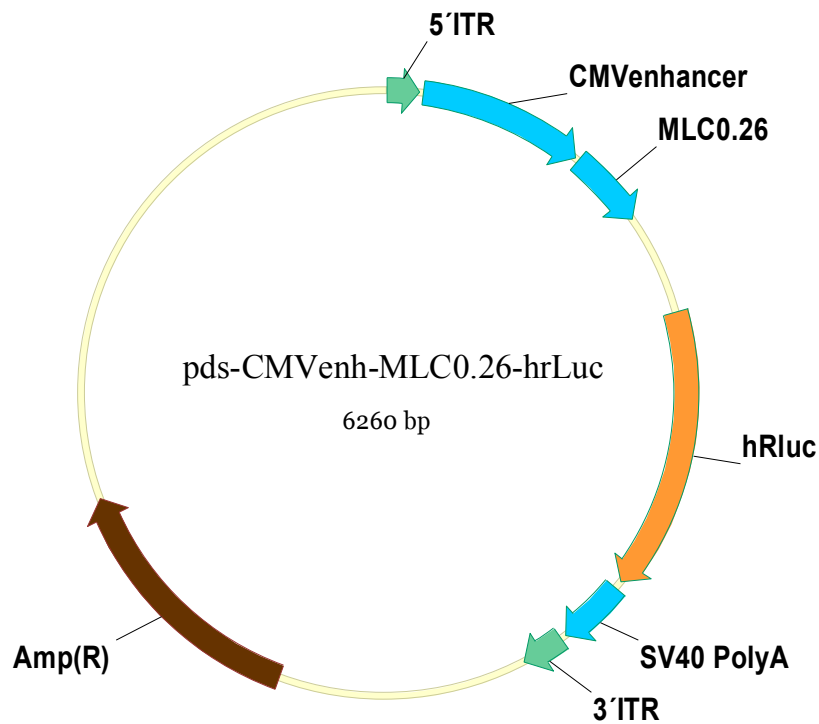


Abb. 3.2: Vektorkarte pds-CMVenh-MLC0.26-hrLuc

3.2 Zellbiologische Arbeiten

Alle Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, bei Raumtemperatur durchgeführt. Verwendete Medien und Lösungen wurden vor Benutzung auf 37°C vorgewärmt. Für sämtliche zellbiologische Arbeiten wurden ausschließlich sterile Lösungen, Medien, Gefäße sowie Pipetten und Pipettenspitzen verwendet.

3.2.1 Kultivierung und Lagerung eukaryontischer Zellen

In dieser Arbeit wurden HEK293T (human embrionic kidney)-Zellen verwendet, die das SV40 Large T-Antigen stabil exprimieren. Nach dem Auftauen der Zellen wurden diese in Dulbeccos modified Eagle Medium (DMEM) aufgenommen, welches mit 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, sowie 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin versetzt wurde (DMEM(+++)) und anschließend bei 1000 rpm für 5 min pelletiert und danach in 15 ml DMEM(+++) resuspendiert. Die HEK293T-Zellen wurden dann in Zellkulturflaschen (75 cm²) mit Filterdeckel überführt und bei 37°C, 5% CO₂ und 90% Luftfeuchtigkeit im Inkubator kultiviert. Hatten die Zellen eine Konfluenz von ca. 90% erreicht, wurden diese im Verhältnis 1:3 bis 1:10 geteilt. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese mit 10 ml PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml 0,25% Trypsin-EDTA Lösung inkubiert, bis sich die Zellen von der Zellkulturflasche ablösen. Zum Reaktionsstopp wurden dann 7 ml DMEM(+++) hinzugegeben und die Zellen durch wiederholtes mischen vereinzelt.

Je nach Zellteilung wurde eine entsprechende Menge an Zellen (1 ml bei einer 1:10 Teilung) in eine neue Zellkulturflasche überführt (175 cm²) und mit 25 ml DMEM(+++) aufgefüllt.

Um Zellen längerfristig zu lagern, wurden diese in einem Einfriermedium (DMEM(+++) mit 10% DMSO) kryokonserviert. Die Zellen wurden dazu zunächst pelettiert und dann mit einer entsprechenden Menge an Einfriermedium (1x10⁶ Zellen/ml Einfriermedium) resuspendiert und in Kryogefäße überführt. Diese sind in einem Einfriercontainer (Nalgene) mit Isopropanol umschichtet und frieren so zunächst langsam bei -80°C ein, um abschließend in flüssigem Stickstoff gelagert zu werden.

3.2.2 Transfektion eukaryontischer Zellen

Um HEK293T Zellen mit Plasmid-DNA zu transfizieren, wurden am Vortag 4x10⁵ Zellen pro Loch in einer 6-Loch-Platte in antibiotikafreiem DMEM(++Ø) ausgesät. Zur Transfektion wurde als Reagenz Lipofectamine™2000 Transfection Reagent (Invitrogen) oder GeneJuice® Transfection Reagent (Novagen) nach Herstellerangaben verwendet. Das Verhältnis DNA:Transfektionsreagenz betrug bei beiden Reagenzien 1:3. Die Analyse der Zellen erfolgte 48 Stunden nach Transfektion.

3.2.3 Virenproduktion

Wie auch bei anderen zellbiologischen Arbeiten, wurden nur sterile Lösungen und Materialien verwendet. Zusätzlich wurden alle Abfallprodukte der Virenproduktion vor dem Entsorgen nochmals im Dampfautoklaven sterilisiert.

3.2.3.1 Transfektion eukaryontischer HEK293T-Zellen zur Virenproduktion

Einen Tag vor Transfektion wurden insgesamt 2,5x10⁸ HEK293T-Zellen in 1052 ml DMEM(+++) gemischt. Zweimal 26 ml wurden jeweils zwei Zellkulturflaschen (175 cm²) überführt, die als Positiv- und Negativkontrolle der Transfektion dienen. Der Rest des Zellen-Medium-Gemisches wurde in einen 10-Kammer-Zellstapel (Corning) überführt und die Zellen durch mehrmaliges Schwenken gleichmäßig darin verteilt. Der Zellstapel besitzt eine Gesamtoberfläche von ca. 40 Zellkulturflaschen mit (Gesamtfläche 7000cm²).

Zur Produktion rekombinanter AAV9-Viren wurde am darauffolgenden Tag eine Doppeltransfektion durchgeführt mit dem (a) Inverted Terminal Repeat (ITR)-tragendem Transgenkonstrukt sowie (b) dem Helferplasmid pDP9rs. Dieses codiert neben den Informationen für die *rep*- und *cap*-Gene auch die notwendigen Adenohelferproteine zur Virenreplikation.

Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz PEI (Polyethylenimin) nach folgendem Protokoll:

Mix 1:	
Transgenkonstrukt / -plasmid	392 µg
Helferplasmid	1525 µg
H ₂ O	ad 34,5 ml
300 mM NaCl	34,5 ml

Mix 2:	
PEI (0,323 g/l)	15,5 ml
H ₂ O	19,0 ml
300 mM NaCl	34,5 ml

Anschließend wurde Mix 2 in Mix 1 überführt, gut vermischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Vom Transfektionsansatz wurden 4 ml in die Positiv-Kontrollflasche gegeben und der restliche Ansatz in den 10-Kammer-Zellstapel, der durch mehrmaliges Drehen (7x) mit dem Medium gut vermischt wurde.

3.2.3.2 Ernte und Aufreinigung rekombinanter AAVs

Die Ernte der rekombinanten AAVs erfolgte 48 bis 72 Stunden nach der Transfektion. Dazu wurde zunächst aus dem Zellstapel das Medium abgenommen und die Zellen in 100 ml PBS durch mehrmaliges Schwenken des Zellstapels gewaschen. Das PBS wurde mit dem zuvor abgenommenen Medium gesammelt. Als nächstes wurden die HEK293T-Zellen mit 100 ml 0,25% Trypsin-EDTA gelöst, mit dem gesammelten Medium durch mehrmaliges Schwenken des Stapels komplett abgenommen und für 10 min bei 4000 rpm und 4°C pelettiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen dann noch zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Um anschließend die rekombinanten AAVs aus den Zellen freizusetzen, wurde das Zellpellet in 10 ml Lysispuffer aufgenommen, dreimal einem Frier-Tau-Zyklus (flüssiger Stickstoff / 37°C Wasserbad) unterzogen und dann für 10 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die sich nun im Überstand befindenden Viren wurden vorsichtig abgenommen und gesammelt. Das Pellet wurde in einem nächsten Schritt in 5 ml Lysispuffer aufgenommen, einem zweimaligem Frier-Tau-Zyklus unterzogen, zentrifugiert und die sich im Überstand befindenden Viren mit denen aus dem ersten Aufreinigungsschritt gesammelt. In einem dritten und letztem Reinigungsschritt wurde das Zellpellet erneut in 5 ml Lysispuffer

aufgenommen, einmal einem Frier-Tau-Zyklus unterzogen, dann wiederum zentrifugiert und der Überstand gesammelt.

Da sich im gesammelten Überstand auch nicht verpackte Plasmid-DNA befinden kann, welche die spätere Aufreinigung und Konzentrationsbestimmung beeinflusst, wurde dieser mit 50 U/ml Benzonase® Nuclease (Sigma-Aldrich) für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend für 30 min bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, und der Überstand abgenommen. In einem letzten Schritt wurden dann die rekombinanten AAVs in einem Iodixanol-Stufengradient (siehe 2.3.3) gereinigt, bei dem die einzelnen Iodixanol-Phasen, beginnend mit dem gesammelten Überstand, in einem Zentrifugenröhrchen unterschichtet wurden. Dieses wurde dann vakuumverschweißt und die Viruspartikel durch Ultrazentrifugation bei 50.000 rpm für 2 Stunden bei 4°C zentrifugiert. Die mit DNA verpackten Viruspartikel sammeln sich dabei in der 40%igen Iodixanolphase an und werden mittels einer Spritze abgezogen. Die Lagerung der Viren erfolgt bei 4°C, eine Langzeitlagerung bei -20°C.

3.2.3.3 Quantifizierung rekombinanter AAVs

Die Quantifizierung der aufgereinigten AAVs erfolgte mittels einer Real-Time PCR-Analyse nach den Protokollen von Hauswirth et al. (2000) und Veldwijk et al. (2002). Durchgeführt wurde diese zur Qualitätskontrolle zusätzlich durch die Abteilung „Vektor-Produktions- und Entwicklungseinheit“ von Dipl.-Ing. (FH) Barbara Leuchs am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ), Im Neuenheimer Feld 280, 69120 Heidelberg.

3.3 Proteinbiochemische Arbeiten

3.3.1 Aufreinigung von Proteinen aus Zelllysaten

Zur Aufreinigung von Proteinen aus Zellen einer 6-Loch-Platte wurde das Medium zunächst abgenommen, die Zellen vorsichtig mit PBS gewaschen und dann mit 75 µl RIPA-Puffer (siehe 2.4.1) geerntet / abgeschabt. Zum Freisetzen von Proteinen aus noch nicht zerstörten Zellen wurde das Lysat dreimal einem Frier-Tau-Prozess unterzogen und dann für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

3.3.2 Aufreinigung von Proteinen aus Gewebe

Die Aufreinigung von Proteinen aus murinem Gewebe erfolgte analog wie bei der Zellaufreinigung mit RIPA-Puffer. Vom tiefgefrorenen Gewebe wurden 100 mg mit 300 µl

RIPA-Puffer für 2 min bei 30 Hz in einer Kugelmühle homogenisiert und anschließend zur Entfernung der Zelltrümmer für 5 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -80°C gelagert.

3.3.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem Protein Assay Dye Reagent Kit (Bio-Rad), der auf der Methode von Bradford beruht (Bradford, 1976). Proteine aus Zelllysaten wurden dabei 1:5, die aus Geweben 1:10 verdünnt und bei einer Wellenlänge von $\lambda=595$ nm vermessen.

3.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte im elektrischen Feld eines Tris-Glycin-SDS-Polyacrylamidgeles. Die Eigenladung der Proteine wird durch das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) durch Bindung maskiert und damit erfolgt die Auftrennung nur noch nach der Molekülmasse. Kleinere Proteine migrieren dabei schneller durch das Polyacrylamidnetz als größere Proteine (Siebstruktureffekt). Für die hier verwendete diskontinuierliche und denaturierende Gelelektrophorese wurden 4-20%ige Tris-Glycin-Gradientengele (Invitrogen) verwendet. Dazu wurden 100 μ g Protein jeweils mit H₂O und Probenpuffer auf ein Endvolumen von 37 μ l gebracht, bei 95°C für 5 min aufgekocht und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 125 V bis die Lauffront das Ende des Polyacrylamidgeles erreicht hatte (ca. 2 ½ Stunden).

3.3.5 Western-Blot

Der Nachweis von Proteinen erfolgte durch eine Immundetektion nachdem die Proteine auf eine PVDF (Polyvinylidenfluorid)-Membran transferiert worden waren. Die SDS-PAGE wurde nach Auftrennung der Proteine dazu auf ein Schichtsystem bestehend aus einer unteren Lage Fließ, gefolgt von einer Lage Whatmanpapier und der in Methanol aktivierten und im Transferpuffer äquilibrierten PVDF-Membran gelegt. Das Gel wurde dann ebenfalls noch mit einer Lage Whatmanpapier und mit Fließ bedeckt. Sowohl das Fließ als auch das Whatmanpapier wurden vor Benutzung im Transferpuffer getaucht. Das komplette Schichtsystem wurde dann in eine Halterung aus PVC eingespannt und in ein „Tank-Blot“-System (Bio-Rad) eingespannt und mit Transferpuffer aufgefüllt. Der Transfer erfolgte bei 50 V für zwei Stunden.

Vor Beginn der Immundetektion wurden zunächst die freien Bindungsstellen auf der PVDF-Membran mit dem Odyssey Blocking Buffer (LI-COR) für drei Stunden bei Raumtemperatur

geblockt, um eine unspezifische Antikörperbindung zu verhindern. Anschließend folgte die Inkubation des Primärantikörpers (siehe 2.4.5) verdünnt in Odyssey Blocking Buffer über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde dann die Membran zunächst viermal für jeweils 5 min mit PBS-T gewaschen und danach mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper (siehe 2.4.6) verdünnt in Odyssey Blocking Buffer für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte wiederum ein viermaliges Waschen der Membran mit PBS-T für 5 min und die anschließende Lagerung in PBS. Die Detektion der Fluoreszenzintensität erfolgte mit dem Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR).

3.4 Versuchstierkundliche Arbeiten am Modell *Mus musculus*

3.4.1 Haltung und Zucht von *Mus musculus*

Die Haltung und Zucht der in dieser Arbeit verwendeten Versuchstiere erfolgte unter den tierschutzrechtlichen Bestimmungen des Landes Baden-Württemberg. Ort der Zucht und Haltung sowie der Versuchsdurchführungen war die Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung (IBF) Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 347, 69120 Heidelberg. Alle Versuchstiere der Art *M. musculus* wurden in einer Barrierehaltung in Makrolonkäfigen vom Typ II bei einem automatisiertem Tag- und Nachtrhythmus von jeweils 12 Stunden gehalten. Die in dieser Arbeit verwendeten Wildtyp-Mäuse des Stammes C57BL/6 wurden von den Firmen Janvier oder Charles River bezogen.

3.4.2 Behandlungen und Versuchsdurchführung

Alle Behandlungen und Versuchsdurchführungen liefen unter der Projektnummer G-156/08. Sämtliche Arbeiten wurden mit sterilen Lösungen und sterilem Instrumenten durchgeführt.

3.4.2.1 *in vivo* Injektion der rekombinanten AAVs

Die Injektion der rekombinanten AAVs zur Therapiebehandlung erfolgte intravenös über die Schwanzvene. Dabei wurde maximal ein Volumen von 200 µl pro Tier injiziert. Die Injektionen wurden freundlicherweise von Frau Ulrike Gärtner bzw. Frau Bianca Heil (IBF Heidelberg) durchgeführt.

3.4.2.2 Subkutane Implantation osmotischer Minipumpen

Zur subkutanen Implantation osmotischer Minipumpen kamen Pumpen der Firma Alzet Typ 1002 zum Einsatz. Diese geben über einen Zeitraum von 14 Tagen kontinuierlich 0,25 µl/h des befüllten Agens ab. Einen Tag vor Implantation wurden die osmotischen Minipumpen mit

0,9%iger Kochsalzlösung bzw. mit Angiotensin II gelöst in 0,9%iger Kochsalzlösung befüllt und über Nacht bei 37°C in einer 0,9%igen Kochsalzlösung im Brutschrank gelagert. Die verwendete Angiotensin II Dosis betrug 1000 ng/kg Körpergewicht pro Minute. Das Gesamtvolumen der Pumpen betrug 100 µl.

Zur Implantation der Pumpen wurden die Versuchstiere zunächst mit einem 5%igen (v/v) Isofluran-Sauerstoff-Gemisch in eine Allgemeinnarkose versetzt und diese während des Pumpeneinbaus mit einem 2,5%igem (v/v) Isofluran-Sauerstoff-Gemisch aufrecht erhalten. Da die Pumpen am Rücken implantiert wurden, wurde dieser im Bereich der Scapula rasiert und mit 70%igem Ethanol desinfiziert. Mit einem Skalpell wurde ein kleiner Hautschnitt etwas caudal der Scapula gesetzt und durch stumpfe Präparation mittels Öffnen und Schließen einer Schere eine subkutane Tasche für die Minipumpe gebildet. Sie sollte ca. 1 cm größer als die etwa 3 cm lange Pumpe sein. Nach dem Einsetzen wurde die Haut dann wieder durch 2 Wundclips verschlossen.

Als Analgetikum erhielten die Versuchstiere präoperativ 100 µl Temgesic (Wirkstoff Buprenorphin; 1:10 verdünnt in 0,9%iger Kochsalzlösung) intraperitoneal. Es erfolgte eine tägliche Kontrolle der operierten Versuchstiere und bei ordnungsgemäßem Wundverschluss eine Entfernung der Wundclips nach ca. einer Woche.

3.4.2.3 Extrakardiale Messungen

Bei der transthorakalen Echokardiographie können die Größe und Funktion der Atrien und Ventrikel sowie die Klappenfunktionen und die Ejektionsfraktion des Herzens bestimmt werden. Kurz vor der Echokardiographie, die von Dr. Emmanuel Chorianopoulos (Innere Medizin III, Universitätsklinikum Heidelberg) verblindet durchgeführt wurde, wurden die Tiere enthaart.

Die jeweils dreimaligen unabhängigen Messungen erfolgten mit einem Ultraschallgerät Sonos 5500 und einem S12 Transducer (Philips). Die Impulswiederholungsfrequenz von 12 MHz im Motion-Mode (M-Mode) ermöglichte die Bewegungsabläufe des linken Ventrikels eindimensional darzustellen und dabei den linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser (LVEDD) sowie den linksventrikulären endsystolischen Durchmesser (LVESD) zu bestimmen. Mit folgender Formel konnte dann die fraktionelle Verkürzung (Durchmesserverkürzung des linken Ventrikels in der Systole = FS: Fractional Shortening) berechnet werden:

$$\text{FS \%} = [(\text{LVEDD} - \text{LVESD}) / \text{LVEDD}] * 100$$

Weiterhin wurde bei der transthorakalen Echokardiographie die Hinterwanddicke des linken Ventrikels bestimmt.

3.4.2.4 Bestimmung des systolischen Blutdrucks

Die Bestimmung des systolischen Blutdrucks wurde freundlicherweise von Dipl.-Biol. Anja Feldner (Institut für Physiologie und Pathophysiologie, Universität Heidelberg) nach der Methode von Kunstmann (1928) durchgeführt.

Während der Messung waren die Versuchstiere einem 0,5%igem (v/v) Isofluran-Sauerstoff-Gemisch ausgesetzt (Narkosegerät für Kleintiere HNG6 – H.Hölzel GmbH). Die Messung des Blutdrucks erfolgte an der Schwanzvene mit dem Gerät Pressure Meter LE5001 sowie der Software NIBP Chart v1.0 von Panlab.

3.4.2.5 Euthanisierung und Organentnahme

Die Euthanisierung der Versuchstiere zur Organentnahme erfolgte durch Überfluten mit Kohlendioxid und anschließender zervikaler Dislokation. Die Konservierung der Gewebeproben zur Isolierung von RNA und Proteinen erfolgte in flüssigem Stickstoff, nachdem diese zuvor in PBS gespült wurden um Blutreste zu entfernen. Anschließend wurden die Proben bei -80°C gelagert. Gewebeproben zur histologischen Analyse wurden in einem Einfriermedium (Tissue Freezing Medium, Leica) gegeben, anschließend auf Trockeneis eingefroren und dann bei -20°C gelagert.

3.5 Histologische Analysen

3.5.1 Anfertigung von Dünnschnittpräparaten aus kryokonserviertem Herzgewebe

Dünnschnittpräparate aus kryokonserviertem Gewebe wurden an einem Kryotom der Firma Leica angefertigt. Die Umgebungstemperatur im Kryotom wie auch die Temperatur des Probenblockes betragen -20°C, um ein Auftauen des Gewebes zu verhindern. Die Gewebeschnitte des Herzens hatten eine Dicke von 10 µm und wurden auf einen Superfrost-Objektträger aufgenommen und anschließend bei -20°C gelagert.

3.5.2 Masson-Trichrom-Färbung

Die angefertigten histologischen Schnitte des Herzens (siehe 3.5.1) wurden einer Trichromfärbung mit dem Trichrom Stain Kit (Sigma-Aldrich) unterzogen. Dabei werden Zellkerne schwarz, Kardiomyozyten rot und Kollagengewebe blau gefärbt (Lillie, 1940; Lillie, 1977). Die Durchführung dieser Färbung erfolgte mit Wesentlichen nach

Herstellerangaben, jedoch wurden die einzelnen Färbezeiten und Waschschrte wie folgt verändert:

Färbeschritt / Färbelösung	Dauer	Bemerkung
Bouins-Lösung	2 min	bei 56°C
Wasser	ca. 5-10 min	unter fließendem Wasser
Weigerts-Eisen-Hämatoxin-Lösung	1 min	
Aqua dest.		kurz spülen
Scharlachrot-Lösung	6 min	
Aqua dest.		2x kurz spülen
Phosphomolybdänsäure/-wolframsäure	4 min	
Anillinblau	5 min	
1% Essigsäure	2 min	
Aqua dest.		kurz spülen
70% Ethanol	2 min	
80% Ethanol	2 min	
90% Ethanol	2 min	
96% Ethanol	2 min	
100% Ethanol	2 min	
Xylol	2 min	

Vor Beginn der Färbung wurden die histologischen Schnitte auf den Objektträger für ca. 5 min bei Raumtemperatur aufgetaut und angetrocknet. Die aufsteigende Alkoholreihe am Ende (70%-100% Ethanol sowie Xylol) diente der Dehydrierung der Schnitte, damit diese mit dem Roti-Histokitt (Carl Roth) konserviert und bei Raumtemperatur gelagert werden konnten.

3.6 Statistische Auswertungen und *in silico*-Analysen

Sämtliche in dieser Arbeit durchgeführten statistischen Auswertungen wurden mit dem Softwareprogramm GraphPad Prism durchgeführt. Angegeben sind dabei jeweils, soweit nichts anderes aufgeführt, die Mittelwerte +/- Standardfehler. Zur Bestimmung des jeweiligen Signifikanzniveaus wurde, soweit nichts anderes angegeben, ein One-Way ANOVA Test mit einem Newman-Keuls Test zum jeweiligen Vergleich der einzelnen Versuchsgruppen durchgeführt. Eine signifikante Abweichung lag bei einem Signifikanzwert von $p < 0,05$, eine hoch signifikante Abweichung bei $p < 0,01$ und eine höchst signifikante Abweichung bei $p < 0,001$ vor.

Im Folgenden sind alle genutzten Softwareprogramme und Datenbanken aufgelistet.

Software und Datenbanken	Anwendung
NCBI (National Center of Biotechnology Information)	Sequenzanalysen, Literaturdatenbank
Ensemble	Sequenzanalysen
Vector NTI® Software (Invitrogen)	Sequenzanalysen, Plasmidverwaltung, Klonierungen
Tierbase – 4D v11 SQL Release 8 (11.8)	Zuchtverwaltung der Versuchstiere
Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR)	Western Blot Analysen
NIBP Chart v1.0 (Panlab)	Blutdruckmessung
GraphPad Prism	statische Auswertungen

4. ERGEBNISSE

4.1 Generierung eines AAV9-exprimierenden Calsarcin-1 Vektors

Um der Fragestellung nachzugehen, ob durch eine AAV9-basierte Calsarcin-1 Genexpression das kardiale Remodelling positiv beeinflusst werden kann, wurde ein entsprechender AAV9-Vektor mit der murinen Calsarcin-1 Sequenz unter der Kontrolle eines CMV-verstärkten Myosinleichtkettenpromotors hergestellt (siehe Abb. 4.1). Dieser Vektor wurde in einer Dosis von 1×10^{11} vG/Tier (virale Genome/Tier) sowie 1×10^{12} vG/Tier in acht Wochen alten männlichen C57BL/6 CS1-KO-Mäusen auf dessen Expression im Vergleich zu einer entsprechenden Wildtyp-Maus getestet. Die Expressionsanalyse erfolgte vier Wochen nach intravenöser Injektion.

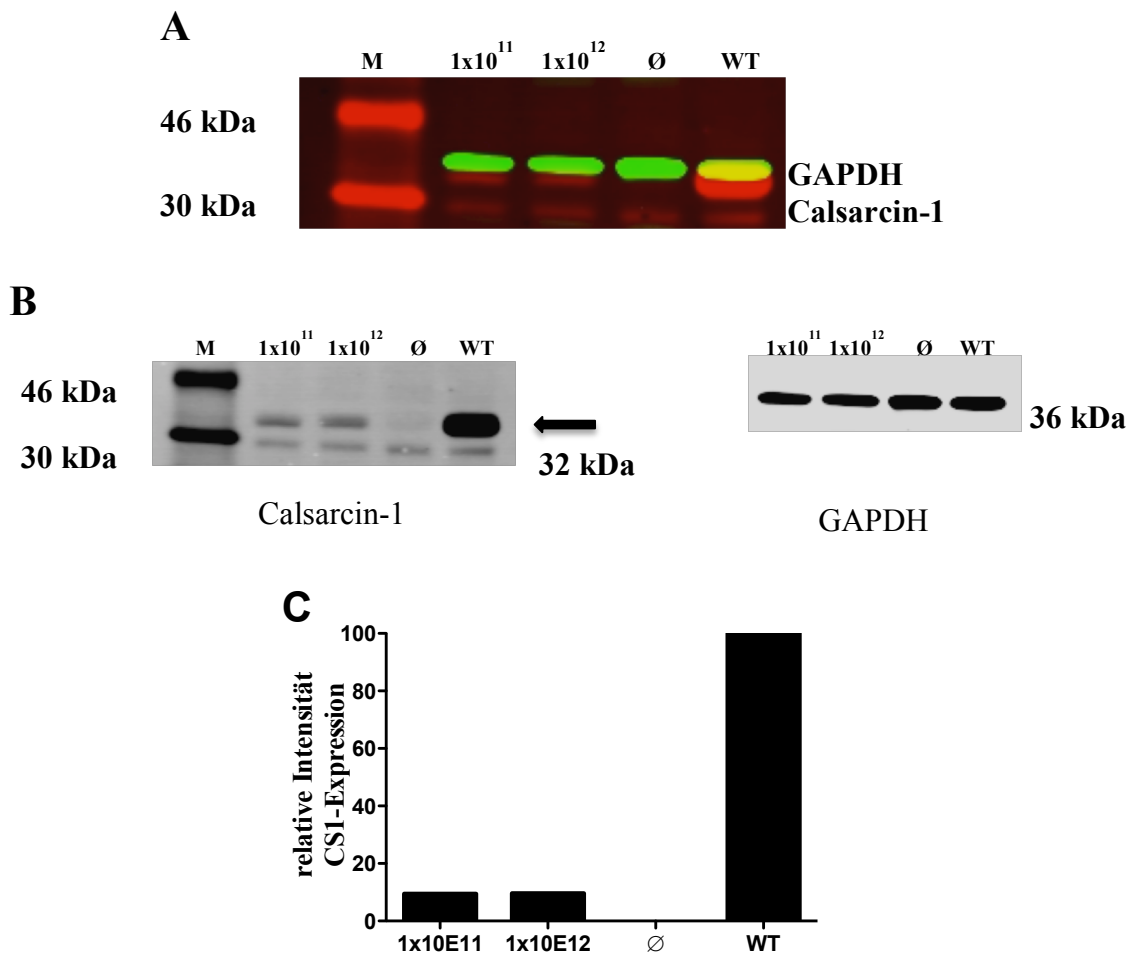


Abb. 4.1: Nachweis der AAV9-basierten *in vivo* Calsarcin-1 Expression im Myokard von CS1-KO-Mäusen

A und **B** Western-Blot-Analyse zur Bestimmung des *in vivo* Expressionsniveaus der AAV9-basierten Calsarcin-1 Expression vier Wochen nach systemischer i.v. Injektion von 1×10^{11} bzw. 1×10^{12} vG pro Tier im Vergleich zur Expression in einer Wildtyp-Maus (C57BL/6). M: Prestained Protein Marker (Größenangaben in kDa). Roter Kanal: Calsarcin-1. Grüner Kanal: GAPDH. In **B** sind die beiden Farbkanäle des Western-Blots aus **A** in Schwarz-Weiß-Darstellung separat aufgeführt. Ø: nicht-injiziertes KO-Kontrolltier. **C** Proteindensitometrie der Calsarcin-1 Expression normalisiert auf GAPDH angegeben als relative Intensität im Vergleich zur Wildtyp-Expression. n=1.

In den CS1-KO-Mäusen konnte eine AAV9-basierte Expression von Calsarcin-1 nachgewiesen werden. Bei beiden injizierten Virusdosen zeigte sich jedoch nur eine Expressionshöhe von ca. 10% im Vergleich zum Wildtyp-Expressionsniveau. In nicht-injizierten KO-Kontrollmäusen war keine Expression nachweisbar.

4.2 AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen bei einer viralen Dosis von 2×10^{11} vG/Tier (Niedrigdosis-Studie)

4.2.1 Studiendesign

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Calsarcin-1 mit einem AAV9-basierten Vektor *in vivo* exprimiert werden kann (Abb. 4.1), wurde eine Studie zur AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie von mit Angiotensin II-behandelten Wildtyp-Mäusen konzipiert (Abb. 4.2). Hierbei sollte der Fragestellung nachgegangen werden, ob die durch Angiotensin II vermittelte kardiale Hypertrophie durch eine AAV9-basierte Calsarcin-1 Expression abgeschwächt oder sogar vollständig verhindert werden kann. Dazu wurden 50 männliche, acht Wochen alte C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (Charles River) zunächst in zwei gleichgroße Gruppen eingeteilt, von denen die erste jeweils 2×10^{11} vG/Tier AAV9-CS1 erhielt und die zweite jeweils das entsprechende Kontrollvirus AAV9-hrLuc in gleicher Dosis („Niedrigdosis-Studie“). Fünf Tage nach intravenöser Virusinjektion wurden dann osmotische Minipumpen befüllt mit Angiotensin II in einer Dosis von 1000 ng/kg Körpergewicht pro Minute bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung implantiert. Die hohe Angiotensin II Dosis wurde gewählt, um ein ausgeprägtes pathologisches Remodelling zu induzieren. Nach zwei weiteren Wochen erfolgte die Analyse der Tiere. Das Studiendesign ist in Abb. 4.2 grafisch dargestellt. Zur vereinfachten Bezeichnung der einzelnen Versuchsgruppen werden für diese jeweilige Kurzbezeichnungen eingeführt. Die mit AAV9-Calsarcin-1 injizierten Mäuse, die eine mit Angiotensin II befüllte osmotische Minipumpe erhielten tragen die Bezeichnung CS1Ang-II. Entsprechende mit 0,9%iger Kochsalzlösung behandelte Kontrolltiere tragen die Kurzbezeichnung CS1NaCl. Für die mit dem Kontrollvirus (AAV9-hrLuc) injizierten Versuchsgruppen wurde auf gleicher Weise verfahren (RenAng-II bzw. RenNaCl).

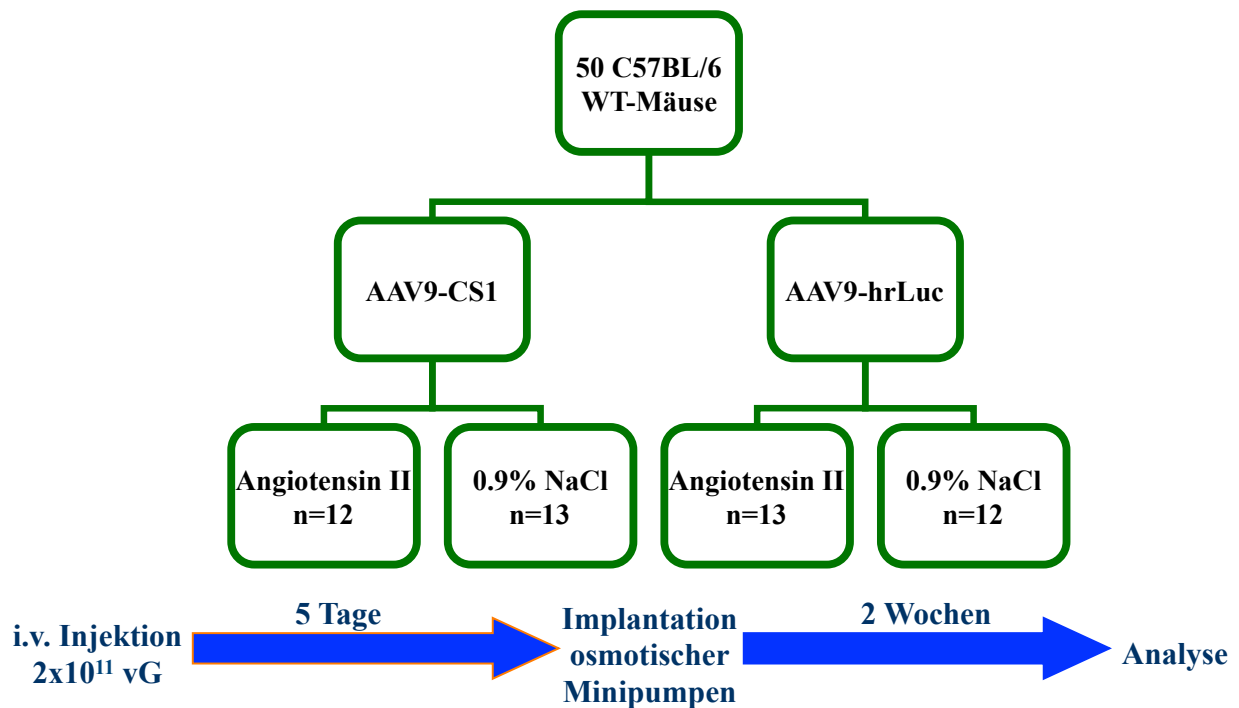


Abb. 4.2: Studiendesign zur AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen bei einer injizierten viralen Dosis von je 2×10^{11} vG/Tier

4.2.2 Morphometrische Analyse

Zwei Wochen nach Implantation der mit Angiotensin II bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung befüllten Minipumpen wurde eine transthorakale Echokardiographie durchgeführt um die fraktionelle Verkürzung (FS) als Maß für die Kontraktilität sowie den enddiastolischen Durchmesser des linken Ventrikels als Maß für eine Dilatation zu bestimmen (Abb. 4.3).

Die Kontrollgruppe (RenNaCl) zeigte eine fraktionelle Verkürzung von 45%, die sich unter Angiotensin II Einfluss signifikant auf 37% reduzierte (RenAng-II; Abb. 4.3A). Durch die AAV9-basierte Calsarcin-1 Überexpression konnte die kontraktile Dysfunktion komplett verhindert werden (FS von 45% in CS1Ang-II-Gruppe). In der Calsarcin-1 überexprimierenden Kontrollgruppe (CS1NaCl) konnte sogar eine leichte Verbesserung der Pumpleistung auf 49% beobachtet werden. Unter Angiotensin II-Infusion zeigte die mit AAV9-hrLuc behandelte Gruppe einen leichten Trend ($p=0,09$; zweiseitiger t-Test) in Richtung linksventrikulärer Dilatation (Zunahme um 9,6% im LVEDD von RenAng-II im Vergleich zu RenNaCl; Abb. 4.3B).

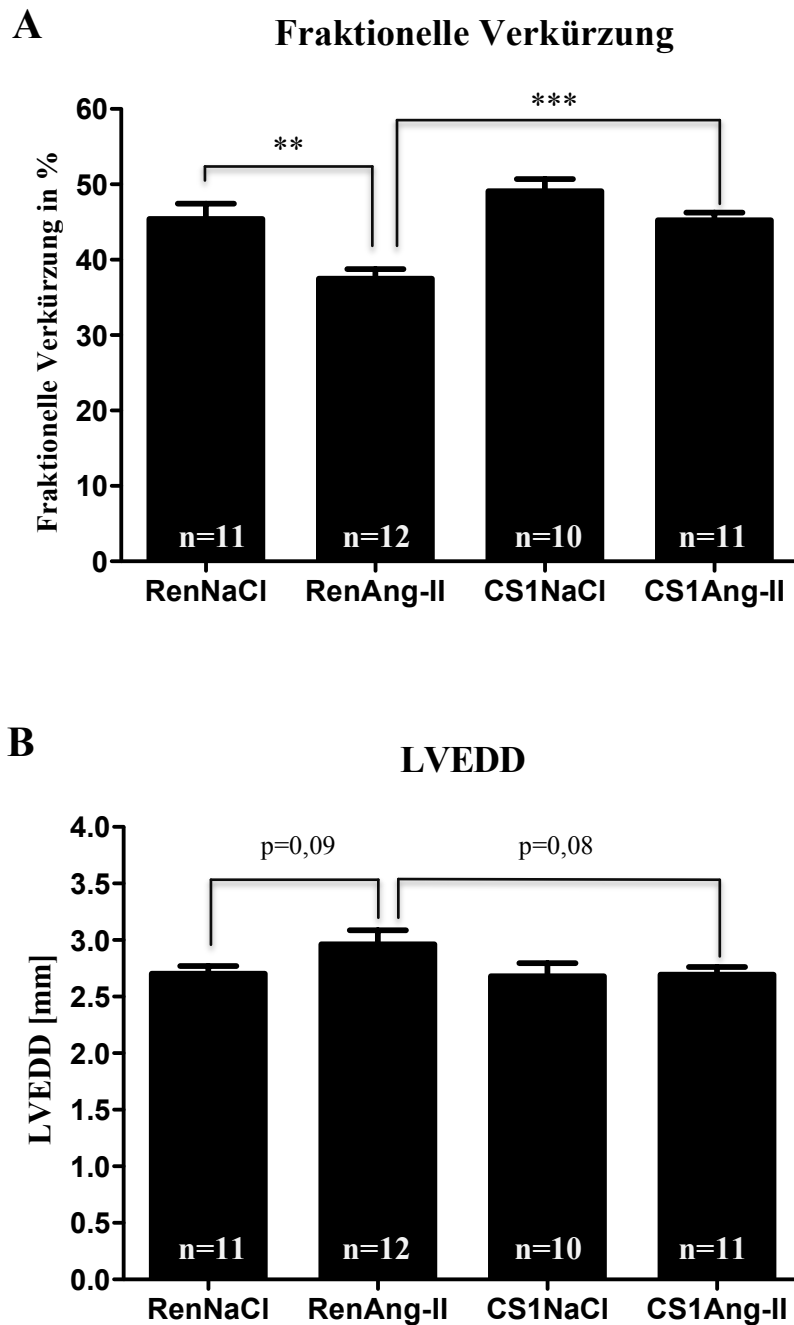


Abb. 4.3: Echokardiographische Analyse der fraktionellen Verkürzung (A) sowie des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels (B) in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen

Die Analyse erfolgte zwei Wochen nach Implantation der mit Angiotensin II bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung befüllten osmotischen Minipumpen in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. Diese erhielten fünf Tage vor Pumpeneinbau systemisch je 2×10^{11} vG AAV9-CS1 bzw. AAV9-hrLuc. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. **:p<0,01. ***:p<0,001.

Das Verhältnis von Herzgewicht-Körpergewicht nahm unter Angiotensin II Einfluss um ca. 50% in den mit Ang-II injizierten Kontrollmäusen im Vergleich zur RenNaCl-Gruppe. Die milde Überexpression von Calsarcin-1 konnte jedoch keine Reduktion der Angiotensin II-induzierten Hypertrophie herbeiführen (Abb. 4.4).

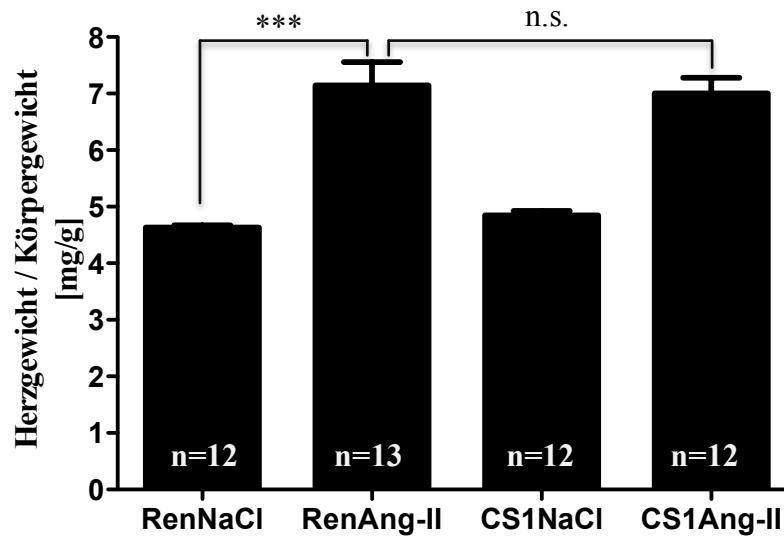


Abb. 4.4: Analyse des Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnisses in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)

Die Analyse erfolgte zwei Wochen nach Implantation der mit Angiotensin II bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung befüllten osmotischen Minipumpen in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. Diese erhielten fünf Tage vor Pumpeneinbau systemisch je 2×10^{11} vG AAV9-CS1 bzw. AAV9-hrLuc. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ***: $p > 0,001$. n.s.: nicht signifikant.

4.2.3 Inhibierung des Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms

Da es unter chronischem Angiotensin II-Einfluss unter anderem zu einer Aktivierung des hypertrophen Genprogramms kommt (Frank et al., 2007), wurden per Real-Time PCR-Analyse die mRNA-Expressionsniveaus von ANF, BNP sowie β -MHC im Myokard bestimmt und als n-fache Regulation gegenüber der Kontrollgruppe RenNaCl angegeben (Abb. 4.5).

In allen analysierten Hypertrophie-Parametern zeigte sich eine signifikante Hochregulation der mRNA-Expression unter Angiotensin II. Diese war mit dem Faktor 10,7 am stärksten für ANF (Abb. 4.5A). Durch die AAV9-basierte Calsarcin-1 Expression konnte die Hochregulation um jeweils ca. 47% für BNP ($p < 0,01$, Abb. 4.5B) und β -MHC ($p < 0,05$, Abb. 4.5C) reduziert werden. ANF wurde durch die Calsarcin-1 Überexpression um 37% in der Expressionsstärke reduziert ($p < 0,05$; Abb. 4.5A).

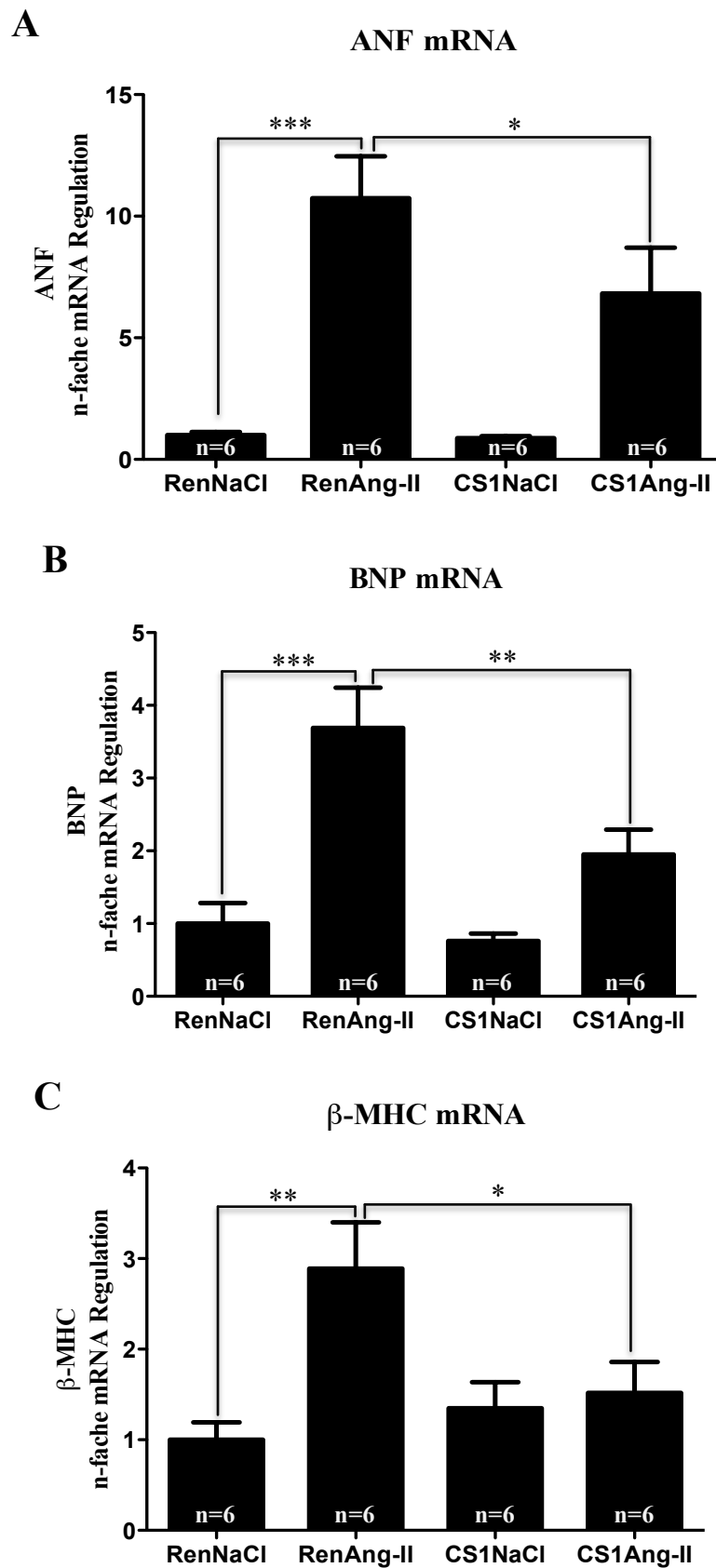


Abb. 4.5: Real-Time PCR-Analyse des durch Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)

Analysiert wurde die mRNA-Expression von ANF (A), BNP (B) und β -MHC (C) normalisiert auf die 18S rRNA. Um den Grad der Regulation zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$.

4.2.4 Inhibierung der Calcineurinaktivität durch eine AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Überexpression

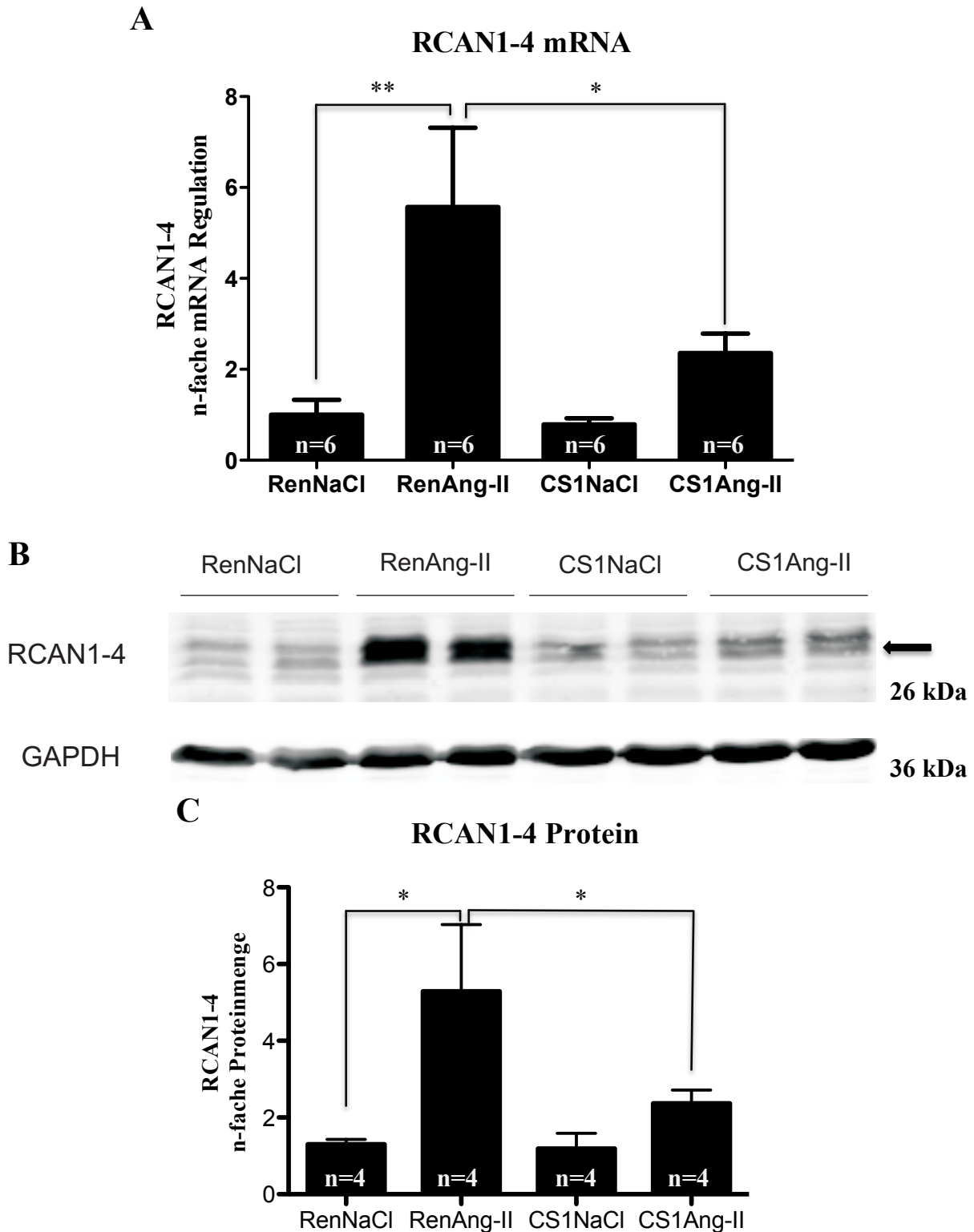


Abb. 4.6: Analyse der Calcineurinaktivität über RCAN1-4 bei kontinuierlicher Angiotensin II-Infusion im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)

Real-Time PCR-Analyse (A) der RCAN1-4 mRNA-Regulation normalisiert auf die 18S rRNA. Um die Stärke der Regulation zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. **B** Exemplarischer Western-Blot zur RCAN1-4 Proteinexpression mit GAPDH als Ladekontrolle sowie die (C) Quantifizierung der Proteinmenge mit Normalisierung auf GAPDH. Alle Daten in A und C sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$.

Da die Ausbildung der kardialen Hypertrophie durch Angiotensin II als G_{q/11}-gekoppelter Rezeptor-Agonist molekular u.a. über die Aktivierung der Phosphatase Calcineurin stattfindet (Frank et al., 2007; Murat et al., 2000; Taigen et al., 2000), wurde untersucht inwieweit dieser Signalweg durch die AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Überexpression inhibiert werden kann. Dazu wurde das Expressionsniveau von RCAN1-4 untersucht, da dieses Gen in seinem Promotorbereich 15 NFAT-Bindungsstellen besitzt und somit u.a. die Calcineurinaktivität vermittelt über NFAT widerspiegelt (Yang et al., 2000).

Sowohl auf mRNA-Ebene (Abb. 4.6A) als auch auf Proteinebene (Abb. 4.6B und C) war eine signifikante Hochregulation der RCAN1-4 Expression nachweisbar, die mutmaßlich auf die durch Angiotensin II gesteigerte Calcineurinaktivität zurückzuführen ist. Die Überexpression von Calsarcin-1 als Negativregulator der Phosphatase Calcineurin reduzierte deren Aktivität wiederum signifikant um 57% auf mRNA-Niveau und 55% auf Proteinniveau.

4.2.5 Reduktion der Fibrose nach AAV9-Calsarcin-1 Behandlung

Shimoyama et al. (1999) haben gezeigt, dass die Inhibierung von Calcineurin mit einem reduzierten kardialen Remodelling sowie einer Reduktion der Fibrose nach chronischer Angiotensin II-Infusion einhergeht. Um den Grad der Fibrose in den einzelnen Versuchsgruppen zu bestimmen, wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Füzési (Universitätsmedizin Göttingen, Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin) histologische Schnitte aus PFA-fixiertem Herzgewebe der mitventrikulären Scheibe angefertigt und diese dann einer Masson-Trichrom-Färbung unterzogen (Abb. 4.7).

Ohne Angiotensin II-Infusion (RenNaCl und CS1NaCl) waren unabhängig vom injizierten Virus keine Unterschiede im Grad der Fibrose festzustellen (Abb. 4.7A). Unter chronischem Angiotensin II-Einfluss kam es jedoch zu einer starken Zunahme der fibrotischen Areale im Herzmuskelgewebe (RenAng-II), die mit Hilfe der AAV9-CS1 Behandlung um ca. 50% reduziert werden konnte ($p < 0,01$ in CS1Ang-II).

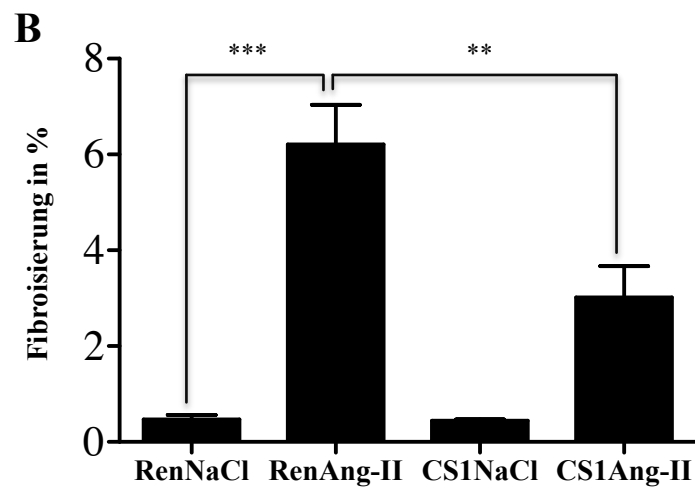
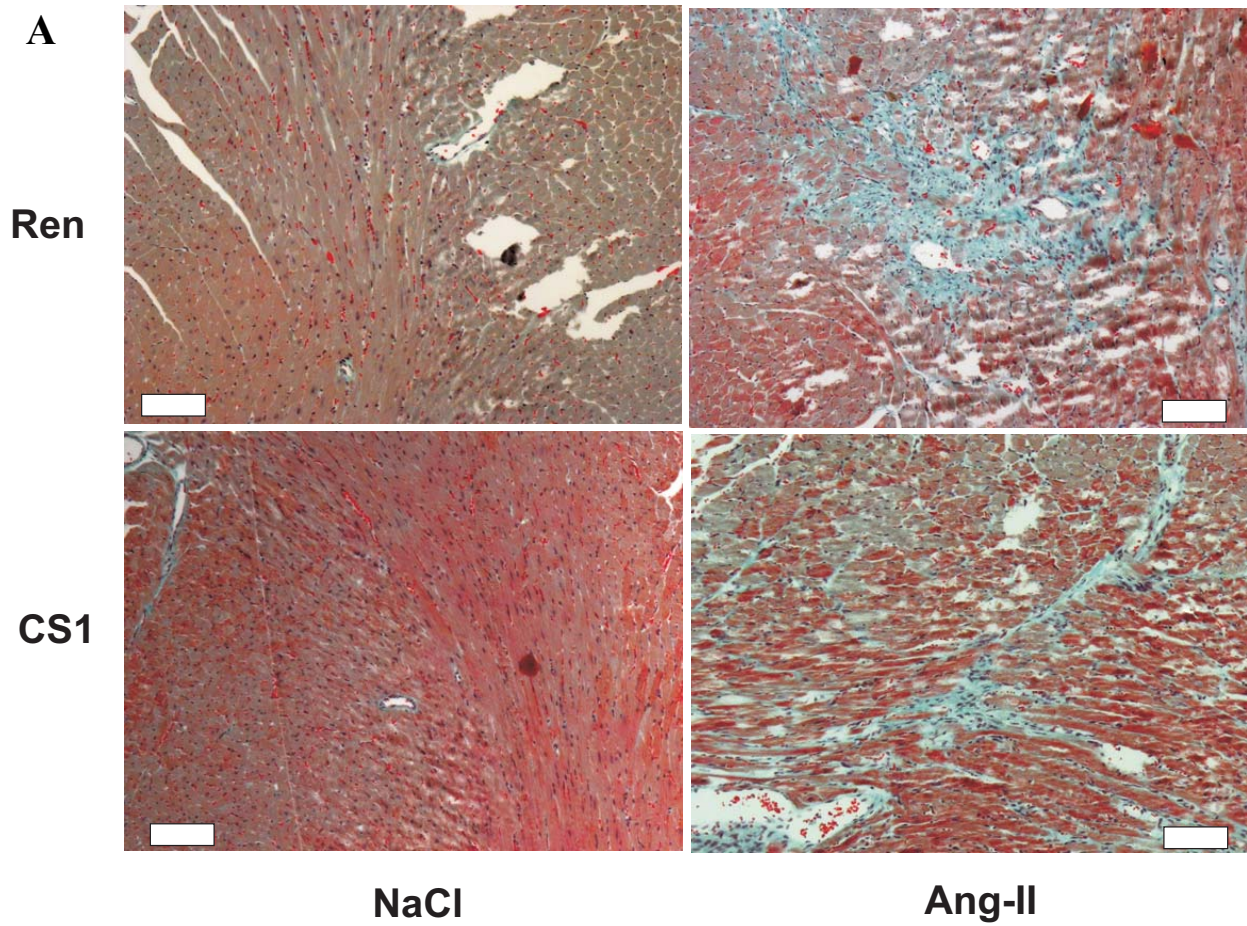


Abb. 4.7: Analyse der durch Angiotensin II-induzierten Fibrose in mitventrikulären Gewebsschnitten des Herzens von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)

In **A** ist für jede experimentelle Gruppe ein histologischer Schnitt, Masson-Trichrom gefärbt, exemplarisch dargestellt. Das fibrotisches Gewebe ist dabei blau gefärbt. Balken: 100 μ m. **B** Bestimmung der prozentualen Fibroisierung am Gesamtgewebe gemessen für n=3 Tiere pro Gruppe. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. **:p<0,01. ***:p<0,001.

Zusätzlich zur histologischen Analyse wurde eine Real-Time PCR-Analyse zur Bestimmung der Kollagen III mRNA-Expression durchgeführt, deren Ergebnis die Daten der histologischen Auswertung stützt (Abb. 4.8).

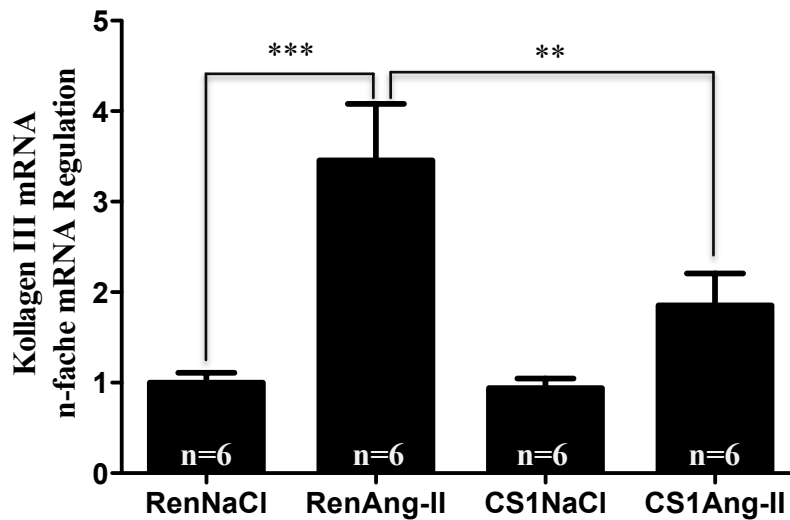


Abb. 4.8: Real-Time PCR-Analyse der Kollagen III mRNA-Expression im Herzmuskelgewebe von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)

Analysiert wurde die mRNA-Expression von Kollagen III normalisiert auf die 18S rRNA. Um den Grad der Regulation zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$.

AAV9-hrLuc behandelte Mäuse zeigten unter Einfluss von Angiotensin II eine ca. 3,5 fache Zunahme der Kollagen III-Expression ($p < 0,001$). Diese war signifikant um ca. 50% bei den AAV9-Calsarcin-1 behandelten Tieren reduziert ($p < 0,01$) und bestätigten damit die histologischen Daten (Abb. 4.7A).

4.2.6 Nachweis der AAV9-vermittelten Überexpression von Calsarcin-1

Um die therapeutischen Effekte der AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie (Abb. 4.3-4.8) auf die Überexpression von Calsarcin-1 zurückzuführen, wurde diese auf Protein- und mRNA-Level analysiert (Abb. 4.9).

Sowohl auf mRNA-Ebene (Abb. 4.9A) als auch auf Proteinebene (Abb. 4.9B und C) war kein Zuwachs der Expression von Calsarcin-1 zusätzlich zum bereits endogen vorhandenen Calsarcin-1 nachweisbar.

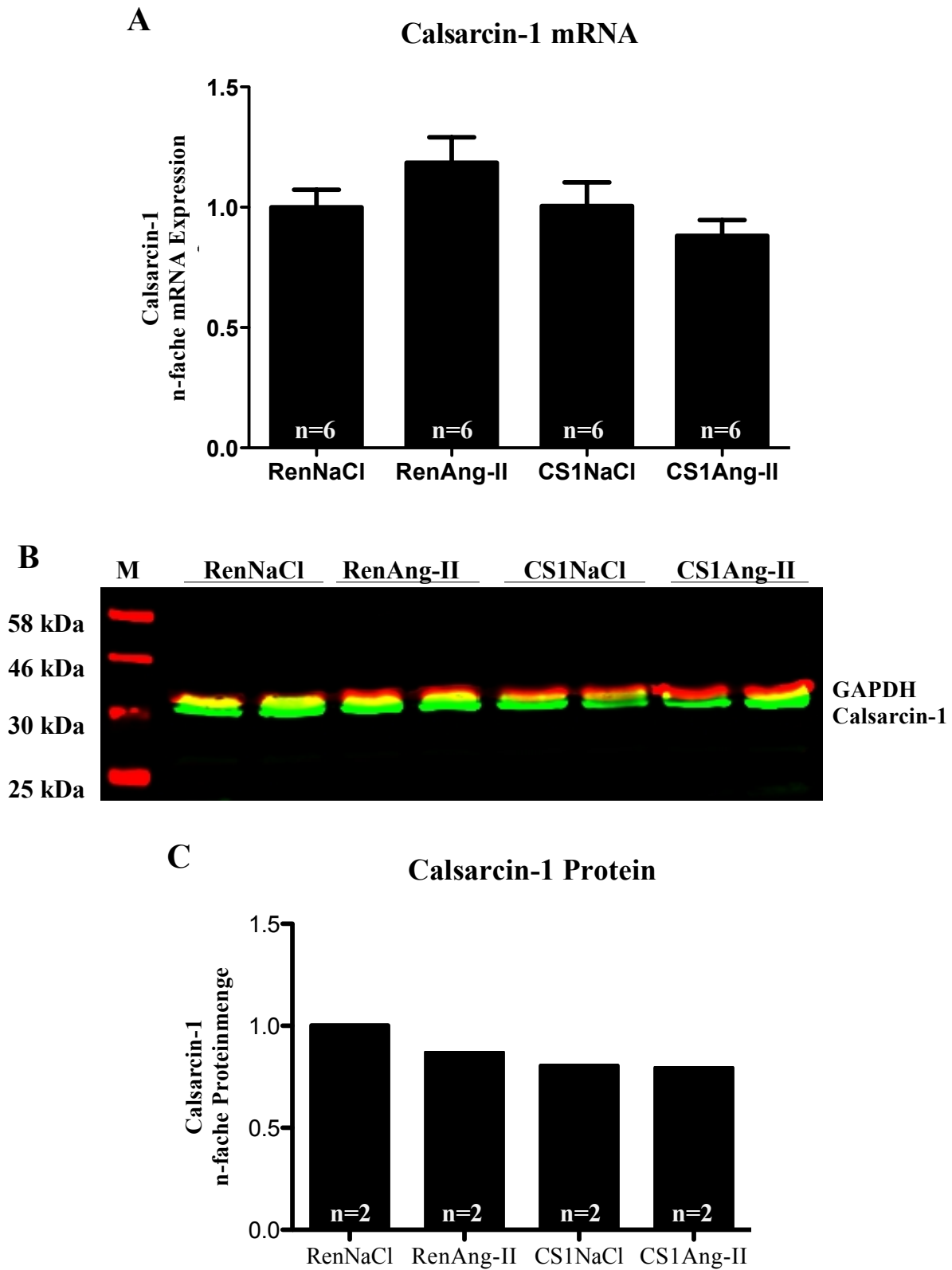


Abb. 4.9: Analyse einer AAV9-vermittelten Calsarcin-1 Überexpression im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Niedrigdosis-Studie)

A Real-Time PCR-Analyse der Calsarcin-1 mRNA-Expression normalisiert auf die 18S rRNA. Die Calsarcin-1 Expression in der Kontrollgruppe (RenNaCl) wurde gleich 1 und die anderen Gruppen dazu ins Verhältnis gesetzt. **B** Exemplarischer Western-Blot zur Calsarcin-1 Proteinexpression mit GAPDH als Ladekontrolle. M: Prestained Protein Marker (Größenangaben in kDa). Roter Kanal: GAPDH. Grüner Kanal: Calsarcin-1. **C** Densitometrische Auswertung mit Normalisierung auf GAPDH. n=2. Alle Daten in **A** sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

4.3 AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen bei einer viralen Dosis von 1×10^{12} vG/Tier (Hochdosis-Studie)

Da in der ersten Studie mit Wildtyp-Mäusen trotz erkennbarer Therapieeffekte auf molekularer und histologischer Ebene keine Überexpression von Calsarcin-1 nachgewiesen werden konnte, wurde eine neue Studie konzipiert, bei der nun eine fünfmal höhere Virusdosis von 1×10^{12} vG/Tier injiziert wurde („Hochdosis-Studie“). Ebenso wurde der Zeitraum zwischen Virusinjektion und Pumpeneinbau um etwas mehr als eine Woche auf insgesamt zwei Wochen erhöht (Abb. 4.10), um die Expression von Calsarcin-1 auf mRNA- und Proteinebene deutlich zu steigern. Darüber hinaus sollte geklärt werden, inwieweit die höhere Virusdosis die Therapieeffekte im Vergleich zu niedrigeren Dosis von 2×10^{11} vG/Tier noch verstärkt.

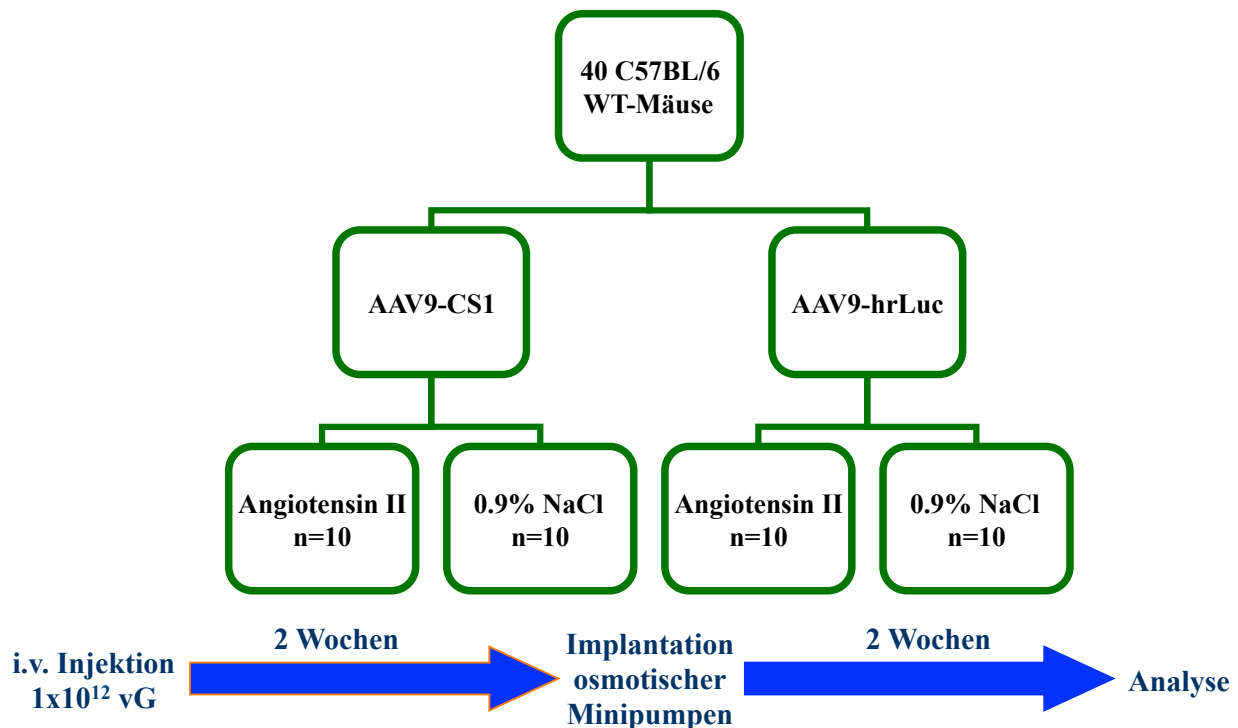


Abb. 4.10 Studiendesign zur AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen bei einer injizierten viralen Dosis von je 1×10^{12} vG/Tier

40 männliche, acht Wochen alte C57BL/6-Wildtyp-Mäuse (Janvier) wurden analog zur ersten Studie (Abschnitt 4.2) in zwei gleich große Gruppen eingeteilt, von denen die eine mit jeweils 1×10^{12} vG/Tier AAV9-Calsarcin-1 und die andere mit jeweils 1×10^{12} vG/Tier AAV9-hrLuc injiziert wurde. Zwei Wochen nach intravenöser Virusinjektion wurden dann osmotische Minipumpen befüllt mit Angiotensin II (1000 ng/kg Körpergewicht pro Minute) bzw.

0,9%iger Kochsalzlösung implantiert. Nach zwei weiteren Wochen erfolgte die Analyse der Tiere.

4.3.1 Morphometrische Analyse

Um sicherzustellen, dass die mit Angiotensin II befüllten osmotischen Minipumpen tatsächlich einen Bluthochdruck in den Versuchstieren induzieren, wurde eine Woche nach Implantation der systolische Blutdruck gemessen. Diese Messung wurde von Dipl.-Biol. Anja Feldner (Universität Heidelberg, Institut für Physiologie und Pathophysiologie) durchgeführt (Abb. 4.11).

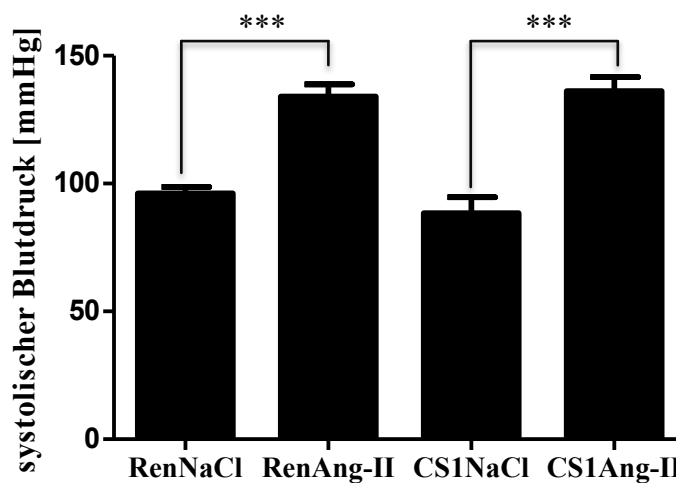


Abb. 4.11: Bestimmung des systolischen Blutdrucks der mit osmotischen Minipumpen versehenen Versuchsgruppen in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)

Messung des systolischen Blutdrucks der mit Angiotensin II bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung befüllten osmotischen Minipumpen. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ***: $p < 0,001$.

Die Angiotensin II-Behandlung führte in den entsprechenden Versuchsgruppen zu einer signifikanten Zunahme des Blutdrucks um 40% (RenNaCl im Vergleich zu RenAng-II) bzw. 54% (CS1NaCl im Vergleich zu CS1Ang-II). Die Virusapplikation per se beeinflusste die Höhe des Blutdrucks offenbar nicht.

Zwei Wochen nach Pumpeneinbau wurde wiederum eine transthorakale Echokardiographie zur Bestimmung der fraktionellen Verkürzung (FS), des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels sowie der Hinterwanddicke des linken Ventrikels durchgeführt.

Durch technische Probleme konnten aus dieser Ultraschalluntersuchung jedoch keine validen Daten gewonnen werden. Der Grund hierfür lag höchstwahrscheinlich an einem Defekt des Schallkopfes des Ultraschallgerätes. In allen vier untersuchten Versuchsgruppen waren die erhobenen Daten nahezu identisch, trotz einer auffälligen Beeinträchtigung der mit Angiotensin II-behandelten Kontrolltiere.

Unter Angiotensin II nahm wie schon bei Abb. 4.4 erkennbar jedoch das Verhältnis aus Herzgewicht/Körpergewicht signifikant zu (Abb. 4.12). Die Überexpression von Calsarcin-1 konnte aber auch hier nicht zu einer Reduktion der induzierten Hypertrophie beitragen.

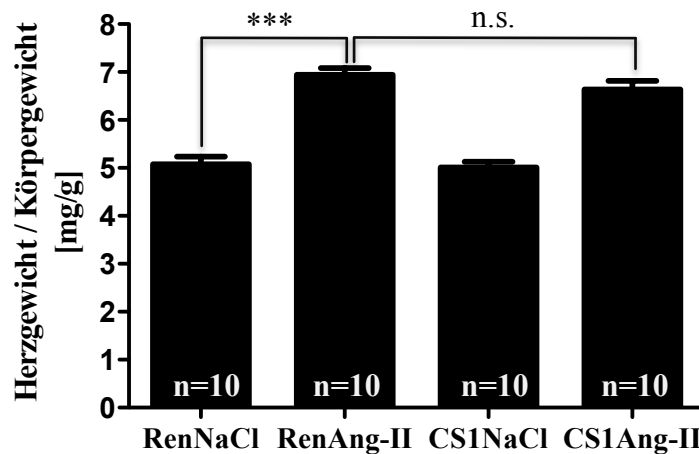


Abb. 4.12: Analyse des Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnisses in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)

Die Analyse erfolgte zwei Wochen nach Implantation der mit Angiotensin II bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung befüllten osmotischen Minipumpen in C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. Diese erhielten zwei Wochen vor Pumpeneinbau systemisch je 1×10^{12} vG AAV9-CS1 bzw. AAV9-hrLuc. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ***: $p < 0,001$. n.s.: nicht signifikant.

4.3.2 Inhibierung des Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms

Um zu bestimmen, wie stark eine AAV9-basierte Überexpression von Calsarcin-1 bei einer höheren viralen Dosis von 1×10^{12} vG/Tier das hypertrophe Genprogramm inhibieren kann, wurden Real-Time PCR-Analysen durchgeführt und das Expressionsniveau von ANF, BNP und β -MHC bestimmt (Abb. 4.13).

Die Zunahme der mRNA-Expression der untersuchten Hypertrophiemarker verursacht durch Angiotensin II in der AAV9-hrLuc-Kontrollgruppe war mit Ausnahme von ANF, wo sie nur halb so hoch war (Abb. 4.13A), vergleichbar zur ersten Wildtypstudie (vgl. Abb. 4.5 im Kapitel 4.2). Für ANF und BNP zeigte sich durch die zusätzliche Expression von Calsarcin-1 eine signifikante Reduktion im Expressionsniveau, die für BNP fast 20% stärker ausfiel als bei der geringen Virusdosis (64,7% gegenüber 47,2%). Im Falle von β -MHC konnte allerdings keine signifikante Reduktion der mRNA-Expression gezeigt werden.

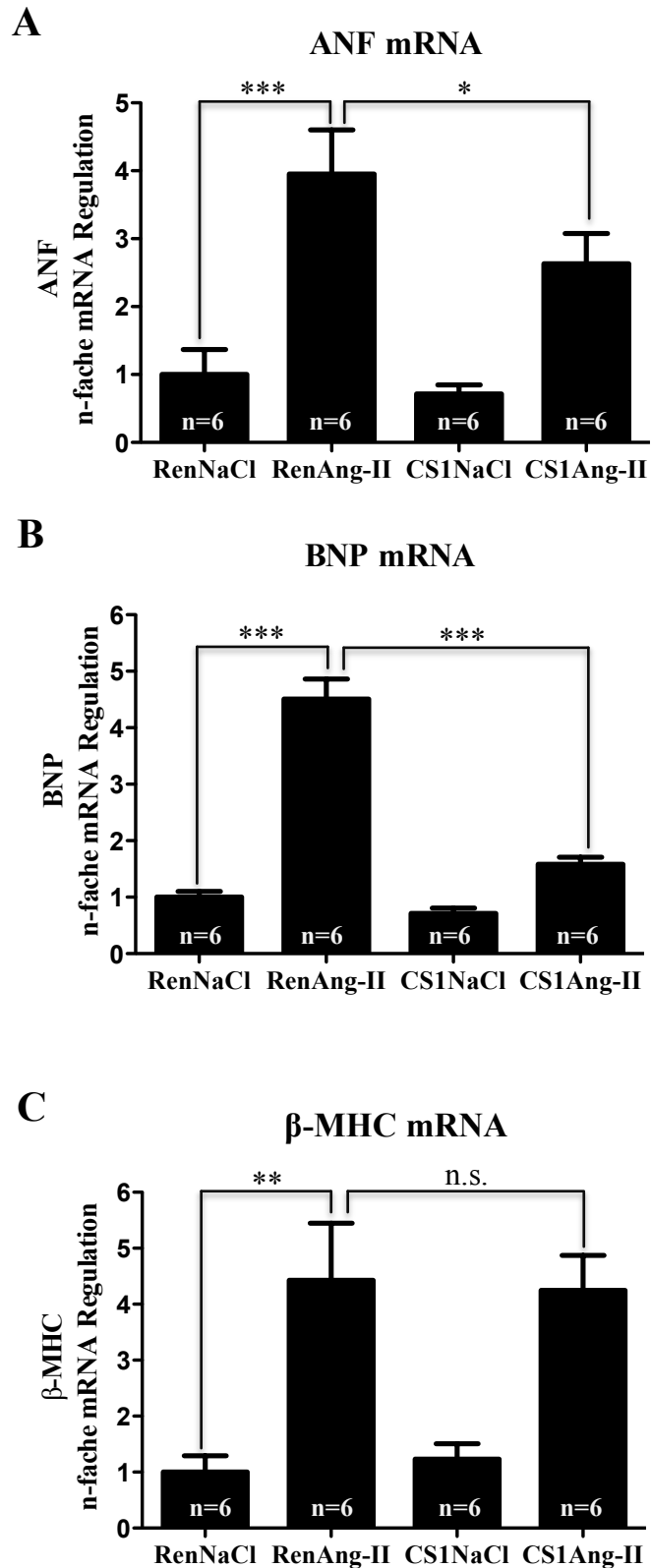


Abb. 4.13: Real-Time PCR-Analyse des durch Angiotensin II-induzierten hypertrophen Genprogramms im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)

Analysiert wurde die mRNA-Expression von ANF (A), BNP (B) und β -MHC (C) normalisiert auf die 18S rRNA. Um den Grad der Regulation zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$. ***: $p < 0,001$. n.s.: nicht signifikant.

4.3.3 Inhibierung der Calcineurinaktivität durch AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Überexpression

Die Aktivierung des hypertrophen Genprogramms (gemessen an ANF, BNP und β -MHC) läuft wie erwähnt u.a. über den Calcineurin-Signalweg (Frank et al., 2007; Murat et al., 2000; Taigen et al., 2000). Bereits in der ersten Wildtypstudie konnte eine Reduktion von knapp 58% dieser Induktion durch die AAV9-basierte Calsarcin-1 Überexpression gezeigt werden (Abb. 4.6A).

Mit einer fünffach höheren Virusdosis wurde nun, bei gleich starker Aktivierung der mRNA-Expression von RCAN1-4 eine Reduktion um ca. 80% festgestellt (Abb. 4.14).

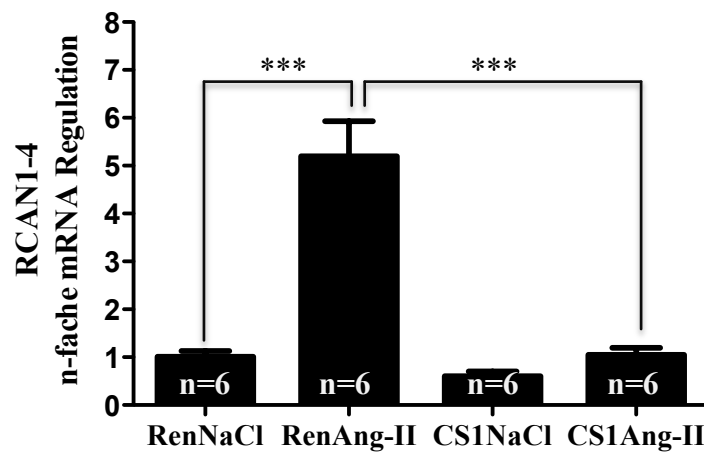


Abb. 4.14: Analyse der Calcineurinaktivität über RCAN1-4 im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen unter chronischer Angiotensin II-Infusion

Real-Time PCR-Expressionsanalyse der RCAN1-4 mRNA-Expression normalisiert auf die 18S rRNA. Um die Stärke der Regulation zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ***: $p < 0,001$.

4.3.4 Reduktion der Angiotensin II-vermittelten Fibrose nach AAV9-Calsarcin-1 Behandlung

Zur Analyse des Einflusses einer höheren Virusdosis auf das Ausmaß der durch Angiotensin II-induzierten Fibrose wurde aus kryokonserviertem Herzgewebe der mitventrikulären Scheibe histologische Schnitte angefertigt und diese dann einer Masson-Trichrom-Färbung unterzogen (Abb. 4.15) und zusätzlich das mRNA-Expressionsniveau von Kollagen III bestimmt (Abb. 4.16).

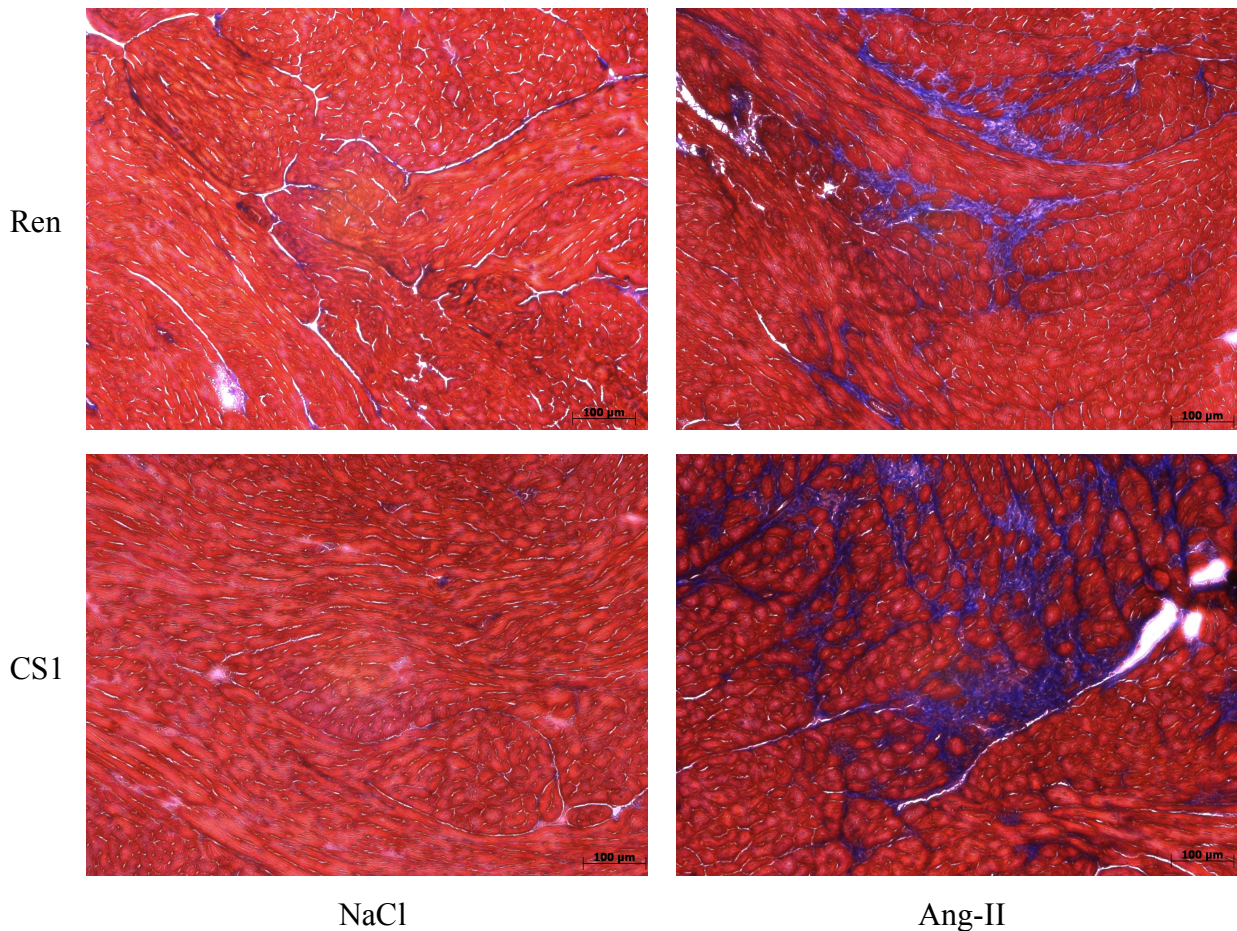


Abb. 4.15: Analyse der durch Angiotensin II-induzierten Fibrose in mitventrikulären Gewebsschnitten des Herzens von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)

Für jede experimentelle Gruppe ist exemplarisch ein Masson-Trichrom gefärbter histologischer Schnitt dargestellt. Das fibrotische Gewebe ist blau gefärbt. Balken: 100 µm.

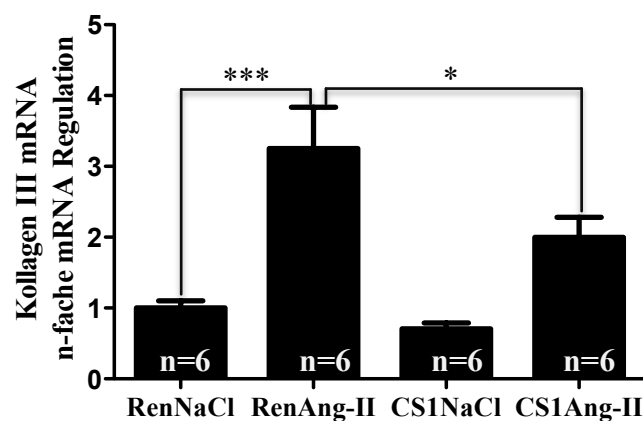


Abb. 4.16: Real-Time PCR-Analyse der Kollagen III mRNA-Expression im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)

Analysiert wurde die mRNA-Expression von Kollagen III normalisiert auf die 18S rRNA. Um den Grad der Expression zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *: $p < 0,05$. ***: $p < 0,001$.

In den beiden mit 0,9%iger Kochsalzlösung behandelten Versuchsgruppen zeigte sich unabhängig vom injizierten Virus keine Fibrosierung (Abb. 4.15). Versuchstiere, die jedoch

einer chronischen Angiotensin II-Infusion ausgesetzt waren, entwickelten fibrotische Bereiche im Herzgewebe, wobei die Überexpression von Calsarcin-1 im Gegensatz zur Niedrigdosis-Studie (Abb. 4.7) keinen reduzierenden Effekt zu haben schien.

Bei der Analyse des mRNA-Expressionsniveaus von Kollagen III (Abb. 4.16) war deutlich erkennbar, dass es zu einer signifikanten Zunahme (ca. dreifach beim Vergleich von RenNaCl mit RenAng-II) bei chronischer Angiotensin II-Infusion kam. Eine stärkere Reduktion im Expressionsniveau durch die höhere Virusdosis war jedoch nicht erkennbar (vgl. Abb. 4.8).

4.3.5 Nachweis der AAV9-vermittelten Überexpression von Calsarcin-1

Um zu klären, ob auf dem Hintergrund einer fünffach höher eingesetzten Virusdosis an AAV9-Calsarcin-1 die Überexpression von Calsarcin-1 nachgewiesen werden kann, wurde wiederum eine Real-Time PCR-Analyse (Abb. 4.17A) sowie eine Western-Blot-Analyse (Abb. 4.17B und C) durchgeführt.

Durch eine fünffach höhere Virusdosis an AAV9-Calsarcin-1 konnte nun zumindest auf mRNA-Ebene eine Überexpression von ca. 65% gegenüber der Kontrollgruppe nachgewiesen werden (Abb. 4.17A). Durch den relativ hohen Standardfehler ist diese Überexpression jedoch nicht signifikant und zeigt lediglich einen Trend dahingehend ($p=0,07$, zweiseitiger t-Test). Auf Proteinebene (Abb. 4.17B) konnte keine Überexpression in der AAV9-Calsarcin-1 behandelten Gruppe vor dem Hintergrund der endogenen Calsarcin-1 Expression dargestellt werden. Die densitometrische Auswertung ergab hier ein gleiches Proteinexpressionsniveau im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4.17C).

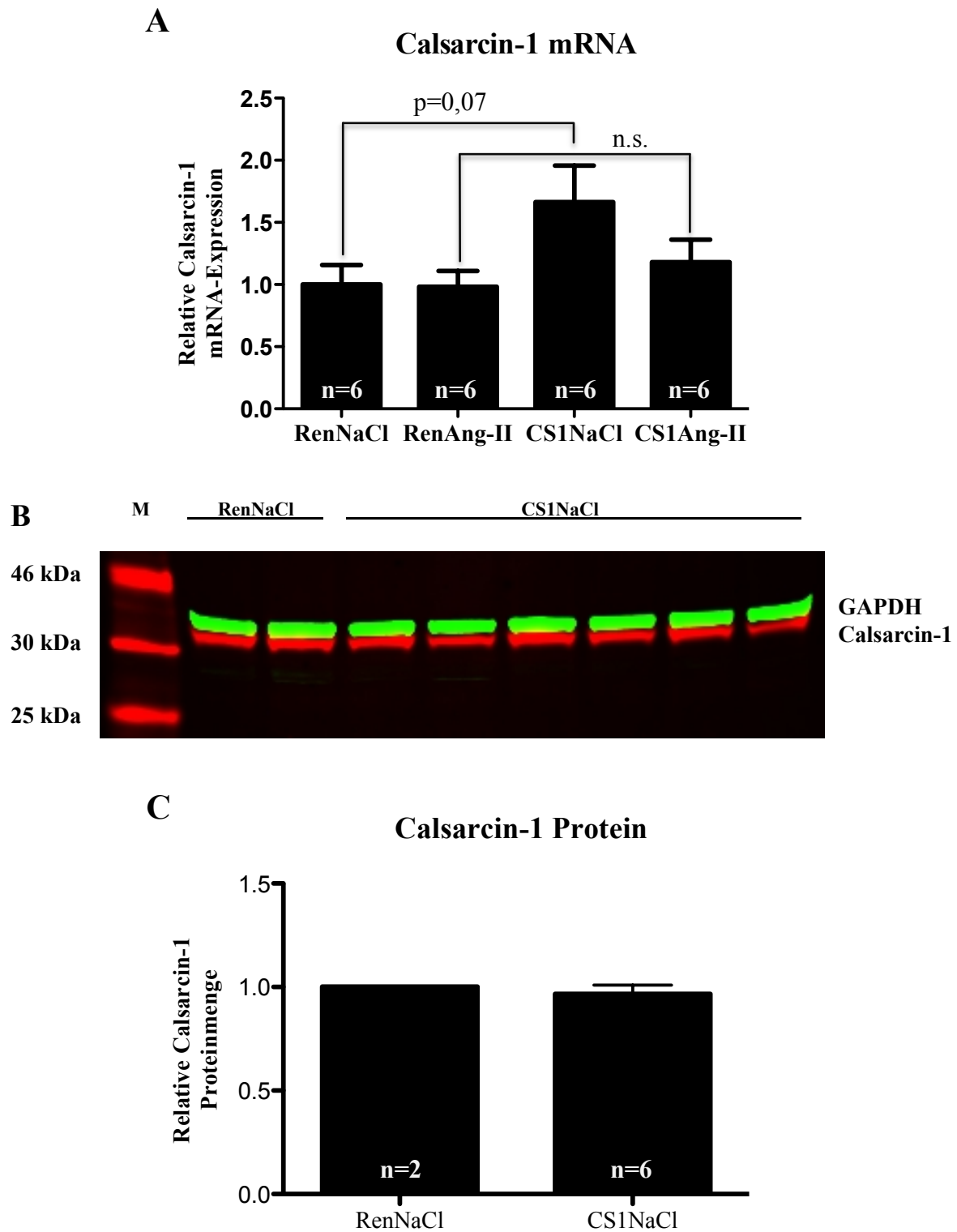


Abb. 4.17: Analyse der AAV9-vermittelten Calsarcin-1 Überexpression im Myokard von C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Hochdosis-Studie)

Real-Time PCR-Analyse (A) der Calsarcin-1 mRNA-Expression normalisiert auf die 18S rRNA. Die Calsarcin-1 Expression in der Kontrollgruppe (RenNaCl) wurde gleich 1 und die anderen Gruppen dazu ins Verhältnis gesetzt. B Exemplarischer Western-Blot zur Calsarcin-1 Proteinexpression mit GAPDH als Ladekontrolle. Roter Kanal: Calsarcin-1. Grüner Kanal: GAPDH. M: Prestained Protein Marker (Größenangaben in kDa). C Densitometrische Auswertung mit Normalisierung auf GAPDH. Dargestellt wurden dabei nur die mit 0,9%iger Kochsalzlösung behandelten Versuchstiere (n=2 für RenNaCl; n=6 für CS1NaCl). Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. n.s.: nicht signifikant.

4.4 AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten CS1-KO-Mäusen bei einer viralen Dosis von 1×10^{12} vG/Tier

Können vergleichbare Therapieeffekte durch eine AAV9-basierende Calsarcin-1 Expression auch im CS1-KO-Mausmodell mit gleichem genetischen Hintergrund wie die Wildtypiere (C57BL/6-Mäuse) erzielt werden?

Da es durch Zuchtprobleme nicht möglich war, gleichzeitig alle CS1-KO-Tiere im gleichen Alter zur Verfügung zu haben, wurde diese Studie gruppenweise nacheinander durchgeführt. Insgesamt 35 männliche, acht Wochen alte CS1-KO-Mäuse wurden mit 1×10^{12} vG/Tier AAV9-CS1 bzw. AAV9-hrLuc injiziert und nach zwei Wochen mit osmotischen Minipumpen versehen, die entweder mit 0,9%iger Kochsalzlösung oder mit Angiotensin II befüllt waren. Nach weiteren zwei Wochen erfolgte dann analog zu den Wildtypstudien die Analyse. Das Studiendesign entsprach dem in Abb. 4.10 dargestellten mit der Ausnahme, dass in der CS1Ang-II-Gruppe 11 Tiere und in den anderen drei Gruppen jeweils 8 Tiere analysiert wurden.

4.4.1 Morphometrische Analyse

Zur Klärung, ob die Versuchstiere, die mit Angiotensin II befüllte Minipumpen implantiert bekommen hatten, auch einen Bluthochdruck entwickeln, wurde wiederum der systolische Blutdruck bestimmt (Abb. 4.18).

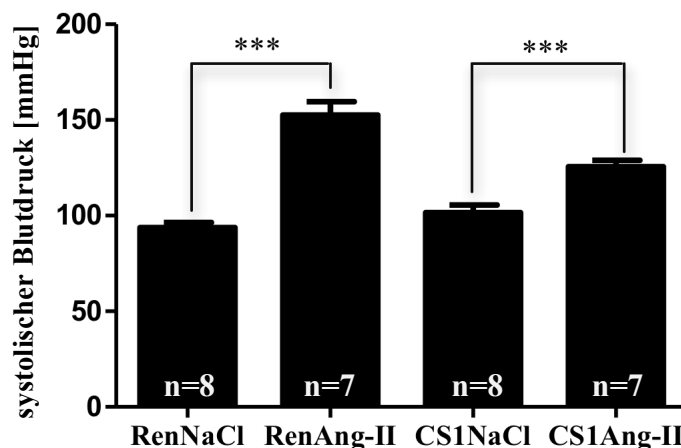


Abb. 4.18: Bestimmung des systolischen Blutdrucks der mit osmotischen Minipumpen versehenen Versuchsgruppen in CS1-KO-Mäusen

Messung des systolischen Blutdrucks der mit Angiotensin II bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung befüllten osmotischen Minipumpen. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. ***: $p < 0,001$.

In den beiden mit Angiotensin II-behandelten Versuchsgruppen zeigte sich eine signifikante Zunahme des systolischen Blutdrucks um 63% (RenNaCl im Vergleich zu RenAng-II) bzw. um 24% (CS1NaCl im Vergleich zu CS1Ang-II). Die chronische Infusion von Angiotensin II führte also reproduzierbar zu einer systolischen signifikanten Erhöhung des Blutdrucks. Der Blutdruckanstieg war in den mit Kontrollvirus-injizierten Tieren allerdings deutlich stärker ausgeprägt als in den AAV9-Calsarcin-1-injizierten Tieren. Im Gegensatz dazu zeigte die AAV9-Calsarcin-1 Kontrollgruppe (CS1NaCl) jedoch schon basal einen leicht höheren Blutdruck um 8%.

Zur Bestimmung der fraktionellen Verkürzung (FS), der Hinterwanddicke und des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels wurde vor Versuchsende wiederum eine transthorakale Echokardiographie durchgeführt (Abb. 4.19).

Die chronische Angiotensin II-Infusion verursachte in den mit dem Kontrollvirus behandelten Tieren eine drastische Abnahme der fraktionellen Verkürzung um 45%, die durch die AAV9-vermittelte Reexpression von Calsarcin-1 nicht verbessert werden konnte (Abb. 4.19A). Allerdings wies die AAV9-Calsarcin-1 Kontrollgruppe eine ähnlich geringe fraktionelle Verkürzung auf. Unter basalen Bedingungen zeigten die CS1-KO-Tiere eine vergleichbare fraktionelle Verkürzung wie die entsprechenden Wildtyp-Tiere von ca. 45%. Lediglich die Reduktion der Pumpleistung des Herzens fiel in den CS1-KO-Mäusen unter Angiotensin II-Infusion stärker aus. Auch bei dieser Ultraschalluntersuchung konnte nicht eindeutig geklärt werden, ob das Gerät, insbesondere der verwendete Ultraschallkopf, in einem einwandfreien Zustand waren. Dies könnte zumindest erklären, warum die CS1NaCl-Kontrollgruppe eine im Vergleich zur RenNaCl-Kontrollgruppe schlechte fraktionelle Verkürzung zeigte.

Der Durchmesser des linken Ventrikels in der Diastole nahm in den mit Angiotensin II-behandelten Kontrolltieren signifikant um fast 42% zu. Diese konnte durch die AAV9-gestützte Reexpression von Calsarcin-1 geringfügig um 7,5% reduziert werden (Abb. 4.19B). Ein Vergleich zur Wildtyp-Studie (Niedrigdosis-Studie) zeigte, dass unter basalen Bedingungen CS1-KO-Tiere einen nur geringfügig größeren linksventrikulären enddiastolischen Durchmesser aufweisen. Unter einer Angiotensin II-Dauerinfusion hingegen nahm dieser in den KO-Tieren wesentlich stärker zu.

Die chronische Angiotensin II-Infusion verursachte ebenfalls eine signifikante Zunahme der linksventrikulären Hinterwanddicke um 33% (Abb. 4.19C). Auch hier reichte die AAV9-vermittelte Reexpression von Calsarcin-1 nicht aus, um diese signifikant zu reduzieren (ca. 8,7%ige Reduktion).

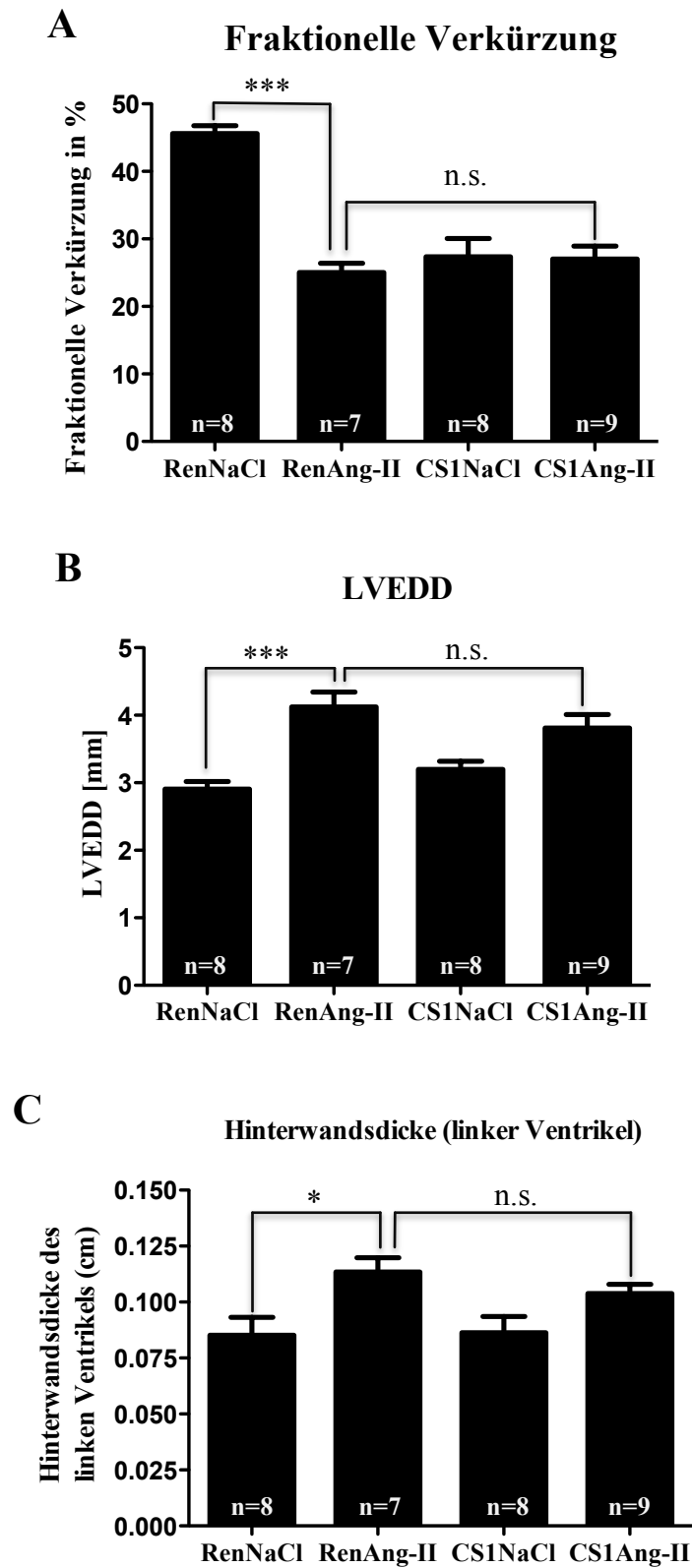


Abb. 4.19: Echokardiographische Analyse der fraktionellen Verkürzung (A), des enddiastolischen Durchmessers des linken Ventrikels (B) sowie der Hinterwandsdicke des linken Ventrikels (C) in CS1-KO-Mäusen

Die Analyse erfolgte zwei Wochen nach Implantation der mit Angiotensin II bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung befüllten osmotischen Minipumpen in CS1-KO-Mäusen. Diese erhielten zwei Wochen vor Pumpeneinbau systemisch je 1×10^{12} vG AAV9-CS1 bzw. AAV9-hrLuc. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *: $p < 0,05$. ***: $p < 0,001$. n.s.: nicht signifikant.

Das Verhältnis von Herzgewicht-Körpergewicht betrug in der RenNaCl-Kontrollgruppe (Abb. 4.20) 7,39 mg/g und war damit um ca. 60% größer als in den mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen (Abb. 4.4 und 4.13).

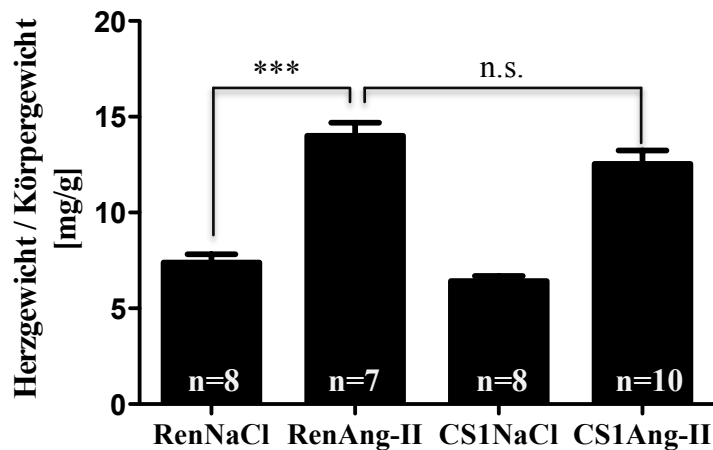


Abb. 4.20: Analyse des Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnisses in CS1-KO-Mäusen

Die Analyse erfolgte zwei Wochen nach Implantation der mit Angiotensin II bzw. 0,9%iger Kochsalzlösung befüllten osmotischen Minipumpen in CS1-KO-Mäusen. Diese erhielten zwei Wochen vor Pumpeneinbau systemisch je 1×10^{12} vG AAV9-CS1 bzw. AAV9-hrLuc. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

***: $p < 0,001$. n.s.: nicht signifikant.

Die Dauerinfusion mit Angiotensin II führte fast zu einer Verdopplung des Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnisses (90% Zuwachs gegenüber der Kontrolle). Wie zuvor auch in den beiden Wildtypstudien erkennbar, führt auch hier die AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Reexpression nicht zu einer signifikanten Reduktion der durch Angiotensin II-induzierten Hypertrophie und damit zu keinem therapeutischen Effekt (Abb. 4.20).

4.4.2 Analyse des hypertrophen Genprogramms

Per Real-Time PCR-Analyse wurde die Expression der prohypertrophen Marker ANF, BNP und β -MHC sowie deren etwaige Inhibierung durch Calsarcin-1 Expression im KO-Hintergrund bestimmt (Abb. 4.21).

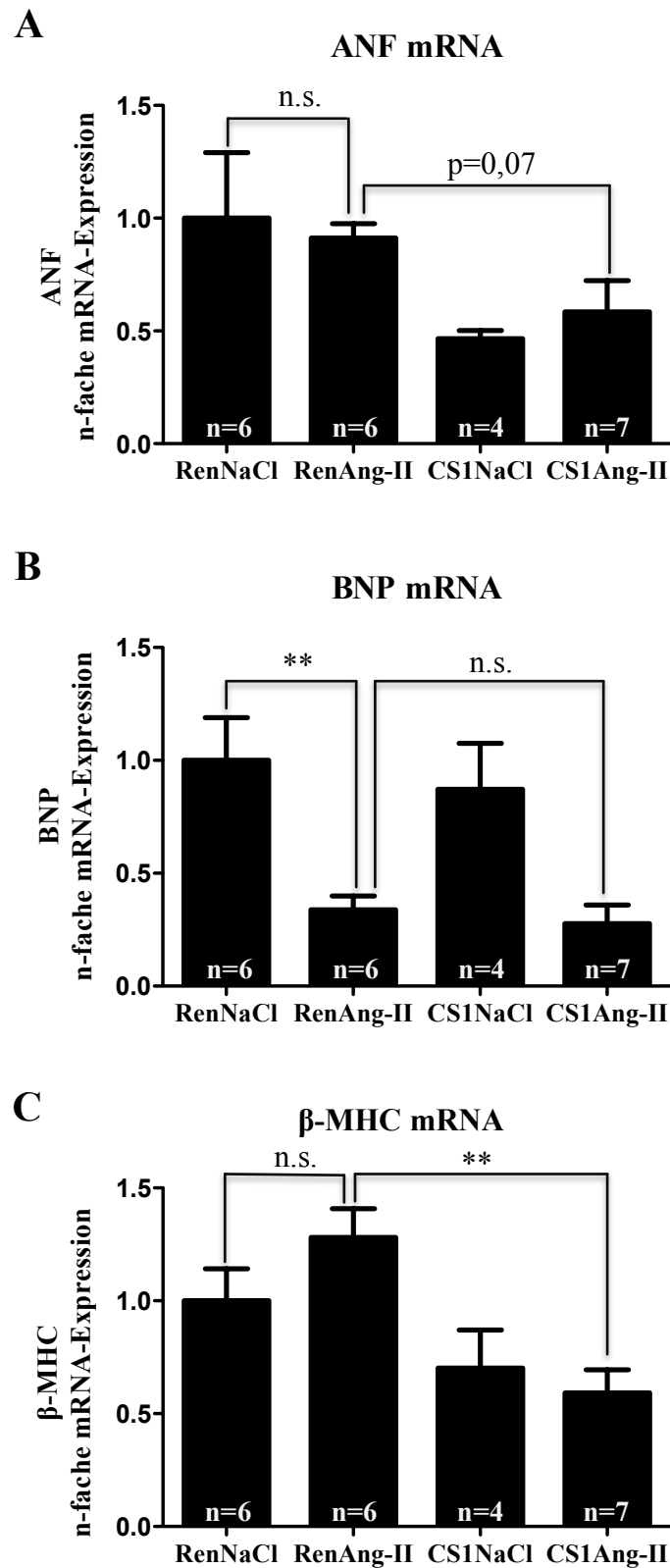


Abb. 4.21: Real-Time PCR-Analyse des hypertrophen Genprogramms im Myokard von CS1-KO-Mäusen

Analysiert wurde die mRNA-Expression von ANF (A), BNP (B) und β -MHC (C) normalisiert auf die 18S rRNA. Um das Expressionsniveau zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. **: $p < 0,01$. n.s.: nicht signifikant.

Bei den beiden prohypertrophen Markern ANF (Abb. 4.21A) und BNP (Abb. 4.21B) war bei Angiotensin II-Behandlung der CS1-KO-Tiere überraschenderweise keine Steigerung der mRNA-Expression festzustellen, sondern im Falle von BNP sogar eine deutliche Reduktion. Für den prohypertrophen Marker β -MHC war eine nicht signifikante Steigerung in der Expression um 28% messbar (Abb. 4.21C). Die fehlende bzw. schwache Induktion in der Genexpression ist hier auf den schon basal hohen mRNA-Spiegel im CS1-KO-Hintergrund der jeweiligen Genprodukte zurückzuführen. Auffallend ist weiterhin, dass die vorhandene Menge an BNP-mRNA in den AAV9-Calsarcin-1-injizierten Kontrolltieren höher war als in den zusätzlich mit Angiotensin II-behandelten Tieren. Dies kann aber auch auf den bereits unter Basalbedingungen hohen Spiegel an BNP mRNA zurückzuführen sein. Für β -MHC konnte durch die Reexpression von Calsarcin-1 die mRNA-Expression um 54% reduziert werden.

4.4.3 Inhibierung der Calcineurinaktivität durch AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Überexpression

Zur Analyse der Calcineurinaktivität wurde wiederum das Expressionsniveau von RCAN1-4 auf mRNA-Ebene bestimmt.

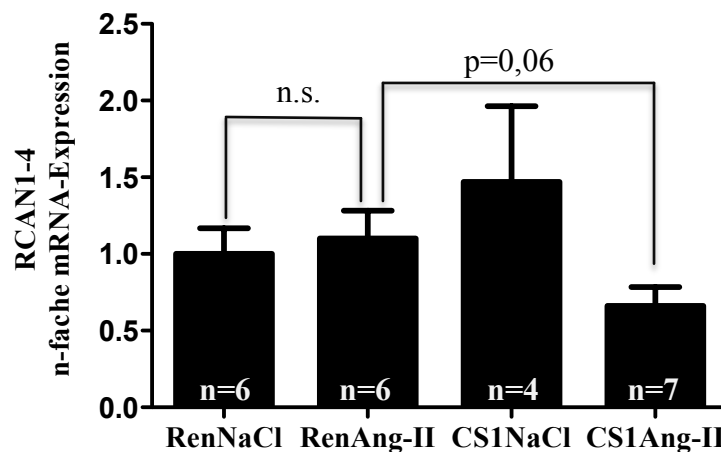


Abb. 4.22: Real-Time PCR-Analyse der Calcineurinaktivität über RCAN1-4 im Myokard von CS1-KO-Mäusen unter chronischer Angiotensin II-Infusion

Real-Time PCR-Analyse der RCAN1-4 mRNA-Expression normalisiert auf die 18S rRNA. Um den Stärke der Expression zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. n.s.: nicht signifikant.

Wie aus Abb. 4.22 erkennbar wird, kommt es zu keiner weiteren Expressionssteigerung von RCAN1-4 unter chronischer Angiotensin II-Behandlung. Die AAV9-CS1-injizierte Kontrollgruppe weist im Durchschnitt ein um ca. 47% erhöhtes mRNA-Expressionsniveau

auf. Durch den fehlenden Negativregulator Calsarcin-1 in den CS1-KO-Tieren ist die basale Calcineurinaktivität und damit die RCAN1-4 Expression bereits hoch und kann und kann durch Angiotensin II offenbar nicht weiter gesteigert werden. Die AAV9-vermittelte Reexpression von Calsarcin-1 führte in den mit Angiotensin II-behandelten Tieren zu einer tendenziellen Reduktion im Expressionsniveau von RCAN1-4 ($p=0,06$ im zweiseitigem t-Test).

4.4.4 Reduktion der Kollagen III mRNA-Expression nach AAV9-Calsarcin-1 Behandlung

Zur Analyse des Einflusses einer höheren Virusdosis auf die Stärke der durch Angiotensin II-induzierten Fibrose wurde das mRNA-Expressionsniveau von Kollagen III bestimmt (Abb. 4.23).

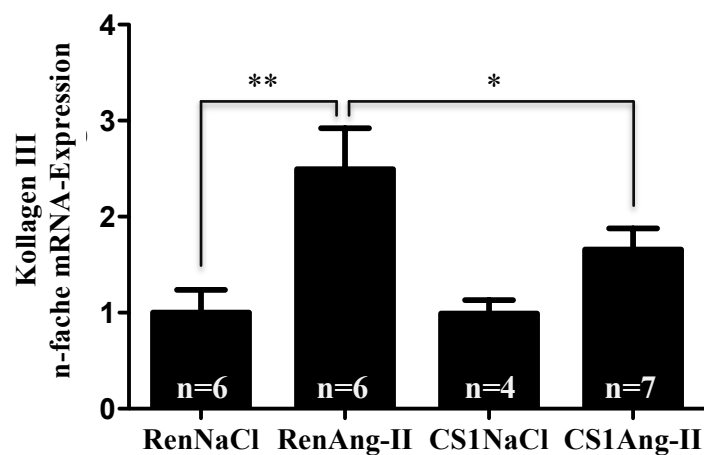


Abb. 4.23: Real-Time PCR-Analyse der Kollagen III mRNA-Expression im Myokard von CS1-KO-Mäusen

Analysiert wurde die mRNA-Expression von Kollagen III normalisiert auf die 18S rRNA. Um das Ausmaß der Expression zwischen den einzelnen Gruppen vergleichen zu können, wurden diese in Bezug zur Kontrollgruppe RenNaCl gesetzt. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. *: $p<0,05$. **: $p<0,01$.

Im Gegensatz zu den analysierten prohypertrophischen Markern (Abb. 4.21) zeigte die Expression von Kollagen III eine signifikante 2,5fache Zunahme nach Angiotensin II-Exposition. Die AAV9-basierte Reexpression von Calsarcin-1 konnte die Expressionszunahme signifikant um 33,5% reduzieren (CS1Ang-II im Vergleich zu RenAng-II). Die kontrollbehandelte AAV9-Calsarcin-1 injizierte Versuchsgruppe zeigte ein gleich hohes Expressionsniveau wie die AAV9-hrLuc Kontrollgruppe.

4.4.5 Nachweis der AAV9-vermittelten Überexpression von Calsarcin-1

Um sicherzustellen, dass das injizierte virale Konstrukt auch zu einer Expression des Transgens führt, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (Abb. 4.24A). Tiere, die mit 1×10^{12} vG/Tier AAV9-Calsarcin-1 injiziert worden waren, zeigten eine schwache Calsarcin-1 Proteinbande vier Wochen nach Virusinjektion, die in ihrer Intensität vergleichbar mit der aus dem Vorversuch war (siehe Abb. 4.1). Die mit dem Kontrollvirus AAV9-hrLuc injizierten Versuchsgruppen zeigten erwartungsgemäß keine Calsarcin-1 Expression.

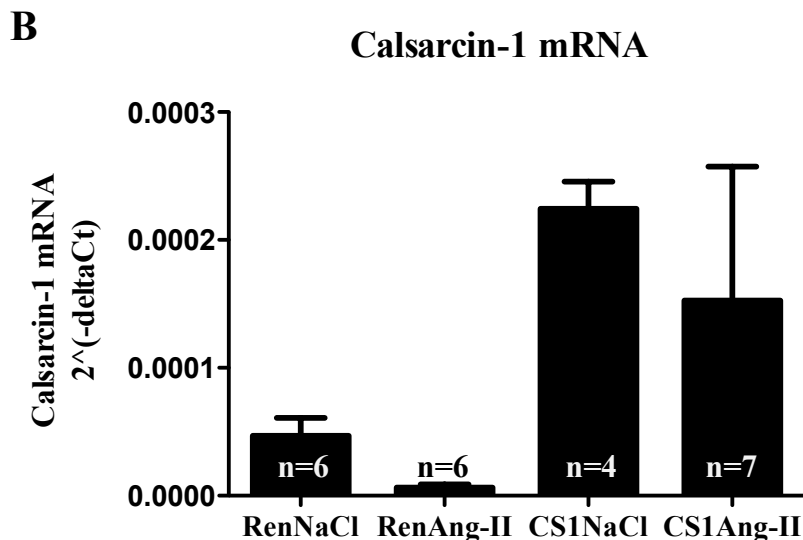
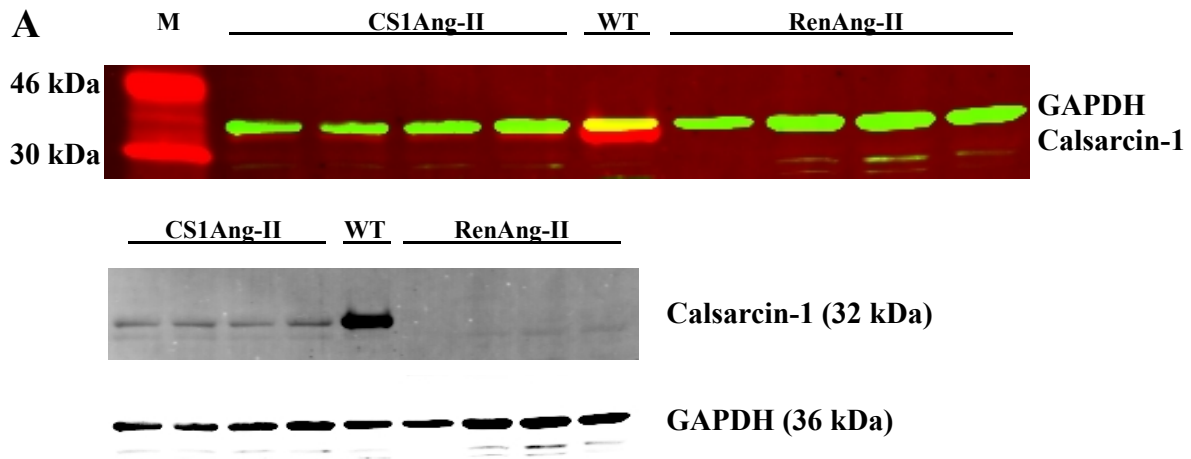


Abb. 4.24: Analyse der AAV9-vermittelten Calsarcin-1 Expression im Myokard von CS1-KO-Mäusen

A Exemplarischer Western-Blot zur Calsarcin-1 Proteinexpression mit GAPDH als Ladekontrolle sowie die separate Darstellung der Kanäle in Schwarz-Weiß. M: Prestained Protein Marker (Größenangaben in kDa). Roter Kanal: Calsarcin-1. Grüner Kanal: GAPDH. WT: Wildtyp-Kontrolltier (C57BL/6). **B** Real-Time PCR-Analyse der Calsarcin-1 Expression normalisiert auf die 18S rRNA angegeben als $2^{(-\Delta Ct)}$ -Wert. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Mittels Real-Time PCR-Analyse wurde abschließend noch die Calsarcin-1 Expression auf mRNA-Ebene untersucht (Abb. 4.24B). Beide mit AAV9-Calsarcin-1 injizierten

Versuchsgruppen zeigten eine deutliche Expression des Transgens auf mRNA-Ebene. Die „gemessenen“ Werte für die mit AAV9-hrLuc injizierten Gruppen stellten dagegen nur Hintergrundschwankungen dar.

5. DISKUSSION

5.1 Generierung eines AAV9-exprimierenden Calsarcin-1 Vektors

Ziel dieser Arbeit war es, einen AAV9-basierten kardialen Gentherapieansatz zur Behandlung einer erworbenen Myokardhypertrophie im Mausmodell zu entwickeln.

Dazu wurde die kodierende murine Sequenz von Calsarcin-1 in einen pds-CMV_{enh}-MLC0.26-Expressionsvektor eingebracht. Vier Wochen nach systemischer Applikation von AAV9-CS1 konnte für beide injizierten Dosen *in vivo* in CS1-KO-Mäusen eine Expression nachgewiesen werden. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass eine AAV9-basierte Expression von Calsarcin-1 *in vivo* möglich ist. Im Vergleich zu nicht-injizierten männlichen C57BL/6-Wildtyp-Mäusen konnte mit beiden injizierten Virusdosen eine Expression von ca. 10% erreicht werden. In Calsarcin-1-transgenen Mäusen kann bei gleichbleibender endogener Calsarcin-1 Synthese eine Überexpression von 140% erreicht werden (Frank et al., 2007) und ist damit 24mal so hoch wie durch AAV9-vermittelte Expression. Allerdings erfolgte die Calsarcin-1 Expression in den transgenen Mäusen auch unter der Nutzung eines anderen herzspezifischen Promotors, dem α -MHC-Promotor, während in dieser Studie eine Kombination aus einem verkürzten Myosinleichtkettenpromotor mit einem CMV-Enhancer-Element (CMV_{enh}-MLC02.6) zum Einsatz kam.

Dieser heterologe Promotor wurde verwendet, um eine hohe Transgenexpression im adulten Herzen zu erreichen (Boshart et al., 1985; Franz et al., 1993; Frey et al., 2000a; Müller et al., 2003). Bei einer Gegenüberstellung des MLC0.26-Promotors (Schinkel, 2010) mit dem größeren MLC1.5-Promotor (Müller et al., 2006) zeigte sich auf der Basis von Einzelstrangvektoren kein Unterschied in der kardialen Expression des untersuchten Reporters. Um nun die Vorteile einer schnelleren Transgenexpression von Calsarcin-1 (ca. 800 bp) in Doppelstrangvektoren im Gegensatz zu Einzelstrangvektoren zu nutzen (Chu et al., 2003; Wright et al., 2001), die gleichzeitig aber zu einer verringerten Verpackungskapazität von ca. 2,5 kb führen (McCarty et al., 2003; McCarty et al., 2001; Wang et al., 2003), fiel die Wahl auf den CMV-verstärkten verkürzten Myosinleichtkettenpromotor.

Wie aus den Western-Blot-Analysen hervorgeht, erreicht man durch Injektion einer zehnfach höheren Virusmenge keine Steigerung im Expressionsniveau von Calsarcin-1. Diese beträgt in beiden Fällen maximal 10% im Vergleich zum Wildtypniveau und fällt damit sehr schwach aus. Dennoch sollte dieser Gentherapieansatz zur Vermeidung einer Hypertrophie im Modell der Angiotensin II-induzierten kardialen Hypertrophie (osmotische Angiotensin II

Minipumpen) diesbezüglich sowohl in Wildtyp-Tieren wie auch im CS1-KO-Mausmodell untersucht werden.

Angiotensin II ist ein Produkt des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, das u.a. durch Regulierung des Wasser- und Salzhaushaltes im Körper Einfluss auf den Blutdruck nimmt. Angiotensin II bewirkt dabei eine Konstriktion peripherer Widerstandsgefäße und damit einen Anstieg im Blutdruck mit dem Ziel einer verbesserten Organdurchblutung insbesondere der Nieren. Der erhöhte periphere Widerstand führt im Endeffekt aber zu einer erhöhten biomechanischen Belastung des Herzens und der Entwicklung einer Linksherzhypertrophie. Darüber hinaus bewirkt Angiotensin II auch direkt über die Bindung an $G_{q/11}$ -gekoppelte AT1-Rezeptoren der Kardiomyozyten eine Aktivierung der Phospholipase $C\beta$ und im weiteren Verlauf einen Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration, der u.a. zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin führt (Ito et al., 1997; Sadoshima et al., 1993; Schunkert et al., 1995).

Der Gentherapieansatz in Wildtyp-Mäusen reflektiert dabei die Situation beim Patienten mit einer erworbenen Herzhypertrophie. Der Gentransfer im Knockout-Mausmodell soll dagegen das Potential eines AAV-gestützten *Rescue* der Calsarcin-1 Expression untersuchen. Hier könnte womöglich bereits eine schwache Reexpression von Calsarcin-1 ausreichen, um einen therapeutischen Effekt zu erzielen. Darüber hinaus ist es auch von Interesse, ob die Expression von Calsarcin-1 in adulten Mäusen überhaupt sinnvoll ist.

5.2 AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten C57BL/6-Wildtyp-Mäusen

Um das Potenzial der AAV9-basierten Calsarcin-1 Gentherapie bei der Angiotensin II-induzierten kardialen Hypertrophie in Wildtyp-Mäusen, einem Modell für die erworbene Myokardhypertrophie beim Patienten, zu untersuchen, wurden zwei Studien mit einer niedrigen viralen Dosis (2×10^{11} vG/Tier; „Niedrigdosis-Studie“) sowie einer hohen Dosis (1×10^{12} vG/Tier; „Hochdosis-Studie“) durchgeführt. Zur Induktion einer ausgeprägten Hypertrophieantwort waren die Versuchstiere einer chronischen Angiotensin II-Applikation mit einer Dosis von 1000 ng/kg Körpergewicht pro Minute für einen Zeitraum von zwei Wochen ausgesetzt. Kontrolltiere erhielten eine 0,9%ige Kochsalzlösung.

5.2.1 Morphometrische Analyse

Eine chronische Angiotensin II-Infusion verursachte in den mit AAV9-hrLuc und mit AAV9-CS1 behandelten Tieren einen signifikanten Blutdruckanstieg von durchschnittlich 47%.

Unabhängig vom Virustiter verursachte Angiotensin II eine signifikante Zunahme im Verhältnis aus Herzgewicht-Körpergewicht. Zusätzlich war eine Verschlechterung der Pumpleistung des Herzens bei gleichzeitigem Trend zur Dilatation des linken Ventrikels in der Niedrigdosis-Studie erkennbar, die beide durch die AAV9-basierte Calsarcin-1 Überexpression aufgehoben werden konnten. In der Hochdosis-Studie konnte diesbezüglich keine Aussage gemacht werden, da die Datenakquisition durch einen Defekt des Schallkopfes des Ultraschallgerätes wahrscheinlich ungültig war. Dennoch zeigen diese Befunde, dass unabhängig vom Virustiter die Hypertrophieentstehung durch eine, wenn auch geringfügige, Überexpression von Calsarcin-1 nicht verhindert werden kann. Lediglich die sich entwickelnde linksventrikuläre Dysfunktion kann verhindert werden.

Die im Vergleich von Frank et al. (2007) verwendeten transgenen Calsarcin-1 Mäuse zeigten bei chronischer Angiotensin II-Behandlung ein vollständiges Ausbleiben der kardialen Hypertrophieentwicklung. Diese Tiere waren jedoch nur einer halb so großen Dosis von Angiotensin II (500 ng/kg Körpergewicht pro Minute) ausgesetzt. Auch fand hier die Expression des Transgens bereits ab der Geburt statt, d.h. insgesamt acht Wochen länger als die AAV9-behandelten Wildtyp-Mäuse, und zeigten eine 24mal so hohe Expression. Bedingt durch die geringere Angiotensin II-Menge kam es hier nicht nur zu einem geringen Anstieg des Blutdrucks um ca. 24% (im Vergleich zu 47% in dieser Arbeit), sondern auch zu keiner linksventrikulären Dysfunktion.

5.2.2 AAV9-Calsarcin-1 Überexpression inhibiert das Angiotensin II-induzierte hypertrophe Genprogramm sowie den Calcineurin-NFAT-Signalweg

Für die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie stellt der Calcineurin-NFAT-Signalweg sowohl eine hinreichende wie auch notwendige Voraussetzung dar (De Windt et al., 2001; Molkentin et al., 1998). Die Aktivierung der Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin erfolgt dabei über $G_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptor-Agonisten wie Angiotensin II (Frank et al., 2007; Murat et al., 2000; Taigen et al., 2000). Die Deletion von $G_{q/11}$ in einem genetischen Knockout-Mausmodell verhindert hingegen die Entwicklung der Herzhypertrophie (Wettschureck et al., 2001).

Um die Aktivität der Serin-Threonin-Phosphatase Calcineurin zu bestimmen, wurde die Expression von RCAN1-4 untersucht. Dieses Gen trägt in seinem Promotorbereich, der stromaufwärts des Exon 4 von RCAN1 liegt, insgesamt 15 NFAT-Bindungsstellen (Yang et al., 2000).

In beiden Wildtyp-Studien konnte nach Angiotensin II-Behandlung eine signifikante Hochregulation von RCAN1-4 auf mRNA-Ebene um den Faktor 4-5 gezeigt werden. In der mit AAV9-Calsarcin-1 behandelten Angiotensin II-Gruppe konnte hingegen die mRNA-Expression von RCAN1-4 um 58% in die Niedrigdosis-Studie und um 80% in der Hochdosis-Studie erreicht werden. Auch auf Proteinebene (Analyse nur in der Niedrigdosis-Studie) zeigte sich eine signifikante Zunahme der RCAN1-4 Expression, deren Inhibierung durch die AAV9-vermittelte Calsarcin-1 Überexpression vergleichbar mit deren Effekt auf die RCAN1-4 mRNA-Spiegel war.

Calsarcin-1 als Negativmodulator von Calcineurin ist also in der Lage auf molekularer Ebene die Aktivität von Calcineurin zu reduzieren bzw. zu hemmen. Ein weiterer Regulationsmechanismus von Calcineurin erfolgt durch die Expression von RCAN1 selbst. Dieses bindet über verschiedene Interaktionsdomänen an Calcineurin und hemmt dieses sowohl kompetitiv wie auch nicht kompetitiv (Chan et al., 2005; Vega et al., 2002).

Durch die calcineurinbedingte Translokation von dephosphorylierten NFAT-Transkriptionsfaktoren kommt es zur Induktion des hypertrophen Genprogramms (Molkentin et al., 1998). Dies zeigte sich in der signifikanten Zunahme der ANF, BNP und β -MHC mRNA-Expression in beiden Studien bei Angiotensin II-Exposition. Mit Ausnahme der β -MHC Expression in der Hochdosis-Studie konnte in allen AAV9-Calsarcin-1 Angiotensin II-behandelten Versuchsgruppen eine signifikante Reduktion der prohypertrophen Effekte von Angiotensin II gezeigt werden. Besonders ausgeprägt war diese für BNP. ANF und BNP gelten beide als vasodilatative Peptide, deren Funktion es u.a. ist, dem Angiotensin II-induzierten Anstieg des Blutdrucks und des Blutvolumens entgegenzuwirken (Kishimoto and Garbers, 1997; Nakao et al., 1996). Beide Peptide binden dabei nach ihrer Sekretion an partikuläre Guanylatzyklase-Rezeptoren vom Typ A. Der nachfolgende Anstieg der cGMP-Konzentration in der Zelle führt zu einer Proteinkinase G-vermittelten Phosphorylierung von RGS4 (regulator of G-protein signaling subtype 4), das die Beschleunigung der GTP-Hydrolyse von $G_{\alpha q/11}$ zu einer Abschwächung der IP3-vermittelten Calciummobilisierung und damit zu einer Inhibition von Calcineurin führt (Tokudome et al., 2008).

β -MHC als direkter Marker einer Herzhypertrophie ist umstritten. Vielmehr geht man davon aus, dass die Aktivierung des Renin-Angiotensin II-Systems dafür notwendig ist (Wiesner et al., 1997). Unter dem Einfluss von Angiotensin II kommt es daher zunächst zu einer Zunahme der β -MHC mRNA-Expression. Die gleichzeitige Expression von ANF und BNP, die vasodilatativ wirken, könnte dann zu einer Reduktion der β -MHC mRNA-Spiegel führen.

Die Zunahme der β -MHC-Expression bewirkt gleichzeitig eine Abnahme der Expression von α -MHC, das im nicht-hypertrophierten adulten Herzen exprimiert wird (Feldman et al., 1993). Die Ursache dieser „reziproken“ Expression liegt in der Koexpression von herzspezifischen miRNAs in Intronbereichen der jeweiligen Gene. So kommt es z.B. zur Koexpression der miR-208, die in einem Intron des α -MHC-Gens kodiert ist. Biomechanischer Stress führt zu einer Herunterregulation der Genexpression von α -MHC und damit auch der miR-208. Dies wiederum führt zur Expression von Thrap1 (thyroid hormone receptor-associated protein 1), das durch eine miR-208-Expression gehemmt wird. Trap1 als Koregulator eines Thyroidhormonrezeptors führt dann u.a. zur Expression von β -MHC (van Rooij et al., 2007)

5.2.3 Reduktion der Angiotensin II-induzierten Fibrose nach AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie

Bei chronischer Angiotensin II-Stimulation kommt es über die erhöhte Aktivität der Calcium/Calmodulin-abhängigen Phosphatase Calcineurin u.a. zu einem kardialen Remodelling, welches eine deutliche Zunahme an Bindegewebe (Fibroisierung) beinhaltet (Shimoyama et al., 1999).

Das Herz besteht neben den Myozyten auch zu 2/3 aus nicht myozytären Zellen (u.a. Fibroblasten), die in die extrazelluläre Matrix eingebettet sind, das überwiegend aus einem Netzwerk von Kollagen I und III besteht. Dieses Netzwerk garantiert die Stabilität und Integrität des gesamten Herzens während der Pumpfunktion (Robinson et al., 1986; Weber, 1989; Zak, 1973). Während unter physiologischen Bedingungen ein Gleichgewicht zwischen der Kollagensynthese und deren Degradation besteht, verschiebt sich dieses im pathologischen Hochdruckherzen in Richtung einer erhöhten Neusynthese, die mit einer Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Signalweges einhergeht und damit zum kardialen Remodeling beiträgt (Brilla et al., 1990; Laurent, 1987; Lee et al., 1995; Young et al., 1994). Darüber hinaus kommt es zu einer reduzierten Aktivität von Kollagenasen unter dem Einfluss von Angiotensin II was zusätzlich zu einer reduzierten Degradation von Kollagenen führt (Brilla et al., 1994; Brilla et al., 1995). Ein weiterer Effekt, der dem Angiotensin II zugeschrieben wird, ist die Aktivierung von TGF (transforming growth factor)- β 1. Dieser trägt ebenfalls zur Modulation der extrazellulären Matrix bei (Lee et al., 1995; Roberts et al., 1992; Roberts et al., 1993).

Nach Analyse der mRNA-Expression von Kollagen III als Marker für die Fibroisierung konnte in beiden Studien eine deutliche Angiotensin II-induzierte Zunahme nachgewiesen werden, die durch die AAV9-vermittelte Überexpression von Calsarcin-1 reduziert werden

konnte, wobei dieser Effekt in der Niedrigdosis-Studie ausgeprägt war als in der Hochdosis-Studie. Masson-Trichrom-Färbungen von Schnittpräparaten bestätigten die Angiotensin II-stimulierte vermehrte Fibroisierung des Herzmuskelgewebes und diese konnte durch die AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie zumindest in der Niedrigdosis-Studie deutlich reduziert werden. Allerdings scheint die Expression von Kollagen III ein sensitiverer Parameter für diesen Effekt zu sein.

Bei der Entwicklung der kardialen Fibrose wird in den letzten Jahren zunehmend die Rolle von miRNAs diskutiert (Cheng et al., 2007; Sayed et al., 2007; van Rooij and Olson, 2007a; van Rooij and Olson, 2007b; van Rooij et al., 2006). So kommt es z.B. zu einer Herunterregulierung der Genexpression der miR-29-Familie in Drucküberlastungsmodellen und bei chronischer Calcineurinaktivierung (van Rooij et al., 2006), die über TGF β vermittelt wird. Im gesunden Herzen reprimieren die Mitglieder der miR-29-Familie die Translation einer Reihe profibrotischer Genprodukte wie z.B. Elastin, Fibrillin 1 sowie Kollagen I-III. Durch die Herunterregulation dieser miRNAs wird die Expression dieser Matrixproteine enthemmt und es kommt zur Fibroisierung (van Rooij et al., 2008).

5.3 AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie in mit Angiotensin II-behandelten CS1-KO-Mäusen

Auf der Basis der beiden Gentherapiestudien mit Wildtyp-Mäusen wurde abschließend eine Studie zur AAV9-vermittelten Calsarcin-1 Reexpression in CS1-KO-Mäusen durchgeführt, um zu klären, inwieweit in diesem Modell trotz der geringen Transduktionseffizienz nicht ungleich stärkere Therapieeffekte erzielt werden. Der Versuchsaufbau ähnelte dabei dem der anderen beiden Studien, jedoch wurde nur eine Hochdosis-Studie (1×10^{12} vG/Tier) durchgeführt, um den maximal möglichen Therapieeffekt zu erzielen.

5.3.1 Morphometrische Analyse

Ähnlich wie bei den Wildtyp-Mäusen konnte auch in den Calsarcin-1 defizienten Tieren ein signifikanter Anstieg im systolischen Blutdruckwert bei Angiotensin II-Applikation verzeichnet werden.

Bei der fraktionellen Verkürzung als Maß für die Pumpleistung des Herzens ergaben sich ähnliche Werte wie in den Wildtyp-Mäusen. Paradoxerweise führte die Angiotensin II-Exposition der Tiere zu einem Abfall der Pumpleistung um 50%. In Wildtyp-Mäusen lag dieser Effekt lediglich bei 18%. Bei der initialen Phänotypisierung der Calsarcin-1 defizienten Mäuse haben Frey et al. (2004) gezeigt, dass diese Tiere Anzeichen einer linksventrikulären Dysfunktion aufweisen (fraktionelle Verkürzung ca. 20% schlechter als bei Wildtyp-Mäusen).

Worauf diese Diskrepanzen letztendlich zurückzuführen sind -möglicherweise auf einen defekten Schallkopf des Ultraschallgerätes- konnte nicht geklärt werden. In jedem Fall führte die AAV9-vermittelte Reexpression von Calsarcin-1 in den Angiotensin II-behandelten Tieren zu keiner Verbesserung der Linksherzfunktion.

Auch bei der Analyse der Hinterwanddicke des linken Ventrikels sowie des linksventrikulären enddiastolischen Durchmessers zeigten sich in den Calsarcin-1 defizienten Mäusen vergleichbare Werte wie in den C57BL/6-Wildtyp-Mäusen. Eine chronische Angiotensin II-Exposition führte zu einer 33%igen Zunahme der Hinterwanddicke des linken Ventrikels als Zeichen für eine entstehende Myokardhypertrophie. Gleichzeitig kam es zu einer Zunahme des LVEDD um 42%, was auf eine gleichzeitige Dilatation des Ventrikels und eine beginnende Linksherzinsuffizienz schließen lässt. Die AAV9-vermittelte Reexpression von Calsarcin-1 zeigte auch bei diesen Parametern keinen therapeutischen Effekt.

CS1-KO-Mäuse haben unter Basalbedingungen ein um mehr als 50% erhöhtes Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht im Vergleich zu Wildtyp-Tieren. Diese deutliche Hypertrophie nimmt nach Angiotensin II-Infusion noch signifikant auf das Doppelte zu. Bei einer derart fulminanten Linksherzhypertrophie, die bereits in eine Linksherzinsuffizienz umschlägt, ist es eigentlich nicht verwunderlich, dass die ohnehin schwache Reexpression von Calsarcin-1 hiergegen nichts auszurichten vermochte. Vergleicht man die hier erhobenen Daten mit denen von Frey et al. (2004), so zeigt sich, dass die Kontrolltiere in dieser Studie ein um 23% höheres Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis aufwiesen. Dieser Unterschied könnte stressbedingt durch den Einbau der osmotischen Minipumpen sein oder aber auch durch einen anderen verwendeten genetischen Hintergrund.

5.3.2 Aktivierung des hypertrophen Genprogramms sowie des Calcineurin-NFAT-Signalwegs in CS1-KO-Mäusen

Bei der Analyse des hypertrophen Genprogramms fällt deutlich auf, dass es hier unter Angiotensin II-Stimulation zu keiner Erhöhung der ANF-, BNP- oder auch β -MHC-Expression auf mRNA-Ebene kam. Dies liegt jedoch vermutlich nicht an der fehlenden Induktion des hypertrophen Genprogramms durch Angiotensin II, sondern in einer per se schon hohen Expression der jeweiligen Markergene in den Calsarcin-1 defizienten Mäusen. Auch beim Vergleich der mRNA-Expression von ANF und BNP zwischen diesen Tieren und Calcineurin-transgenen Mäusen zeigte sich keine wirkliche Induktion dieser beiden Parameter mehr (Frey et al., 2004). Lediglich Calcineurin-transgene Mäuse mit einem gleichzeitigen Verlust der Calsarcin-1 Expression weisen einen nochmaligen Anstieg der mRNA-

Expressionswerte für ANF und BNP auf. Vergleichbare Aussagen lassen sich ebenfalls über die NFAT-regulierte Expression von RCAN1-4 in den Calsarcin-1 defizienten Mäusen treffen. Die AAV9-basierte Calsarcin-1 Reexpression von ca. 10% gegenüber dem Proteinniveau in Wildtyp-Mäusen reicht offenbar nicht aus, um eine effektive Inhibierung des über den Calcineurin-NFAT-Signalweg aktivierten hypertrophen Genprogramms zu erreichen.

5.3.3 Reduktion der Angiotensin II-induzierten Fibrose nach AAV9-Calsarcin-1 Gentherapie

Anders als bei der Analyse der prohypertrophen Marker, zeigte sich eine deutliche Zunahme der Kollagen III-Expression in den Angiotensin II-exponierten Calsarcin-1 defizienten Mäusen, die dann durch die Reexpression von Calsarcin-1 immerhin um 33% reduziert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass eine fehlende Inhibierung von Calcineurin durch den Knockout von Calsarcin-1 im Gegensatz zu dem prohypertrophen Genexpressionsprogramm nicht ausreicht, um eine Induktion von profibrotischen Genen wie Kollagen III zu bewirken. Calsarcin-1 könnte insofern an der Regulation von miRNAs aus der antifibrotisch wirkenden miR29-Genfamilie beteiligt sein. Da es jedoch zu keiner Hemmung der Calcineurinaktivität bei der Calsarcin-1 Reexpression kommt (fehlende Inhibierung der RCAN1-4 Expression), liegt die Vermutung nahe, dass solch ein Regulationsmechanismus auf einem anderen als dem Calcineurin-NFAT-Signalweg basiert.

5.4 AAV9-Calsarcin-1 als Gentherapievektor

5.4.1 AAV9-Calsarcin-1 Expressionsniveau

In der hier vorgelegten Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass eine AAV9-basierte Calsarcin-1 Expression *in vivo* möglich ist. In beiden Wildtypstudien konnten auf molekularer Ebene die durch Angiotensin II-induzierten Effekte reduziert bzw. inhibiert werden. Auch eine beginnende fibrotische Entwicklung konnte durch die Gentherapie gemildert werden. Eine Inhibierung der Hypertrophie konnte jedoch durch eine Calsarcin-1 AAV-Gentherapie nicht erreicht werden (keine Reduktion im Herzgewicht-Körpergewicht-Verhältnis).

In der Studie mit Calsarcin-1-defizienten Mäusen hingegen waren eindeutige Therapieeffekte nur für den Fibrosemarker Kollagen III erkennbar.

Die marginalen Therapieeffekte sind wohl vor allen Dingen auf die schwache AAV9-Calsarcin-1 Über- bzw. Reexpression von maximal 10% des Niveaus von Wildtyp-Mäusen zurückzuführen. Da Frank et al. (2007) in Calsarcin-1 transgenen Mäusen gezeigt haben, dass

diese eine Mehrexpression von 140% über den Basalwert bei einem gleichbleibenden endogenen Calsarcin-1-Proteinniveau zeigen, ist auch hier nicht davon auszugehen, dass die nicht darstellbare Überexpression von Calsarcin-1 in den Wildtyp-Tieren durch eine kompensatorische Herunterregulierung der endogenen Calsarcin-1-Expression bedingt ist. Eine exakte Differenzierung war durch die fehlende Markierung des viral exprimierten Calsarcin-1-Proteins in dieser Studie nicht möglich. Auf diese wurde beim Design des Vektors bewusst verzichtet, um eine etwaige Beeinflussung der AAV9-basierten Expression zu vermeiden.

Da für AAVs gezeigt wurde, dass diese zu einer lang anhaltenden Transgenexpression, bedingt durch eine fehlende Immunantwort führen, ist auch in dieser Studie nicht davon auszugehen, dass die geringe Expression auf einen Abbau des Genprodukts zurückzuführen ist (Jiang et al., 2006; Wang et al., 2004).

Kürzlich wurde von (Nathwani et al., 2011) beschrieben, dass bei einer AAV8-basierten Gentherapiestudie zur Behandlung der X-chromosomal vererbten Krankheit Hämophilie B in Patienten ein Therapieerfolg erzielt werden konnte. In dieser Studie kamen dabei drei verschiedene virale Dosen zum Einsatz, die zu einer maximalen Expression des humanen Faktors IX von 11% im Vergleich zu gesunden Menschen führte. Dies zeigt, dass selbst mit einer geringen AAV-vermittelten Transgenexpression Therapieerfolge verzeichnet werden können. Eine Inhibierung bzw. Reduzierung der durch Angiotensin II-induzierten Myokardhypertrophie in dieser Arbeit hätte möglicherweise durch eine geringere Konzentration von 500 ng/kg Körpergewicht pro Minute erreicht werden können. Die hohe Dosis wurde jedoch gewählt, um ein ausgeprägtes pathologisches Remodelling zu induzieren. Möglicherweise war die verwendete Dosis unphysiologisch hoch, um den antihypertrophen Effekt der Gentherapie nachzuweisen.

Eine weitere Ursache für eine geringe Transgenexpression könnte auf der Ebene von Transkriptionsregulationsmechanismen liegen. So wurde für den hier verwendeten CMV-verstärkten Promotor eine Methylierung in CpG-Inseln berichtet, die zu einer drastischen Abnahme der Transgenexpression führen (Brooks et al., 2004; Sutter and Doerfler, 1980). Dies dient dabei als Schutzmechanismus gegen die Expression von fremden Genen im betroffenen Organismus (Doerfler, 1992). Um auszuschließen, dass eine solche Methylierung des Promotors auch in diesem Fall stattfand, sollte das Transgen zusätzlich unter einem anderen Promotor, wie z.B. den kardialen humanen Troponin T-Promotor exprimiert werden und dessen Expressionsniveau des Transgens *in vivo* mit dem des CMV-verstärkten

verkürzten Myosinleichtkettenpromotor (CMV_{enh}-MLC0.26) verglichen werden. Eine Untersuchung zu dieser Fragestellung wurde aktuell begonnen.

5.4.2 Therapeutische Relevanz einer AAV-basierten Calsarcin-1 Gentherapie

Zumindest mit dem erzielten Calsarcin-1-Expressionsniveau ist in dem Hochdosis-Angiotensin II-Modell eine AAV-basierte Calsarcin-1 Gentherapie nicht erfolgversprechend. Dafür sind weitere Verbesserungen notwendig, die insbesondere auf ein höheres Expressionsniveau abzielen. Dazu wird aktuell die kodierende murine Calsarcin-1 Sequenz unter einem anderen Promotor (humaner Troponin-T Promotor) kloniert und dessen Expression mit dem hier verwendeten CMV-verstärkten verkürzten Myosinleichtkettenpromotor verglichen. Darüber hinaus ist es sinnvoll einen möglich Zusammenhang der Expression von Calsarcin-1 und der Regulation der miR29-Familie zu analysieren.

Weiterführende Analysen sind auch im Hinblick auf ein verändertes Studiendesign notwendig. In den hier durchgeführten Experimenten erfolgte zuerst die Gabe des therapeutischen Agens und danach der hypertrophieinduzierende Stimulus. Um die wirkliche klinische Bedeutung einer AAV-Calsarcin-1 Gentherapie abschätzen zu können, ist es im Tiermodell auch notwendig zuerst eine Hypertrophie zu induzieren, die anschließend therapiert werden soll um einen Bezug zu einer etwaigen Behandlung von erkrankten Patienten zu bekommen, die bekanntlich erst bei Krankheitseintritt zum Arzt gehen. Die Berücksichtigung dieser Punkte (höherer Virustiter, anderes Hypertrophiemodell, Promotor) sollte die Frage abschließend klären, ob eine therapeutische Modulierung von Calsarcin-1 zukünftig einen Therapieansatz der Myokardhypertrophie ermöglicht. Dabei sollte zusätzlich der Einsatz von verbesserten rekombinanten AAVs in Erwägung gezogen werden, die z.B. durch Oberflächenmodifikationen im Kapsid eine höhere Transduktionseffizienz aufweisen. Gerade im Hinblick auf eine zukünftige gentherapeutische Anwendung beim Menschen kann man dann bei einer geringeren Viruslast einen vergleichbaren Effekt bei einer gleichzeitig geringen Belastung des Immunsystems erreichen.

6. LITERATURVERZEICHNIS

- Aikawa, R., G.S. Huggins, and R.O. Snyder. 2002. Cardiomyocyte-specific gene expression following recombinant adeno-associated viral vector transduction. *J Biol Chem.* 277:18979-18985.
- Arber, S., J.J. Hunter, J. Ross, Jr., M. Hongo, G. Sansig, J. Borg, J.C. Perriard, K.R. Chien, and P. Caroni. 1997. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy, and heart failure. *Cell.* 88:393-403.
- Atchison, R.W., B.C. Casto, and W.M. Hammon. 1965. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science.* 149:754-756.
- Bartlett, J.S., R. Wilcher, and R.J. Samulski. 2000. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *J Virol.* 74:2777-2785.
- Bekeredjian, R., S. Chen, P.A. Frenkel, P.A. Grayburn, and R.V. Shohet. 2003. Ultrasound-targeted microbubble destruction can repeatedly direct highly specific plasmid expression to the heart. *Circulation.* 108:1022-1026.
- Biggar, W.D., M. Gingras, D.L. Fehlings, V.A. Harris, and C.A. Steele. 2001. Deflazacort treatment of Duchenne muscular dystrophy. *J Pediatr.* 138:45-50.
- Bohenzky, R.A., R.B. LeFebvre, and K.I. Berns. 1988. Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology.* 166:316-327.
- Boshart, M., F. Weber, G. Jahn, K. Dorsch-Hasler, B. Fleckenstein, and W. Schaffner. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell.* 41:521-530.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Braunwald, E., and M.R. Bristow. 2000. Congestive heart failure: fifty years of progress. *Circulation.* 102:IV14-23.
- Brilla, C.G., R. Pick, L.B. Tan, J.S. Janicki, and K.T. Weber. 1990. Remodeling of the rat right and left ventricles in experimental hypertension. *Circ Res.* 67:1355-1364.
- Brilla, C.G., G. Zhou, L. Matsubara, and K.T. Weber. 1994. Collagen metabolism in cultured adult rat cardiac fibroblasts: response to angiotensin II and aldosterone. *J Mol Cell Cardiol.* 26:809-820.
- Brilla, C.G., G. Zhou, H. Rupp, B. Maisch, and K.T. Weber. 1995. Role of angiotensin II and prostaglandin E2 in regulating cardiac fibroblast collagen turnover. *Am J Cardiol.* 76:8D-13D.
- Brooks, A.R., R.N. Harkins, P. Wang, H.S. Qian, P. Liu, and G.M. Rubanyi. 2004. Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med.* 6:395-404.
- Bueno, O.F., B.J. Wilkins, K.M. Tymitz, B.J. Glascock, T.F. Kimball, J.N. Lorenz, and J.D. Molkentin. 2002. Impaired cardiac hypertrophic response in Calcineurin A β - deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:4586-4591.
- Calabrese, F., and G. Thiene. 2003. Myocarditis and inflammatory cardiomyopathy: microbiological and molecular biological aspects. *Cardiovasc Res.* 60:11-25.
- Campbell, K.P., and S.D. Kahl. 1989. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. *Nature.* 338:259-262.
- Cao, O., E. Dobrzynski, L. Wang, S. Nayak, B. Mingle, C. Terhorst, and R.W. Herzog. 2007. Induction and role of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood.* 110:1132-1140.

- Carrier, L., C. Hengstenberg, J.S. Beckmann, P. Guicheney, C. Dufour, J. Bercovici, E. Dausse, I. Berebbi-Bertrand, C. Wisnewsky, D. Pulvenis, and et al. 1993. Mapping of a novel gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 11. *Nat Genet.* 4:311-313.
- Chan, B., G. Greenan, F. McKeon, and T. Ellenberger. 2005. Identification of a peptide fragment of DSCR1 that competitively inhibits calcineurin activity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:13075-13080.
- Check, E. 2005. Sanctions agreed over teenager's gene-therapy death. *Nature.* 433:674.
- Cheng, Y., R. Ji, J. Yue, J. Yang, X. Liu, H. Chen, D.B. Dean, and C. Zhang. 2007. MicroRNAs are aberrantly expressed in hypertrophic heart: do they play a role in cardiac hypertrophy? *Am J Pathol.* 170:1831-1840.
- Chien, K.R., H. Zhu, K.U. Knowlton, W. Miller-Hance, M. van-Bilsen, T.X. O'Brien, and S.M. Evans. 1993. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *Annu Rev Physiol.* 55:77-95.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Chu, D., C.C. Sullivan, M.D. Weitzman, L. Du, P.L. Wolf, S.W. Jamieson, and P.A. Thistlethwaite. 2003. Direct comparison of efficiency and stability of gene transfer into the mammalian heart using adeno-associated virus versus adenovirus vectors. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 126:671-679.
- Clipstone, N.A., and G.R. Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature.* 357:695-697.
- Cohn, J.N., M.R. Bristow, K.R. Chien, W.S. Colucci, O.H. Frazier, L.A. Leinwand, B.H. Lorell, A.J. Moss, E.H. Sonnenblick, R.A. Walsh, S.C. Mockrin, and L. Reinlib. 1997. Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute Special Emphasis Panel on Heart Failure Research. *Circulation.* 95:766-770.
- Daya, S., and K.I. Berns. 2008. Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev.* 21:583-593.
- De Windt, L.J., H.W. Lim, O.F. Bueno, Q. Liang, U. Delling, J.C. Braz, B.J. Glascock, T.F. Kimball, F. del Monte, R.J. Hajjar, and J.D. Molkenin. 2001. Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:3322-3327.
- Doerfler, W. 1992. DNA methylation: eukaryotic defense against the transcription of foreign genes? *Microb Pathog.* 12:1-8.
- Dominguez, R., Y. Freyzon, K.M. Trybus, and C. Cohen. 1998. Crystal structure of a vertebrate smooth muscle myosin motor domain and its complex with the essential light chain: visualization of the pre-power stroke state. *Cell.* 94:559-571.
- Dote, K., H. Sato, H. Tateishi, T. Uchida, and M. Ishihara. 1991. [Myocardial stunning due to simultaneous multivessel coronary spasms: a review of 5 cases]. *J Cardiol.* 21:203-214.
- England, S.B., L.V. Nicholson, M.A. Johnson, S.M. Forrest, D.R. Love, E.E. Zubrzycka-Gaarn, D.E. Bulman, J.B. Harris, and K.E. Davies. 1990. Very mild muscular dystrophy associated with the deletion of 46% of dystrophin. *Nature.* 343:180-182.
- ESGCT. 2002. Position paper on social, ethical and public awareness issues in gene therapy. European Society of Gene and Cell Therapy.
- Fatkin, D., R. Otway, and Z. Richmond. 2010. Genetics of dilated cardiomyopathy. *Heart Fail Clin.* 6:129-140.
- Fatkin, D., J.G. Seidman, and C.E. Seidman. 2000. Cardiovascular Medicine. J.T. Willerson and J.N. Cohn, Churchill Livingstone. 1055-1074 pp.

- Feldman, A.M., E.O. Weinberg, P.E. Ray, and B.H. Lorell. 1993. Selective changes in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res.* 73:184-192.
- Filatov, V.L., A.G. Katrukha, T.V. Bulargina, and N.B. Gusev. 1999. Troponin: structure, properties, and mechanism of functioning. *Biochemistry (Mosc).* 64:969-985.
- Franco, L.M., B. Sun, X. Yang, A. Bird, H. Zhang, A. Schneider, T. Brown, S.P. Young, T.M. Clay, A. Amalfitano, Y.T. Chen, and D.D. Koeberl. 2005. Evasion of immune responses to introduced human acid alpha-glucosidase by liver-restricted expression in glycogen storage disease type II. *Mol Ther.* 12:876-884.
- Frank, D., and N. Frey. 2011. Cardiac Z-disc signaling network. *J Biol Chem.* 286:9897-9904.
- Frank, D., C. Kuhn, H.A. Katus, and N. Frey. 2006. The sarcomeric Z-disc: a nodal point in signalling and disease. *J Mol Med (Berl).* 84:446-468.
- Frank, D., C. Kuhn, M. van Eickels, D. Gehring, C. Hanselmann, S. Lippl, R. Will, H.A. Katus, and N. Frey. 2007. Calsarcin-1 protects against angiotensin-II induced cardiac hypertrophy. *Circulation.* 116:2587-2596.
- Franz, W.M., D. Breves, K. Klingel, G. Brem, P.H. Hofschneider, and R. Kandolf. 1993. Heart-specific targeting of firefly luciferase by the myosin light chain-2 promoter and developmental regulation in transgenic mice. *Circ Res.* 73:629-638.
- French, B.A., W. Mazur, R.S. Geske, and R. Bolli. 1994. Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors. *Circulation.* 90:2414-2424.
- Frey, N., M. Luedde, and H.A. Katus. 2012. Mechanisms of disease: hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* 9:91-100.
- Frey, N., T. Barrientos, J.M. Shelton, D. Frank, H. Rutten, D. Gehring, C. Kuhn, M. Lutz, B. Rothermel, R. Bassel-Duby, J.A. Richardson, H.A. Katus, J.A. Hill, and E.N. Olson. 2004. Mice lacking calsarcin-1 are sensitized to calcineurin signaling and show accelerated cardiomyopathy in response to pathological biomechanical stress. *Nat Med.* 10:1336-1343.
- Frey, N., D. Frank, S. Lippl, C. Kuhn, H. Kogler, T. Barrientos, C. Rohr, R. Will, O.J. Muller, H. Weiler, R. Bassel-Duby, H.A. Katus, and E.N. Olson. 2008. Calsarcin-2 deficiency increases exercise capacity in mice through calcineurin/NFAT activation. *J Clin Invest.* 118:3598-3608.
- Frey, N., W.M. Franz, K. Gloeckner, M. Degenhardt, M. Muller, O. Muller, H. Merz, and H.A. Katus. 2000a. Transgenic rat hearts expressing a human cardiac troponin T deletion reveal diastolic dysfunction and ventricular arrhythmias. *Cardiovasc Res.* 47:254-264.
- Frey, N., and E.N. Olson. 2002. Calsarcin-3, a novel skeletal muscle-specific member of the calsarcin family, interacts with multiple Z-disc proteins. *J Biol Chem.* 277:13998-14004.
- Frey, N., and E.N. Olson. 2003. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 65:45-79.
- Frey, N., J.A. Richardson, and E.N. Olson. 2000b. Calsarcins, a novel family of sarcomeric calcineurin-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:14632-14637.
- Gao, G., L.H. Vandenberghe, and J.M. Wilson. 2005. New recombinant serotypes of AAV vectors. *Curr Gene Ther.* 5:285-297.
- Gaudet, D., J. de Wal, K. Tremblay, S. Dery, S. van Deventer, A. Freidig, D. Brisson, and J. Methot. 2010. Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Atheroscler Suppl.* 11:55-60.
- Geisterfer-Lowrance, A.A., M. Christe, D.A. Conner, J.S. Ingwall, F.J. Schoen, C.E. Seidman, and J.G. Seidman. 1996. A mouse model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Science.* 272:731-734.

- Gontier, Y., A. Taivainen, L. Fontao, A. Sonnenberg, A. van der Flier, O. Carpen, G. Faulkner, and L. Borradori. 2005. The Z-disc proteins myotilin and FATZ-1 interact with each other and are connected to the sarcolemma via muscle-specific filamins. *J Cell Sci.* 118:3739-3749.
- Grünig, E., J.A. Tasman, H. Kucherer, W. Franz, W. Kubler, and H.A. Katus. 1998. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 31:186-194.
- Guzman, R.J., P. Lemarchand, R.G. Crystal, S.E. Epstein, and T. Finkel. 1993. Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ Res.* 73:1202-1207.
- Hacein-Bey-Abina, S., C. Von Kalle, M. Schmidt, M.P. McCormack, N. Wulffraat, P. Leboulch, A. Lim, C.S. Osborne, R. Pawliuk, E. Morillon, R. Sorensen, A. Forster, P. Fraser, J.I. Cohen, G. de Saint Basile, I. Alexander, U. Wintergerst, T. Frebourg, A. Aurias, D. Stoppa-Lyonnet, S. Romana, I. Radford-Weiss, F. Gross, F. Valensi, E. Delabesse, E. Macintyre, F. Sigaux, J. Soulier, L.E. Leiva, M. Wissler, C. Prinz, T.H. Rabbitts, F. Le Deist, A. Fischer, and M. Cavazzana-Calvo. 2003. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. *Science.* 302:415-419.
- Haghighi, K., F. Kolokathis, L. Pater, R.A. Lynch, M. Asahi, A.O. Gramolini, G.C. Fan, D. Tsiapras, H.S. Hahn, S. Adamopoulos, S.B. Liggett, G.W. Dorn, 2nd, D.H. MacLennan, D.T. Kremastinos, and E.G. Kranias. 2003. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest.* 111:869-876.
- Hasenfuss, G., H. Reinecke, R. Studer, M. Meyer, B. Pieske, J. Holtz, C. Holubarsch, H. Posival, H. Just, and H. Drexler. 1994. Relation between myocardial function and expression of sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase in failing and nonfailing human myocardium. *Circ Res.* 75:434-442.
- Hasenfuss, G., and B. Pieske. 2002. Calcium cycling in congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol.* 34:951-969.
- Hauswirth, W.W., A.S. Lewin, S. Zolotukhin, and N. Muzyczka. 2000. Production and purification of recombinant adeno-associated virus. *Methods Enzymol.* 316:743-761.
- Hayashi, T., T. Arimura, M. Itoh-Satoh, K. Ueda, S. Hohda, N. Inagaki, M. Takahashi, H. Hori, M. Yasunami, H. Nishi, Y. Koga, H. Nakamura, M. Matsuzaki, B.Y. Choi, S.W. Bae, C.W. You, K.H. Han, J.E. Park, R. Knoll, M. Hoshijima, K.R. Chien, and A. Kimura. 2004. Tcap gene mutations in hypertrophic cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 44:2192-2201.
- Heineke, J., H. Ruetten, C. Willenbockel, S.C. Gross, M. Naguib, A. Schaefer, T. Kempf, D. Hilfiker-Kleiner, P. Caroni, T. Kraft, R.A. Kaiser, J.D. Molkentin, H. Drexler, and K.C. Wollert. 2005. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:1655-1660.
- Hogan, P.G., L. Chen, J. Nardone, and A. Rao. 2003. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. *Genes Dev.* 17:2205-2232.
- Ito, N., Y. Kagaya, E.O. Weinberg, W.H. Barry, and B.H. Lorell. 1997. Endothelin and angiotensin II stimulation of Na⁺-H⁺ exchange is impaired in cardiac hypertrophy. *J Clin Invest.* 99:125-135.
- Jarcho, J.A., W. McKenna, J.A. Pare, S.D. Solomon, R.F. Holcombe, S. Dickie, T. Levi, H. Donis-Keller, J.G. Seidman, and C.E. Seidman. 1989. Mapping a gene for familial hypertrophic cardiomyopathy to chromosome 14q1. *N Engl J Med.* 321:1372-1378.

- Jaski, B.E., M.L. Jessup, D.M. Mancini, T.P. Cappola, D.F. Pauly, B. Greenberg, K. Borow, H. Dittrich, K.M. Zsebo, and R.J. Hajjar. 2009. Calcium upregulation by percutaneous administration of gene therapy in cardiac disease (CUPID Trial), a first-in-human phase 1/2 clinical trial. *J Card Fail.* 15:171-181.
- Ji, Y., M.J. Lalli, G.J. Babu, Y. Xu, D.L. Kirkpatrick, L.H. Liu, N. Chiamvimonvat, R.A. Walsh, G.E. Shull, and M. Periasamy. 2000. Disruption of a single copy of the SERCA2 gene results in altered Ca²⁺ homeostasis and cardiomyocyte function. *J Biol Chem.* 275:38073-38080.
- Jiang, H., G.F. Pierce, M.C. Ozelo, E.V. de Paula, J.A. Vargas, P. Smith, J. Sommer, A. Luk, C.S. Manno, K.A. High, and V.R. Arruda. 2006. Evidence of multiyear factor IX expression by AAV-mediated gene transfer to skeletal muscle in an individual with severe hemophilia B. *Mol Ther.* 14:452-455.
- Kamisago, M., S.D. Sharma, S.R. DePalma, S. Solomon, P. Sharma, B. McDonough, L. Smoot, M.P. Mullen, P.K. Woolf, E.D. Wigle, J.G. Seidman, and C.E. Seidman. 2000. Mutations in sarcomere protein genes as a cause of dilated cardiomyopathy. *N Engl J Med.* 343:1688-1696.
- Kastrup, J., E. Jorgensen, A. Ruck, K. Tagil, D. Glogar, W. Ruzyllo, H.E. Botker, D. Dudek, V. Drvota, B. Hesse, L. Thuesen, P. Blomberg, M. Gyongyosi, and C. Sylven. 2005. Direct intramyocardial plasmid vascular endothelial growth factor-A165 gene therapy in patients with stable severe angina pectoris A randomized double-blind placebo-controlled study: the Euroinject One trial. *J Am Coll Cardiol.* 45:982-988.
- King, J.A., R. Dubielzig, D. Grimm, and J.A. Kleinschmidt. 2001. DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *EMBO J.* 20:3282-3291.
- Kishimoto, I., and D.L. Garbers. 1997. Physiological regulation of blood pressure and kidney function by guanylyl cyclase isoforms. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 6:58-63.
- Klee, C.B., H. Ren, and X. Wang. 1998. Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem.* 273:13367-13370.
- Knöll, R., M. Hoshijima, H.M. Hoffman, V. Person, I. Lorenzen-Schmidt, M.L. Bang, T. Hayashi, N. Shiga, H. Yasukawa, W. Schaper, W. McKenna, M. Yokoyama, N.J. Schork, J.H. Omens, A.D. McCulloch, A. Kimura, C.C. Gregorio, W. Poller, J. Schaper, H.P. Schultheiss, and K.R. Chien. 2002. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. *Cell.* 111:943-955.
- Kotin, R.M., J.C. Menninger, D.C. Ward, and K.I. Berns. 1991. Mapping and direct visualization of a region-specific viral DNA integration site on chromosome 19q13-qter. *Genomics.* 10:831-834.
- Kozak, M. 1987. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15:8125-8148.
- Kunstmann, H.K. 1928. Ein Verfahren zur Blutdruckbestimmung bei Maus, Ratte und Kaninchen. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology.* 132:122-123.
- Laurent, G.J. 1987. Dynamic state of collagen: pathways of collagen degradation in vivo and their possible role in regulation of collagen mass. *Am J Physiol.* 252:C1-9.
- Lee, A.A., W.H. Dillmann, A.D. McCulloch, and F.J. Villarreal. 1995. Angiotensin II stimulates the autocrine production of transforming growth factor-beta 1 in adult rat cardiac fibroblasts. *J Mol Cell Cardiol.* 27:2347-2357.
- Lee, K.J., R.S. Ross, H.A. Rockman, A.N. Harris, T.X. O'Brien, M. van Bilsen, H.E. Shubeita, R. Kandolf, G. Brem, J. Price, and et al. 1992. Myosin light chain-2 luciferase transgenic mice reveal distinct regulatory programs for cardiac and skeletal muscle-specific expression of a single contractile protein gene. *J Biol Chem.* 267:15875-15885.

- Lehrman, S. 1999. Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature*. 401:517-518.
- Lillie, R.D. 1940. Further experiments with the Masson trichrome modification of Mallory's connective tissue stain. *Stain Technol.* 15:17-22.
- Lillie, R.D. 1977. HJ Conn's Biological Stains. Williams and Wilkins, Baltimore (MD).
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-408.
- Losordo, D.W., P.R. Vale, R.C. Hendel, C.E. Milliken, F.D. Fortuin, N. Cummings, R.A. Schatz, T. Asahara, J.M. Isner, and R.E. Kuntz. 2002. Phase 1/2 placebo-controlled, double-blind, dose-escalating trial of myocardial vascular endothelial growth factor 2 gene transfer by catheter delivery in patients with chronic myocardial ischemia. *Circulation*. 105:2012-2018.
- Losordo, D.W., P.R. Vale, J.F. Symes, C.H. Dunnington, D.D. Esakof, M. Maysky, A.B. Ashare, K. Lathi, and J.M. Isner. 1998. Gene therapy for myocardial angiogenesis: initial clinical results with direct myocardial injection of phVEGF165 as sole therapy for myocardial ischemia. *Circulation*. 98:2800-2804.
- Luther, P.K. 1991. Three-dimensional reconstruction of a simple Z-band in fish muscle. *J Cell Biol.* 113:1043-1055.
- Luther, P.K. 2000. Three-dimensional structure of a vertebrate muscle Z-band: implications for titin and alpha-actinin binding. *J Struct Biol.* 129:1-16.
- Luther, P.K., J.S. Barry, and J.M. Squire. 2002. The three-dimensional structure of a vertebrate wide (slow muscle) Z-band: lessons on Z-band assembly. *J Mol Biol.* 315:9-20.
- MacKrell, J.J. 1999. Protein-protein interactions in intracellular Ca²⁺-release channel function. *Biochem J.* 337 (Pt 3):345-361.
- Marian, A.J., Y. Wu, D.S. Lim, M. McCluggage, K. Youker, Q.T. Yu, R. Brugada, F. DeMayo, M. Quinones, and R. Roberts. 1999. A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 104:1683-1692.
- Maron, B.J., J.M. Gardin, J.M. Flack, S.S. Gidding, T.T. Kurosaki, and D.E. Bild. 1995. Prevalence of hypertrophic cardiomyopathy in a general population of young adults. Echocardiographic analysis of 4111 subjects in the CARDIA Study. Coronary Artery Risk Development in (Young) Adults. *Circulation*. 92:785-789.
- Maron, B.J., J.A. Towbin, G. Thiene, C. Antzelevitch, D. Corrado, D. Arnett, A.J. Moss, C.E. Seidman, and J.B. Young. 2006. Contemporary definitions and classification of the cardiomyopathies: an American Heart Association Scientific Statement from the Council on Clinical Cardiology, Heart Failure and Transplantation Committee; Quality of Care and Outcomes Research and Functional Genomics and Translational Biology Interdisciplinary Working Groups; and Council on Epidemiology and Prevention. *Circulation*. 113:1807-1816.
- Martin, A.B., S. Webber, F.J. Fricker, R. Jaffe, G. Demmler, D. Kearney, Y.H. Zhang, J. Bodurtha, B. Gelb, J. Ni, and et al. 1994. Acute myocarditis. Rapid diagnosis by PCR in children. *Circulation*. 90:330-339.
- Mayor, H.D., R.M. Jamison, L.E. Jordan, and J.L. Melnick. 1965. Structure and Composition of a Small Particle Prepared from a Simian Adenovirus. *J Bacteriol.* 90:235-242.
- McCarty, D.M., H. Fu, P.E. Monahan, C.E. Toulson, P. Naik, and R.J. Samulski. 2003. Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther.* 10:2112-2118.
- McCarty, D.M., P.E. Monahan, and R.J. Samulski. 2001. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 8:1248-1254.

- McLaughlin, S.K., P. Collis, P.L. Hermonat, and N. Muzyczka. 1988. Adeno-associated virus general transduction vectors: analysis of proviral structures. *J Virol.* 62:1963-1973.
- Metules, T. 2002. Duchenne muscular dystrophy. *RN.* 65:39-44, 47; quiz 48.
- Mingozzi, F., and K.A. High. 2011. Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet.* 12:341-355.
- Miyagawa, S., Y. Sawa, S. Taketani, N. Kawaguchi, T. Nakamura, N. Matsuura, and H. Matsuda. 2002. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty. *Circulation.* 105:2556-2561.
- Mohapatra, B., S. Jimenez, J.H. Lin, K.R. Bowles, K.J. Coveler, J.G. Marx, M.A. Chrisco, R.T. Murphy, P.R. Lurie, R.J. Schwartz, P.M. Elliott, M. Vatta, W. McKenna, J.A. Towbin, and N.E. Bowles. 2003. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. *Mol Genet Metab.* 80:207-215.
- Molkentin, J.D. 2000. Calcineurin and beyond: cardiac hypertrophic signaling. *Circ Res.* 87:731-738.
- Molkentin, J.D., J.R. Lu, C.L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S.R. Grant, and E.N. Olson. 1998. A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell.* 93:215-228.
- Morgan, R.A., M.E. Dudley, J.R. Wunderlich, M.S. Hughes, J.C. Yang, R.M. Sherry, R.E. Royal, S.L. Topalian, U.S. Kammula, N.P. Restifo, Z. Zheng, A. Nahvi, C.R. de Vries, L.J. Rogers-Freezer, S.A. Mavroukakis, and S.A. Rosenberg. 2006. Cancer regression in patients after transfer of genetically engineered lymphocytes. *Science.* 314:126-129.
- Müller, O.J., M. Lange, H. Rattunde, H.P. Lorenzen, M. Müller, N. Frey, C. Bittner, W. Simonides, H.A. Katus, and W.M. Franz. 2003. Transgenic rat hearts overexpressing SERCA2a show improved contractility under baseline conditions and pressure overload. *Cardiovasc Res.* 59:380-389.
- Müller, O.J., B. Leuchs, S.T. Pleger, D. Grimm, W.M. Franz, H.A. Katus, and J.A. Kleinschmidt. 2006. Improved cardiac gene transfer by transcriptional and transductional targeting of adeno-associated viral vectors. *Cardiovasc Res.* 70:70-78.
- Müller, O.J., S. Schinkel, J.A. Kleinschmidt, H.A. Katus, and R. Bekeredjian. 2008. Augmentation of AAV-mediated cardiac gene transfer after systemic administration in adult rats. *Gene Ther.* 15:1558-1565.
- Murat, A., C. Pellieux, H.R. Brunner, and T. Pedrazzini. 2000. Calcineurin blockade prevents cardiac mitogen-activated protein kinase activation and hypertrophy in renovascular hypertension. *The Journal of biological chemistry.* 275:40867-40873.
- Nakao, K., H. Itoh, Y. Saito, M. Mukoyama, and Y. Ogawa. 1996. The natriuretic peptide family. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 5:4-11.
- Nathwani, A.C., E.G. Tuddenham, S. Rangarajan, C. Rosales, J. McIntosh, D.C. Linch, P. Chowdhary, A. Riddell, A.J. Pie, C. Harrington, J. O'Beirne, K. Smith, J. Pasi, B. Glader, P. Rustagi, C.Y. Ng, M.A. Kay, J. Zhou, Y. Spence, C.L. Morton, J. Allay, J. Coleman, S. Sleep, J.M. Cunningham, D. Srivastava, E. Basner-Tschakarjan, F. Mingozzi, K.A. High, J.T. Gray, U.M. Reiss, A.W. Nienhuis, and A.M. Davidoff. 2011. Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med.* 365:2357-2365.
- Nef, H.M., H. Mollmann, Y.J. Akashi, and C.W. Hamm. 2010. Mechanisms of stress (Takotsubo) cardiomyopathy. *Nat Rev Cardiol.* 7:187-193.
- Oberst, L., G. Zhao, J.T. Park, R. Brugada, L.H. Michael, M.L. Entman, R. Roberts, and A.J. Marian. 1998. Dominant-negative effect of a mutant cardiac troponin T on cardiac structure and function in transgenic mice. *J Clin Invest.* 102:1498-1505.

- Okamura, H., J. Aramburu, C. Garcia-Rodriguez, J.P. Viola, A. Raghavan, M. Tahiliani, X. Zhang, J. Qin, P.G. Hogan, and A. Rao. 2000. Concerted dephosphorylation of the transcription factor NFAT1 induces a conformational switch that regulates transcriptional activity. *Mol Cell*. 6:539-550.
- Olson, T.M., V.V. Michels, S.N. Thibodeau, Y.S. Tai, and M.T. Keating. 1998. Actin mutations in dilated cardiomyopathy, a heritable form of heart failure. *Science*. 280:750-752.
- Osio, A., L. Tan, S.N. Chen, R. Lombardi, S.F. Nagueh, S. Shete, R. Roberts, J.T. Willerson, and A.J. Marian. 2007. Myozenin 2 is a novel gene for human hypertrophic cardiomyopathy. *Circ Res*. 100:766-768.
- Pacak, C.A., C.S. Mah, B.D. Thattaliyath, T.J. Conlon, M.A. Lewis, D.E. Cloutier, I. Zolotukhin, A.F. Tarantal, and B.J. Byrne. 2006. Recombinant adeno-associated virus serotype 9 leads to preferential cardiac transduction in vivo. *Circ Res*. 99:3-9.
- Pauschinger, M., N.E. Bowles, F.J. Fuentes-Garcia, V. Pham, U. Kuhl, P.L. Schwimmbeck, H.P. Schultheiss, and J.A. Towbin. 1999. Detection of adenoviral genome in the myocardium of adult patients with idiopathic left ventricular dysfunction. *Circulation*. 99:1348-1354.
- Phillips, M.I., Y. Tang, K. Schmidt-Ott, K. Qian, and S. Kagiya. 2002. Vigilant vector: heart-specific promoter in an adeno-associated virus vector for cardioprotection. *Hypertension*. 39:651-655.
- Pilgrim, T.M., and T.R. Wyss. 2008. Takotsubo cardiomyopathy or transient left ventricular apical ballooning syndrome: A systematic review. *Int J Cardiol*. 124:283-292.
- Pyle, W.G., and R.J. Solaro. 2004. At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res*. 94:296-305.
- Qin, L., Y. Ding, D.R. Pahud, E. Chang, M.J. Imperiale, and J.S. Bromberg. 1997. Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression. *Hum Gene Ther*. 8:2019-2029.
- Qing, K., C. Mah, J. Hansen, S. Zhou, V. Dwarki, and A. Srivastava. 1999. Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med*. 5:71-77.
- Rayment, I., H.M. Holden, J.R. Sellers, L. Fananapazir, and N.D. Epstein. 1995. Structural interpretation of the mutations in the beta-cardiac myosin that have been implicated in familial hypertrophic cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:3864-3868.
- Rayment, I., H.M. Holden, M. Whittaker, C.B. Yohn, M. Lorenz, K.C. Holmes, and R.A. Milligan. 1993. Structure of the actin-myosin complex and its implications for muscle contraction. *Science*. 261:58-65.
- Roberts, A.B., N.S. Roche, T.S. Winokur, J.K. Burmester, and M.B. Sporn. 1992. Role of transforming growth factor-beta in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1. *J Clin Invest*. 90:2056-2062.
- Roberts, A.B., M.B. Sporn, and A.M. Lefer. 1993. Cardioprotective actions of transforming growth factor-beta. *Trends Cardiovasc Med*. 3:77-81.
- Robinson, T.F., S.M. Factor, and E.H. Sonnenblick. 1986. The heart as a suction pump. *Sci Am*. 254:84-91.
- Rosenberg, S.A., P. Aebersold, K. Cornetta, A. Kasid, R.A. Morgan, R. Moen, E.M. Karson, M.T. Lotze, J.C. Yang, S.L. Topalian, and et al. 1990. Gene transfer into humans--immunotherapy of patients with advanced melanoma, using tumor-infiltrating lymphocytes modified by retroviral gene transduction. *N Engl J Med*. 323:570-578.
- Rusnak, F., and P. Mertz. 2000. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*. 80:1483-1521.

- Rutanan, J., T.T. Rissanen, J.E. Markkanen, M. Gruchala, P. Silvennoinen, A. Kivela, A. Hedman, M. Hedman, T. Heikura, M.R. Orden, S.A. Stacker, M.G. Achen, J. Hartikainen, and S. Yla-Herttuala. 2004. Adenoviral catheter-mediated intramyocardial gene transfer using the mature form of vascular endothelial growth factor-D induces transmural angiogenesis in porcine heart. *Circulation*. 109:1029-1035.
- Sadoshima, J., and S. Izumo. 1997. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. 59:551-571.
- Sadoshima, J., Y. Xu, H.S. Slayter, and S. Izumo. 1993. Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell*. 75:977-984.
- Samulski, R.J., X. Zhu, X. Xiao, J.D. Brook, D.E. Housman, N. Epstein, and L.A. Hunter. 1991. Targeted integration of adeno-associated virus (AAV) into human chromosome 19. *EMBO J*. 10:3941-3950.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74:5463-5467.
- Sarkar, N., P. Blomberg, E. Wardell, M. Eskandarpour, C. Sylven, V. Drvota, and K.B. Islam. 2002. Nonsurgical direct delivery of plasmid DNA into rat heart: time course, dose response, and the influence of different promoters on gene expression. *J Cardiovasc Pharmacol*. 39:215-224.
- Sayed, D., C. Hong, I.Y. Chen, J. Lypowy, and M. Abdellatif. 2007. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 100:416-424.
- Schiaffino, S., and C. Reggiani. 1996. Molecular diversity of myofibrillar proteins: gene regulation and functional significance. *Physiol Rev*. 76:371-423.
- Schiedner, G., N. Morral, R.J. Parks, Y. Wu, S.C. Koopmans, C. Langston, F.L. Graham, A.L. Beaudet, and S. Kochanek. 1998. Genomic DNA transfer with a high-capacity adenovirus vector results in improved in vivo gene expression and decreased toxicity. *Nat Genet*. 18:180-183.
- Schinkel, S. 2010. Ansätze zur kausalen Gentherapie einer hereditären Kardiomyopathie im Tiermodell durch gezielten Gentransfer mit Adeno-assoziierten viralen Vektoren *In* Universitätsklinik Heidelberg. Universität Heidelberg, Heidelberg.
- Schmitt, J.P., M. Kamisago, M. Asahi, G.H. Li, F. Ahmad, U. Mende, E.G. Kranias, D.H. MacLennan, J.G. Seidman, and C.E. Seidman. 2003. Dilated cardiomyopathy and heart failure caused by a mutation in phospholamban. *Science*. 299:1410-1413.
- Schunkert, H., J. Sadoshima, T. Cornelius, Y. Kagaya, E.O. Weinberg, S. Izumo, G. Riegger, and B.H. Lorell. 1995. Angiotensin II-induced growth responses in isolated adult rat hearts. Evidence for load-independent induction of cardiac protein synthesis by angiotensin II. *Circ Res*. 76:489-497.
- Seidman, J.G., and C. Seidman. 2001. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell*. 104:557-567.
- Shimoyama, M., D. Hayashi, E. Takimoto, Y. Zou, T. Oka, H. Uozumi, S. Kudoh, F. Shibasaki, Y. Yazaki, R. Nagai, and I. Komuro. 1999. Calcineurin plays a critical role in pressure overload-induced cardiac hypertrophy. *Circulation*. 100:2449-2454.
- Shubeita, H.E., P.M. McDonough, A.N. Harris, K.U. Knowlton, C.C. Glembotski, J.H. Brown, and K.R. Chien. 1990. Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*. 265:20555-20562.
- Siegl, G., R.C. Bates, K.I. Berns, B.J. Carter, D.C. Kelly, E. Kurstak, and P. Tattersall. 1985. Characteristics and taxonomy of Parvoviridae. *Intervirology*. 23:61-73.

- Sonntag, F., S. Bleker, B. Leuchs, R. Fischer, and J.A. Kleinschmidt. 2006. Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol.* 80:11040-11054.
- Sonntag, F., K. Schmidt, and J.A. Kleinschmidt. 2010. A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107:10220-10225.
- Sonntag, F., K. Kother, K. Schmidt, M. Weghofer, C. Raupp, K. Nieto, A. Kuck, B. Gerlach, B. Bottcher, O.J. Muller, K. Lux, M. Horer, and J.A. Kleinschmidt. 2011. The assembly-activating protein promotes capsid assembly of different adeno-associated virus serotypes. *J Virol.* 85:12686-12697.
- Srivastava, A. 2008. Adeno-associated virus-mediated gene transfer. *J Cell Biochem.* 105:17-24.
- Straub, V., and K.P. Campbell. 1997. Muscular dystrophies and the dystrophin-glycoprotein complex. *Curr Opin Neurol.* 10:168-175.
- Suikkanen, S., M. Antila, A. Jaatinen, M. Vihinen-Ranta, and M. Vuento. 2003. Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology.* 316:267-280.
- Summerford, C., J.S. Bartlett, and R.J. Samulski. 1999. AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med.* 5:78-82.
- Summerford, C., and R.J. Samulski. 1998. Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol.* 72:1438-1445.
- Sutter, D., and W. Doerfler. 1980. Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:253-256.
- Taigen, T., L.J. De Windt, H.W. Lim, and J.D. Molkentin. 2000. Targeted inhibition of calcineurin prevents agonist-induced cardiomyocyte hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:1196-1201.
- Tardiff, J.C., S.M. Factor, B.D. Tompkins, T.E. Hewett, B.M. Palmer, R.L. Moore, S. Schwartz, J. Robbins, and L.A. Leinwand. 1998. A truncated cardiac troponin T molecule in transgenic mice suggests multiple cellular mechanisms for familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest.* 101:2800-2811.
- Thierfelder, L., C. MacRae, H. Watkins, J. Tomfohrde, M. Williams, W. McKenna, K. Bohm, G. Noeske, M. Schlepper, A. Bowcock, and et al. 1993. A familial hypertrophic cardiomyopathy locus maps to chromosome 15q2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:6270-6274.
- Tokudome, T., I. Kishimoto, T. Horio, Y. Arai, D.O. Schwenke, J. Hino, I. Okano, Y. Kawano, M. Kohno, M. Miyazato, K. Nakao, and K. Kangawa. 2008. Regulator of G-protein signaling subtype 4 mediates antihypertrophic effect of locally secreted natriuretic peptides in the heart. *Circulation.* 117:2329-2339.
- Tomko, R.P., C.B. Johansson, M. Totrov, R. Abagyan, J. Frisen, and L. Philipson. 2000. Expression of the adenovirus receptor and its interaction with the fiber knob. *Exp Cell Res.* 255:47-55.
- Tratschin, J.D., I.L. Miller, and B.J. Carter. 1984. Genetic analysis of adeno-associated virus: properties of deletion mutants constructed in vitro and evidence for an adeno-associated virus replication function. *J Virol.* 51:611-619.
- Tsunoda, S., O. Mazda, Y. Oda, Y. Iida, S. Akabame, T. Kishida, M. Shin-Ya, H. Asada, S. Gojo, J. Imanishi, H. Matsubara, and T. Yoshikawa. 2005. Sonoporation using microbubble BR14 promotes pDNA/siRNA transduction to murine heart. *Biochem Biophys Res Commun.* 336:118-127.
- van Rooij, E., and E.N. Olson. 2007a. microRNAs put their signatures on the heart. *Physiol Genomics.* 31:365-366.

- van Rooij, E., and E.N. Olson. 2007b. MicroRNAs: powerful new regulators of heart disease and provocative therapeutic targets. *J Clin Invest.* 117:2369-2376.
- van Rooij, E., L.B. Sutherland, N. Liu, A.H. Williams, J. McAnally, R.D. Gerard, J.A. Richardson, and E.N. Olson. 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.
- van Rooij, E., L.B. Sutherland, X. Qi, J.A. Richardson, J. Hill, and E.N. Olson. 2007c. Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA. *Science.* 316:575-579.
- van Rooij, E., L.B. Sutherland, J.E. Thatcher, J.M. DiMaio, R.H. Naseem, W.S. Marshall, J.A. Hill, and E.N. Olson. 2008. Dysregulation of microRNAs after myocardial infarction reveals a role of miR-29 in cardiac fibrosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:13027-13032.
- Vega, R.B., J. Yang, B.A. Rothmel, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 2002. Multiple domains of MCIP1 contribute to inhibition of calcineurin activity. *J Biol Chem.* 277:30401-30407.
- Veldwijk, M.R., J. Topaly, S. Laufs, U.R. Hengge, F. Wenz, W.J. Zeller, and S. Fruehauf. 2002. Development and optimization of a real-time quantitative PCR-based method for the titration of AAV-2 vector stocks. *Mol Ther.* 6:272-278.
- Vihinen-Ranta, M., L. Kakkola, A. Kalela, P. Vilja, and M. Vuento. 1997. Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem.* 250:389-394.
- Vihinen-Ranta, M., D. Wang, W.S. Weichert, and C.R. Parrish. 2002. The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol.* 76:1884-1891.
- Viiala, N.O., S.R. Larsen, and J.E. Rasko. 2009. Gene therapy for hemophilia: clinical trials and technical tribulations. *Semin Thromb Hemost.* 35:81-92.
- Volpers, C., and S. Kochanek. 2004. Adenoviral vectors for gene transfer and therapy. *J Gene Med.* 6 Suppl 1:S164-171.
- von Nandelstadh, P., M. Ismail, C. Gardin, H. Suila, I. Zara, A. Belgrano, G. Valle, O. Carpen, and G. Faulkner. 2009. A class III PDZ binding motif in the myotilin and FATZ families binds enigma family proteins: a common link for Z-disc myopathies. *Mol Cell Biol.* 29:822-834.
- Wagner, K.R. 2002. Genetic diseases of muscle. *Neurol Clin.* 20:645-678.
- Walters, R.W., T. Grunst, J.M. Bergelson, R.W. Finberg, M.J. Welsh, and J. Zabner. 1999. Basolateral localization of fiber receptors limits adenovirus infection from the apical surface of airway epithelia. *J Biol Chem.* 274:10219-10226.
- Wang, C.H., D.W. Liu, Y.P. Tsao, X. Xiao, and S.L. Chen. 2004. Can genes transduced by adeno-associated virus vectors elicit or evade an immune response? *Arch Virol.* 149:1-15.
- Wang, J., S.M. Faust, and J.E. Rabinowitz. 2011. The next step in gene delivery: molecular engineering of adeno-associated virus serotypes. *J Mol Cell Cardiol.* 50:793-802.
- Wang, Z., H.I. Ma, J. Li, L. Sun, J. Zhang, and X. Xiao. 2003. Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther.* 10:2105-2111.
- Watkins, H., C. MacRae, L. Thierfelder, Y.H. Chou, M. Frenneaux, W. McKenna, J.G. Seidman, and C.E. Seidman. 1993. A disease locus for familial hypertrophic cardiomyopathy maps to chromosome 1q3. *Nat Genet.* 3:333-337.
- Weber, K.T. 1989. Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol.* 13:1637-1652.

- Weitzman, M.D., S.R. Kyostio, R.M. Kotin, and R.A. Owens. 1994. Adeno-associated virus (AAV) Rep proteins mediate complex formation between AAV DNA and its integration site in human DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:5808-5812.
- Wettschureck, N., H. Rutten, A. Zywiets, D. Gehring, T.M. Wilkie, J. Chen, K.R. Chien, and S. Offermanns. 2001. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galphi1 in cardiomyocytes. *Nat Med*. 7:1236-1240.
- WHO. 1980. Report of the WHO/ISFC task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Br Heart J*. 44:672-673.
- Wickham, T.J., M.E. Carrion, and I. Kovesdi. 1995. Targeting of adenovirus penton base to new receptors through replacement of its RGD motif with other receptor-specific peptide motifs. *Gene Ther*. 2:750-756.
- Wiesner, R.J., H. Ehmke, J. Faulhaber, R. Zak, and J.C. Ruegg. 1997. Dissociation of left ventricular hypertrophy, beta-myosin heavy chain gene expression, and myosin isoform switch in rats after ascending aortic stenosis. *Circulation*. 95:1253-1259.
- Wilkins, B.J., and J.D. Molkenin. 2004. Calcium-calceurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 322:1178-1191.
- Wittstein, I.S., D.R. Thiemann, J.A. Lima, K.L. Baughman, S.P. Schulman, G. Gerstenblith, K.C. Wu, J.J. Rade, T.J. Bivalacqua, and H.C. Champion. 2005. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress. *N Engl J Med*. 352:539-548.
- Woo, Y.J., J.C. Zhang, M.D. Taylor, J.E. Cohen, V.M. Hsu, and H.L. Sweeney. 2005. One year transgene expression with adeno-associated virus cardiac gene transfer. *Int J Cardiol*. 100:421-426.
- Wright, M.J., L.M. Wightman, C. Lilley, M. de Alwis, S.L. Hart, A. Miller, R.S. Coffin, A. Thrasher, D.S. Latchman, and M.S. Marber. 2001. In vivo myocardial gene transfer: optimization, evaluation and direct comparison of gene transfer vectors. *Basic Res Cardiol*. 96:227-236.
- Yamaguchi, M., M. Izumimoto, R.M. Robson, and M.H. Stromer. 1985. Fine structure of wide and narrow vertebrate muscle Z-lines. A proposed model and computer simulation of Z-line architecture. *J Mol Biol*. 184:621-643.
- Yang, J., B. Rothermel, R.B. Vega, N. Frey, T.A. McKinsey, E.N. Olson, R. Bassel-Duby, and R.S. Williams. 2000. Independent signals control expression of the calcineurin inhibitory proteins MCIP1 and MCIP2 in striated muscles. *Circ Res*. 87:E61-68.
- Yang, Q., A. Sanbe, H. Osinska, T.E. Hewett, R. Klevitsky, and J. Robbins. 1998. A mouse model of myosin binding protein C human familial hypertrophic cardiomyopathy. *J Clin Invest*. 102:1292-1300.
- Young, M., M. Fullerton, R. Dilley, and J. Funder. 1994. Mineralocorticoids, hypertension, and cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. 93:2578-2583.
- Zak, R. 1973. Cell proliferation during cardiac growth. *Am J Cardiol*. 31:211-219.
- Zipper, H., H. Brunner, J. Bernhagen, and F. Vitzthum. 2004. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 32:e103.
- Zou, Y., A. Yao, W. Zhu, S. Kudoh, Y. Hiroi, M. Shimoyama, H. Uozumi, O. Kohmoto, T. Takahashi, F. Shibasaki, R. Nagai, Y. Yazaki, and I. Komuro. 2001. Isoproterenol activates extracellular signal-regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation*. 104:102-108.