

Aus der Medizinischen Klinik II  
der Medizinischen Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. H.A. Katus

---

**Entwicklung klinisch experimenteller Ansätze zur  
therapeutischen Nutzung des kalziumbindenden  
Proteins S100A1 im Herzen**

Inauguraldissertation  
Zur Erlangung der Doktorwürde  
Der Medizinischen Universität zu Lübeck  
-Aus der Medizinischen Fakultät-

Vorgelegt von  
Sven Torsten Pleger  
aus Bremen

# **Widmung**

Meiner Mutter.

1. Berichtstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Bjoern-Andrew Remppis

2. Berichtstatter: Prof. Dr. med. Norbert Guldner

Tag der mündlichen Prüfung: 22.10. 2004

zum Druck genehmigt. Lübeck, den 22.10. 2004

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak  
- Dekan der Medizinischen Fakultät -

# Inhaltsverzeichnis

## I. Einleitung

- I.1 Epidemiologische Bedeutung der Herzinsuffizienz
- I.2 Klinisch experimentelle Therapieansätze der Herzinsuffizienz
- I.3 Regulation der kontraktiven Funktion des Herzmuskels durch Kalzium
- I.4 S100 Proteinfamilie und S100A1
- I.5 Regulation der kontraktiven Funktion des Herzmuskels durch S100A1
- I.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit

## II. Methoden und Material

- II.1 Prinzip der Konstruktion eines E1/E3 deletierten Adenovirus zur S100A1 Überexpression
  - II.1.1 Schneiden von DNA
  - II.1.2 Isolation und Aufreinigung von DNA
  - II.1.3 Ligation der S100A1 cDNA mit dem adenoviralen Shuttlevektor pAdTrack-CMV
  - II.1.4 Transformation des Ligationsproduktes (pAdTrack/S100A1) in E.Coli DH<sub>5α</sub>
  - II. 1.5 Kontrolle der Ligation
  - II.1.6 Rekombination von pAdTrack/S100A1 und pEASY-1
  - II.1.7 Kontrolle des Rekombinationsproduktes
  - II.1.8 Verdau der S100A1 rekombinanten adenoviralen DNA
  - II.1.9 Einbringen der S100A1 rekombinanten adenoviralen DNA in HEK 293 Zellen
- II.2 Konstruktion eines GFP Kontrollvirus
- II.3 Vermehrung und Anreicherung der rekombinanten Adenoviren
  - II.3.1 Virusvermehrung in HEK 293 Zellen
  - II.3.2 Virusanreicherung mittels Cäsiumchloriddichtegradienten
  - II.3.3 Testung der viralen Infektiosität durch einen Plaque Assay
- II.4 Überprüfung des adenoviralen Konstruktes an isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten
  - II.4.1 Isolation adulter Kardiomyozyten und S100A1 Gentransfer
  - II.4.2 Kontraktilitätsmessung isolierter Kardiomyozyten
- II.5 Adenoviraler S100A1 Gentransfer in engineered heart tissue (EHT)
  - II.5.1 Isolation neonataler Kardiomyozyten
  - II.5.2 Konstruktion der EHT's und S100A1 Gentransfer

- II.5.3 Messung der isometrischen Kraft der EHT`s
- II.6 Myokardialer S100A1 *in vivo* Gentransfer
  - II.6.1 Intrakoronarer S100A1 *in vivo* Gentransfer
  - II.6.2 *In vivo* Charakterisierung der Herzfunktion mittels Linksherzkatheter
- II.7 Expressionsanalysen
  - II.7.1 Western Blot
  - II.7.2 Expressionsanalyse isolierter Kardiomyozyten nach Adv-Gentransfer
    - II.7.2.1 Western Blot
    - II.7.2.2 GFP-Expression
  - II.7.3 Expressionsanalyse des EHT nach Adv-Gentransfer
    - II.7.3.1 Western Blot
    - II.7.3.2 GFP-Expression
  - II.7.4 Expressionsanalyse linksventrikulären Myokards nach Adv-Gentransfer
    - II.7.4.1 Western Blot
    - II.7.4.2 GFP-Expression
- II.8 Statistische Berechnungen
- II.9 Material und Reagenzien

### **III. Ergebnisse**

- III.1 Konstruktion eines E1/E3 deletierten Adenovirus zur S100A1 Überexpression (AdvS100A1)
- III.2 Vermehrung und Anreicherung der rekombinanten Adenoviren
- III.3 Adenoviraler S100A1 Gentransfer in isolierte, adulte Kardiomyozyten
- III.4 S100A1 Protein Überexpression adulter Kardiomyozyten nach S100A1 Gentransfer
- III.5 Kontraktile Funktion ventrikulärer Kardiomyozyten nach S100A1 Gentransfer
- III.6 Adenoviraler (Adv) Gentransfer in engineered heart tissue (EHT)
- III.7 Expressionsanalyse der EHT`s nach S100A1 Gentransfer
- III.8 Kontraktile Funktion der EHT`s nach S100A1 Gentransfer
- III.9 Myokardialer S100A1 *in vivo* Gentransfer und S100A1 Expressionsanalyse
- III.10 Hämodynamische Messung der Herzfunktion nach myokardialen S100A1 Gentransfer

## **IV. Diskussion**

IV.1 Funktionelle Testung des S100A1 rekombinanten Adenovirus (AdvS100A1)

IV.2 Anwendung des AdvS100A1 zur Steigerung der myokardialen Kontraktilität

IV.2.1 S100A1 Gentransfer in Engineered Heart Tissue (EHT)

IV.2.2 Steigerung der myokardialen Kontraktilität durch einen S100A1 *in vivo* Gentransfer

## **V. Zusammenfassung**

## **VI. Abkürzungsverzeichnis**

## **VII. Literaturverzeichnis**

## **VIII. Danksagung**

## **IX. Lebenslauf**

### **I. Einleitung**

#### **I.1 Epidemiologische Bedeutung der Herzinsuffizienz**

Trotz deutlicher therapeutischer Fortschritte stellt die Herzinsuffizienz weltweit eine der häufigsten internistischen Erkrankungen dar und geht vor allem in ihrem terminalen Stadium nach wie vor mit einer Mortalität einher, die der malignen Erkrankungen vergleichbar ist (Packer et al., 2001; Zannad et al., 1999). So waren 1998 in Deutschland 48% der Todesfälle auf Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems zurückzuführen und "Herzinsuffizienz" allein die häufigste Entlassungsdiagnose aus stationärer Behandlung. Die Prävalenz und Inzidenz sind altersabhängig. Im Alter zwischen 45 und 55 Jahren leiden weniger als 1% der Bevölkerung an einer Herzinsuffizienz, zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr bereits 2-5% und bei über 80 jährigen fast 10%. Männer sind häufiger als Frauen betroffen mit einer Geschlechterrelation von etwa 1,5:1. Die häufigsten Ursachen einer Herzinsuffizienz umfassen hierbei die koronare Herzerkrankung (KHK) (54-70%), die idiopathische Kardiomyopathie (18-28%), den arteriellen Hypertonus (9-20%) sowie Myokarditiden, Herzvitien, alkoholische Kardiomyopathien, Endokarditiden und andere (Ho et al., 1993), (Kannel und Belanger, 1991). Die initiale myokardiale Schädigung durch eine Druck-Volumen-Überlastung oder durch einen direkten Gewebsverlust mündet jedoch unabhängig von ihrer Genese in einer gemeinsamen dysfunktionellen Endstrecke. Diese ist charakterisiert durch eine reduzierte kontraktile Funktion, eine gestörte intrazelluläre Kalziumhomöostase sowie durch eine Erhöhung der Kalziumsensitivität der Myofilamente (Gwathmey et al., 1987). Als Folge der Minderperfusion peripherer Organe entsteht zudem eine systemische neuroendokrine Aktivierung. Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die vermehrte Freisetzung von NO, Vasopressin, Zytokinen sowie erhöhte Plasmaendothelinspiegel führen zu einer peripheren Vasokonstriktion, Flüssigkeitsretention, Arrythmiegeneigung und Katecholaminrefraktärität des Herzens (McMurray et al., 1992; Yazaki and Yamazaki, 1997). Die chronische Herzinsuffizienz stellt somit einen dynamischen Prozess dar, bei dem Kompensationmechanismen in einen Cirulus vitiosus zu einer weiteren kardialen Funktionsverschlechterung beitragen (Anversa et al., 1996).

## I. Einleitung

---

### **1.2 Klinisch experimentelle Therapieansätze der Herzinsuffizienz**

Vor dem Hintergrund der großen volkswirtschaftlichen Bedeutung (Rich et al, 1997) und der trotz deutlicher therapeutischer Fortschritte nach wie vor hohen Mortalität der Herzinsuffizienz muss daher nach neuen Therapieansätzen gesucht werden, die über den bisherigen pharmakologischen Ansatz hinaus die strukturelle und funktionelle Integrität des Herzmuskels und somit auch die Prognose der Erkrankung verbessern können. Auch wenn neue Therapiemodalitäten, wie der gezielte kardiale Gentransfer oder die zelluläre Kardiomyoplastie, heute noch rein experimenteller Natur sind, so könnten diese doch in wenigen Jahren eine bedeutende Rolle in der klinischen Therapie der Herzinsuffizienz spielen.

Einen neuen potentiellen Therapieansatz der Herzinsuffizienz stellt der Herzmuskelgewebersatz dar. Eschenhagen et al. entwickelten einen aus neonatalen Kardiomyozyten in vitro rekonstituierten Herzmuskelgewebeverband (Eschenhagen et al., 1997). Dieser synzytiale Zellverband weist viele physiologische und morphologische Eigenschaften von adultem, in vivo-Herzmuskelgewebe auf einschließlich der Ausbildung von Sarkomeren, Desmosomen, gap junctions und T-tubulärem System mit Dyadenformation (Zimmermann et al., 2002b) und besitzt aus diesem Grund das Potential für eine Herzmuskelgewebersatztherapie (Eschenhagen et al., 2002). Die Praktikierbarkeit der Transplantation von EHT auf das Herz von Ratten wurde kürzlich von Zimmermann et al. (Zimmermann et al., 2002a) gezeigt. Interessanterweise kontrahierten und überlebten die transplantierten EHT`s auf dem Rattenherz während des Untersuchungszeitraumes von 28 Tagen und waren vaskularisiert, innerviert und höher differenziert als vor der Transplantation (Zimmermann et al., 2002a). Limitierend für eine klinische Anwendung des kardialen Ersatzgewebes in der Herzinsuffizienz sind allerdings die elektrische Integration des Herzmuskelerersatzgewebes in das native Myokard (Reinecke et al., 1999), die Abstoßungsreaktion (Zimmermann et al., 2002a) und die geringe Kraft des Ersatzgewebes.

Als weitere neue klinische Möglichkeit zur Behandlung der Herzinsuffizienz ist die kardiale Gentherapie bereits in greifbare Nähe gerückt und konnte in klinischen Phase I- und II-Studien bereits erste therapeutische Erfolge erzielen (Bashir et al., 2002), (Francis et al., 2001). Anhand von Tiermodellen der Herzinsuffizienz konnte prinzipiell gezeigt werden, dass der Transfer einzelner Gene mit einer signifikanten Steigerung der Kontraktilität einhergeht (Hajjar et al., 2000; Shah et al., 2001). Für die Weiterentwicklung dieser therapeutischen Ansätze wird es jedoch von entscheidender Bedeutung sein,

## I. Einleitung

---

weitere kardiale Faktoren zu identifizieren, die für die kardiomyozytäre Funktion von zentraler Bedeutung sind.

### **I.3 Regulation der kontraktile Funktion des Herzmuskels durch Kalzium**

Dem Kalziumion ( $\text{Ca}^{2+}$ ) kommt eine zentrale Rolle bei der elektromechanischen Kopplung zu, wie klassische Studien von Ringer belegen (Ringer, 1885). Das Aktionspotential, das entlang der Oberfläche der Kardiomyozyte (Sarkolemm) generiert wird, initiiert den kontraktile Prozeß des Herzmuskels, indem die Öffnungswahrscheinlichkeit der sarkolemmalen Kalziumkanäle (Dihydropyridinrezeptor/DHPR) durch die Depolarisation erhöht wird. Das Kalzium, das durch die spannungsabhängige Öffnung der sarkolemmalen DHPR in die Zelle einströmt, führt zu einer Aktivierung und Öffnung der sarkoplasmatischen Ryanodin Rezeptoren und somit zu einer Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum. Der relativ geringe Kalziumeinstrom über die L-Typ Kalziumkanäle (DHPR) triggert somit die Freisetzung einer für die Kontraktion der Kardiomyozyte bedeutsamen Kalziummenge aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) (calcium induced calcium release) (Marks, 2000). Der zytosolische Anstieg des freien Kalziums führt zu einer erhöhten Bindungswahrscheinlichkeit des Kations mit Troponin C, einer Komponente des Tropomyosin-Troponin-Komplexes, der entlang der Aktinfilamente lokalisiert ist und den eigentlichen  $\text{Ca}^{2+}$  Rezeptor des kontraktile Apparates darstellt. Die Bindung des  $\text{Ca}^{2+}$  an Troponin C führt zu einer Konformationsänderung im Tropomyosin-Troponin-Komplex und ermöglicht so die Formation von Querbrücken zwischen Myosin und Aktin mit der Konsequenz der Aktivierung des Querbrückenzyklus und der Verkürzung der Myofilamente der Herzmuskelzelle (Huxley, 1990). Die Energie für die myokardiale Kontraktion wird aus der Spaltung des Adenosintriphosphates durch die Myosin ATPase Aktivität während der Interaktion des Myosins mit Aktin gewonnen. Die anschließende Relaxation der Kardiomyozyte beginnt, sobald die Kalziumaufnahme in das SR die zytosolische Kalziumfreisetzung übersteigt. Dabei steigt die Wahrscheinlichkeit der Dissoziation des Kalziums vom Troponin C mit der sinkenden zytosolischen Kalziumkonzentration (Callewaert, 1992). Die entscheidende Determinante der  $\text{Ca}^{2+}$  Sequestration in das sarkoplasmatische Retikulum ist die sarkoplasmatische Retikulum ATPase (SERCA2a), die hauptsächlich entlang der longitudinalen Tubuli des SR lokalisiert ist. Der Kalziumtransport geschieht als primär aktiver Prozeß unter dem Verbrauch von

## I. Einleitung

---

ATP. Reguliert wird die SERCA2a Aktivität durch das Protein Phospholamban (PLB), das durch seine reversible Bindung an die SERCA2a die Aktivität der Pumpe konstitutionell hemmt (Lompre et al., 1994). Die im Zuge der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade stattfindende Phosphorylierung des Phospholamban erhöht die sarkoplasmatische Kalziumaufnahme durch Sensitivierung der SERCA2a für Kalzium. Die Kontraktionsgeschwindigkeit und die durch die Interaktion von Aktin und Myosin entwickelte Kraft korreliert direkt mit dem freien zytosolischen Kalzium. Ein Anstieg der freien Kalziumkonzentration von  $5 \times 10^{-7}$  M auf  $6 \times 10^{-6}$  M führt zu der Entwicklung von 90% der Maximalkraft. Dem Kation Kalzium kommt somit eine zentrale Rolle in der Steuerung der Kraftentwicklung des Herzmuskels zu.

### I.4 S100 Proteinfamilie und S100A1

S100A1 ist ein kalziumbindendes Protein aus der Familie der S100 Proteine. Diese Proteine bilden mit aktuell neunzehn Mitgliedern die größte bekannte Subgruppe innerhalb der Superfamilie kalziumbindender EF-Hand Proteine (Donato, 2001). Das EF-Hand Motiv, das in der Natur als Kalziumkomplexbildner weit verbreitet ist, weist generell eine repetitive Helix-Loop-Helix-Sekundärstruktur auf (Persechini et al., 1989). Diese Leitstruktur wurde erstmals im dritten kalziumbindenden Motiv des Proteins Parvalbumin beschrieben und gibt der Proteinsuperfamilie als gemeinsames Kennzeichen ihren Namen (Abb.I.1) (Moews and Kretsinger, 1975).

Abb.I.1

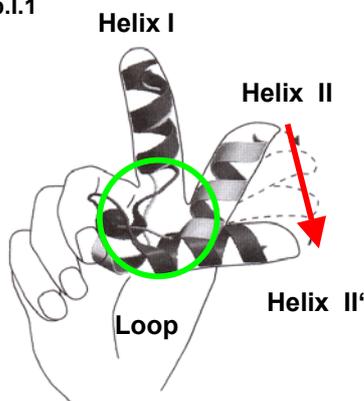


Abb.I.1 veranschaulicht die Sekundärstruktur der kalziumbindenden EF-Hand ( $\alpha$ -Helix-Loop- $\alpha$ -Helix) nach Kretsinger (1975) in einem dreidimensionalen Schema (Lewit-Bentley und Rety, 2000). Beide  $\alpha$ -Helices des kalziumbindenden Motivs können durch den gestreckten Zeige- (I) und Mittelfinger (II) der rechten Hand dargestellt werden. Sie sind durch einen linearen Abschnitt (Loop, grüner Kreis) verbunden, der Kalzium wie in einer Bindungsnische koordinativ bindet. Die Bindung von Kalzium in diesem Bereich induziert durch die Verlagerung der Helix II (roter Pfeil) eine Konformationsänderung der EF-Hand.

## I. Einleitung

---

Die gegenwärtige Nomenklatur der S100 Proteinfamilie stützt sich im Wesentlichen auf die Organisationsstruktur ihrer Gene in einem Cluster auf Chromosom 21. Gene dieses Clusters werden terminal mit A gekennzeichnet und gemäß ihrer Position in Leserichtung des kodierenden DNA Stranges fortlaufend nummeriert (S100A1, S100A2, etc.) (Schafer and Heizmann, 1996). Eine Ausnahme bildet S100B mit seiner Lokalisation auf Chromosom 22 (Allore et al., 1988). S100 Proteine sind kleine Proteine (8-13 kD), die typischerweise zwei kalziumbindende Domänen aufweisen (Abb.1.2) (Zimmer et al., 1995). Magnetresonanztomographische Untersuchungen (NMR) zeigen, dass S100 Proteine bevorzugt Dimere

Abb.1.2

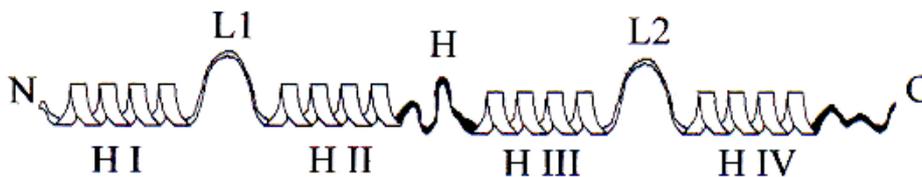


Abb.1.2 verdeutlicht die typische Sekundärstruktur einer monomeren S100 Untereinheit (Donato, 1991). Jedes Monomer besteht aus zwei kalziumbindenden EF-Hand Motiven (Helix-Loop-Helix; H I-L1-H II, H III-L2-H IV), die durch eine Scharnierregion (Hinge; H) getrennt werden. Deutlich sind die Loops (L1, L2) beider EF-Hände zu erkennen, die Kalzium koordinativ binden. Die Enden des Monomers (N und C terminal) weisen im Gegensatz zur Scharnierregion eine ausgeprägte Hydrophobizität auf und dienen unter anderem der Stabilisation des Dimers (siehe Abb.5).

Abb.1.3

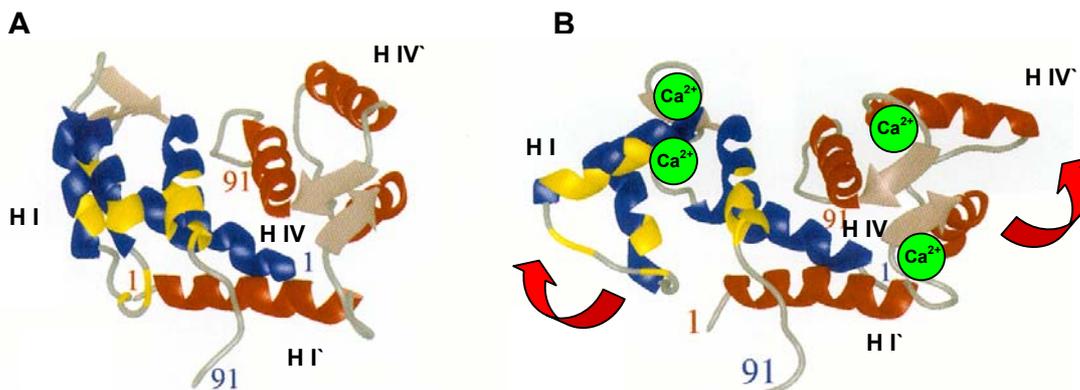


Abb.1.3 A veranschaulicht die dreidimensionale Struktur von S100A1 (Wang, 2001). Zwei homologe Untereinheiten (blau und orange) bilden je ein antiparalleles, kompaktes Homodimer (25×25×49 Angström). Jede Untereinheit verfügt über zwei EF-Hände, die durch eine Scharnierregion getrennt sind. Die kalziumbindenden Loops der EF-Hände sind durch braune Pfeile markiert. Das Dimer wird durch die antiparallele Überkreuzung der Helix I und IV beider Dimere stabilisiert. B verdeutlicht die Konformationsänderung des Dimers nach Kalziumbindung (grün). Deutlich ist die Auswärtsbewegung der Helix IV und I zu erkennen (rote Pfeile), die die hydrophoben Epitope des Moleküls freilegen.

## I. Einleitung

---

bilden (Abb.1.3) (Drohat et al., 1998). Die Bindung von Kalzium über die EF-Hände löst dabei eine komplexe Veränderung der Tertiärstruktur des Dimers aus (Matsumura et al., 1998).

Die hydrophoben Pole des Monomers - N- (N) und C-terminal (C) – gruppieren sich zusammen mit dem mittleren Anteil der Untereinheit - sog. Scharnierregion, im Folgenden auch *Hinge region* (H) genannt - an den Oberflächen des dimeren Moleküls, um an Zielproteine zu binden. Die *Hinge region*, die die beiden EF-Hände des Monomers strukturell trennt, weist eine S100 Isoform spezifische Primärstruktur auf. Es wird angenommen, dass die *Hinge region* die Spezifität der Interaktion eines bestimmten S100 Proteins mit seinen Zielproteinen vermittelt, die durch die hydrophoben N- und C-terminalen Flanken stabilisiert wird (Heizmann and Cox, 1998). Die Struktur der S100 Proteine weist mit einer hohen Kalziumaffinität und einer niedrigen Kalziumbindungskapazität die Charakteristik sogenannter Kalziumsensoren auf (Groves et al., 1998). Im Zusammenhang mit ihrem gewebsspezifischen Expressionsmuster verleiht ihnen dies die Fähigkeit, den Informationsgehalt des unspezifischen *second messengers* Kalzium in eine spezifische Antwort eines Zelltyps umzuwandeln (Donato, 1991). Die hochkonservierte Molekülstruktur der S100 Proteine lässt in Analogie zu anderen, ebenfalls strukturell hochkonservierten Proteinfamilien (z.B. G-Proteine, Histone, etc.) eine grundlegende Funktion der S100 Proteine im Rahmen der kalziumabhängigen Signaltransduktion bzw. der Regulation zellulärer Funktionen vermuten. Die Dysregulation der Expression einzelner S100 Proteine konnte bereits mit einer Reihe extrakardialer Erkrankungen assoziiert werden. Beispielsweise scheint die veränderte Expression des neuronal spezifischen S100B in der Pathogenese neurodegenerativer Erkrankungen eine wichtige Rolle zu spielen, (Allore et al., 1988) während S100A4 (Tulchinsky et al., 1993) und A6 (Lee et al., 1992) eine zentrale Funktion in der Metastasierungskaskade des Mammakarzinoms sowie S100A8 (Passey et al., 1999) und A9 (Kerkhoff et al., 1999) eine Schlüsselrolle in der Entwicklung chronisch inflammatorischer Prozesse einnehmen.

S100A1 wird vor allem im quergestreiften Muskel exprimiert und weist im Herzmuskel mit Abstand das höchste Expressionsniveau auf (Kato and Kimura, 1985). S100A1 formt wie die meisten der S100 Proteine nach der Expression seiner monomeren  $\alpha$ -Untereinheiten ein symmetrisches, antiparalleles Homodimer ( $25 \times 25 \times 49 \text{ \AA}$ ) (Wang Z, 2001). Das S100A1 Dimer mit einer relativen Masse von 22 kD

## I. Einleitung

---

wird dabei über intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen und eine kovalente Disulfidbrücke stabilisiert. Untersuchungen im frühen embryonalen Entwicklungsstadium des Herzens belegen eine enge zeitliche und räumliche Assoziation der Expression des Proteins mit der Entstehung der Herzhöhlen und ihrer Trennung in Vorhöfe und Ventrikel (Kiewitz et al., 2000). Dieses differentielle Expressionsmuster findet sich auch im adulten Myokard wieder und Studien zur Transkription und Translation des S100A1 Gens im adulten Herzen weisen im linken Ventrikel die höchsten mRNA- und Proteinkonzentrationen nach (Remppis et al., 1996). Eine bemerkenswerte Plastizität der Expression zeigt sich interessanterweise auch in der Entwicklung der Herzinsuffizienz. Findet sich im Stadium der kompensierten Hypertrophie eine gesteigerte Expression des Proteins (Ehlermann et al., 2000), so belegen Untersuchungen im Rahmen der terminalen Herzinsuffizienz eine drastische Verringerung der Proteinexpression im Vergleich zum Normalkollektiv (Remppis et al., 1996). Elektronenmikroskopische Studien zur subzellulären Verteilung des Proteins im gesunden Herzmuskel konnten S100A1 mit dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und dem kontraktilem Apparat kolokalisieren (Haimoto and Kato, 1988) und weisen mit den oben genannten Befunden auf eine Funktion des Proteins in der Regulation des kardialen Kontraktionszyklus hin.

### **I.5 Regulation der kontraktilem Funktion des Herzmuskels durch S100A1**

Funktionelle Studien an S100A1 transgenen Mäusen mit einer herzspezifischen Überexpression des Proteins konnten nachweisen, dass eine Überexpression des Proteins in vivo zu einer signifikanten Steigerung der systolischen und diastolischen Funktion des Myokards führt (Most et al., submitted). Als wesentliche Grundlage des positiv inotropen/lusitropen Effektes konnte sowohl eine Steigerung der zytosolischen Kalziumtransienten durch Steigerung der SERCA Aktivierung sowie eine Reduktion der Kalziumsensitivität der Myofilamente durch S100A1 nachgewiesen werden (Remppis, 2002) (Most et al., 2001). Darüber hinaus steigert S100A1 zusätzlich zu einer sympathomimetischen Aktivierung die Kontraktilität des Myokards und weist somit einen alternativ additiv-inotropen Effekt auf. Trotz der positiv inotropen Effekte führt die Überexpression der kardialen S100A1 Isoform jedoch nicht zur Ausbildung einer kardialen Hypertrophie (Most et al., submitted). Diese Daten stehen im Einklang mit Beobachtungen am Modell der S100A1 knock-out-Maus, in dem die S100A1 Defizienz ebenfalls zu keiner phänotypischen Veränderung führt (Du et al., 2002). In der S100A1 knock-out Maus zeigen sich darüber auch keine hämodynamischen Unterschiede unter Ruhebedingungen. Dagegen führt die akute  $\beta$ -adrenerge

## I. Einleitung

---

Stimulation zu einer verminderten hämodynamischen Antwort der S100A1 defizienten Mäuse mit einem signifikant niedrigeren Anstieg des systolischen Ejektionsdruckes (SEP) sowie der ersten Ableitung des maximalen linksventrikulären Druckanstieges (+dP/dt) bzw. Druckabfalles (-dP/dt) im Vergleich mit dem Wildtyp (Du et al., 2002). Ein weiterer Hinweis für die funktionelle Bedeutung von S100A1 für die kontraktile Funktion des Myokards zeigt sich unter chronischer Druckbelastung durch *aortales banding*. Im Gegensatz zu den Kontrolltieren, bei denen eine adaptive Hypertrophie durch die Druckbelastung auch zu einem Anstieg der myokardialen Kontraktilität führt, bildet sich bei S100A1 knock-out Tieren eine Hypertrophie aus, die mit einer signifikanten Reduktion der Kontraktilität einhergeht (Du et al., 2002). Die gesteigerte myokardiale Kontraktilität der S100A1 transgenen Tiere und die verminderte Adaption der S100A1 knock-out Mäuse an akuten und chronischen hämodynamischen Streß belegen somit die funktionelle Relevanz von S100A1 für die Regulation der kontraktile Funktion des Herzmuskels.

### **I.6 Fragestellung und Ziel der Arbeit**

Vor dem Hintergrund des Wirkprinzips von S100A1 als positiv inotroper Regulator der Herzfunktion (Most et al., 2001)(Du et al., 2002) erscheint die myokardiale S100A1 Substitution in der Herzinsuffizienz therapeutisch sinnvoll. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, klinisch experimentelle Ansätze zur therapeutischen Nutzung des Proteins S100A1 in der Herzinsuffizienz zu entwickeln. Hierzu sollte sowohl die Möglichkeit einer S100A1-vermittelten Kraftsteigerung von künstlichem Herzmuskelgewebe zur Herzmuskelerersatztherapie, als auch die direkte Steigerung der Kontraktilität des Herzmuskels durch einen myokardialen S100A1 Gentransfer *in vivo* untersucht werden.

## II. Methoden

### II.1 Prinzip der Konstruktion eines E1/E3 deletierten Adenovirus zur S100A1 Überexpression

Zur Durchführung eines S100A1 Gentransfers wurde als Vektor ein rekombinanter Adenovirus konstruiert. Adenoviren sind in der Lage, Herzmuskelzellen zu infizieren und die zelleigene episodale Transkriptions und Translationfähigkeit zur Produktion eigener Proteine zu nutzen. Vom Johns Hopkins Oncology Center (Baltimore, MD, USA) wurde für den Bau des S100A1 Virus ein System zur Generation von rekombinanten Adenoviren zur Verfügung gestellt (He et al., 1998). Die adenovirale  $\approx$  41 kb Doppelstrang DNA war hierbei auf 2 Plasmide, pAdTrack-CMV (Abb.II.1) und pAdEASY-1 (Abb.II.2), aufgeteilt.

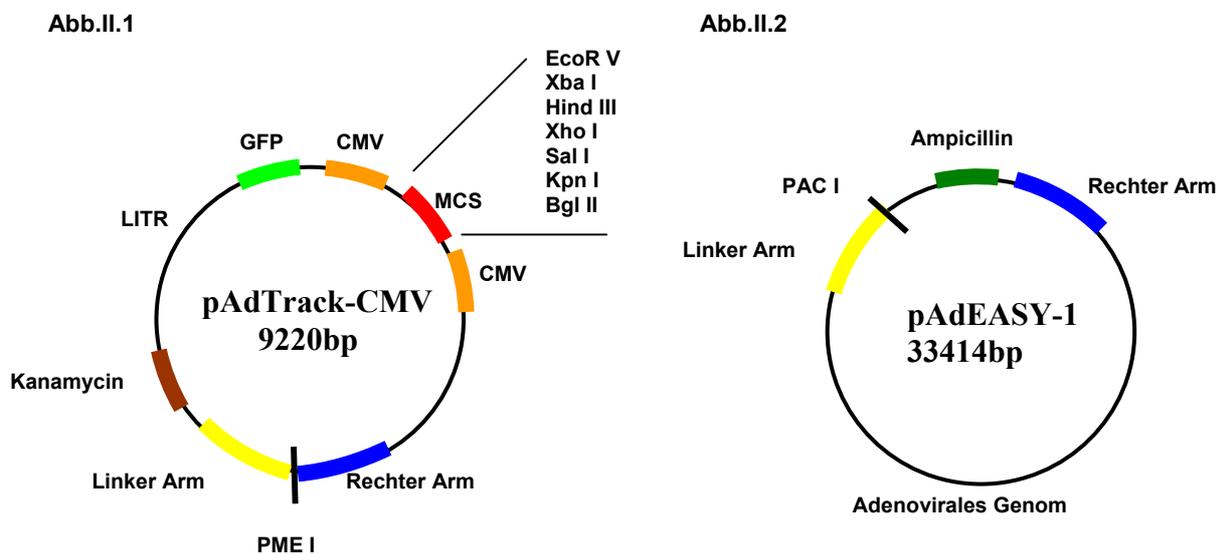


Abb.II.1 und Abb.II.2 veranschaulichen die zur Generation der rekombinanten Adenoviren verwendeten Plasmide. Die S100A1 cDNA konnte hinter einen CMV Promotor in das Plasmid pAdTrack-CMV kloniert werden. Die Vervollständigung der adenoviralen Genomsequenz wurde durch die Rekombination des Klonierungsproduktes mit dem pAdEASY-1 unter Ausnutzung homologer Sequenzen erreicht.

Für die Generation des rekombinanten S100A1 Adenovirus (AdvS100A1) wurde die S100A1 cDNA, unter Kontrolle eines CMV-Promotors, in den pAdTrack-CMV kloniert (Abb.II.3). Hierzu wurde eine Abfolge von bekannten singulären Schnittstellen der Plasmid-DNA (Multi Cloning Site (MCS)) genutzt. Die verwendete S100A1 cDNA wurde aus einer humanen, kardialen cDNA Bank (HL 5506u, Clontech) bezogen und durch Sequenzierung geprüft (Gen Bank; Accession Count x58079). Eine für ein grün

fluoreszierendes Protein (GFP) kodierende DNA-Sequenz wurde von einem zweiten CMV Promotor kontrolliert.

Abb.II.3

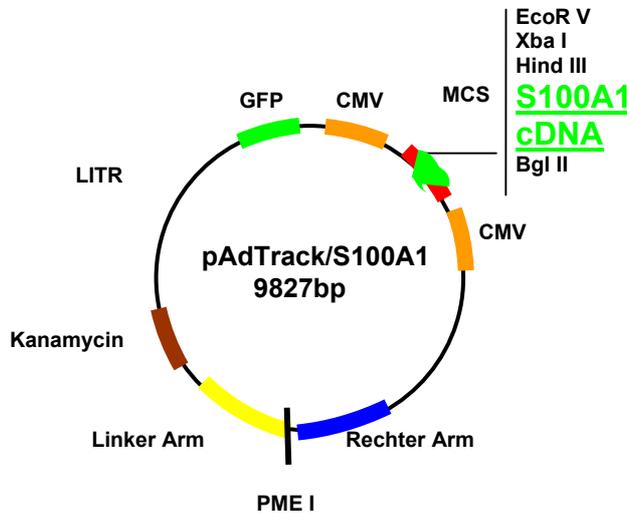


Abb.II.3 veranschaulicht das Plasmid pAdTrack/S100A1. Der pAdTrack/S100A1 entstand durch die Klonierung der S100A1 cDNA in den pAdTrack-CMV unter Nutzung der Bgl II und der Hind III Schnittstelle in der multi cloning site (MCS) des Vektors.

Nach der Insertion der S100A1 cDNA in den pAdTrack-CMV erfolgte die Rekombination dieses Klonierungsproduktes mit dem größeren Teil der adenoviralen DNA, in Form des 33414 bp umfassenden pEASY-1, in E.Coli BJ 5183 (Abb.II.4). Als Rekombinationsprodukt entstand die Plasmid DNA eines *Early 1* (E1: Basenpaare 1-3533) und *Early 3* (E3: Basenpaare 28130-30820) deletierten rekombinanten S100A1-Erstgenerationsadenovirus (pAd/S100A1). Die Generierung des S100A1 rekombinanten Adenovirus (AdvS100A1) erfolgte durch Einbringen des pAd/S100A1 in eine spezielle Zelllinie, den HEK 293 Zellen, welche die deletären Gene E1 und E3 supplementierten. Die E1/E3 Deletion ist gleichzeitig auch ein Sicherheitsfaktor, um eine nicht gewollte Verbreitung des S100A1 Virus in der Umwelt zu verhindern. Der Transfektionsmarker GFP diente der Infektionskontrolle. Alle Arbeiten, die mit der Replikation, Reinigung und der Verwendung der Viren zu Versuchszwecken durchgeführt wurden, fanden unter Bedingungen der Sicherheitsstufe 2 (S2) statt.

Abb.II.4

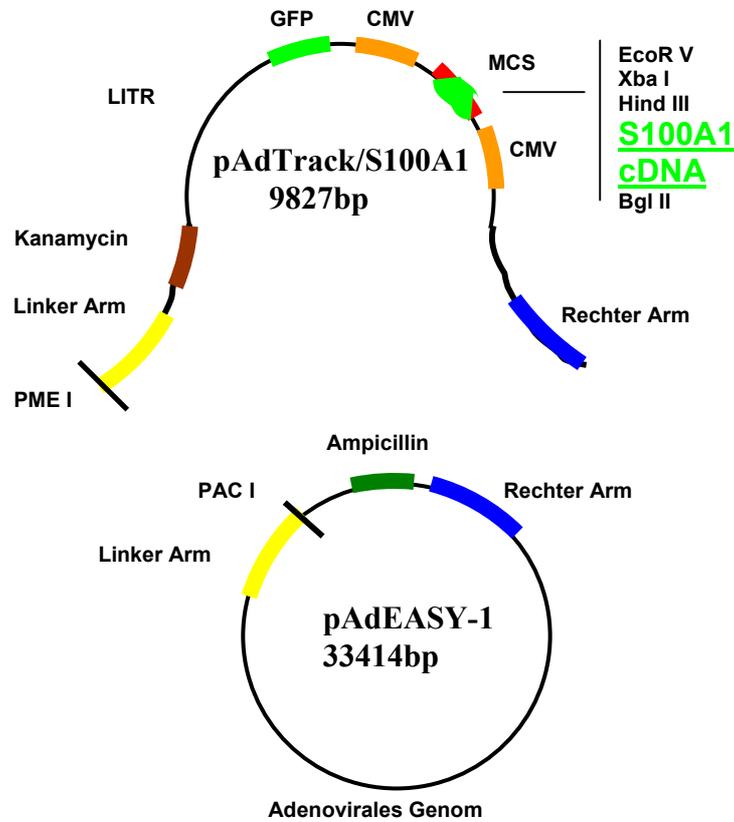


Abb.II.4 beschreibt die Rekombination des die S100A1 cDNA enthaltenden Shuttlevektors pAdTrack/S100A1 mit dem pEASY-1 zur Vervollständigung des adenoviralen Genoms. Der pAdTrack/S100A1 wurde hierzu mit dem Restriktionsenzym PME I *blunt* linearisiert und mit dem pEASY-1 in E.Coli BJ 5183 kotransfiziert. Die Rekombination erfolgte über die homologen Sequenzen des rechten (blau) und des linken (gelb) Armes.

### II.1.1 Schneiden von DNA

Restriktionsendonukleasen werden für das Schneiden von DNA verwendet. Diese Enzyme erkennen eine Abfolge von Basenpaaren und schneiden an diesen Stellen die DNA spezifisch. Für die durchgeführten Verdauungen wurde ein Protokoll nach Wilson (Wilson et al., 1993) angewendet und angenommen, daß 1 U des jeweiligen Restriktionsenzymes bei 37°C  $\approx$  1 µg DNA/h schneidet. Um ein vollständiges Schneiden der DNA zu erreichen, wurde die DNA über Nacht mit dem Restriktionsenzym inkubiert. Die Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs (NEB) bezogen und die von NEB für die jeweiligen Enzymkombinationen empfohlenen Puffer verwendet (New England Biolabs, Catalog 2000/2001).

Die humane S100A1 cDNA (Gen Bank; Accession Count x58079) war als 607 Basenpaare umfassendes DNA Stück in die multi cloning site (MCS) des Plasmides pBluescript sk<sup>-</sup> (pBSK<sup>-</sup>) kloniert (Abb.II.5). Von den 607 Basenpaaren kodierten Basenpaar 114 bis 398 für das humane Protein S100A1. In der MCS des pBluescript sk<sup>-</sup> befand sich 5' eine BamH I und 3' eine Hind III Schnittstelle.

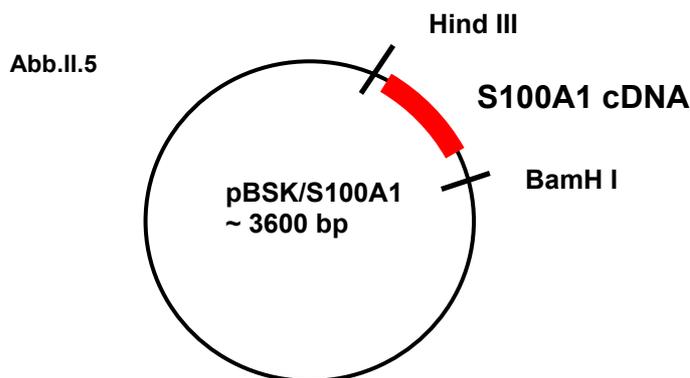


Abb.II.5 Darstellung des Vektors pBSK/S100A1. In diesem Vektor befand sich 5' der S100A1 cDNA eine BamH I und 3' eine Hind III Schnittstelle.

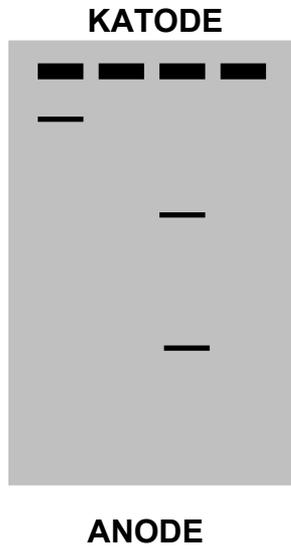
Diese Schnittstellenkombination des pBSK/S100A1 war kompatibel mit den Schnittstellen Hind III und Bgl II in der MCS des adenoviralen Transfervektors pAdTrack-CMV, da BamHI und Bgl II geschnittene DNA Enden bei einer Ligation zusammensetzbar sind.

20 µg der pBSK<sup>-</sup>/S100A1 DNA wurden hierzu mit 1 µl (20 Units (U)) des Hind III Restriktionsenzymes, 1 µl (20 U) des Bam HI Restriktionsenzymes und 2 µl des Bam H1 Puffers in einem Volumen von insgesamt 20 µl über Nacht bei 37°C inkubiert. Der pAdTrack-CMV wurde 5' mit Bgl II und 3' mit Hind III geschnitten. 20 µg des pAdTrack-CMV Plasmids wurden mit 1 µl (20 U) des Hind III Restriktionsenzymes, 1 µl (20 U) des Bgl II Restriktionsenzymes und 2 µl des NEB Puffers 2 in einem Volumen von insgesamt 20 µl über Nacht bei 37°C inkubiert.

### II.1.2 Isolation und Aufreinigung von DNA

Als Produkt des Hind III/Bam HI Verdauens des pBSK/S100A1 entstanden die S100A1 cDNA (607 bp) und der linearisierte pBSK (2960 bp). Der mit Bgl II/Hind III linearisierte pAdTrack-CMV ergab ein 9196 Basenpaare umfassendes DNA Stück. Die Darstellung der DNA Banden erfolgte elektrophoretisch auf einem Agarosegel (Abb.II.6). Für die Herstellung von (1% w/v) Agarosegelen wurden 1,5 g Agarose in 135 ml H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> und 15 ml 10x TAE Puffer gelöst. Diese Lösung wurde in der Mikrowelle zum Kochen gebracht und nach Abkühlen auf etwa 60°C mit 10 µg Ethidiumbromid versetzt. Durch einen Kamm wurden an einem Ende des Geles Taschen erzeugt. Nach dem vollständigen Abkühlen und Aushärten des Agarosegels wurden der mit BamH I und Hind III geschnittene pBSK/S100A1 und der mit Bgl I und Hind III geschnittene pAdTrack-CMV jeweils in die Taschen des Geles aufgetragen. In einer Elektrophoresekammer wurde eine Spannung von 120 V für 30 min angelegt, wodurch die DNA Stücke aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode gezogen wurden. Nach diesem Prinzip erfolgte eine Auftrennung der DNA Stücke der Größe (Basenpaaranzahl) nach (Abb.II.6). Durch die Interkalierung des Ethidiumbromids mit der DNA konnte die DNA im UV Licht sichtbar gemacht werden. Größenstandards (Smartladder, Eurogentec), die bei jeder Auftrennung mitliefen, erlaubten eine sowohl qualitative als auch quantitative Auswertung der DNA. Unter UV Anregung wurden das die S100A1 cDNA enthaltende 607 bp DNA Fragment und die DNA des linearisierten 9196 bp pAdTrack-CMV mit dem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten (Abb.II.7). Die ausgeschnittenen, DNA enthaltenden, Agarosegelstücke wurden in Microspin Tubes (Amicon) überführt. Die DNA liegt dabei in einem Tube mit einem Filterboden. Dieses Tube steckt in einem größeren Auffangtube (Abb.II.8). Durch die Zentrifugation der Microspin Tubes für 10 min bei 13000 rpm in einer Tischzentrifuge floß das im Gel enthaltende Wasser mit der DNA durch den Filter in das Auffangtube während das Agarosegel durch den Filter im oberen Tube zurückgehalten wurde. Zu dem Volumen, in dem die S100A1 cDNA gelöst war wurde ein gleiches Volumen an Isopropanol und ein Zehntel des Wasservolumens an 3M Natriumacetat hinzugefügt. Nach 15 minütigem Ausfällen der DNA bei -80°C wurde die DNA für 10 min mit 13000 rpm bei Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Das dabei entstandene DNA Pellet wurde in 500 µl 70% Ethanol gewaschen und danach erneut für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Das gewaschene DNA Pellet wurde dann in einen gewünschten Volumen an H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Abb.II.6



pAdTrack-CMV  
(9196 bp)

pBSK  
(2960 bp)

S100A1 cDNA  
(607 bp)

24 bp  
Fragment  
(nicht sichtbar)

Abb.II.7

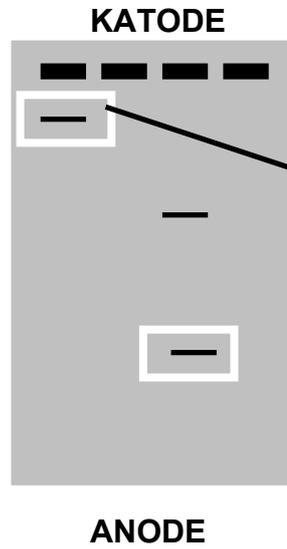


Abb.II.8

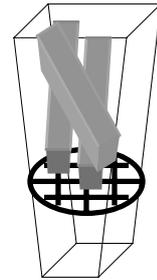


Abb.II.6 Schematische Darstellung der elektrophoretischen Auftrennung des mit Hind III/Bgl II geschnittenen pAdTrack-CMV sowie des mit Hind III/BamH I geschnittenen pBSK/S100A1 auf einem Agarosegel. Abb.II.7 veranschaulicht schematisch die aus dem Agarosegel ausgeschnittenen pAdTrack-CMV und S100A1 cDNA Banden. Abb.II.8 zeigt die ausgeschnittene pAdTrack-CMV Gelbande in einem Mikrosprin Tube.

### II.1.3 Ligation der S100A1 cDNA mit dem adenviralen Transfervektor pAdTrack-CMV

Zur Ligation der S100A1 cDNA mit dem pAdTrack-CMV wurde ein Protokoll von Sambrook verwendet (Sambrook, 1989). Ligasen sind Enzyme, die DNA Stücke unspezifisch zusammensetzen. Die Effektivität einer Ligation hängt ab von der DNA Konzentration im Reaktionsgemisch, der Länge der zu ligierenden DNA Stücke, der Kompatibilität der Basenpaare und dem mengenmäßigen Verhältnis der DNA Stücke zueinander. Zur Erfassung der DNA Konzentrationen wurden je 1 µl der BamH I/Hind III bzw. Bgl II/Hind III geschnittenen und aufgereinigten S100A1 cDNA bzw. pAdTrack-CMV DNA auf einem Agarosegel aufgetragen und die DNA Mengen mit Hilfe eines DNA Standards semiquantitativ bestimmt. Für die Ligation wurden 100 ng des pAdTrack-CMV Vektors und 300 ng der S100A1 cDNA verwendet. In einem Volumen von 10 µl wurden je 1 µl der geschnittenen S100A1 DNA (50 ng/µl) und der pAdTrack-CMV DNA (250 ng/µl) mit 1 µl Ligationspuffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 dithiothreitol, 1mM ATP, 25 µg/ml BSA) und 0,5 µl (200 U) Ligase über Nacht bei RT inkubiert (Abb.II.9).

Abb.II.9

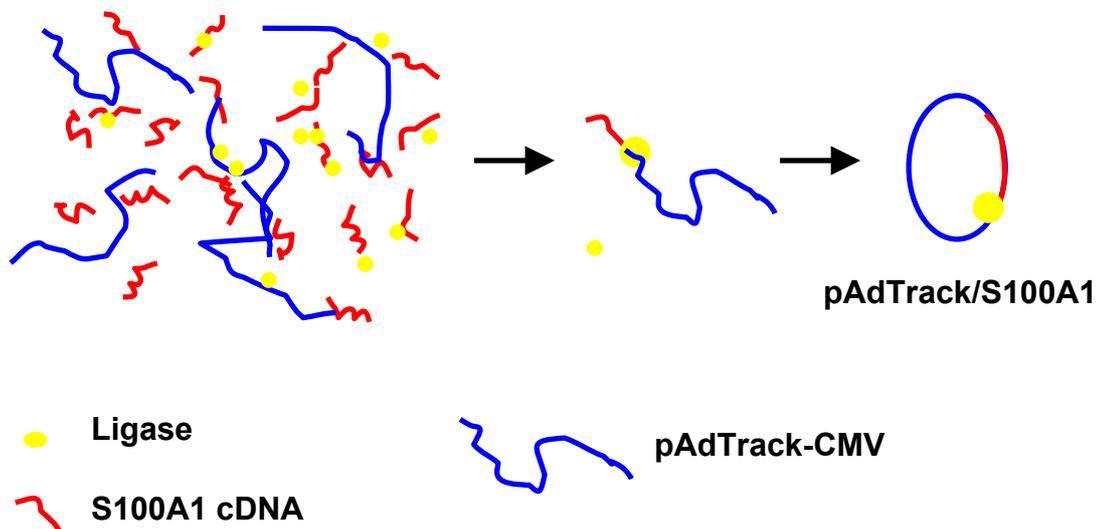


Abb.II.9 Schematische Darstellung des Ligationsreaktionsgemisches. Auf der linken Seite der Grafik liegen die S100A1 cDNA und die pAdTrack-CMV DNA ungeordnet nebeneinander. Durch die Ligasereaktion bilden sich zufällig größere DNA Stücke. Exemplarisch herausgehoben auf der rechten Seite der Grafik ist das gewünschte Ligationsergebnis, die in den Vektor pAdTrack-CMV eingefügte S100A1 cDNA.

### II.1.4 Transformation des Ligationsproduktes (pAdTrack/S100A1) in E.Coli DH<sub>5α</sub>

Bei 121°C wurde 1 Liter Agarmedium für 15 min autoklaviert. Nach Abkühlung des Mediums auf 60°C erfolgte der Antibiotikazusatz (50 µg/ml Kanamycin). Jeweils 20 ml dieses Mediums wurden in einer 100 mm Petrischale unter sterilen Bedingungen zum Aushärten gegeben.

Kompetente E. Coli DH<sub>5α</sub> wurden auf Eis aufgetaut. In einem 17,0/100mm Röhrchen wurden zu 100 µl kompetenter E.Coli DH<sub>5α</sub> ≈ 125ng DNA (5 µl des Ligationsansatzes) gegeben und auf Eis für 15 min inkubiert. Dieser Schritt diente der Anlagerung der in die Bakterien einzubringenden DNA an die Bakterienwand. Unter Inkubation des Reaktionansatzes für 90 sec bei 42°C wurde die DNA in E. Coli eingebracht. Im Anschluß daran wurde der Transformationsansatz für 2 min auf Eis gekühlt und 0,5 ml LB Medium wurden zu dem Transformationsansatz pipettiert. Danach erfolgte eine Inkubation des Transformationsansatzes für 45 min bei 37°C und 600 rpm. 100 µl dieser Kultur wurden auf einer Agarplatte mit Antibiotikaresistenz (50 µg/ml Kanamycin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Durch den letzten Schritt wurden die Bakterien, die über eine Kanamycinresistenz verfügten, von den Bakterien selektioniert, die durch das Antibiotikum aufgrund einer fehlenden Resistenz abstarben.

### II.1.5 Kontrolle der Ligation

E.Coli DH<sub>5α</sub> wurden nach der Transformation des Ligationsproduktes auf Agarplatten mit 50 µg/ml Kanamycin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Auf den Agarplatten konnten sich aufgrund der Selektionsbedingungen lediglich Bakterien mit einer Kanamycinresistenz vermehren. Diese konnte entweder durch den unvollständig verdauten und religierten pAdTrack-CMV (Abb.II.10) oder durch das Ligationsprodukt aus pAdTrack-CMV und S100A1 cDNA (pAdTrack/S100A1) (Abb.II.11) vermittelt werden. Die Kontrolle des Ligationsproduktes pAdTrack/S100A1 erfolgte durch einen enzymatischen NDE I Verdau und gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA Fragmente.

Abb.II.10

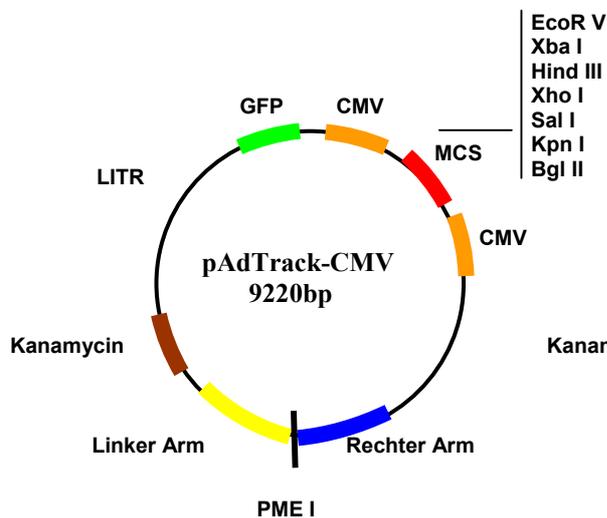


Abb.II.11

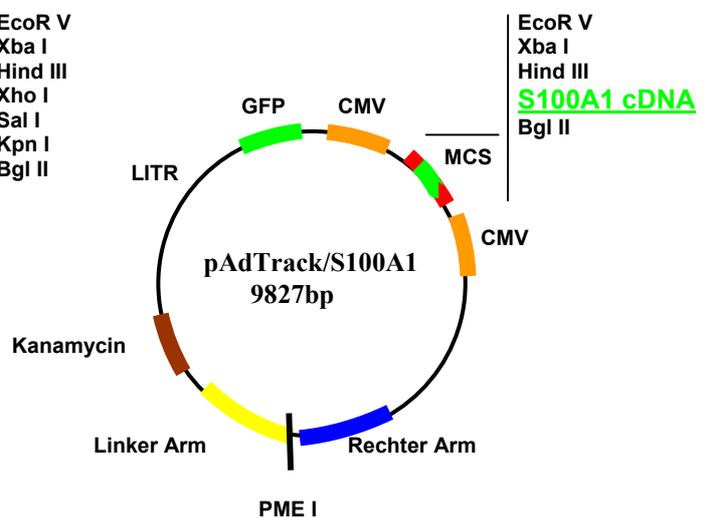


Abb.II.10 und Abb.II.11 veranschaulichen die Plasmide pAdTrack-CMV und pAdTrack/S100A1, die beide eine Kanamycinresistenz vermitteln. Bakterien, die eines dieser beiden Plasmide enthalten, werden auf den Kanamycinagarplatten selektioniert. Die aus den selektionierten Bakterien isolierten Plasmide mussten deshalb dahingehend überprüft werden, ob es sich um den religierten Shuttlevektor (pAdTrack-CMV) oder um das gewünschte Ligationsprodukt (pAdTrack/S100A1) handelt.

Die auf der Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonien wurden gepickt, zu je 1,5 ml LB Medium Flüssigkulturmedium gegeben und über Nacht bei 37°C zur Vermehrung der Ligationsprodukte inkubiert. Die gesättigten 1,5 ml Bakterienübernachtulturen wurde bei 13000 rpm pelletiert. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Standardprotokoll der Firma Quiagen nach der Methodik von Birnboim (Birnboim, 1983). Der Überstand der Bakterienkultur wurde dazu abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 250 µl Puffer P1 versetzt und resuspendiert. Die Bakteriolyse wurde

## II. Methoden und Material

---

durch Zugabe von 250 µl Puffer P2 und 4-5 mal vorsichtiges Schütteln erreicht. Die Lysereaktion durfte nicht länger als 5 min andauern, weil ansonsten die genomische DNA mobilisiert wurde. Die Zugabe von 350 µl Puffer N3 und sofortiges leichtes Schütteln stoppte die Lysereaktion. Die Lösung wurde milchig und viskös. Die lysierten Bakterienwandbestandteile wurden für 10 min bei 13000 rpm pelletiert. Die im Überstand befindlichen Plasmide wurden vorsichtig abgenommen und in eine vorbereitete Qiagen Spin Column pipettiert. Die Spin Columns wurden bei 13000 rpm für 30-60 sec zentrifugiert und der Inhalt der Collection Tubes wurde verworfen. Die Plasmid DNA auf den Spin Columns wurde durch Zugabe von 0,75 ml PE Puffer und anschließendes Zentrifugieren für 30-60 sec gewaschen. Die Plasmid DNA wurde schließlich mit 30 µl eines 90°C warmen Tris Puffers (10 mM, pH 8.5) eluiert.

### II.1.6 Rekombination von pAdTrack/S100A1 und pEASY-1

Die Zusammensetzung der vollständigen rekombinanten adenoviralen DNA aus dem Plasmid pEASY-1 und dem pAdTrack/S100A1 erfolgte durch Rekombination in E.Coli BJ5183 unter Ausnutzung der homologen adenoviralen Sequenzen 1-480 (linker Arm) und 3534-5790 (rechter Arm) (He et al., 1998). Der pAdTrack/S100A1 wurde wie unter II.1.1 beschrieben mit PME I geschnitten (Abb.II.12) und mit dem pEASY-1 rekombiniert (Abb.II.13). Hierzu wurden 2 µg (1 µl) der pEASY-Plasmid-DNA und 200ng, der linearisierten und wie unter II.1.2 beschrieben aufgereinigten pAdTrack/S100A1 DNA, in E. Coli BJ 5183 durch Elektroporation eingebracht. Die Transformation erfolgte mit 50 µl elektrokompetenter BJ 5183 in 2,0 mm Küvetten bei 2500 V, 25 µF und 200 Ω. Nach der Elektroporation wurden die transformierten Bakterien mit 500 µl LB Medium für 30 min bei 37°C und 600 rpm inkubiert. 100 µl dieser Kultur wurden auf eine Agarplatte mit Kanamycinresistenz (50 µg/ml) aufgetragen und für 36 h bei 37°C inkubiert.

Abb.II.12

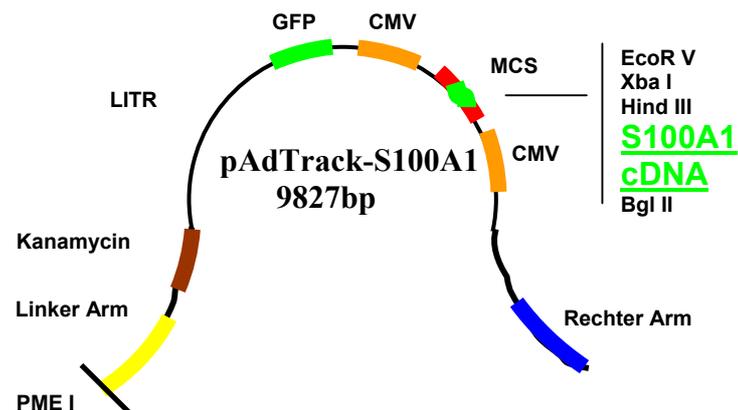


Abb.II.13

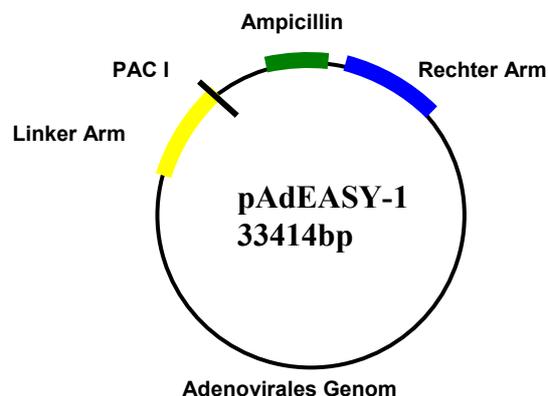


Abb.II.12 und Abb.II.13 beschreiben die Rekombination des die S100A1 cDNA enthaltenden Shuttlevektors pAdTrack/S100A1 mit dem pEASY-1 zur Vervollständigung des adenoviralen Genoms. Der pAdTrack/S100A1 wurde hierzu mit dem Restriktionsenzym PME I *blunt* linearisiert und mit dem pEASY-1 in E.Coli BJ 5183 kotransfiziert. Die Rekombination erfolgte über die homologen Sequenzen des rechten (blau) und des linken (gelb) Armes.

### II.1.7 Kontrolle des Rekombinationsproduktes

Das Plasmid pEASY-1 vermittelt eine Ampicillinresistenz und wächst nicht auf den Kanamycinplatten. Der pAdTrack/S100A1 sowie das Rekombinationprodukt aus pEASY-1 und pAdTrack/S100A1, der pAd/S100A1, vermitteln jeweils eine Kanamycinresistenz und wuchsen auf den Kanamycinplatten. Aufgrund der längeren Basensequenz des pAd/S100A1 ( $\cong$  41 kb) im Vergleich zum pAdTrack/S100A1 ( $\cong$  9,8 kb) wuchsen die Bakterien, die mit dem pAd/S100A1 transformiert waren langsamer. Aus diesem Grund wurden die kleineren, der auf den Kanamycinplatten gewachsenen, Kolonien gepickt und in je 5 ml LB-Medium Kulturen mit Kanamycin (50 $\mu$ g/ml) hochgezogen. Die Plasmide wurden wie unter II.1.5 beschrieben isoliert. Das Rekombinationsprodukt wurde durch einen enzymatischen NDE I Verdau und gelelektrophoretischer Auftrennung der DNA Fragmente kontrolliert.

### II.1.8 Verdau der S100A1 rekombinanten adenoviralen DNA

Der pAd/S100A1 wurde wie unter II.1.4 und II.1.5 beschrieben in E.Coli DH<sub>5 $\alpha$</sub>  transformiert und vermehrt. 50  $\mu$ g der pAd/S100A1 DNA wurden mit PAC I wie unter II.1.1 beschrieben geschnitten. Durch das Schneiden des aufgereinigten pAd/S100A1 mit PAC I wurde die S100A1 rekombinante lineare adenovirale DNA hergestellt (Abb.II.14).

Abb.II.14

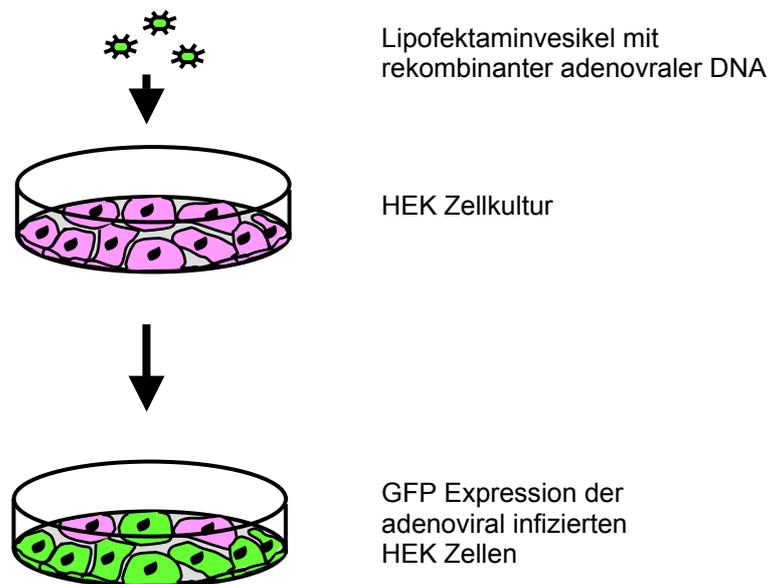


Abb.II.14 zeigt schematisch das Genom des S100A1 rekombinanten Adenovirus (AdvS100A1). Die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) und des S100A1 Proteins unterliegt der Steuerung durch je einen Cytomegalieviruspromotor (CMV). Die adenoviralen *Early 1 (E1)* und *Early 3 (E3)* Sequenzen sind deletiert.

### II.1.9 Einbringen der S100A1 rekombinanten adenoviralen DNA in HEK 293 Zellen

Zur Herstellung funktionsfähiger Adenoviren wurde die linearisierte rekombinante adenovirale DNA in HEK 293 Zellen eingebracht. Durch diesen Versuchsschritt kam es zur Translation adenoviraler DNA und somit zur Produktion adenoviraler Proteine. HEK 293 Zellen supplimentierten die deletären *E1* und *E3* Gene des Adenovirus, so daß komplette und infektiöse Viruspartikel entstehen konnten (He et al., 1998). Zur Verpackung der linearisierten rekombinanten adenoviralen DNA in Fettmizellen wurden 50 µg des mit PAC I geschnittenen pAd/S100A1 mit 50 µl Lipofektamin gemischt. Die mit Lipofektamin verpackte DNA wurde in 1 ml DMEM-Medium (serumfrei) aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Eine zu 80% mit HEK 293 Zellen konfluente 145 mm Zellkulturschale wurde 2 x mit 10 ml DMEM-Medium (serumfrei) gewaschen. Danach wurden die DNA verpackenden Lipofektaminvesikel in 9 ml DMEN Medium (serumfrei) zu der HEK 293 Zellkultur gegeben. Durch das Verschmelzen der Lipofektaminmizellen mit der Membran der HEK-Zellen wurden die HEK 293 Zellen mit der rekombinanten adenoviralen DNA transfiziert (Abb.II.15).

Abb.II.15



Die transfizierte HEK 293 Zellkultur wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zugabe von 15 ml DMEM-Medium, versetzt mit 10% FCS und 1% P/S (sDMEM), erfolgte 8 h nach der Infektion. Die Virusvermehrung in den HEK-Zellen wurde mit Hilfe der GFP-Expression kontrolliert (Abb.II.15).

## II.2 Konstruktion eines Kontrollvirus (AdvGFP)

Zur Kontrolle der adenviralen S100A1 Überexpression und zur Abgrenzung von Effekten, die durch das adenvirale Konstrukt selbst verursacht werden, wurde ein Kontrollvirus (AdvGFP) generiert. Der AdvGFP war mit dem S100A1 überexprimierenden Virus (AdvS100A1), bis auf das Fehlen der S100A1 cDNA, identisch (Abb.II.16). Zur Konstruktion des AdvGFP wurde wie unter II.1 vorgegangen. Der pEASY-1 wurde mit dem linearisierten pAdTrack-CMV rekombiniert. Das Rekombinationsprodukt wurde in E.Coli DH<sub>5α</sub> vermehrt, linearisiert, aufgereinigt und in HEK 293 Zellen eingebracht (He et al., 1998).

Abb.II.16



Abb.II.16 zeigt schematisch das Genom des adenviralen GFP Kontrollvirus (AdvGFP). Die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) unterliegt der Steuerung durch einen Cytomegalieviruspromotor (CMV). Die adenviralen *Early 1* (E1) und *Early 3* (E3) Sequenzen sind deletiert. Der AdvGFP unterscheidet sich lediglich in der fehlenden Sequenz der S100A1 cDNA von dem AdvS100A1.

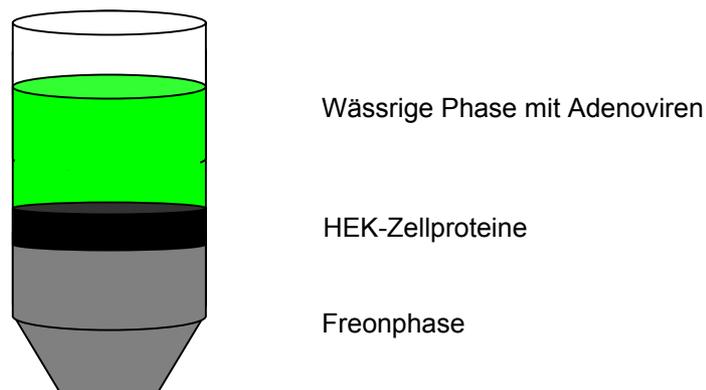
## II.3 Vermehrung und Anreicherung der rekombinanten Adenoviren

### II.3.1 Virusvermehrung in HEK 293 Zellen

Die Virusvermehrung erfolgte gemäß Akhter et al. (Akhter et al., 1997). 8 ½ Tage nach der Transfektion der HEK 293 Zellen mit der in Lipofektamin verpackten adenviralen DNA wurden die HEK 293 Zellen in sDMEM Medium von der Zellkulturschale abgenommen und in ein 50 ml Falcon Tube überführt. Die Lyse der HEK Zellen erfolgte durch dreimaliges Schockgefrieren in Flüssigstickstoff und Wiederauftauen bei 37°C im Inkubator. Das Lysat wurde bei 3400 rpm zentrifugiert und die im Überstand befindlichen rekombinanten Viren für die Infektion von HEK Zellen aufbewahrt. Hierzu wurden die HEK Zellen in 15 ml sDMEM auf Kulturschalen (145 mm Durchmesser) im Inkubator inkubiert (37°C, pH<sub>2</sub>O 47 mmHG, 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) und bei Erreichen einer Konfluenz von 80% mit 0,5 ml des virushaltigen Mediums infiziert. 36 bis 48 h nach der Infektion wurde der Infektionsgrad der HEK Zellen fluoreszenzmikroskopisch und morphologisch bestimmt. Die Zellen

waren bei ihrer Ernte zu  $\approx 100\%$  infiziert. Nach dem Ablösen der infizierten HEK Zellen mit einem Zellschaber und Überführung in Falcon Tubes wurden diese bei 3400 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das HEK-Zellpellet wurde 2 x mit PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  10mM,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10 mM, NaCl 120mM, pH 7.4) gewaschen und danach in 3 ml PBS aufgenommen. Die Lyse der HEK Zellen und somit die Freisetzung der Viren aus den HEK Zellen erfolgte durch dreimaliges Schockgefrieren in Flüssigstickstoff und Wiedererwärmen bei  $37^\circ\text{C}$ . Die freigesetzten Adenoviren und die lysierten HEK Zellen wurden zur Eliminierung der HEK-Zell DNA mit 2 U/ml Rq1 RNA`se freier DNA`se für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  im Wasserbad inkubiert. Die HEK Zell Proteine wurden durch Extraktion mit einem gleichen Volumen an Freon (Merck) ausgefällt. Durch eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 min sammelten sich die HEK-Zellproteine an der Wasser/Freon Grenzschicht (Abb.II.17). Die wässrige obere Schicht, in der die Viren enthalten waren, wurde abgenommen und in ein 50 ml Falcon Tube überführt.

**Abb.II.17**

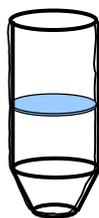


### II.3.2 Virusanreicherung mittels Cäsiumchloriddichtegradienten

Die Virusanreicherung erfolgte nach Tollefsen et al (Tollefsen, 1999). Der von HEK-Zell-DNA und Proteinen gereinigte Virusüberstand wurde über einen Cäsiumchloridgradienten aufgereinigt. Hierzu wurden 2 Cäsiumchloridlösungen mit unterschiedlicher Dichte (1,3 g/ml und 1,4 g/ml) hergestellt. In ein 13 ml fassendes Polyallomertube wurden 4 ml des leichteren CsCl Stockes (1,3 g/ml) eingeführt, die mit 4 ml des schwereren CsCl Stockes (1,4 g/ml) unterschichtet wurden. 4 ml des wässrigen virushaltigen Überstandes wurden auf den so vorbereiteten Cäsiumchloridgradienten gegeben. Der Cäsiumchloridgradient wurde für 3 h bei  $200000g$  bei  $4^\circ\text{C}$  in einer Ultrazentrifuge zentrifugiert. Nach

dem Zentrifugationschritt befand sich das Virus, aufgrund der Dichte des Adenovirus von 1,33 g/ml, an der Grenze beider CsCl Phasen (Abb.II.18). Die bläulich schimmernde Virusbande wurde mit einer Kanüle abpunktiert. Eine darüber lokalisierte dünnere Bande enthielt lediglich Viruskapsid. Zur Elimination restlicher Zellbestandteile erfolgte ein zweiter Ultrazentrifugationsschritt über einen Cäsiumchloridgradienten mit einer Zentrifugationsdauer von 12h. Nach dieser zweiten Zentrifugation wurde das Virus 2 x für 4 h in 10000 MWCO Dialysekassetten gegen PBS dialysiert. Ein dritter Dialyseschritt gegen PBS wurde über Nacht durchgeführt.

**Abb.II.19**



**CsCl (Dichte 1,3 g/ml)**

**Virusbande (Dichte 1,33 g/ml)**

**CsCl (Dichte 1,4 g/ml)**

### II.3.3 Testung der viralen Infektiosität durch einen Plaque Assay

Die Infektiosität der Viren wurde mit einem Plaque Assay nach Cauthen (Cauthen R, 1999) bestimmt. Hierfür wurden für beide Viruspräparationen (AdvS100A1 und AdvGFP) je 13 Kulturschalen (60 mm Durchmesser) mit HEK 293 Zellen beschichtet und bis zu einer Konfluenz von 80% kultiviert. Ein Virusaliquot wurde auf Eis aufgetaut und eine zehnstufige Verdünnungsreihe in DMEM ( $10^2$ - $10^{12}$  v/v) hergestellt. Das Kulturmedium wurde von den Platten entfernt und jeweils 2 Platten wurden mit der gleichen Verdünnungsstufe (100  $\mu$ l) des Virus inkubiert. Die dreizehnte Platte wurde als Negativkontrolle nur mit 100  $\mu$ l DMEM überschichtet. Nach einer Stunde Inkubation bei 37°C wurden die Platten mit je 5 ml einer handwarmen, sterilen 1,2% Agarose/DMEM Lösung überschichtet. Die Agarose wurde hierfür in  $H_2O_{dd}$  gelöst, autoklaviert und zu gleichen Teilen mit DMEM gemischt. Danach wurden die Platten erneut im Inkubator inkubiert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen erneut mit einer frischen Schicht der Agarose/DMEM Lösung überzogen. 5-9 Tagen später konnten die ersten Plaques durch die adenoviral vermittelte Lyse der HEK 293 Zellen unter Durchlicht im Mikroskop beobachtet werden. Die Kultur der Zellen wurde von nun an nach dem oben geschilderten

## II. Methoden und Material

---

Schema mit Phenol Rot (1 mg/l) eingefärbter Agarose/DMEM Lösung solange fortgesetzt, bis keine neuen Plaques mehr sichtbar wurden (ca. Tag 12). Vor einem dunklen Hintergrund wurden die Plaques, nun erkennbar als rote Punkte, mit einem Stift auf der Unterseite der Kulturschale markiert, unter dem Mikroskop verifiziert und ausgezählt. Die Plaqueanzahl zweier Platten einer Verdünnungsstufe wurden addiert, das arithmetische Mittel gebildet und mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert. Das Ergebnis ergab die Anzahl der sog. „Plaque forming units“ pro ml (PFU/ml), die die Aktivität des Virus bzw. die Anzahl der infektiösen Viruspartikel angibt.

### II.4 Überprüfung des adenoviralen Konstruktes an isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten

#### II.4.1 Isolation adulter Kardiomyozyten und S100A1 Gentransfer

Bei der Isolation adulter Kardiomyozyten der Ratte wurde nach dem Protokoll von Piper et al. (Piper et al., 1990) mit einigen Modifikationen vorgegangen. Für die Isolation der Rattenherzen wurden 3 Monate alte 300 - 400 g schwere, männliche Sprague Dawley Ratten mit 5 mg/kg KG Xylazine und 100 mg/kg KG Ketamin intraperitoneal anästhesiert. Die Bauchhöhle wurde eröffnet und 2.500 U Heparin wurden in die V. Cava inferior injiziert. Nach der Präparation des Zwerchfelles und der Eröffnung des Thorax wurde das schlagende Herz herausgenommen und sofort zum Ausschlagen in eiskaltes, kalziumfreies Medium (AC Medium: KCL 5,4 mM, MgSO<sub>4</sub>, 3,5 mM, NaPyruvat 0,05 mM, NaHCO<sub>3</sub> 20,0 mM, Glukose 11 mM, HEPES 20 mM, NaGlutamat 23,5 mM, NaAzetat 4,87 mM, EDTA 10 mM, Phenol Rot 0,5 mM Butanedionemonoxime 15 mM, Kreatinin 20 mM, Kreatinphosphat 15 mM, Taurin 15 mM, Insulin 27 IU/ml, pH 7,2) überführt. Mit der Perfusionskanüle des Langendorffapparates wurde die Aorta oberhalb der Aortenklappe kanüliert und in dieser Stellung fixiert. Das Lungengewebe wurde vom Herz gelöst, damit dieses in den Koronarien keine Embolien verursachen konnte. Das Rattenherz wurde für 5 Minuten mit AC Medium (Flußrate von 10 ml/min, 37°C, 95% CO<sub>2</sub> / 5% O<sub>2</sub>) in einem offenen Kreislauf perfundiert. Die korrekte Lage der Perfusionskanüle wurde am Ablassen der Koronarien kontrolliert. Nach Auswaschen des Kalziums sistierte die Herzfunktion nach wenigen Sekunden. Das Enzym Kollagenase Typ I (100 U/ml) wurde in das Perfusionsmedium (AC Medium) gegeben und ein geschlossener Perfusionskreislauf hergestellt. Das Herz wurde für 28 min mit der Kollagenaselösung intrakoronar perfundiert. Danach wurde das Herz vom Langendorffsystem entfernt und der linke Ventrikel in AC Medium auf eine Zellkulturschale (145 mm Durchmesser) gelegt. Der linke Ventrikel wurde vorsichtig kleingeschnitten, zerfiel aber größtenteils von allein. Die Kardiomyozyten wurden, durch das Filtern der Zellen mit Hilfe eines autoklavierten Nylonnetzes mit einer Porengröße von 250 µm, von unverdauten Ventrikelstücken isoliert. Vitale Kardiomyozyten wurden durch die Kombination aus Kalziumtoleration und dichteabhängiger Sedimentation von lysierten Zellen und Nichtkardiomyozyten getrennt. Hierfür wurde die Kalziumkonzentration in dem AC Medium schrittweise (0,025 mM, 0,05 mM, 0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 1,0 mM und 1,8 mM) angehoben. Nach jeder Erhöhung der extrazellulären Kalziumkonzentration wurden die Kardiomyozyten in einem Falcon Tube für 5 min im Zellkulturschrank inkubiert (37°C, pH<sub>2</sub>O 47mmHg, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>). Vitale, kalziumtolerante Herzmuskelzellen formten danach, aufgrund ihrer höheren Dichte, ein sichtbares, weiches Zellpellet. Nichtkardiomyozyten und lysierte Zellen verblieben nach

diesem Zeitraum noch im Überstand. Der Überstand wurde jeweils verworfen, die vitalen Kardiomyozyten im AC Medium mit der nächsthöheren Kalziumkonzentration resuspendiert. Das Pellet des letzten Schrittes wurde in 40 ml Medium 199 (Sigma) mit Zusätzen von 5% FCS, 15 mM HEPES und 1% P/S aufgenommen. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Die isolierten, ventrikulären Kardiomyozyten wurden auf Zellkulturschalen (145 mm Gewebekulturschalen) kultiviert (37°C, p<sub>H<sub>2</sub>O</sub> 47mmHg, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>).

Vier Stunden nach Isolation der Kardiomyozyten erfolgte die Infektion mit dem AdvS100A1 oder dem AdvGFP. Die Kardiomyozyten (5x10<sup>4</sup> Zellen pro Schale) wurden, um eine 100%ige Infektionsrate zu erzielen, mit einer zwanzigfach höheren Anzahl infektionsfähiger viraler Partikel (1x10<sup>6</sup> ≈ 0,01 µl Virus/Schale; PFU/ml = 10<sup>11</sup>) inkubiert. Hierzu wurden die Viren unter 5 minütigen Schütteln (60/min) direkt in das Zellkulturmedium (2 ml) gegeben. 24 Stunden nach adenoviraler Infektion (Inkubation bei 37°C, p<sub>H<sub>2</sub>O</sub> 47mmHg, 95%O<sub>2</sub>, 5%CO<sub>2</sub>) erfolgte die Kontrolle der Vitalität der Kardiomyozyten anhand der Zellmorphologie sowie die Infektionskontrolle mit Hilfe des Transfektionsmarkers GFP.

### II.4.2 Kontraktilitätsmessung isolierter Kardiomyozyten

Die transfizierten, adulten Kardiomyozyten wurden 24 Stunden nach der Virusinfektion in einer mit Carbogen äquilibrierten (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) Kammer in Medium 199 (1,8 mM Ca<sup>2+</sup>) bei Raumtemperatur gemessen. Der jeweils zu messende Myozyt wurde mit einem invertierten Nikon Mikroskop (ECLIPSE TE 300) bei 40-facher Vergrößerung visualisiert und mit einer digitalen Videokamera (CD800, Philips) im Phasenkontrast auf einem Videomonitor sichtbar gemacht. Die kontrastierten longitudinalen Enden des Kardiomyozyten wurden im digitalisierten Bild mit Hilfe des videogestützten Kontrasterfassungssystems (VED; Crescent Electronics, Utah, USA) erfaßt, wodurch die systolisch-diastolischen Bewegungen des Kardiomyozyten ausgemessen werden konnten. Die Myozytenlängen wurden unter Benutzung eines MacLab Systems (ADInstruments) ausgewertet und auf einem Computer gespeichert. Über zwei Platinelektroden, die in das Medium der Meßkammer eintauchten und die mit einem Stimulator verbunden waren, wurde eine Feldstimulation erzeugt. Die Kardiomyozyten wurden mit einer Pulsdauer von 5 ms und einer Frequenz von 1 Hz (5 Volt) stimuliert. Aufnahmen der Kardiomyozyten wurden unter Basalbedingungen sowie 2 min. nach Zusatz von 10<sup>-6</sup> mM Isoproterenol in das Zellkulturmedium gemacht. Nur parallel zu den Feldlinien angeordnete Kardiomyozyten wurden analysiert (Hedgepath et al. 1997). Der Durchschnittswert von 8 Einzelmessungen einer Kardiomyozyte wurde verwendet. Als Messparameter wurden die prozentuale

## II. Methoden und Material

---

Zellverkürzung (%CS, berechnet aus der prozentualen Veränderung der Kardiomyozytenlängen  $L_{MAX}$  und  $L_{MIN}$ ), die Verkürzungsgeschwindigkeit ( $-dL/dt$ ) und die Relaxationsgeschwindigkeit ( $+dL/dt$ ) sowie die systolische ( $L_{MIN}$ ) und die diastolische Zelllänge ( $L_{MAX}$ ) der Kardiomyozyten erhoben. In 4 Versuchen wurden Kardiomyozyten aus den Herzen je einer adulten Ratte isoliert. Die kontraktile Parameter wurden für jede Meßbedingung und jede Versuchsgruppe an 64 Kardiomyozyten erhoben.

### II.5 Adenoviraler Gentransfer in engineered heart tissue (EHT)

#### II.5.1 Isolation neonataler Kardiomyozyten

Bei der Isolation neonataler Kardiomyozyten für die Herstellung der EHT's wurde nach dem Protokoll von Webster et al. (Webster und Patrick, 2000) vorgegangen. Die Herzen von  $\approx 40$  zwei bis drei Tage alten neonatalen Ratten wurden in PBS + 1% P/S gewaschen, die Atrien abgetrennt und die Ventrikel mit einer Schere in 1,8 ml Medium A (NaCl 136,9 mM, KCl 5,36mM,  $\text{MgSO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$  0,81mM, Dextrose 5,55mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,44mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4(\text{H}_2\text{O})_7$  0,34mM, HEPES pH 7,4) zerkleinert. Zur Elimination von Zellschrott wurden die Ventrikelstücke in 10 ml Trypsinlösung (TL) (Medium A mit Zusatz von Trypsin (3 mg/ml), 1% P/S und 100 U/ml DNA`se Typ V (Sigma; D-8764)) gewaschen. Nach dem Absetzen der Ventrikelstücke bei Raumtemperatur (RT) wurde der Überstand verworfen. Der Verdau des neonatalen Rattenmyokards erfolgte durch Inkubation mit 10 ml der TL bei RT für 12 min auf einem Schüttler (60/min). Durch die Zugabe von 9 ml Antitrypsinlösung (AL) (Medium A mit dem Zusatz von 100 U DNA`se Typ V (Sigma), 2,5% FCS nicht inaktiviert (v/v), 1% P/S) wurde der Verdau gestoppt. Durch zweiminütiges vorsichtiges vortexen wurden die neonatalen Kardiomyozyten aus dem Gewebeverband gelöst. Nach kurzer Sedimentation der Ventrikelstücke wurde der Überstand mit den isolierten Kardiomyozyten abgenommen und auf Eis in einem Falcontube aufbewahrt. Das verbliebene Ventrikelmyokard wurde durch intermittierende Zugabe von 10 ml (TL) für 5 min und nachfolgende Inhibition des Verdaues mit 9 ml (AL) weiter verdaut. Die Trypsin und Antitrypsinvolumina wurden mit Fortschreiten des Verdaues an die sich reduzierende Ventrikelmasse angepasst. Nach 4 Zyklen mit 10 ml TL wurden die TL und die AL Volumina je um 0,5 ml reduziert. Der Verdau des neonatalen Myokards wurde in diesem Zyklus bis zum Vorhandensein eines fibrotischen Restgewebes fortgesetzt. Die gepoolten Überstände mit neonatalen Kardiomyozyten wurden für 15 min bei 610 rpm zentrifugiert und die Zellen in 20 ml sDMEM aufgenommen. Zur Elimination der DNA aus dem Ventrikelmyokard wurden 100 U/ml DNA`se Typ V zu den isolierten Zellen gegeben und die Kardiomyozyten erneut bei 610 rpm zentrifugiert. Nach erneuter vorsichtiger Aufnahme der neonatalen Kardiomyozyten in 20 ml sDMEM erfolgte die Trennung der Zellen von groben Gewebestücken durch Filtern mit einem autoklavierten Netz. Eine Reduktion des Fibroblastenanteils an den isolierten Zellen wurde durch 2 stündiges Ausplattieren der Zellen erreicht (Inkubation bei 37°C,  $\text{pH}_2\text{O}$  47 mmHG, 95%  $\text{O}_2$ , 5%  $\text{CO}_2$ ). Die nicht seßhaft gewordenen Zellen wurden danach abgenommen und zur Konstruktion der EHT's verwendet.

### II.5.2 Konstruktion der EHT`s und S100A1 Gentransfer

Die Konstitution der EHT`s sowie das Aushärten extrazellulären Matrix erfolgte in Silikonschalen.

Abb.II.20

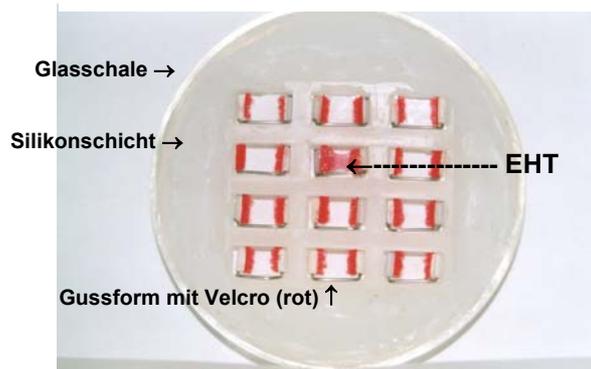


Abb.II.20 zeigt eine Gusschale zur Herstellung der EHT`s. In den Gussformen liegen Gelträger mit Velcros (rot). In der Gusschale in der Mitte der zweiten Reihe von oben ist ein engineered heart tissue (EHT) zu erkennen.

Aus Nirosa Stahl wurden Gelträger (13 × 6 × 8 mm; Länge × Breite × Höhe) geformt, die in die ausgeschnittenen Gußformen der Silikonmatrix passten. Auf die Gelträger wurden Plastikröhrchen (6 x 2 mm) aufgesteckt, die mit einer dünnen Silikonschicht an Velcros (Klettverschluss) befestigt waren. Die EHT-Matrix wurde in die Silikonschalen gegossen und härtete zwischen den Velcros aus. (Abb.II.20). Hierzu wurden isolierten neonatalen Kardiomyozyten gezählt und in sDMEM auf eine Konzentration von  $20 \times 10^6$  Zellen/ml gebracht. Zum Erhalt von vier EHT`s wurden  $8 \times 10^6$  Zellen (0.4 ml) in 2,4 ml eiskalter Matrixlösung aufgenommen. Die Matrixlösung setzte sich aus 0.88 ml  $2 \times$ sDMEM, 0,8 ml Kollagen Typ I (3,7 mg/ml), isoliert aus Rattenschwänzen (upstate biotechnologies), 0,28 ml extrazellulärer Matrix gewonnen aus Engelbreth-Holm-Swarm Tumoren (TEBU) und 0,44 ml NaOH 1M. 0,7 ml dieser Suspension aus neonatalen Kardiomyozyten und Matrixlösung wurden zur Generierung je eines EHT`s (Abb.II.21) in eine standardisierte rechteckige Silikongußform mit je einem Gelträger und Velcros gegeben (Eschenhagen et al., 1997). Das Aushärten der EHT`s erfolgte im Inkubator bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>. Nach 30 Minuten wurden 20 ml PKM Medium (10% Pferdeserum (GIBCO), 2% Hühner Embryo Extrakt (GIBCO), 100U/mL Penicillin und 100 µg/mL Streptomycin) auf die Silikongußschale mit den jeweils 8 EHT`s gegeben. Nach 12 Stunden wurden die EHT`s aus der Gusschale auf eine Zellkulturschale überführt (Durchmesser 145mm). Der Mediumwechsel erfolgte täglich.

Abb.II.21

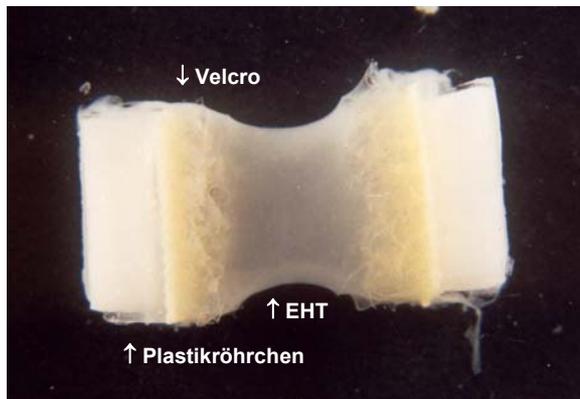


Abb.II.21 stellt ein repräsentatives EHT 14 Tage nach der Konstitution dar. Die Plastikröhrchen sind mit Silikon am Velcro (weiß) befestigt. Das EHT wächst am Velcro fest. Aufgrund der spontanen Kontraktionsaktivität bildet sich eine bikonkave Form des EHT's heraus. Die weißliche Farbe des EHT's an den Seitenrändern ist durch die erhöhte Zelldichte in diesem Bereich bedingt.

7 Tage nach Konstitution der Herzmuskelgewebe erfolgte mit Hilfe des adenoviralen Konstruktes AdvS100A1 der Gentransfer der humanen S100A1 cDNA in die Kardiomyozyten. Das PKM Medium wurde hierzu abgenommen und die EHT's jeweils mit den Adenoviren (10 plaque forming units; PFU; AdvS100A1 oder AdvGFP) in 500  $\mu$ l serumfreien DME-Medium inkubiert (37°C, 5%CO<sub>2</sub>/95%O<sub>2</sub>). Nach 30 Minuten wurden jeweils 20 ml PKM Medium zu je einer 145 mm Schale mit 12 EHT's zugefügt. Die Infektion der Zellen der EHT's mit den Adenoviren wurde fluoreszenzoptisch mit Hilfe des Transfektionsmarkers GFP überprüft.

### II.5.2 Messung der isometrischen Kraft der EHT's

14 Tage nach der Rekonstitution neonataler Rattenkardiomyozyten in der extrazellulären Matrix wurden der Stahlträger aus den Plastikröhrchen entfernt und die transfizierten EHT's zwischen einen festen Pol und einen Kraftaufnehmer, in einem kontinuierlich begasteten Organbad (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% O<sub>2</sub>) in Tyrodelösung (NaCl 119,8, KCl 5,4, CaCl<sub>2</sub> 0,4-2,4, MgCl<sub>2</sub> 1,05, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,42, NaHCO<sub>3</sub> 22,6, Na<sub>2</sub>EDTA 0,05, Ascorbinsäure 0,28, Glukose 5,0 mmol/l), vertikal aufgehängt (Abb.II.22).

Abb.II.22

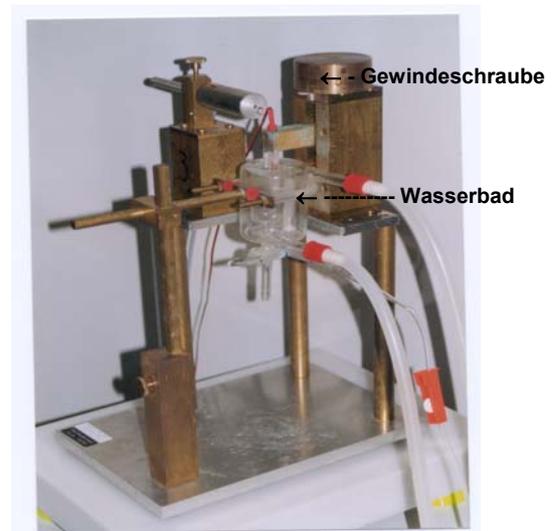
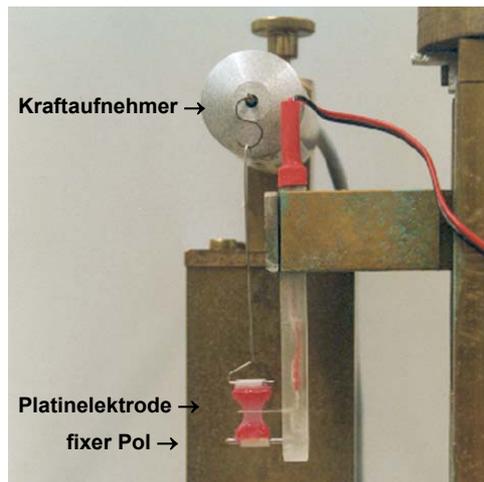


Abb.II.22 veranschaulicht die Messung der isometrischen Kontraktionskraft am EHT. Ein Plastikröhrchen des EHT's ist an einem fixen Pol eingehängt. Das zweite Plastikröhrchen des EHT's ist über einen Haken aufgehängt und mit dem Kraftaufnehmer verbunden. Mit Hilfe von 2 Platinelektroden konnte der Herzmuskelverband elektrisch stimuliert werden. Abb.II.23 zeigt den gesamten Kontraktionsmessplatz. Während der gesamten Messung befand sich das EHT in einem Wasserbad mit Tyrodelösung und Carbogenbegasung bei 37°C. Die Vordehnung der EHT's konnte während der Messung durch ein Gewinde definiert variiert werden.

Die Meßanlage (Abb.II.23) erlaubte die Einstellung der EHT-Länge auf einen zehntel Millimeter genau. Die EHT's wurden auf der Ausgangslänge der Stahlträger aufgehängt, mit einer Frequenz von 2 Hz (170-240 mA) stimuliert und die isometrische Kontraktionskraft gemessen. Die Messung der isometrischen Kraft erfolgte a.) unter zunehmender Vordehnung ausgehend von der Ausgangslänge der EHT's ( $L_0$ ) in 0,1 mm Schritten bis zu  $L_{MAX}$ , der Länge, bei der die maximale isometrische Kraft gemessen werden konnte (extrazelluläre Kalziumkonzentration: 0,4 mM), b.) bei  $L_{MAX}$  unter steigenden extrazellulären Kalziumkonzentrationen (0,4 - 2,4 mM) sowie c.) bei  $L_{MAX}$  unter Zugabe von ansteigenden Isoproterenolkonzentrationen ( $10^{-9}$ mM-  $10^{-6}$  mM) (extrazelluläre Kalziumkonzentration: 0,4 mM).

### II.6 Myokardialer S100A1 *in vivo* Gentransfer

#### II.6.1 Intrakoronarer S100A1 *in vivo* Gentransfer

Für den myokardialen S100A1 *in vivo* Gentransfer wurde eine Methode nach Hata verwendet (Hata et al., 1999). Hierzu wurden 1,5 bis 2,5 kg schwere New Zealand White Rabbits mit 25 mg/kg KG Ketamin und 7,5 mg/kg KG Xylazine i.m. anästhesiert. Die rechte Körperseite der Tiere wurde vom Hals bis zum Rippenbogen rasiert. Nach der Intubation mit einem blockbaren 3,0 pädiatrischen Tubus erfolgte die Beatmung der Kaninchen mit Raumluft unter Zusatz 0,5 Liter O<sub>2</sub> pro Minute (Atemfrequenz 26-30/min, Atemvolumen 25-30 ml). Die Kaninchen wurden mit Tapeband auf dem Operationstisch an den Beinen fixiert, ein venöser Zugang wurde über die Ohrvene gelegt (24 G Braunüle) und mit Ringerlösung gespült. Die rasierte Körperoberfläche des Kaninchens wurde zuerst mit Alkohol (70%) und danach mit Chlorhexidine abgewaschen. Der weitere operative Eingriff vollzog sich unter sterilen Bedingungen.

Der 3. Interkostalraum (ICR) wurde ertastet und ein 4-5 cm Hautschnitt mit dem Skalpell durchgeführt. Das interkostale Muskelgewebe wurde mit der Schere durchtrennt. Ein Thoraxspanner wurde, ohne die Lunge zu verletzen, im 3. ICR eingesetzt und auf 4X2 cm aufgedehnt. Die Lunge wurde mit Hilfe eines befeuchteten Mulltuches (1x1 cm) vorsichtig von dem Operationsfeld ferngehalten. Nachdem das schlagende Herz frei zugänglich war, wurde das Perikard vom Apex bis zur Aorta geöffnet. Die Aorta wurde freipräpariert und angeschlossen. 0,25 ml Adenosin (6 mg/2ml) wurden als Bolus mit einer 26 G Nadel in den rechten Ventrikel injiziert. Um für die Virusapplikation einen Zugang zum linken Ventrikel zu bekommen, wurde das Herz am Apex durch das Unterschieben einer Pinzette angehoben. Ein rechtwinklig abgebogener Butterfly (25 G) wurde direkt am Apex in den linken Ventrikel eingeführt. Die korrekte Lage des Butterfly im Ventrikelkavum wurde durch die Aspiration von Blut kontrolliert. Der verwendete Butterfly war über einen Dreiwegehahn an 2 Spritzen angeschlossen. Die erste Spritze wurde für die Injektion der Viruslösung verwendet ( $1 \times 10^{11}$  PFU). Die zweite Spritze diente dem Auswaschen des Virus aus dem Butterflysistem mit 1,5 ml PBS + 1% Saccharose sowie einem gesteigerten koronaren Perfusionsdruck. Die bereits angeschlungene Aorta wurde für 45 Sekunden ligiert. Währenddessen erfolgte die bolusartige Injektion der auf 37°C angewärmten virushaltigen PBS Lösung in das schlagende Herz mit der Folge einer koronaren Virusperfusion. Das Herz wurde direkt nach der bolusartigen Injektion in den Situs zurückgelegt. Nach 45 Sekunden wurde die Ligationsschleife geöffnet und der Faden entfernt. Zur besseren Entfaltung der Lungen wurde das Mulltuch sofort entfernt und der Thoraxspanner leicht gelöst. Für 1 bis 2 Minuten wurde die

regelgerechte Herzfunktion, der aortale Füllungsdruck und die Herzfarbe kontrolliert. Zur vollständigen Lungenentfaltung wurde mit PEEP beatmet bis die Atelektasen vollständig verschwanden. Gleichzeitig wurde die O<sub>2</sub> Gabe auf 1 Liter/Minute kurzfristig erhöht. Der Thoraxspanner wurde entfernt. Eine Braunüle wurde ohne die Lunge zu verletzen durch die Haut und die Muskulatur in den Thorax eingelegt. Es erfolgte der schichtweise Wundverschluß. Nachdem der Thorax luftdicht verschlossen war, wurde die restliche Luft im Thorax durch die eingelegte Braunüle einmal vollständig abgesaugt. Der Tubus wurde vom Beatmungsgerät gelöst und abgewartet, ob das Kaninchen spontan atmete. Bei Einsetzen der Spontanatmung wurde das Kaninchen extubiert. Während der ersten drei Tage nach dem Gentransfer erhielten die Kaninchen 5 mg Methylprednisolon pro kg/KG i.m. Die Kombination aus Temgesic und Rimadyl (Carprofen) wurde als Schmerzmedikation täglich verabreicht. Die Tiere wurden darüberhinaus täglich visitiert.

### II.6.2 In vivo Charakterisierung der Herzfunktion mittels Linksherzkatheter

Um die kontraktile Funktion des Herzmuskels direkt zu beurteilen, wurde die Linksherzkatheteruntersuchung zur intrakavitären Druckmessung am narkotisierten Tier durchgeführt. Hierzu wurden 1,5 bis 2,5 kg schwere New Zealand White Rabbits mit 25 mg/kgKG Ketamin und 7,5 mg/kgKG Xylazine i.m. betäubt. Der Hals der Kaninchen wurde rasiert und mit Ethanol (70%) gereinigt. Danach erfolgte die Injektion von 0,5 ml (10 mg/ml) Lidocain subkutan an der Stelle der Inzision. Um einen arteriellen Zugang für den Herzkatheter zu bekommen wurde die rechte A. Carotis aufgesucht. Ein 3 cm langer Schnitt wurde 0,5 cm rechts neben der Trachea durchgeführt und die A. Carotis, durch stumpfes Spreizen des Gewebes mit einer Schere auf ca. 2 cm Länge, dargestellt. Der N. Vagus wurde vorsichtig von der A. Carotis gelöst und intakt belassen. Die Arterie wurde kranial ligiert und kaudal nach dem Anbringen einer Klemmligatur angeschlungen. Die A. Carotis wurde mit Hilfe eines feinen Rasierklingschnittes eröffnet. Ein 3 French Tip-Katheter (Millar Instruments) wurde geeicht und zur Digitalisierung des Messsignals mit einem Transducer (Millar Instruments, Pressure Transducer Unit, Model Nr. SPR-524) verbunden. Nach Inzision der A. Carotis wurde der Tip Katheter in das Lumen der Arterie eingeführt und zwischen dem lediglich angeschlungenen Faden und der etwas weiter proximal gelegenen Gefäßklemme plaziert. Unter Vorschieben des Katheters wurde die Klemme gelöst und der Katheter danach mit Hilfe des Fadens gegen das Lumen der A. Carotis blutdicht abgedichtet. Unter Sicht der mit dem Tip Katheter gewonnenen Druckkurven wurde der Katheter retrograd in das Cavum des linken Ventrikels eingeführt. Der systolische Ejektionsdruck

## II. Methoden und Material

---

im linken Ventrikel (SEP; mmHg), die Herzfrequenz (HF;  $\text{min}^{-1}$ ), die erste Ableitung des linksventrikulären Druckanstieges ( $+\text{dp}/\text{dt}$ ; mmHg/s) -und Druckabfalles ( $-\text{dp}/\text{dt}$ ; mmHg/s) wurden jeweils im Gleichgewicht gemessen. Die gemessenen Werte wurden jeweils über eine Minute gemittelt. Die Herzfunktion wurde sowohl unter Basalbedingungen als auch unter ansteigenden Dosen Isoproterenol (0,1, 0,5 und 1, 0  $\mu\text{g}/\text{kgKG}/\text{min}$ ) charakterisiert.

### II.7 Expressionsanalysen

#### II.7.1 Western Blot

Der spezifische S100A1 Proteinnachweis erfolgte mit Hilfe der Western Blot Technik im Wesentlichen nach einem Protokoll von Ehlermann et al. (Ehlermann., 2001). Das Gewebe, aus dem der Proteinnachweis erfolgen sollte, wurde in PBS (5x w/v) aufgenommen und auf Eis mit einem Ultraschallgerät homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend bei 15000 g für 20 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde für die Gelelektrophorese verwendet. Eine Proteinbestimmung wurde unter Verwendung des DC-Protein Assays (BioRad) nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierzu wurden 5 µl des Überstandes 1:10 mit dem Bio Rad Puffer verdünnt. 250 µl Reagenz A, 5 µl Reagenz S und 2 ml von Reagenz B wurden zu der Probe dazugegeben. 30 min später wurden die Proteinproben bei 600 nm densitometrisch gemessen. Für die Auftrennung im SDS-Page wurden die Proben in Probenpuffer 1:1 verdünnt, 30 sec bei 80°C aufgeköcht und nach dem Abkühlen mit Iodacetamid (2% w/v) versetzt. Pro Geltasche wurden je 30 µg Protein auf vorbereitete 15% Polyacrylamidgele mit einem 3%igen Vernetzungsgrad aufgetragen. Nach etwa 2 Stunden wurde die elektrophoretische Auftrennung bei einer Stromstärke von 25 mA/cm<sup>2</sup> in der Trennkammer (BioRad, Mini Protean 3 Kammer™) in Elektrophoresepuffer anhand des Laufmarkers (Multi-Mark™, 5 µl/Tasche) gestoppt. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine aktivierte Polyvinylidenefluoridmembran (PVDF) erfolgte für weitere 2 Stunden in einer Tankblotkammer bei einer Spannung von 50 Volt (240 mA und 30 Watt) in Transferpuffer. Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten in Waschpuffer gewaschen und über Nacht bei 4°C in in Blockierpuffer (I-Block™) inkubiert. Nach erneutem 30 minütigen Waschen in Waschpuffer erfolgte die Zugabe des Erstantikörpers (Anti-S100A1: SA5632 (Eurogentec), polyklonal Kaninchen-Anti-HumanS100A1, 1/100000; Anti-CSQ: MA3-913 (ABR), monoklonal Maus-Anti-Kaninchen, 1/10000; Anti-GFP: 8367-1 (Clontech), Kaninchen-Anti-GFP (synthetische Peptide), 1:40000) in I-Block™ für 45 Minuten bei RT. Auf das Waschen der PVDF-Membran für 15 Minuten mit Waschpuffer folgte die 30 minütige Inkubation mit dem Zweitantikörper bei RT (Dionava; Ziege-Anti-IgG-Kaninchen / Ziege-Anti-IgG-Maus Alkalische Phosphatase gekoppelt; 1:40000). Die Membran wurde zweimalig für 5 Minuten mit Assaypuffer bei RT inkubiert, danach auf eine durchsichtige Plastikfolie gelegt und mit 3 ml des alkalischen Phosphatase Substrates CDP-Star gleichmäßig benetzt. Nach 5 minütiger Reaktionszeit erfolgte der spezifische Proteinnachweis durch Belichtung eines handelsüblichen,

chemoluminiszenzsensiblen Blattfilms. Die Filmentwicklung erfolgte mit Hilfe eines Entwicklers der Firma Agfa.

### **II.7.2 Expressionsanalyse isolierter Kardiomyozyten nach Adv-Gentransfer**

#### **II.7.2.1 Western Blot**

Für die Proteinextraktion aus adulten Kardiomyozyten wurden  $\approx 1$  Million Zellen nach 24-stündiger Primärkultur durch Zentrifugation (2500g für 10 Minuten) pelletiert, gewogen und wie unter II.7.1 beschrieben für den Western Blot verwendet.

#### **II.7.2.2 GFP-Expression**

Die GFP-Expression der isolierten adulten Kardiomyozyten wurde bei einer Exzitation von 470 nm und der Emissionswellenlänge von 510 nm evaluiert.

### **II.7.3 Expressionsanalyse des EHT nach Adv-Gentransfer**

#### **II.7.3.1 Western Blot**

Vierzehn Tage nach der Konstitution und sieben Tage nach dem erfolgten Gentransfer wurden die EHT's in Flüssigstickstoff gefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  verwahrt. EHT's, die mit dem AdvS100A1 oder dem AdvGFP infiziert worden waren wurden jeweils gepoolt und wie unter II.7.1 beschrieben der Analyse durch Western Blotting zugeführt.

#### **II.7.3.2 GFP-Expression**

Die EHT's wurden auf die Länge der Stahlträger gedehnt und bei einer Emissionswellenlänge von 510 nm bezüglich der GFP-Expression ausgewertet.

### **II.7.4 Expressionsanalyse linksventrikulären Myokards nach Adv-Gentransfer**

#### **II.7.4.1 Western Blot**

Am siebten Tag nach dem adenoviral vermittelten Gentransfer wurden die Tiere durch eine Überdosierung an Betäubungsmittel getötet. Die Herzen wurden entnommen und in PBS gewaschen. Nach der Abtrennung der Atrien erfolgte die Separation von Septum sowie rechten und linken Ventrikel. Die Gewebeproben wurden bis zu ihrer weiteren Verwendung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. 100 mg

des linksventrikulären freien Myokards wurden wie unter II.7.1 beschrieben für den Western Blot verwendet.

### **II.7.4.2 GFP Expression**

Die Herzen wurden entnommen, in PBS gewaschen und transversal geschnitten. Die Myokardblöcke wurden in Gefriermedium (Tissue Tek) aufgenommen. 10 µm Kryoschnitte der Kaninchenherzen, bei denen ein Gentransfer mit dem AdvGFP oder dem AdvS100A1 durchgeführt worden war, wurden in 10% Formaldehyd fixiert. Bei der Emissionswellenlänge von 510 nm erfolgte die Evaluation der GFP Expression.

### **II.8 Statistische Berechnungen**

Die statistischen Berechnungen zum Vergleich der Mittelwerte der Argumente zweier unabhängiger Gruppen wurden mit einem zweiseitigen Student-*t* Test im Programm *Excel*<sup>TM</sup> durchgeführt. Ein Signifikanzniveau ( $P$ ) < 0,05 wurde als statistisch signifikant anerkannt.

## II.9 Material und Reagenzien

### Geräte:

Varifuge RF (Heraeus) 2000

Biofuge A (Heraeus) Tisch

BioRad Power Pac 300 (BioRad)

Inkubator 7310 (Dräger)

Hera Cell (Heraeus)

Hera Safe (Heraeus)

Mikroskop Olympus IX 70 (Olympus) mit Monochromator

BioRad E.Coli Pulser (BioRad)

Centrikon T-1075 (Centrikon) UZ

Rotor TST41.14 (Centrikon)

Elektrophoresekammer für DNA

Elektrophoresekammer für Protein

Autoklav

Blotkammer

Sonifiziergerät

Langendorff Perfusionsapparat

Beatmungsgerät

Operationslampen

Operationsbesteck

Videodetektionssystem mit Mikroskop, Kamera, MacLab Software

### Verbrauchsmaterial und Reagenzien:

Saccharose (Sigma, Cat. Nr. S-0389)

Adenosin

CsCl (Sigma, Cat. Nr. C-4036)

Taurin (Sigma, Cat. Nr. T-0625)

Tris (Roth, Cat. Nr. 4855.2)

Ammoniumpersulfat

PBS (Sigma, Cat. Nr. P-3813)

## II. Methoden und Material

---

Xylazine (Sigma, Cat. Nr. X-1251)

Hepes

Kollagenase Typ II (Worthington)

Lennox L Broth Base (GibcoBRL, Cat. Nr. 12780-052)

Agar Bacteriological (GibcoBRL, Cat. Nr. 20001-020)

Agarose (GibcoBRL, Cat. Nr. 15510-019)

Freon (Merck, Cat. Nr. 1.08239.0500)

Ethanol

Ethidiumbromid

Isopropanol

Kanamycin

Ampicillin

Ketanest S (Parke Davis, Cat. Nr. 7829486)

Isoproterenol (Abbott, Cat. Nr. 0050-732)

Scandicain 1% (Astra, Cat. Nr. 83-575-63-XF/S)

3M Natriumacetat

Puregene DNA Hydratations solution (Gentra Systems, Cat. Nr. D 5004)

Wizard Miniprep DNA Purification Solution (Promega, Cat. Nr. 7056902)

Maxi-Prep Kit (Quiagen, Cat. Nr. 11452-018)

2,0 mm Küvetten für den Gene Pulser

Miniprep Kit

Bio Rad Assay

DH<sub>5α</sub> Subcloning efficiency competent cells (GibcoBRL, Cat. Nr. 18265-017)

HEK 293 Zellen

DMEM-Medium (GibcoBRL, Cat. Nr. 41966-065)

Joklik's Ca<sup>2+</sup> freier Puffer

P/S (Biochrom KG, Cat. Nr. A2213)

Trypsin/EDTA (GibcoBRL, Cat. Nr. 25200-056)

FCS

TEMED

CDP-Star

## II. Methoden und Material

---

S100A1 Antikörper (Eurogentec, 5623)

Zweitantikörper goat anti rabbit

Avidix

Lipofectamin (GibcoBRL, Cat. Nr. 18324-012)

Dialysekassetten 10000 MWCO (Pierce, Cat. Nr. 66425)

13 ml Polyallomer tubes (Kendro, Cat. Nr. 74500073)

Eppendorf Tubes (Greiner Labortechnik, Cat. Nr. 616201)

17 mm Tubes (Greiner Labortechnik, Cat. Nr. 187261)

50 ml Falcon Tubes (Greiner Labortechnik, Cat. Nr. 227261)

100 mm Petrischale

Microspin Tubes (Promega, Cat. Nr. 9003-D220)

Gewebekulturschalen 145/20 mm (Cellstar, Cat. Nr. 639160)

Sterile OP-Handschuhe (Biogel, Cat. Nr. 82275)

Sterile OP- Abdecktücher

Sterile OP-Kittel

OP-Mundschutz

OP-Hauben (Johnson/Johnson, Cat. Nr. 42063)

Millar Tip Katheter SPR-524

Skalpell spitz (Aesculap, Cat. Nr. BB525)

Skalpell dickbäuchig (Aesculap, Cat. Nr. BB521)

3/0 Nahtmaterial / Vicryl (Ethicon, Cat. Nr. V-920H)

2/0 Nahtmaterial / Seide (Ethicon, Cat. Nr. K-873H)

Trachealtuben 2,5 (Mallinckrodt, Cat. Nr. 111-25)

16 G Braunüle (Ohmeda, Cat. Nr. 1455-50)

24 G Braunüle (Johnson/Johnson, Cat. Nr. 4013)

23 G Butterfly (Braun, 0404-8075)

Ligase und Ligationspuffer (Boehringer/Ingelheim)

RQ1 RNA`se free DNA`se (GibcoBRL, Cat. Nr. 18047-019)

NDE I (New England Biolabs, Cat. Nr. R0111S)

BGL II (New England Biolabs, Cat. Nr. R0144S)

Bam H I (New England Biolabs, Cat. Nr. R0136S)

## II. Methoden und Material

---

Hind III (New England Biolabs, Cat. Nr. R0104S)

PME I (New England Biolabs, Cat. Nr. R0560S)

PAC I (New England Biolabs, Cat. Nr. R0547S)

Hind III DNA Marker

1 kb DNA Marker

### III. Ergebnisse

#### III.1 Konstruktion eines E1/E3 deletierten Adenovirus zur S100A1 Überexpression (AdvS100A1)

Zur Konstruktion des S100A1 rekombinanten Adenovirus wurde ein von He et al. beschriebenes System verwendet (He et al., 1998). Bei dieser Methode wurde die S100A1 cDNA in das Transferplasmid pAdTrack-CMV kloniert, welches danach mit der adenoviralen Genomsequenz in Form des Plasmides pEASY-1 rekombiniert werden konnte. Die S100A1 cDNA und der pAdTrack-CMV wurden zunächst Ligationskompatibel mit BamHI/HindIII bzw. BgIII/HindIII geschnitten. In der elektrophoretischen Auftrennung der DNA auf einem Agarosegel zeigte sich die 2960 Basenpaare (bp) große pBluescript (pBSK<sup>-</sup>) DNA Bande sowie das 607 bp DNA Fragment, welches von Basenpaar 114 bis 398 für das S100A1 Gen kodiert (Abb.III.1).

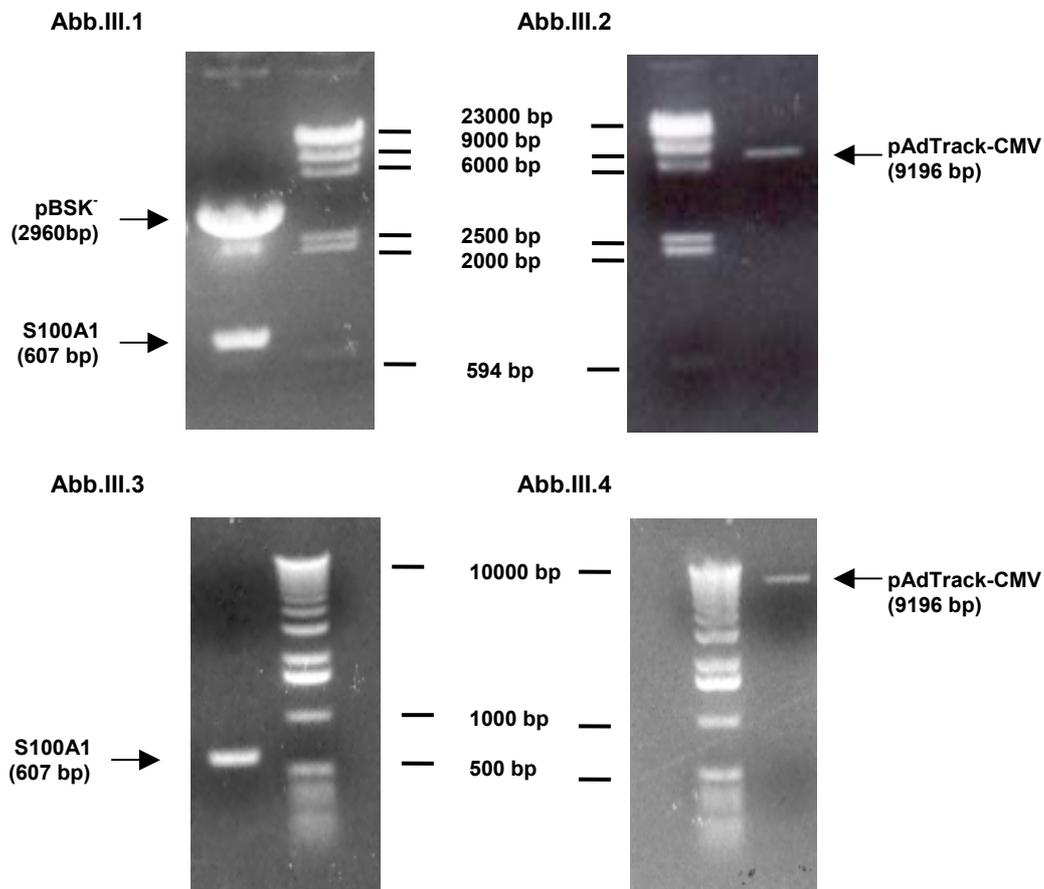


Abb.III.1 – Abb.III.4: Elektrophoretische Auftrennung der geschnittenen Plasmide pAdTrack-CMV und pBluescript/S100A1 (pBSK/S100A1).

Abb.III.1 zeigt die Banden des mit BamH I und Hind III verdauten pBSK/S100A1. Die 2960 bp Bande entspricht dem linearisierten pBluescript, die 607 bp Bande entspricht der S100A1 cDNA. Abb.III.2 stellt den mit BgIII und Hind III linearisierten pAdTrack-CMV dar. Abb.III.3 und Abb.III.4 veranschaulichen die erfolgreiche Isolation und Aufreinigung der S100A1 und der pAdTrack-CMV Banden.

Der linearisierte pAdTrack-CMV ergab in der elektrophoretischen Auftrennung eine DNA Bande bei 9200 bp. Das 24 Basenpaar umfassende DNA Fragment aus der multi cloning site (MCS) war nicht sichtbar (Abb.III.2). Die erfolgreiche Isolation und Aufreinigung der geschnittenen S100A1 (Abb.III.3) und pAdTrack-CMV DNA (Abb.III.4) aus dem Agarosegel wurde durch die erneute gelelektrophoretische Darstellung der Banden verifiziert.

### Ligation der S100A1 cDNA in den pAdTrack-CMV

Der Nachweis der erfolgreichen Ligation der S100A1 cDNA in den pAdTrack-CMV wurde durch einen NDE I Verdau geführt. In der S100A1 cDNA existiert keine NDE I Schnittstelle. Im pAdTrack-CMV existieren 3 NDE I Schnittstellen. Das Schneiden des pAdTrack-CMV mit NDE I ergibt somit 3 DNA Banden, wobei je eine Bande bei 4,5 kb und 3,5 kb in der elektrophoretischen Auftrennung laufen. Die dritte DNA Bande liegt bei 900 bp (Abb.III.5 (C)). Diese Bande entsteht durch je eine NDE I Schnittstelle im CMV-Promotor vor und hinter der Multi Cloning Site (MCS) und wird durch die Ligation der S100A1 DNA in die MCS des pAdTrack-CMV um 607 Basenpaare verlängert. Die dritte DNA Bande des pAdTrack/S100A1 ist somit bei 1500 Basenpaaren zu erkennen (Abb.III.5 (B)). Die Ligation der S100A1 cDNA in den pAdTrack-CMV konnte somit durch den Shift der Größe der dritten DNA Bande von 0,9 kb auf 1,5 kb kontrolliert werden.

Abb.III.5

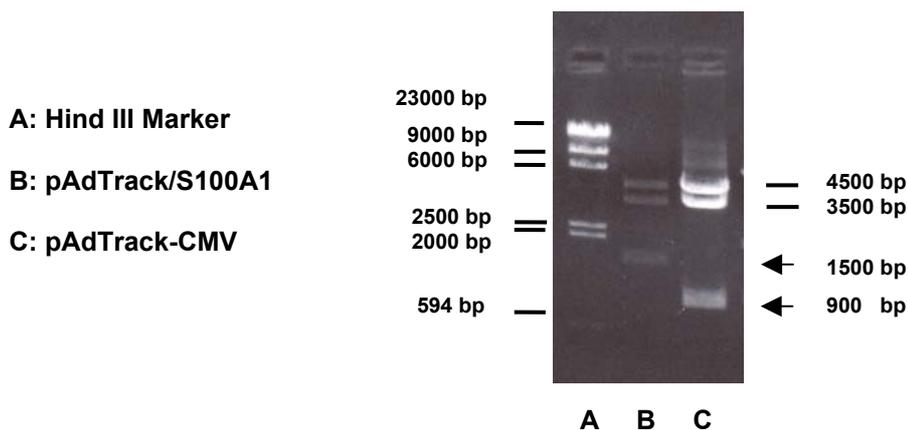


Abb.III.5 zeigt die mit NDE I verdauten Plasmide pAdTrack/S100A1 (B) und pAdTrack-CMV (C) in der elektrophoretischen Auftrennung. Die Ligation der S100A1 cDNA in den pAdTrack-CMV wird dadurch veranschaulicht, dass die kleinste der drei entstehenden DNA Banden des pAdTrack/S100A1 607 Basenpaare, die Größe der S100A1 cDNA, größer ist als die kleinste DNA Bande des pAdTrack-CMV.

### Rekombination von pAdTrack/S100A1 und pEASY-1

Die Rekombination des pEASY-1 mit dem pAdTrack/S100A1 wurde ebenfalls mit Hilfe eines NDE I Verdauens überprüft (Abb.III.6). Das Schneiden des Plasmides pAdTrack/S100A1 führt aufgrund von 3 NDE I Schnittstellen zu 3 Banden von 4,5 Kilobasen (kb), 3,5 kb und 1,5 kb Größe (C). Der pEASY-1 besitzt 3 NDE I Schnittstellen, wodurch sich 3 Banden in den Größen 19 kb, 9 kb und 6 kb ergeben (B). Das Rekombinationsprodukt pAd/S100A1 beinhaltet allerdings nur 5 NDE I Schnittstellen, da 3500 Basenpaare, mit einer NDE I Schnittstelle des pEASY-1, nicht Bestandteil des Rekombinationsproduktes sind. Die 19 kb und die 9 kb DNA Banden aus dem pEASY-1 sowie die 1,5 kb Bande aus dem pAdTrack/S100A1, welche das in die MCS integrierte S100A1 Gen umfasst bleiben im Rekombinationsprodukt unverändert erhalten (A). Somit konnte die Integration der S100A1 cDNA in das adenovirale Genom durch den Shift der 0,9 kb Bande zu 1,5 kb kontrolliert werden.

Abb.III.6

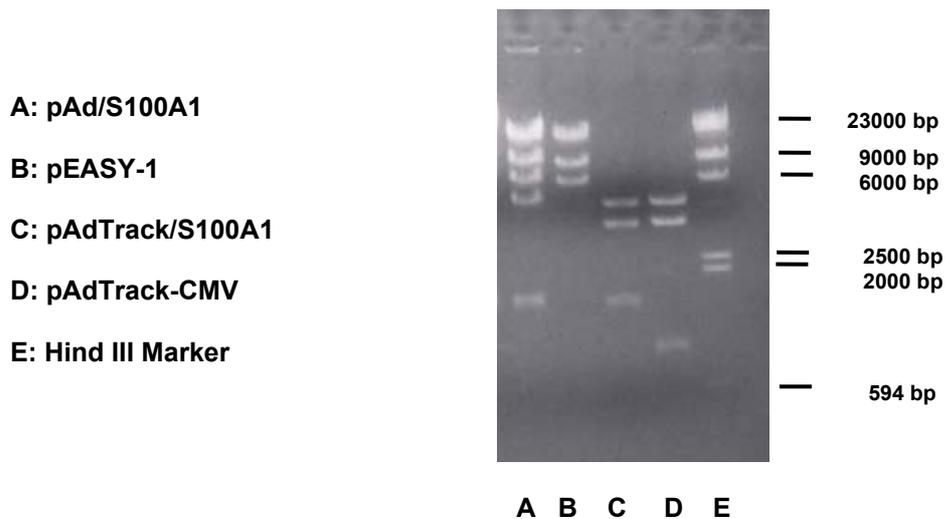


Abb.III.6: Elektrophoretische Darstellung nach NDE I Verdau.

Der pAdTrack/S100A1 (C) ist erneut an der um 607 bp vergrößerten unteren DNA Bande im Vergleich zum pAdTrack-CMV (D) zu erkennen. Bei der Rekombination des pAdTrack/S100A1 (C) mit dem pEASY-1 (B) entsteht der (pAd/S100A1) (A) integriert.

**Transfektion der HEK 293 Zellen mit S100A1 rekombinanter adenoviraler DNA**

Durch den Verdau des Rekombinationsproduktes pAd/S100A1 mit Pac I entstand die linearisierte adenovirale DNA (Abb.III.7). Abb.III.8 zeigt die S100A1 rekombinante adenovirale DNA nach elektrophoretischer Auftrennung auf einem Agarosegel vor Einschleusung in die HEK 293 Zellen. 7 Tage nach der Transfektion von 50 µg der S100A1 rekombinanten adenoviralen DNA mit Hilfe von Lipofektamin™ in HEK 293 Zellen zeigte sich eine sichtbare Expression des Transfektionsmarkers GFP. Aufgrund der Lyse, der mit den Adenoviren infizierten HEK 293 Zellen, erfolgte die Verbreitung der Infektion auf die Nachbarzellen (Abb.III.9). Die Verbreitung der GFP Expression in der HEK 293 Zellkultur war der Nachweis von replikationsfähigen Viren (Abb.III.10).

Abb.III.7

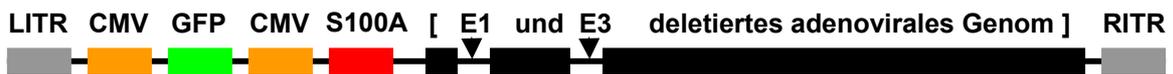


Abb.III.8

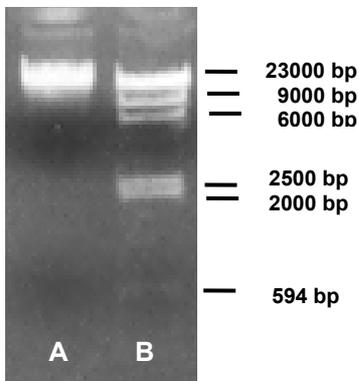


Abb.III.9

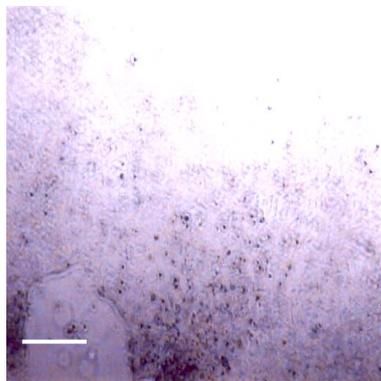
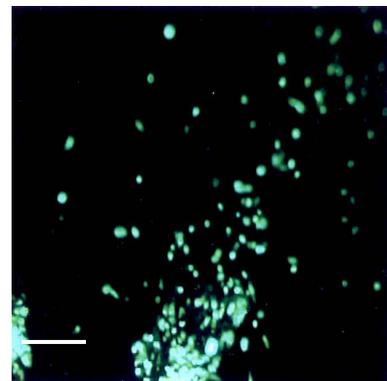


Abb.III.10



Darstellung der S100A1 rekombinanten, linearisierten adenoviralen DNA als Schema (Abb.III.7) und in der elektrophoretischen Auftrennung (Abb.III.8). Abb.III.9 zeigt HEK 293 Zellen 7 Tage nach der Transfektion mit der linearisierten pAd/S100A1 DNA in der Lichtmikroskopie. Abb.III.10: Darstellung derselben Zellen fluoreszenzmikroskopisch (510 nm emission). A: pAd/S100A1 (linearisiert), B:Hind III Marker. Balken = 100 µm.

#### III.2 Vermehrung und Anreicherung der rekombinanten Adenoviren

Mit der Präparation des S100A1 (AdvS100A1) und des Kontrolladenovirus (AdvGFP) nach He et al. (He et al., 1998) gelang es, für beide Viren hochinfektiöse Chargen herzustellen. Die Infektiosität wurde vor und nach Aufkonzentrierung beider Viren mit einem CsCl Gradienten anhand eines Plaque Assays bestimmt. Nach Vermehrung beider Viren in HEK 293 Zellen enthielten die virushaltigen Lysate im Mittel ca.  $1,0 \pm 0,2 \times 10^9$  infektiöse Partikel pro ml (plaque forming units/ml; pfu/ml). Dieser Wert errechnete sich aus einer mittleren Plaquezahl von  $10 \pm 2$  bei der Verdünnungsstufe  $10^7$  der konzentrierten Virusstocks im Plaque Assay (Plaqueanzahl x Verdünnungsfaktor/0,1 ml = pfu/ml;  $10 \text{ pfu} \times 10^7 / 0,1 \text{ ml} = 1 \times 10^9 \text{ pfu/ml}$ ). Durch die Konzentrierung der Viren mit einem CsCl Gradienten erhöhte sich die virale Partikeldichte um den Faktor 100 und erreichte im Plaque Assay einen Infektiositätsindex von ca.  $1,0 \pm 0,2 \times 10^{11}$  pfu/ml.

### III.3 Testung des AdvS100A1 an isolierten, adulten Kardiomyozyten

#### III.3.1 Adenoviraler S100A1 Gentransfer in isolierte adulte Kardiomyozyten

Die Isolation adulter ventrikulärer Kardiomyozyten der Ratte nach dem Protokoll von Piper et al. (Piper et al., 1990) lieferte im Durchschnitt  $8,0 \pm 2,0 \times 10^6$  Myozyten mit typischer backsteinförmiger Morphologie pro Rattenherz Abb.III.11. In der Zellkultur waren durchschnittlich über 90 % der isolierten Kardiomyozyten vital und kontraktionsfähig.

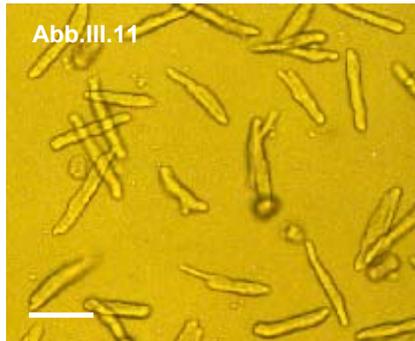


Abb.III.11

Repräsentative Aufnahme ventrikulärer Kardiomyozyten nach Isolation und Kalziumtoleration. (Vergrößerung 100-fach, Balken 100 µm)

4 Stunden nach der Zellisolation erfolgte der Gentransfer mit 20 infektiösen Partikeln (multiplicity of infection (MOI) von 20) des S100A1 rekombinanten Adenovirus (AdvS100A1) oder des Kontrollvirus (AdvGFP) pro Kardiomyozyt. Die Transfektion der Kardiomyozyten wurde 16 h nach der adenoviralen Infektion mit Hilfe des Transfektionsmarkers GFP kontrolliert. Lichtmikroskopisch zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den mit dem AdvGFP (Abb.III.12) oder dem AdvS100A1 (Abb.III.14) infizierten adulten Kardiomyozyten. Regelmäßig ergab sich in nahezu 100% der AdvGFP (Abb.III.13) oder AdvS100A1 (Abb.III.15) transfizierten Kardiomyozyten eine Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP).



Abb.III.12

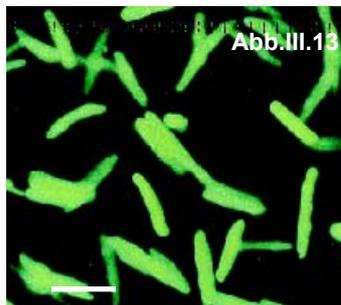


Abb.III.13

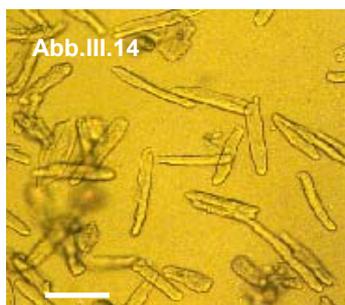


Abb.III.14

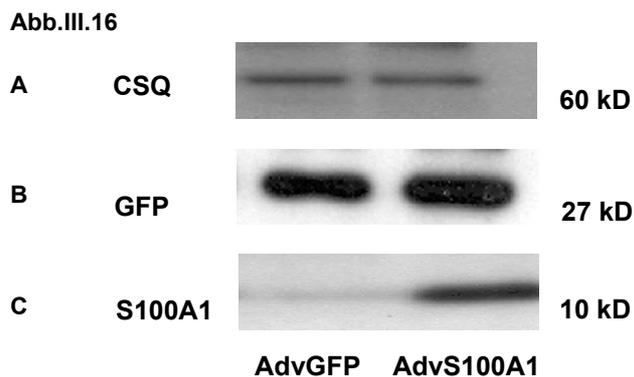


Abb.III.15

Abb.III.12 bis Abb.III.15: Repräsentative Transmissionsaufnahmen und GFP Emissionsaufnahmen adulter Kardiomyozyten der Ratte 16 h nach der Isolation. AdvGFP (Abb.III.12) und AdvS100A1 (Abb.III.14) transfizierte Kardiomyozyten zeigen morphologisch keine Unterschiede in der Lichtmikroskopie 16 h nach adenoviraler Infektion. Die adenovirale Infektion der Kardiomyozyten wurde anhand des Transfektionsmarkerproteins GFP kontrolliert. Die Infektion (MOI von 20) durch den AdvGFP oder durch den AdvS100A1 ergab eine nahezu 100%ige GFP Expression der Kardiomyozyten. (Vergrößerung 100-fach, Balken 80 µm)

### III.4 S100A1 Protein Überexpression adulter Kardiomyozyten nach S100A1 Gentransfer

Die gesteigerte S100A1 Expression der isolierten, adulten Kardiomyozyten durch den S100A1 Gentransfer wurde mittels Western Blotting kontrolliert. Die zytosolische Proteinfraction aus den mit dem AdvS100A1 oder dem AdvGFP behandelten Kardiomyozyten wurde isoliert und die Proteinkonzentration photometrisch nach standardisierten Protokoll der Firma Bio-Rad gemessen. Die Proteinkonzentration in der zytosolischen Fraction der AdvS100A1 (AdvGFP) infizierten Kardiomyozyten betrug  $16\pm 3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $18\pm 2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Die densitometrische Quantifizierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden mit dem Programm One-Dimensional-Scan™ (Adobe) erfolgte für die Proteine S100A1, GFP und Calsequestrin. In beiden Versuchsgruppen unterschied sich das Signal für Calsequestrin (Abb.III.16A) und GFP (Abb.III.16B) nicht signifikant. Standardisiert auf Calsequestrin führte der S100A1 Gentransfer in isolierten, adulten Kardiomyozyten, im Vergleich zu der AdvGFP Kontrollgruppe, zu einer signifikanten  $6,2\pm 0,5$ -fachen S100A1 Überexpression (Abb.III.16C).



**Abb.III.16** Repräsentative SDS/PAGE Analyse aus isolierten AdvGFP oder AdvS100A1 transfizierten adulten Kardiomyozyten.

Dargestellt ist die zwischen den AdvGFP und AdvS100A1 Gruppen nicht signifikant unterschiedliche Expression der Proteine Calsequestrin (A) und GFP (B). Die S100A1 Proteinexpression der AdvS100A1 transfizierten Kardiomyozyten ist im Vergleich zu der AdvGFP Gruppe signifikant  $6,2\pm 0,5$ -fach gesteigert (C).

### III.5 Kontraktile Funktion ventrikulärer Kardiomyozyten nach S100A1 Gentransfer

Zur Erhebung der Daten wurden Kardiomyozyten aus 4 Ratten isoliert. Die dargestellten Meßdaten sind Durchschnittswerte aus jeweils 80 Einzelzellmessungen. Die Ausgangslänge der isolierten Kardiomyozyten in Ruhe (L) unterschied sich nicht signifikant in der S100A1 Gruppe (AdvS100A1; 89,25 µm) im Vergleich zu der Kontrollgruppe (AdvGFP; 92,8 µm) (Abb.III.17).

Abb.III.17

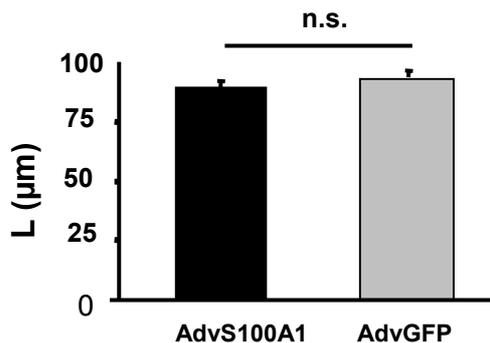


Abb.III.17: Die Ausgangslänge isolierter, adulter Kardiomyozyten unterschied sich nicht signifikant zwischen AdvGFP und AdvS100A1 transfizierten adulten Kardiomyozyten.

Die lastfreie prozentuale Verkürzung (CS%) der Kardiomyozyten war in den S100A1 überexprimierenden Kardiomyozyten ( $11,7 \pm 0,62$  %) signifikant um 55 % im Vergleich zur Kontrollgruppe ( $7,65 \pm 0,41$  %;  $p < 0,05$ ) gesteigert (Abb.III.18). Gleichzeitig zeigte sich eine signifikante Zunahme der Kontraktions ( $-dL/dt$ )– und Relaxationsgeschwindigkeit ( $+dL/dt$ ) der S100A1 überexprimierenden Kardiomyozyten. Die Verkürzungsgeschwindigkeit der adulten S100A1 transfizierten Kardiomyozyten betrug  $-108,9 \pm 0,58$  µm/s im Vergleich zur Kontrollgruppe  $-83,7 \pm 0,54$  µm/s;  $p < 0,05$  (Abb.III.19). Die Relaxationsgeschwindigkeit wurde durch den S100A1 Gentransfer um 35,6 % von  $+61,3 \pm 0,5$  µm/s (AdvGFP) auf  $+83,1 \pm 0,47$  µm/s signifikant gesteigert ( $p < 0,05$ ) (Abb.III.20). Unter Zugabe von  $10^{-6}$  M Isoproterenol kam es in beiden Versuchsgruppen zu einer Steigerung der Kontraktilität. Die lastfreie prozentuale Zellverkürzung der S100A1 transfizierten Kardiomyozyten blieb auch unter diesen Bedingungen signifikant ( $p < 0,05$ ) um 11,6 % gegenüber der Kontrollgruppe gesteigert ( $16,37 \pm 0,69$  % vs.  $14,2 \pm 0,43$  %) (Abb.III.21). Die  $-dL/dt$  und  $+dL/dt$  der S100A1 überexprimierenden Kardiomyozyten ( $-122 \pm 0,5$  µm/s bzw.  $+88,9$  µm/s) waren ebenfalls unter  $10^{-6}$  M Isoproterenol im Vergleich zur Kontrollgruppe (AdvGFP;  $-110 \pm 0,43$  µm/s;  $p < 0,05$  bzw.  $80,0 \pm 0,325$  µm/s;  $p < 0,05$ ) signifikant gesteigert (Abb.III.22 und Abb.III.23).

Abb.III.18

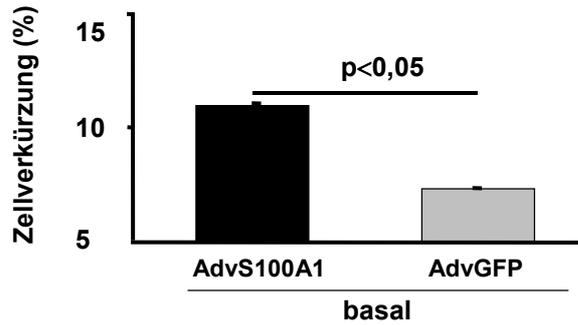


Abb.III.21

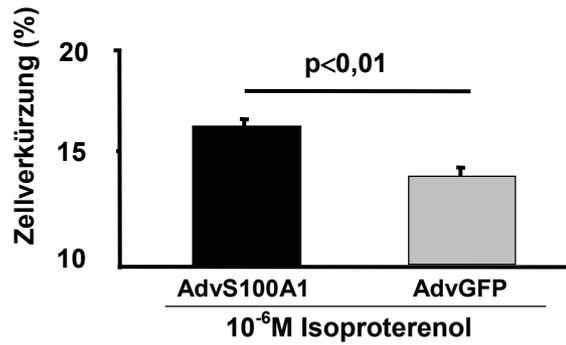


Abb.III.19

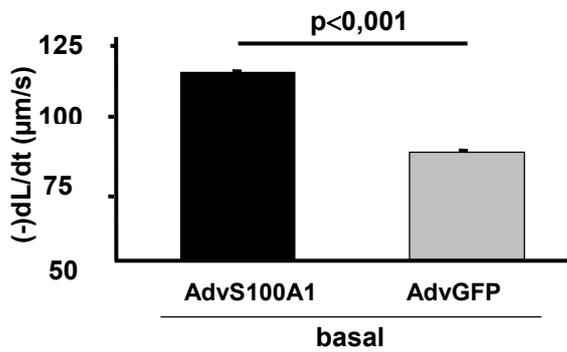


Abb.III.22

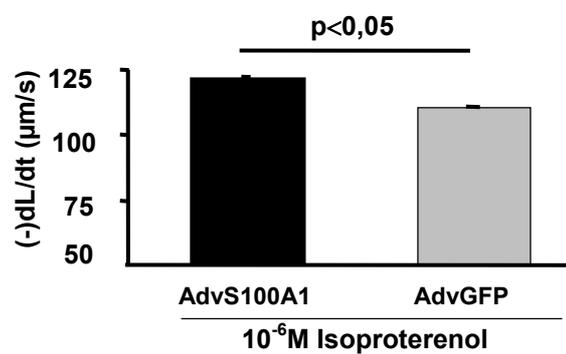


Abb.III.20

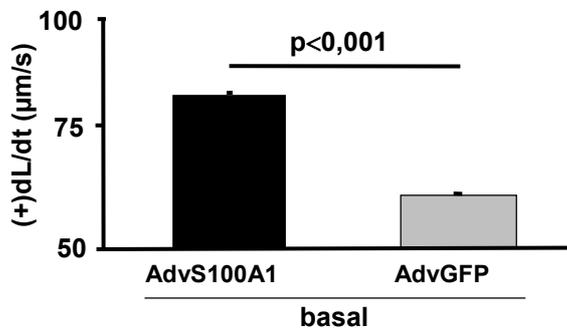


Abb.III.23

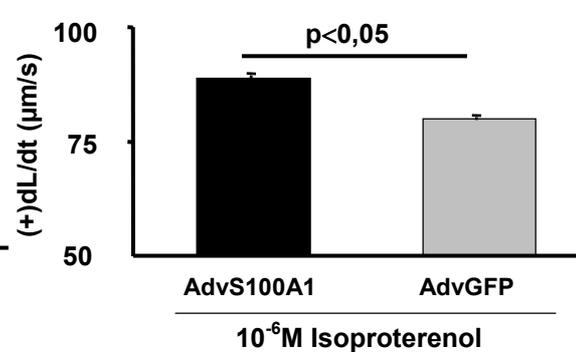


Abb.III.18 – Abb.III.23:

Zunahme der prozentualen Zellverkürzung (Abb.III.18 und 21), Anstieg der Kontraktionsgeschwindigkeit (-dL/dt) (Abb.III.19 und 22) und Steigerung der Relaxationsgeschwindigkeit (+dL/dt) (Abb.III.20 und 23) in adulten Kardiomyozyten 24 Stunden nach S100A1 Gentransfer (AdvS100A1) im Vergleich zur Kontrolle (AdvGFP) (n=80) unter Basalbedingungen und unter  $10^{-6}$  M Isoproterenol.

### III.6 Adenoviraler (Adv) Gentransfer in engineered heart tissue (EHT)

Die rekonstituierten EHT's waren nach einer 1/2 Stunde ausgehärtet. 2 Tage später begannen die EHT's spontan und kohärent zu schlagen. Abb.III.24 zeigt ein repräsentatives EHT 14 Tage nach der Rekonstitution mit der von Eschenhagen et al. beschriebenen bikonkaven Form und der Konzentration der Herzmuskelzellen an den freien lateralen Rändern der EHT's (Eschenhagen et al., 1997). Die Kontrolle der adenoviralen Infektion erfolgte fluorezenzmikroskopisch mit Hilfe des GFP. Die Inkubation der EHT's mit 10 infektiösen Partikeln pro Zelle des AdvS100A1 oder des AdvGFP (multiplicity of infection, MOI 10) führte zu einer ~100%igen Transfektion von GFP in den Zellen der EHT's (Abb.III.25). Der fluorezenzmikroskopische GFP Nachweis bestätigte optisch den adenoviralen Gentransfer mit der Transskription der cDNA Sequenzen durch den CMV-Promotor (Akther et al. 1997).

Abb.III.24

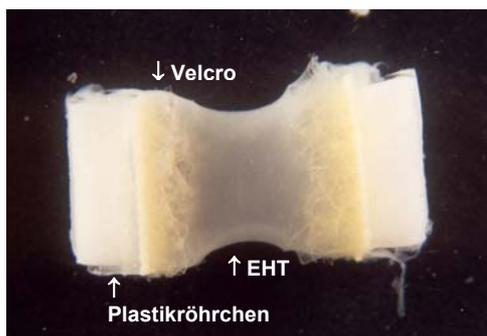


Abb.III.25

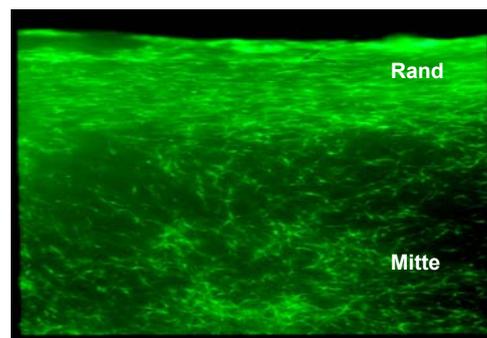


Abb.III.24 stellt ein repräsentatives EHT 14 Tage nach der Konstitution dar. Aufgrund der spontanen Kontraktionsaktivität bildet sich eine bikonkave Form des EHT's heraus. Die weißliche Farbe des EHT's an den Seitenrändern ist durch die erhöhte Zelldichte in diesem Bereich bedingt.

Abb.III.25 veranschaulicht anhand des Transfektionsmarkerproteins GFP die nahezu 100%ige Infektion der rekonstituierten Zellen im EHT. Die Transfektion unterschied sich nicht signifikant zwischen der AdvGFP und der AdvS100A1 Gruppe. Am Rand des EHT's ist die longitudinale Ausrichtung der rekonstituierten Kardiomyozyten erkennbar. In der Mitte des EHT's liegen die Zellen netzförmig orientiert.

### III. Ergebnisse

---

#### III.7 Expressionsanalyse der EHT`s nach S100A1 Gentransfer

Der spezifische Nachweis der S100A1 Proteinexpression in AdvS100A1 infizierten EHT`s, im Vergleich zu der AdvGFP infizierten EHT Kontrollgruppe, erfolgte mit Hilfe von Western Blotting. Die zytosolische Proteinfraction der mit dem AdvS100A1 und dem AdvGFP behandelten EHT`S wurde isoliert und die Proteinkonzentration photometrisch nach standardisiertem Protokoll der Firma Bio-Rad gemessen. In der zytosolischen Fraktion der AdvS100A1 (AdvGFP) infizierten EHT`s betrug die Proteinkonzentration  $19\pm 3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $18\pm 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Die densitometrische Quantifizierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden mit dem Programm One-Dimensional-Scan™ (Adobe) erfolgte für die Proteine S100A1, GFP und Calsequestrin (CSQ). Abb.III.26 zeigt eine repräsentative Westernblotanalyse für S100A1, GFP und CSQ aus homogenisierten EHT`s. Standardisiert auf CSQ führte der S100A1 Gentransfer im EHT zu einer  $4,2\pm 0,5$ -fachen S100A1 Überexpression im Vergleich zu den AdvGFP transfizierten EHT`s ( $P<0,001$ ). Die durch die Infektion mit dem AdvS100A1 oder AdvGFP vermittelte GFP Expression unterschied sich in beiden Gruppen nicht signifikant (Abb.III.26).

Abb.III.26

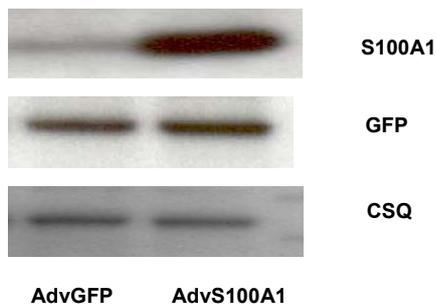


Abb.III.26 Repräsentative SDS/PAGE Analyse aus isoliertem AdvGFP oder AdvS100A1 transfizierten engineered heart tissue (EHT). Dargestellt ist die zwischen der AdvGFP und der AdvS100A1 Gruppe nicht signifikant unterschiedliche Expression der Proteine GFP und Calsequestrin 7 Tage nach erfolgtem Gentransfer. Die S100A1 Proteinexpression der AdvS100A1 transfizierten EHT`s ist im Vergleich zu der AdvGFP Gruppe signifikant  $4,2\pm 0,5$ -fach gesteigert.

### III.8 Kontraktile Funktion der EHT`s nach S100A1 Gentransfer

Abb.III.27 zeigt die Messung der isometrischen Kraft der AdvS100A1 transfizierten EHT`s im Vergleich zu der AdvGFP Kontrollgruppe unter ansteigender Vorlast. Die extrazelluläre Kalziumkonzentration  $[Ca^{2+}]_e$  betrug 0,4 mM, die Stimulationsfrequenz 2 Hz (5 ms, 30 V). Auf der Ausgangslänge  $L_0$ , bei der das künstliche Herzmuskelgewebe konstituiert und gezüchtet worden war, entwickelten die mit dem AdvS100A1 behandelten EHT`s eine mit  $0,219 \pm 0,04$  mN signifikant gesteigerte isometrische Kraft im Vergleich zu den mit dem AdvGFP behandelten Geweben ( $0,103 \pm 0,013$  mN;  $n=11$ ;  $p < 0,05$ ). Unter steigender Vordehnung blieb die signifikant erhöhte isometrische Kraft der AdvS100A1 transfizierten EHT`s bestehen. Bei der maximalen Vordehnung der EHT`s um 0,4 mm war die isometrische Kraft der mit dem AdvS100A1 behandelten EHT`s mit  $0,314 \pm 0,058$  mN um 65% gegenüber der Kontrollgruppe (AdvGFP;  $0,19 \pm 0,018$  mN;  $p < 0,05$ ) gesteigert.

Abb.III.27

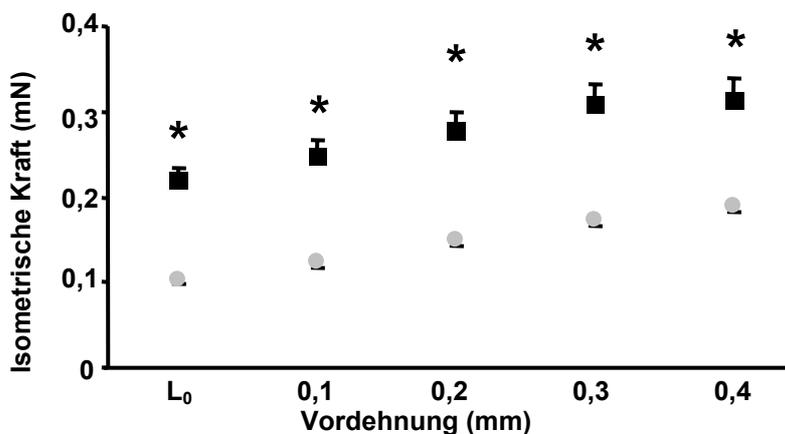


Abb.III.27: Vordehnungsabhängige Kraftentwicklung am EHT (Frank-Starling).

Die vordehnungsabhängige Entwicklung der isometrischen Kraft war in den AdvS100A1 transfizierten EHT`s signifikant im Vergleich zu den Kontroll-EHT`s (AdvGFP) gesteigert. ■ AdvS100A1 (n=20), ○ AdvGFP (n=20), \*  $p < 0,05$ .

Unter Erhöhung der  $[Ca^{2+}]_e$  zeigte sich sowohl bei den AdvS100A1 behandelten, als auch bei den AdvGFP transfizierten EHT`s eine signifikante Steigerung der isometrischen Kraft (Kalziumtreppe). Die signifikant gesteigerte isometrische Kraft der S100A1 überexprimierenden EHT`s im Vergleich zu den AdvGFP transfizierten Geweben blieb unter ansteigenden Kalziumkonzentrationen (0,4 mM bis 2,4 mM) erhalten (Abb.III.28). Bei einer extrazellulären Kalziumkonzentration von 2,4 mM entwickelten die S100A1 transfizierten EHT`s (AdvS100A1;  $0,496 \pm 0,091$  mN) eine gegenüber den mit dem

AdvGFP ( $0,315 \pm 0,031$  mN;  $p < 0,05$ ) behandelten Kontrollen um 54% gesteigerte isometrische Kraft (Abb.III.28).

Abb.III.28

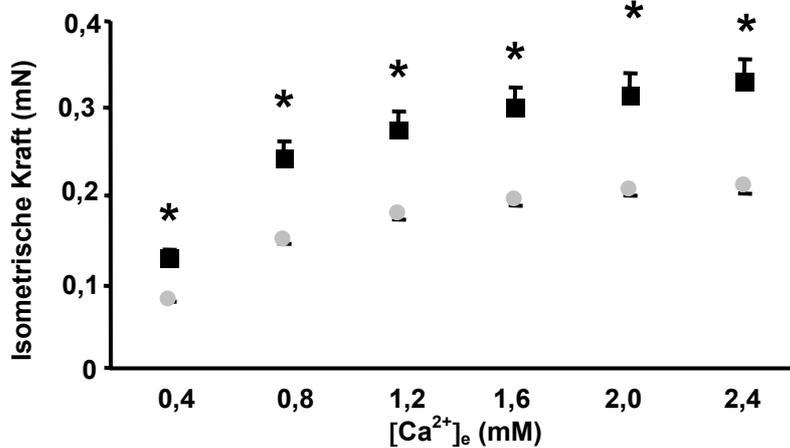


Abb.III.28: Kalziuminduzierte Kraftentsteigerung am EHT (Kalzium-Treppe).

Die S100A1 Überexpression steigerte die isometrische Kraft der EHT's signifikant bei extrazellulären Kalziumkonzentrationen zwischen 0,4 bis 2,4 mM im Vergleich zu den Kontroll EHT's. ■ AdvS100A1 (n=20), ○ AdvGFP (n=20), \*  $p < 0,05$ .

Die Applikation von ansteigenden Konzentrationen Isoproterenol führte sowohl bei den AdvS100A1, als auch bei den AdvGFP behandelten EHT's zu einer signifikanten Zunahme der isometrischen Kraft. Die signifikant gesteigerte isometrische Kraft der S100A1 transfizierten EHT's blieb unter ansteigenden Isoproterenolkonzentrationen ( $10^{-9}$ M bis  $10^{-6}$ M) erhalten (Abb.III.29). Unter einer maximalen extrazellulären Isoproterenolkonzentration von  $10^{-6}$ M führte die S100A1 Genaddition (AdvS100A1;  $0,372 \pm 0,068$  mN) zu einer um 69,8% signifikant gesteigerten isometrischen Kraft im Vergleich zu der AdvGFP Kontrollgruppe ( $0,219 \pm 0,018$  mN;  $p < 0,05$ ) (Abb.III.29).

Abb.III.29

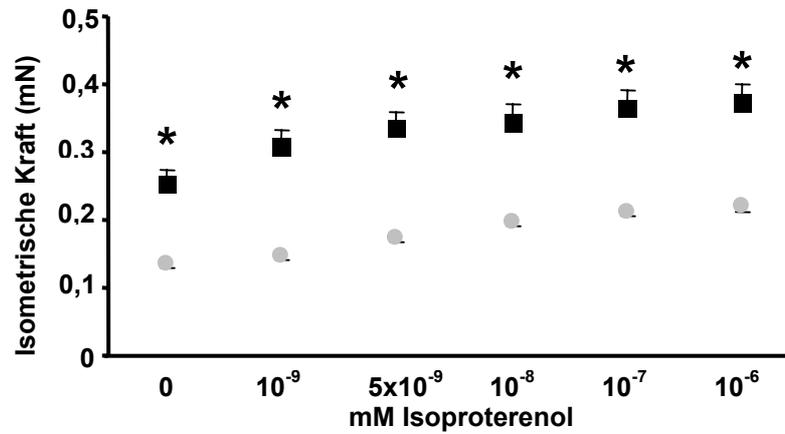


Abb.III.29: Steigerung der isometrischen Kontraktionskraft unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation.

Unter ansteigender Konzentration von Isoproterenol blieb die signifikant gesteigerte isometrische Kontraktionskraft der AdVS100A1 transfizierten EHT's im Vergleich zu der Kontrollgruppe (AdvGFP) erhalten.

■ AdvS100A1 (n=20), ○ AdvGFP (n=20), \* p<0,05.

#### III.9 Myokardialer S100A1 in vivo Gentransfer und S100A1 Expressionsanalyse

Zur myokardialen Applikation des S100A1 rekombinanten Adenovirus wurde die intrakoronare Gentransferstrategie der aortalen Ligation bei gleichzeitiger Injektion der Viruslösung in den linken Ventrikel angewandt (Hata et al., 1999). Bei dieser Methode wird unter Verwendung von  $1 \times 10^{11}$  PFU eine globale, myokardiale GFP Expression erreicht (Hata et al., 1999). Die Identifizierung der Myokardareale, in denen mit Hilfe der Gentransfertechnik eine adenovirale Infektion erreicht werden konnte, gelang anhand der fluoreszenzoptischen Untersuchung des Kotransfektionsmarkers GFP. Aufgrund der hohen Wandspannung während der Virusapplikation waren die endokardialen Myokardareale und das Septum von der adenoviralen Transfektion ausgenommen. Epikardial fand sich jedoch eine nahezu 100%ige Transfektionsrate (Abb.III.31).

Abb.III.30

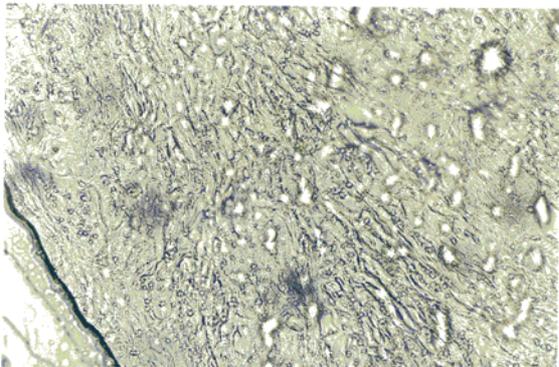
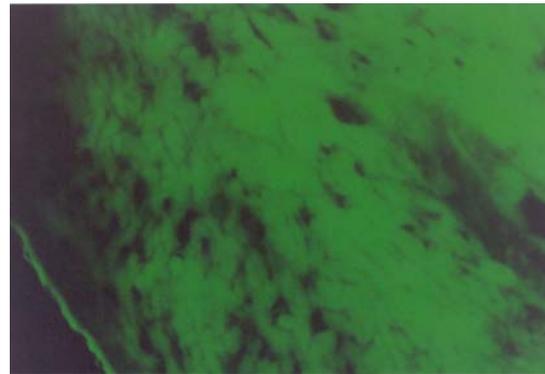


Abb.III.31



Linksventrikulärer 10 µm Kryoschnitt eines AdvGFP transfizierten Kaninchens 7 Tage nach erfolgten Gentransfer in der Lichtmikroskopie (Abb.III.30) und unter GFP Emission (510 nm) (Abb.III.31). Abb.III.31 veranschaulicht anhand der GFP Expression eine robuste Infektionsrate des AdvGFP in der äußeren myokardialen Wand.

### III. Ergebnisse

---

Die myokardiale S100A1 Überexpression, hervorgerufen durch den S100A1 Gentransfer, wurde durch Western Blotting kontrolliert. Nach der Entnahme der Herzen wurden die Atrien und der rechte Ventrikel entfernt. Die zytosolische Proteinfraction aus den mit dem AdvS100A1 oder dem AdvGFP behandelten linksventrikulären Myokard wurde isoliert und die Proteinkonzentration photometrisch nach standardisierten Protokoll der Firma Bio-Rad gemessen. Die Proteinkonzentration in der zytosolischen Fraction des AdvS100A1 (AdvGFP) infizierten Myokards betrug  $24 \pm 5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  ( $22 \pm 3 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Die densitometrische Quantifizierung der elektrophoretisch aufgetrennten Proteinbanden mit dem Programm One-Dimensional-Scan™ (Adobe) erfolgte für die Proteine S100A1, GFP und Calsequestrin (CSQ). Abb.III.33 und Abb.III.34 stellen die Ergebnisse der Proteinanalysen in einer repräsentativen Form dar. Der myokardiale S100A1 Gentransfer (n=8) steigerte die S100A1 Expression des Herzmuskels standardisiert auf CSQ im Vergleich zu den Kontrolltieren (n=11) signifikant um den Faktor  $3,2 \pm 0,5$ ;  $p < 0,01$  (Abb.III.33). Die GFP Expression in der AdvS100A1 und der AdvGFP Gruppe war nicht signifikant unterschiedlich (Abb.III.34).

Abb.III.33

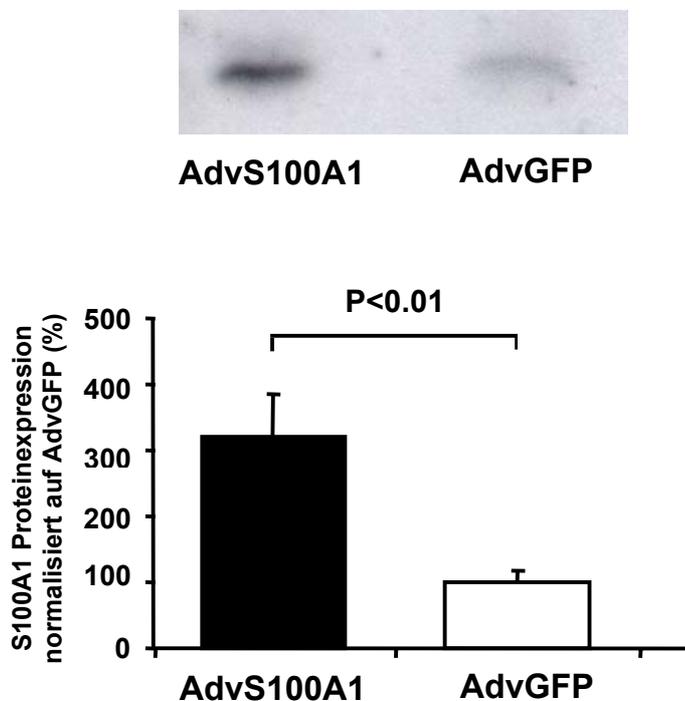


Abb.III.33

Repräsentative SDS/PAGE Analyse aus AdvGFP und AdvS100A1 transfiziertem linksventrikulären Myokard. Die densitometrische Auswertung ergab eine signifikante  $3,2 \pm 0,5$ -fache Steigerung der S100A1 Expression in AdvS100A1 transfiziertem linksventrikulären Myokard im Vergleich zu den AdvGFP Kontrollen (n=8),  $p < 0,01$ .

Abb.III.34

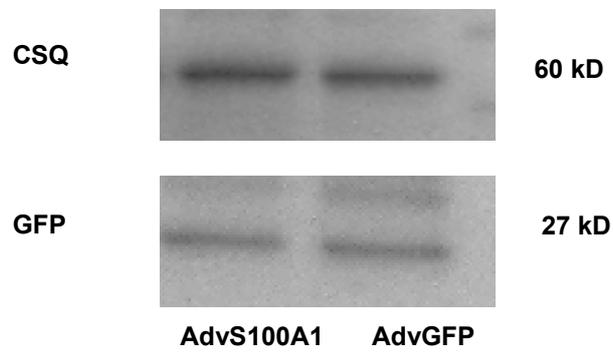


Abb.III.34 Repräsentative SDS/PAGE Analyse aus AdvGFP oder AdvS100A1 transfizierten linksventrikulären Myokard.

Dargestellt ist die zwischen der AdvGFP und der AdvS100A1 Gruppe nicht signifikant unterschiedliche Expression der Proteine Calsequestrin (CSQ) und GFP 7 Tage nach erfolgtem Gentransfer.

#### III.10 Hämodynamische Messung der Herzfunktion nach myokardialen S100A1 Gentransfer

Um die hämodynamischen Auswirkungen einer myokardialen in vivo S100A1 Überexpression zu evaluieren, wurde eine Linksherzkatheteruntersuchung durchgeführt. Die kardiale Kontraktilität wurde 7 Tage nach dem S100A1 Gentransfer gemessen. Die Linksherzkatheteruntersuchung mit der Messung der ersten Ableitung des ventrikulären Druckanstieges (+dP/dt) und des Druckabfalles (-dP/dt), des systolischen Ejektionsdruckes (SEP) und der Herzfrequenz (HF) wurde unter Basalbedingungen durchgeführt. Danach erfolgte die Messung der linksventrikulären Hämodynamik unter kontinuierlicher venöser Infusion von 0,1, 0,5 und 1,0 µg Isoproterenol pro kg KG pro Minute nach Einstellung eines hämodynamischen Gleichgewichtes. Die mit dem AdvS100A1 behandelten Kaninchen sowie die AdvGFP Kontrollgruppe zeigten einen dosisabhängigen, physiologischen Anstieg der +dP/dt, -dP/dt, SEP und der HF (Abb. III.35.D). Unter Basalbedingungen führte der adenovirale S100A1 Gentransfer zu keiner signifikanten Veränderung der ermittelten Parameter im Vergleich zu der AdvGFP Kontrollgruppe (Abb.III.35). Die β-adrenerge Stimulation mit 0,1 µg Isoproterenol pro kg KG pro Minute führte in der mit dem AdvS100A1 behandelten Gruppe zu einer im Vergleich mit der AdvGFP Kontrollgruppe signifikant gesteigerten Kontraktilität: +dP/dt (4756,6±178,9 mmHg/sec vs 3773±185,4 mmHg/sec, P<0.005), -dP/dt (2564±111,1 mmHg/sec vs 2237±98,9 mmHg/sec, P<0.05) und SEP (65,2, ±3,8 mmHg vs 55,1±1,8 mmHg, P<0.05), (Abb.III.35). Die gesteigerte myokardiale Kontraktilität der AdvS100A1 behandelten Tiere blieb unter einer höheren Dosis Isoproterenol erhalten (0,5µg Isoproterenol pro kg KG pro Minute): +dP/dt (5815,9±109 mmHg/sec vs 4818±198 mmHg/sec, P<0.005), -dP/dt (2965,3±93,4 mmHg/sec vs 2453±124,2 mmHg/sec, P<0.05), SEP (69,9±3,3 mmHg vs 59±2,1 mmHg, P<0.05), (Abb.III.35). Die Herzfrequenz unterschied sich unter Isoproterenolstimulation nicht signifikant zwischen der AdvS100A1 (279,6±10 min<sup>-1</sup> bzw. 297±9,8 min<sup>-1</sup>) und der AdvGFP Gruppe (249,3±7,6 min<sup>-1</sup> bzw. 280,8±9,6 min<sup>-1</sup>; ns), (Abb.III.35D). Die β-adrenerge Stimulation mit 1,0 µg Isoproterenol pro kg KG pro Minute führte in keiner der Versuchsgruppen zu einer weiteren signifikanten Steigerung der hämodynamischen Parameter. Die signifikant erhöhte myokardiale Kontraktilität der S100A1 behandelten Tiere, im Vergleich zu der AdvGFP behandelten Kontrollgruppe, blieb unter diesen Bedingungen erhalten: +dP/dt (5761,8±117 mmHg/sec vs 5106,1±176 mmHg/sec, P<0.05), -dP/dt (3059,5±97,4 mmHg/sec vs 2599,6±136,4 mmHg/sec,

### III. Ergebnisse

$P < 0.05$ ), SEP ( $72,25 \pm 3,1$  mmHg vs  $61,1 \pm 2,4$  mmHg,  $P < 0.05$ ), Herzfrequenz ( $285,75 \pm 11,4$   $\text{min}^{-1}$  vs  $286,6 \pm 9,3$   $\text{min}^{-1}$ ; ns), (Abb.III.35).

Abb.III.35A

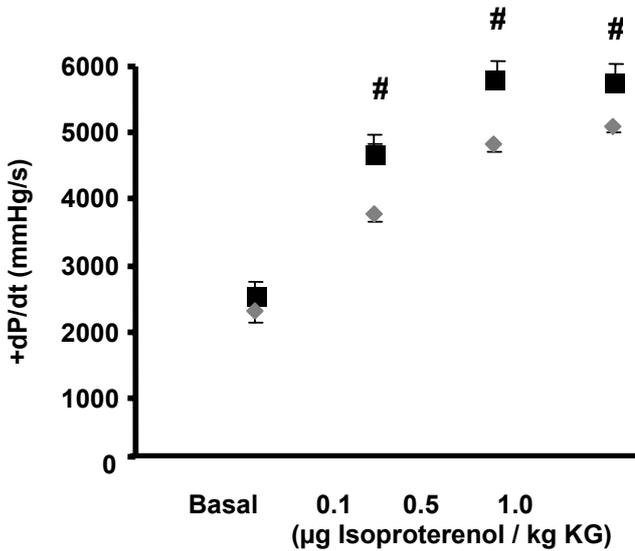


Abb.III.35A

Steigerung des maximalen linksventrikulären Druckanstieges pro Zeit (+dP/dt) unter Isoproterenolstimulation nach S100A1 Gentransfer (n=8). ■ AdvS100A1, ○ AdvGFP (n=11), #  $p < 0,05$ .

Abb.III.35B

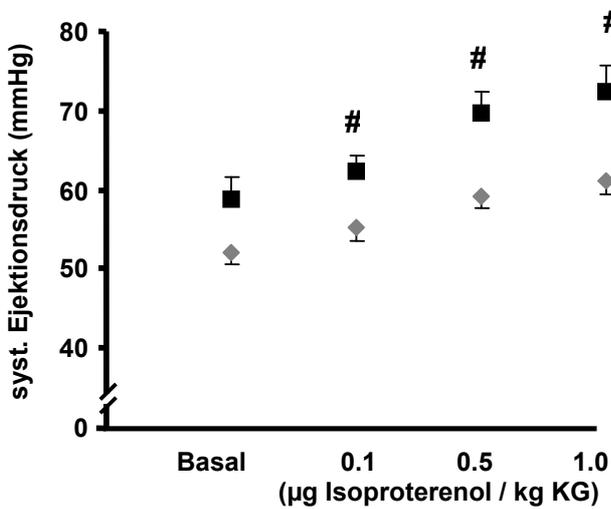


Abb.III.35C

Steigerung des maximalen systolischen linksventrikulären Ejektionsdruckes unter Isoproterenolstimulation nach S100A1 Gentransfer (n=8). ■ AdvS100A1, ○ AdvGFP (n=11), #  $p < 0,05$ .

Abb.III.35C

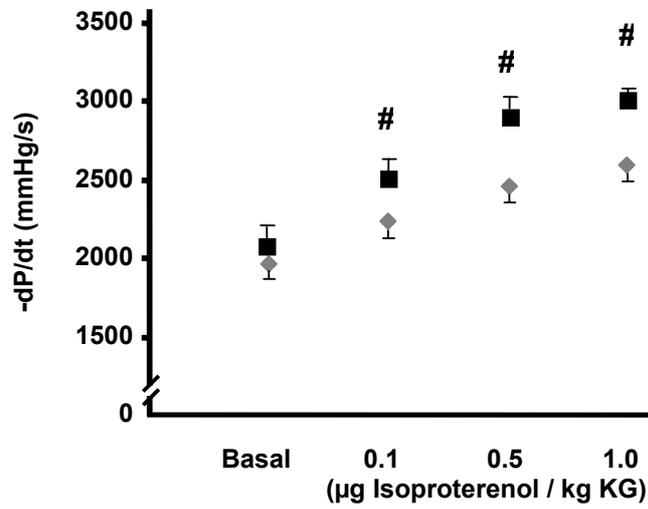


Abb.III.35B

Steigerung des maximalen linksventrikulären Druckabfalles pro Zeit (-dP/dt) unter Isoproterenolstimulation nach S100A1 Gentransfer (n=8). ■ AdvS100A1, ○ AdvGFP (n=11), # p<0,05.

Abb.III.35D

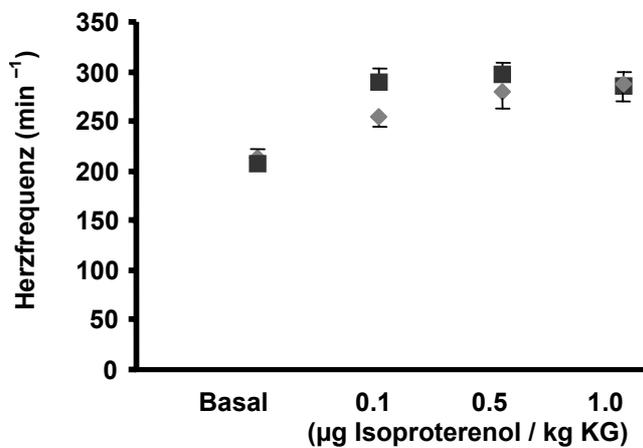


Abb.III.35D

Unveränderte Herzfrequenz unter basalen Bedingungen und Isoproterenolstimulation nach S100A1 Gentransfer (n=8). ■ AdvS100A1, ○ AdvGFP (n=11), # p<0,05.

### IV. Diskussion

Vor dem Hintergrund der Zunahme der Prävalenz der Herzinsuffizienz in den westlichen Nationen und einer weiterhin hohen 1 Jahres Mortalität von 9-12 % (NYHA II-III) bzw. von 52% (NYHA IV) (Cohn et al., 1991; The CONSENSUS Trial Study Group., 1987; The SOLVD Investigators., 1991) bieten neue therapeutische Ansätze, geschädigtes Myokard zu unterstützen oder durch Herzmuskelerersatzgewebe zu ersetzen eine Option in der zukünftigen Behandlung der chronischen Herzinsuffizienz. Somit könnte der Entwicklung neuer Therapieansätze, die über den bisherigen pharmakologischen Ansatz hinausgehend eine myokardiale Genaddition oder eine Herzmuskelerersatztherapie umfassen, eine wichtige Bedeutung zukommen.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung klinisch experimenteller Ansätze zur Therapie der Herzinsuffizienz unter Verwendung eines S100A1 Gentransfers. Hierfür wurde im Wesentlichen die Strategie eines myokardialen, adenoviralen S100A1 Gentransfers *in vivo* als auch einer adenoviralen S100A1 Genaddition in ein Herzmuskelerersatzgewebe *in vitro* etabliert.

#### IV.1 Funktionelle Testung des S100A1 rekombinanten Adenovirus (AdvS100A1)

Die funktionelle Testung der aufgereinigten Viruschargen erfolgte am Modell kultivierter, adulter Kardiomyozyten der Ratte. Hierbei konnte die positiv inotrope Wirkung des adenoviral vermittelt exprimierten S100A1, anhand der Kontraktilität der isolierten Kardiomyozyten, wie von Most et al. beschrieben (Most et al., 2001) nachvollzogen werden. So steigerte die 6,2±0,5-fache S100A1 Überexpression die Verkürzungs- und Relaxationsgeschwindigkeit sowie die prozentuale Verkürzung der Rattenkardiomyozyten signifikant. Die Daten der vorliegenden Arbeit stehen somit im Einklang mit der positiv inotropen Wirkung der S100A1 Überexpression an isolierten Kaninchenkardiomyozyten (Most et al., 2001). Der generierte S100A1 rekombinante Adenovirus war aus diesen Grund zur experimentellen Nutzung für klinisch therapeutische Ansätze einer S100A1 Gentherapie geeignet.

#### IV.2 Anwendung des AdvS100A1 zur Steigerung der myokardialen Kontraktilität

##### IV.2.1 S100A1 Gentransfer in *Engineered Heart Tissue* (EHT)

Das EHT stellt ein vielversprechendes Gewebe für eine potentielle Herzmuskelerersatztherapie dar, seitdem die Transplantation und Inkorporation von EHT's in den Rattenherzmuskel gezeigt werden konnte (Eschenhagen et al., 2002; Zimmermann et al., 2002a). Zimmermann et al konnten darüber hinaus zeigen, dass transplantierte EHT's kontrahierten, stark vaskularisiert und innerviert waren

sowie ihren Differenzierungsgrad während eines 28-tägigen Transplantationszeitraumes steigerten (Zimmermann et al., 2002a). Limitierend für den klinischen Einsatz der Herzmuskelerersatztherapie sind allerdings nach wie vor die fragliche elektrische Kopplung mit dem nativen Myokard (Reinecke et al., 1999), die Abstoßungsreaktion (Zimmermann et al., 2002a) und die geringe Kontraktionskraft der *in vitro* konstituierten Herzmuskelgewebe.

Die positiv inotropen Eigenschaften des Proteins S100A1 sollten genutzt werden, das EHT für die Herzmuskelerersatztherapie weiterzuentwickeln und in diesem Zusammenhang durch eine genetische Manipulation die geringe Kontraktionskraft der EHT's als Limitation für die myokardiale Gewebersersatztherapie zu überwinden. Vorausgehende Untersuchungen konnten die Steigerung der Kontraktions- und Relaxationsfähigkeit isolierter, adulter Kardiomyozyten nach adenoviral vermittelter S100A1 Überexpression zeigen (Most et al., 2001). Zurückzuführen sind diese Befunde auf eine Beeinflussung der intrazellulären Kalziumtransienten und der myofilamentären Kalziumsensitivität durch S100A1 (Most et al., 2001; Remppis et al., 2002). Darüber hinaus konnte unter *in vivo* Bedingungen an der S100A1 transgenen Maus eine signifikante Steigerung der myokardialen Kontraktilität gezeigt werden (Most et al., submitted). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stehen daher im Einklang mit diesen Studien und unterstützen den experimentellen Ansatz eines S100A1 Gentransfers im EHT, da durch die S100A1 Überexpression eine signifikante Steigerung der isometrischen Kontraktionskraft im Vergleich zu den Kontroll-EHT's erreicht werden konnte (Most et al., 2001; Pleger et al., 2002; Pleger et al., submitted).

Von besonderer Bedeutung ist, dass die  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit des Myokards bzw. der EHT's auch unter einer Überexpression von S100A1 voll erhalten bleibt, sodaß auch S100A1 genmanipulierte EHT's ihre Kontraktionsfähigkeit an eine gesteigerte Arbeitslast anpassen können. Offensichtlich ist eine ausreichend hohe S100A1 Expression sogar die Voraussetzung für die Anpassungsfähigkeit des Myokards an akute und chronische hämodynamischen Belastungen des Herzens, da Du et al. im homozygotem S100A1 knock-out Modell eine aufgehobene  $\beta$ -adrenerge Ansprechbarkeit des Myokards fanden (Du et al., 2002).

Die S100A1 überexprimierenden EHT's behielten darüber hinaus weiterhin die funktionellen Charakteristika von Rattenherzen wie von Eschenhagen et al beschrieben bei: eine positive Kraft-Vordehnungsbeziehung (Frank-Starling), eine kalziumabhängige (Kalziumtreppe) sowie eine  $\beta$ -adrenerg vermittelte Steigerung des inotropen Status (Eschenhagen et al., 1997).

Die vorliegenden Daten belegen also, dass die Manipulation der S100A1 Genexpression geeignet ist die geringe Kraftentfaltung des *Engineered Heart Tissues* (EHT), die als solche eine bedeutende Limitation dieses technischen Ansatzes zur myokardialen Gewebersatztherapie darstellt, zu überwinden. Dieses Merkmal könnte gerade während des initialen Transplantationszeitraumes von Vorteil sein, da Shimizu et al eine erhöhte elektrische Kopplung und Überlebenswahrscheinlichkeit bei höher entwickeltem konstituierten Herzmuskelgewebe nachweisen konnte (Shimizu et al., 2002).

Da die kontraktile Eigenschaften der EHT's auch ganz wesentlich durch die Konstitution verschiedener geometrischer Ausformungen beeinflusst werden kann (Zimmermann et al., 2000), ist zu hoffen, dass durch einen S100A1 Gentransfer in ein neuentwickeltes ringförmiges EHT eine weitere Verbesserung der myokardialen Gewebersatztherapie zu erzielen sein wird. Zur klinischen Realisierung der S100A1 Genaddition in Herzmuskelerersatzgewebe könnten ferner durch Anwendung eines adenoviral-assoziierten Gentransfersystems (AAV) die Abstoßungsreaktionen, als Antwort auf adenovirale Antigene, vermindert und die S100A1 Expressionsdauer optimiert werden (Chan et al., 1999; Shimpo et al., 2002).

#### **IV.2.2 Steigerung der myokardialen Kontraktilität durch einen S100A1 *in vivo* Gentransfer**

Einen weiteren neuen klinischen Therapieansatz zur Behandlung der Herzinsuffizienz stellt die Genterapie dar. Mit Hilfe einer selektiven Genaddition ermöglicht dieser Therapieansatz auf molekularer Ebene eine Unterstützung insuffizienten Myokards sowie eine gezielte Beeinflussung derjenigen pathophysiologischen Veränderungen, die der kontraktile Insuffizienz ursächlich zugrunde liegen (Isner, 2002). Aufgrund der gesteigerten myokardialen Expression des positiv inotropen kardialen Proteins S100A1 im Modell des moderaten chronisch-pulmonalen Hypertonus (Ehlermann et al., 2000) und der verminderten kardialen Expression von S100A1 in der dekompensierten Herzinsuffizienz (Remppis et al., 1996), erscheint eine Substitution des Proteins S100A1 therapeutisch vielversprechend. Die Möglichkeit einer myokardialen Kontraktilitätssteigerung durch Überexpression des Proteins S100A1 sollte daher unter *in vivo* Bedingungen mit einer klinisch experimentellen Technik untersucht werden. Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten hinsichtlich einer Verbesserung der myokardialen Funktion *in vivo* durch S100A1 Genaddition untermauert das Potential einer S100A1 Genterapie der Herzinsuffizienz (Pleger et al., 1999). Interessanterweise konnten Du et al im Modell der S100A1 knock-out Maus belegen, dass hohe S100A1 Gewebkonzentrationen Voraussetzung sind um eine Anpassung der Kontraktilität des Myokards an akute ( $\beta$ -adrenerge Stimulation) und chronische (aortales banding) hämodynamische Belastungen zu

ermöglichen (Du et al., 2002). Dieser Zusammenhang erklärt möglicherweise auch, dass die Kontraktilität der S100A1 gentherapierten Herzen unter Ruhebedingungen unverändert war, unter  $\beta$ -adrenerger Stimulation jedoch signifikant gesteigert werden konnte und gibt einen Hinweis auf eine Funktion von S100A1 als positiv inotropes Reserveprotein. Aufgrund der signifikant gesteigerten Hämodynamik S100A1 transgener Mäuse (Most et al., submitted) auch unter Basalbedingungen könnte der in den S100A1 gentherapierten Kaninchen beobachtete, von einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation abhängige Effekt, allerdings auch speziesspezifisch oder durch die nicht vollständig global, transmurale S100A1 Expression zustande kommen. Da die Herzfrequenz der AdvS100A1 behandelten Tiere im Vergleich zu der Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich war, kann ein positiv chronotroper Effekt (Bowditch-Phänomen) (Opie, 1998) als Ursache der gesteigerten kontraktilen Funktion des Herzmuskels unter Isoproterenolstimulation ausgeschlossen werden. Eine durch den adenoviralen Vektor bedingte Immunantwort wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Für die langfristige myokardiale S100A1 Überexpression stehen jedoch kürzlich entwickelte adeno-assoziierte virale (AAV) Expressionsysteme zur Verfügung, bei denen eine Immunantwort nicht zu erwarten ist (Asfour et al., 2002; Shimpko et al., 2002). Letzendlich wird der therapeutische Nutzen einer myokardialen S100A1 Gentherapie in einem *in vivo* Herzinsuffizienzmodell evaluiert werden müssen.

Die Resultate dieser Arbeit eröffnen somit neuartige Ansätze zur Therapie der Herzinsuffizienz. Zum einen belegen die gewonnenen Daten den Nutzen der positiv inotropen Effekte von S100A1 bei der Realisierung der klinischen Anwendung der Herzmuskelgewebersersatztherapie. Darüber hinaus zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit das Potential einer gesteigerten kontraktilen Funktion des Herzmuskels durch eine myokardiale S100A1 Gentherapie. Es ist somit zu hoffen, dass sich die myokardiale S100A1 Genaddition als neue Therapie der chronischen Herzinsuffizienz bewährt. Dies zu untersuchen wird Gegenstand weiterführender Forschungsarbeiten sein.

### Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Nutzung des Proteins S100A1 zur Entwicklung neuer Therapieansätze der Herzinsuffizienz. Grundlage der vorliegenden Arbeit waren Studien von Ehlermann (Ehlermann et al., 2000) und Remppis (Remppis et al., 1996), die eine differentielle Expression des Proteins S100A1 beim Übergang von einer kompensierten Hypertrophie in eine klinisch manifeste Herzinsuffizienz zeigen konnten. So war am Modell des moderaten chronisch-pulmonalen Hypertonus eine signifikant erhöhte S100A1 Proteinexpression nachzuweisen, während in der dekompensierten Herzinsuffizienz von Patienten die myokardiale Expression von S100A1 signifikant vermindert war.

Aufgrund der positiv inotropen kardialen Eigenschaften von S100A1 (Most et al., 2001) und seiner Funktion als inotropes Reserveprotein (Du et al., 2002) sollte daher die therapeutische Option einer Steigerung der myokardialen Kontraktilität durch eine S100A1 Überexpression untersucht werden. Um diese Fragestellung bearbeiten zu können, wurde ein S100A1 rekombinanter Adenovirus (AdvS100A1) konstruiert, der funktionell zunächst am Modell isolierter, adulter Kardiomyozyten der Ratte getestet wurde (Remppis et al., 2002). Mit Hilfe des AdvS100A1 wurde sodann die Strategie einer S100A1 Genaddition an einem *in vitro* rekonstituierten Herzmuskelgewebsverbandes (EHT) sowie am Myokard unter *in vivo* Bedingungen verfolgt.

Mit der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal das therapeutische Potential eines adenoviralen S100A1 Gentransfers gezeigt werden. Die Überexpression des Proteins steigerte die isometrische Kontraktionskraft der EHT's ohne die physiologischen Eigenschaften der *ex vivo* rekonstituierten Herzmuskelgewebeverbände zu verändern (Most et al., 2001; Pleger et al., submitted). Darüber hinaus blieb die durch die S100A1 Genaddition gesteigerte Kontraktilität der EHT's auch unter positiv inotroper Intervention mit Kalzium und Katecholaminen erhalten.

In einem weiteren Schritt konnte mit Hilfe der intrakoronaren Applikation des S100A1 rekombinanten Adenovirus unter *in vivo* Bedingungen eine robuste, globale myokardiale S100A1 Überexpression erreicht werden. Die Kontraktilität der gesunden Kaninchenherzen war hierbei durch die S100A1 Überexpression unter Basalbedingungen nicht verändert. Unter akuten hämodynamischen Steß, im Sinne einer  $\beta$ -adrenergen Stimulation, steigerte der myokardiale S100A1 Gentransfer jedoch die kontraktile Funktion des Herzmuskels signifikant (Pleger et al., 1999), sodaß in diesem Modell die Funktion von S100A1 als positiv inotropes Reserveprotein bestätigt werden konnte. Da die vermehrte S100A1 Expression keinen Einfluß auf die Chronotropie hatte, kann eine Beeinflussung der

Herzfrequenz als Ursache der potenzierten Wirkung von Isoproterenol durch S100A1 ausgeschlossen werden.

Mit den vorliegenden Experimenten ist es also gelungen zum einen das *Engineered Heart Tissue* (EHT) als Option zur myokardialen Gewebersersatztherapie weiterzuentwickeln und die erhebliche Limitation einer zu geringen Kraftentwicklung zu minimieren. Somit könnte die S100A1 Genaddition einen Beitrag zur klinischen Realisierung der Herzmuskelgewebersersatztherapie leisten.

Ferner konnte anhand der Etablierung des myokardialen S100A1 *in vivo* Gentransfers am Kaninchen gezeigt werden, dass mit einer genetischen Manipulation der S100A1 Expression prinzipiell die Möglichkeit der Steigerung der kontraktile Funktion des Myokards besteht. Mit diesen Daten ist nunmehr ausreichend Evidenz geschaffen, um in weiteren Studien an Herzinsuffizienzmodellen die Rekonstitution der eingeschränkten kontraktile Funktion und somit den therapeutischen Nutzen einer S100A1 Genterapie im Sinne eines „proof of principle“ zu belegen.

**VI. Abkürzungsverzeichnis**

Adv	Adenovirus
AdvGFP	GFP rekombinanter Adenovirus
AdvS100A1	S100A1 rekombinanter Adenovirus
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CaCl <sub>2</sub>	Kalziumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosintriphosphat
cDNA	klonierte Desoxyribonukleinsäure
CMV	Cytomegalievirus
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CS%	prozentuale Zellverkürzung
CsCl	Cäsiumchlorid
CSQ	Calsequestrin
DME	Dulbecco`s modifiziertes Eagle`s Medium
DTT	Dithiothitol
DHPR	Dihydropyridinrezeptor
EDTA	Ethylenediamintetraacetat
EHT	Engineered Heart Tissue
FCS	Fetales Kälberserum
GFP	Grün Fluoreszierendes Protein
HEK	Humane Embryonale Nierenkarzinomzellen
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2ethanesulfonsäure
HF	Herzfrequenz
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
ICR	Interkostalraum
IgG	Immunglobulin G
KCl	Kaliumchlorid
kB	Kilobasen

## VI. Abkürzungsverzeichnis

---

kD	Kilodalton
KHK	koronare Herzerkrankung
LV	linker Ventrikel
MCS	Multiklonierungseinheit
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
M 199	Medium 199
MOI	Multiplicity of Infection
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natriumhydrogencarbonat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NEB	New England Biolabs
NO	Stickstoffmonoxid
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
PBS	Phosphat-Natriumchlorid Puffer
PFU	Plaque Forming Units
PLB	Phospholamban
PVDF	Polyvinylidenefluoridmembran
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RyR	Ryanodin Rezeptor
SEP	systolischer Ejektionsdruck
SDS-Page	Sodium-dodecyl-sulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese
SERCA	Sarko(endo)plasmatische Retikulum Kalzium-ATPase
SL	Sarkolemm
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TAE	TRIS-Essigsäure
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
UV	Ultraviolett
VED	Video Edge Detection
WT	Wild-Typ

**VII. Literaturverzeichnis**

Akhter, S. A., Skaer, C. A., Kypson, A. P., McDonald, P. H., Peppel, K. C., Glower, D. D., Lefkowitz, R. J., and Koch, W. J. (1997). Restoration of beta-adrenergic signaling in failing cardiac ventricular myocytes via adenoviral-mediated gene transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 12100-12105.

Allore, R., O'Hanlon, D., Price, R., Neilson, K., Willard, H. F., Cox, D. R., Marks, A., and Dunn, R. J. (1988). Gene encoding the beta subunit of S100 protein is on chromosome 21: implications for Down syndrome. *Science* *239*, 1311-1313.

Anversa, P., Kajstura, J., and Olivetti, G. (1996). Myocyte death in heart failure. *Curr Opin Cardiol* *11*, 245-251.

Asfour, B., Baba, H. A., Scheld, H. H., Hruban, R. H., Hammel, D., and Byrne, B. J. (2002). Uniform Long-Term Gene Expression using Adeno-Associated Virus (AAV) by Ex Vivo Recirculation in Rat-Cardiac Isografts. *Thorac Cardiovasc Surg* *50*, 347-350.

Bashir, R., Vale, P. R., Isner, J. M., and Losordo, D. W. (2002). Angiogenic gene therapy: pre-clinical studies and phase I clinical data. *Kidney Int* *61 Suppl 1*, 110-114.

Birnboim, H. C. (1983). A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol* *100*, 243-255.

Callewaert, G. (1992). Excitation-contraction coupling in mammalian cardiac cells. *Cardiovasc Res* *26*, 923-932.

Cauthen R, S. K. (1999). Construction of Mouse Adenovirus Type 1 Mutants. *Methods in Molecular Medicine*, Humana Press Inc, New Jersey, USA *Adenovirus Methods and Protocols*, 85-103.

## VII. Literaturverzeichnis

---

Chan, S. Y., Li, K., Piccotti, J. R., Louie, M. C., Judge, T. A., Turka, L. A., Eichwald, E. J., and Bishop, D. K. (1999). Tissue-specific consequences of the anti-adenoviral immune response: implications for cardiac transplants. *Nat Med* 5, 1143-1149.

Cohn, J. N., Johnson, G., Ziesche, S., Cobb, F., Francis, G., Tristani, F., Smith, R., Dunkman, W. B., Loeb, H., Wong, M., and et al. (1991). A comparison of enalapril with hydralazine-isosorbide dinitrate in the treatment of chronic congestive heart failure. *N Engl J Med* 325, 303-310.

Donato, R. (1991). Perspectives in S-100 protein biology. Review article. *Cell Calcium* 12, 713-726.

Donato, R. (2001). S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. *Int J Biochem Cell Biol* 33, 637-668.

Drohat, A. C., Baldisseri, D. M., Rustandi, R. R., and Weber, D. J. (1998). Solution structure of calcium-bound rat S100B(beta-beta) as determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Biochemistry* 37, 2729-2740.

Du, X. J., Cole, T. J., Tennis, N., Gao, X. M., Kontgen, F., Kemp, B. E., and Heierhorst, J. (2002). Impaired cardiac contractility response to hemodynamic stress in S100A1- deficient mice. *Mol Cell Biol* 22, 2821-2829.

Ehlermann, P., Redweik, U., Blau, N., Heizmann, C. W., Katus, H. A., and Remppis, A. (2001). Separation of low molecular weight proteins with SDS-PAGE using taurine as a new trailing ion. *Gen Physiol Biophys* 20, 203-207.

Ehlermann, P., Remppis, A., Guddat, O., Weimann, J., Schnabel, P. A., Motsch, J., Heizmann, C. W., and Katus, H. A. (2000). Right ventricular upregulation of the Ca<sup>2+</sup> binding protein S100A1 in chronic pulmonary hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1500, 249-255.

## VII. Literaturverzeichnis

---

Eschenhagen, T., Didie, M., Heubach, J., Ravens, U., and Zimmermann, W. H. (2002). Cardiac tissue engineering. *Transpl Immunol* 9, 315-321.

Eschenhagen, T., Fink, C., Remmers, U., Scholz, H., Wattchow, J., Weil, J., Zimmermann, W., Dohmen, H. H., Schafer, H., Bishopric, N., *et al.* (1997). Three-dimensional reconstitution of embryonic cardiomyocytes in a collagen matrix: a new heart muscle model system. *Faseb J* 11, 683-694.

Francis, S. C., Raizada, M. K., Mangi, A. A., Melo, L. G., Dzau, V. J., Vale, P. R., Isner, J. M., Losordo, D. W., Chao, J., Katovich, M. J., and Berecek, K. H. (2001). Genetic targeting for cardiovascular therapeutics: are we near the summit or just beginning the climb? *Physiol Genomics* 7, 79-94.

Groves, P., Finn, B. E., Kuznicki, J., and Forsen, S. (1998). A model for target protein binding to calcium-activated S100 dimers. *FEBS Lett* 421, 175-179.

Gwathmey, J. K., Copelas, L., MacKinnon, R., Schoen, F. J., Feldman, M. D., Grossman, W., and Morgan, J. P. (1987). Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patients with end-stage heart failure. *Circ Res* 61, 70-76.

Haimoto, H., and Kato, K. (1988). S100a0 (alpha alpha) protein in cardiac muscle. Isolation from human cardiac muscle and ultrastructural localization. *Eur J Biochem* 171, 409-415.

Hajjar, R. J., del Monte, F., Matsui, T., and Rosenzweig, A. (2000). Prospects for gene therapy for heart failure. *Circ Res* 86, 616-621.

Hata, J. A., Maurice, J. P., Shah, A. S., White, D. C., McDonald, P. H., Dolber, P. C., Wilson, K. H., Lefkowitz, R. J., Glower, D. D., and Koch, W. J. (1999). Enhancement of cardiac function after adenoviral-mediated in vivo intracoronary beta2-adrenergic receptor gene delivery. *J Clin Invest* 104, 21-29.

## VII. Literaturverzeichnis

---

He, T. C., Zhou, S., da Costa, L. T., Yu, J., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2509-2514.

Hedgepath KR, Mukherjee R, Wang Z, Spinale FG (1997): The relation between changes in myocyte orientation and contractile function with electrical field stimulation.

*Basic Res Cardiol* 92: 385-90.

Heizmann, C. W., and Cox, J. A. (1998). New perspectives on S100 proteins: a multi-functional Ca(2+)-, Zn(2+)- and Cu(2+)-binding protein family. *Biometals* 11, 383-397.

Ho, K. K., Anderson, K. M., Kannel, W. B., Grossman, W., and Levy, D. (1993). Survival after the onset of congestive heart failure in Framingham Heart Study subjects. *Circulation* 88, 107-115.

Huxley, H. E. (1990). Sliding filaments and molecular motile systems. *J Biol Chem* 265, 8347-8350.

Isner, J. M. (2002). Myocardial gene therapy. *Nature* 415, 234-239.

Kannel, W. B., and Belanger, A. J. (1991). Epidemiology of heart failure. *Am Heart J* 121, 951-957.

Kato, K., and Kimura, S. (1985). S100ao (alpha alpha) protein is mainly located in the heart and striated muscles. *Biochim Biophys Acta* 842, 146-150.

Kerkhoff, C., Klempt, M., Kaefer, V., and Sorg, C. (1999). The two calcium-binding proteins, S100A8 and S100A9, are involved in the metabolism of arachidonic acid in human neutrophils. *J Biol Chem* 274, 32672-32679.

Kiewitz, R., Lyons, G. E., Schafer, B. W., and Heizmann, C. W. (2000). Transcriptional regulation of S100A1 and expression during mouse heart development. *Biochim Biophys Acta* 1498, 207-219.

## VII. Literaturverzeichnis

---

Lee, S. W., Tomasetto, C., Swisshelm, K., Keyomarsi, K., and Sager, R. (1992). Down-regulation of a member of the S100 gene family in mammary carcinoma cells and reexpression by azadeoxycytidine treatment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2504-2508.

Lompre, A. M., Anger, M., and Levitsky, D. (1994). Sarco(endo)plasmic reticulum calcium pumps in the cardiovascular system: function and gene expression. *J Mol Cell Cardiol* 26, 1109-1121.

Marks, A. R. (2000). Cardiac intracellular calcium release channels: role in heart failure. *Circ Res* 87, 8-11.

Matsumura, H., Shiba, T., Inoue, T., Harada, S., and Kai, Y. (1998). A novel mode of target recognition suggested by the 2.0 Å structure of holo S100B from bovine brain. *Structure* 6, 233-241.

McMurray, J. J., Ray, S. G., Abdullah, I., Dargie, H. J., and Morton, J. J. (1992). Plasma endothelin in chronic heart failure. *Circulation* 85, 1374-1379.

Moews, P. C., and Kretsinger, R. H. (1975). Refinement of the structure of carp muscle calcium-binding parvalbumin by model building and difference Fourier analysis. *J Mol Biol* 91, 201-225.

Most, P., Bernotat, J., Ehlermann, P., Pleger, S. T., Reppel, M., Borries, M., Niroomand, F., Pieske, B., Janssen, P. M., Eschenhagen, T., *et al.* (2001). S100A1: a regulator of myocardial contractility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13889-13894.

Most, P., Remppis, A., Löffler, E., Ehlermann, P., Pleger, S. T., Mao, L., Rockman, H. A., Duncan, S. J., Kleuss, C., Ruiz, P., *et al.* (submitted). Transgenic overexpression of the Ca<sup>2+</sup> binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance.

Opie (1998). Ventricular Function. *The Heart Physiology from Cell to Circulation* 3. *Aufl.*, 343-389.

## VII. Literaturverzeichnis

---

Packer, M., Coats, A. J., Fowler, M. B., Katus, H. A., Krum, H., Mohacsi, P., Rouleau, J. L., Tendera, M., Castaigne, A., Roecker, E. B., *et al.* (2001). Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 344, 1651-1658.

Passey, R. J., Xu, K., Hume, D. A., and Geczy, C. L. (1999). S100A8: emerging functions and regulation. *J Leukoc Biol* 66, 549-556.

Persechini, A., Moncrief, N. D., and Kretsinger, R. H. (1989). The EF-hand family of calcium-modulated proteins. *Trends Neurosci* 12, 462-467.

Piper HM, V. A., Schwartz P (1990). Adult Rat Heart Cells. *Cell Culture Techniques in Heart and Vessel Research*, 36-60.

Pleger ST, Manning B., Hata J, Most P, Ehlermann P, Koch WJ, Katus HA, Remppis A (1999). Increased heart function by S100A1 gene therapy. *Eur Heart J* 20 (*Suppl.*), 374 (Abstract).

Pleger ST, Most P., Lindenkamp J, Ehlermann P, Koch WJ, Katus HA, Remppis A (2002). S100A1 gene transfer augments contractile performance of engineered heart tissue (EHT). *Circulation* 106, I-539 (Abstract).

Pleger ST, Remppis A., Most P, Lindenkamp J, Ehlermann P, Löffler EK, Weichenhan D, Zimmermann W, Eschenhagen T, Koch WJ, Katus HA (submitted). Genetic modification of engineered heart tissue (EHT): S100A1 gene transfer strengthens EHT.

Reinecke, Z., Bartosek, Murry (1999). Survival, Integration, and Differentiation of Cardiomyocyte Grafts. *Circulation* 100, 193-202.

Remppis, A., Greten, T., Schafer, B. W., Hunziker, P., Erne, P., Katus, H. A., and Heizmann, C. W. (1996). Altered expression of the Ca(2+)-binding protein S100A1 in human cardiomyopathy. *Biochim Biophys Acta* 1313, 253-257.

Remppis, A., Most, P., Löffler, E., Ehlermann, P., Bernotat, J., Pleger, S. T., Börries, M., Repper, M., Fischer, J., Koch, W. J., *et al.* (2002). The small EF-hand  $\text{Ca}^{2+}$  binding protein S100A1 increases contractility and  $\text{Ca}^{2+}$  cycling in rat cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 97, 1/56-1/62.

Rich, M. W. (1997). Epidemiology, pathophysiology, and etiology of congestive heart failure in older adults. *J Am Geriatr Soc* 45, 968-974.

Ringer, S. (1885). A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J Physiol (Lond)* 4, 29-42.

Sambrook, J. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Molecular Cloning: A Laboratory Manual *second edition*, 1.53-51.73.

Schafer, B. W., and Heizmann, C. W. (1996). The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. *Trends Biochem Sci* 21, 134-140.

Shah, A. S., White, D. C., Emani, S., Kypson, A. P., Lilly, R. E., Wilson, K., Glower, D. D., Lefkowitz, R. J., and Koch, W. J. (2001). In vivo ventricular gene delivery of a beta-adrenergic receptor kinase inhibitor to the failing heart reverses cardiac dysfunction. *Circulation* 103, 1311-1316.

Shimizu, T., Yamato, M., Isoi, Y., Akutsu, T., Setomaru, T., Abe, K., Kikuchi, A., Umezumi, M., and Okano, T. (2002). Fabrication of pulsatile cardiac tissue grafts using a novel 3- dimensional cell sheet manipulation technique and temperature- responsive cell culture surfaces. *Circ Res* 90, e40.

Shimpo, M., Ikeda, U., Maeda, Y., Takahashi, M., Miyashita, H., Mizukami, H., Urabe, M., Kume, A., Takizawa, T., Shibuya, M., *et al.* (2002). AAV-mediated VEGF gene transfer into skeletal muscle stimulates angiogenesis and improves blood flow in a rat hindlimb ischemia model. *Cardiovasc Res* 53, 993-1001.

The CONSENSUS Trial Study Group (1987). Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The CONSENSUS Trial Study Group. *N Engl J Med* 316, 1429-1435.

The SOLVD Investigators. (1991). Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. The SOLVD Investigators. *N Engl J Med* 325, 293-302.

Tollefson AE, H. T. (1999). Preparation and Titration of CsCl-Banded Adenovirus Stock. *Methods in Molecular Medicine*, Humana Press Inc, New Jersey, USA *Adenovirus Methods and Protocols*, 1-9.

Tulchinsky, E., Kramerov, D., Ford, H. L., Reshetnyak, E., Lukanidin, E., and Zain, S. (1993). Characterization of a positive regulatory element in the mts1 gene. *Oncogene* 8, 79-86.

Wang, Z., Zhang, H., Ding, Y., Wang, G., Wang, X., Ye, S., Bartlam, M., Tang, H., Liu, Y., Jiang, F., *et al.* (2001). Preliminary X-ray crystallographic analysis of a Ca<sup>2+</sup>-binding protein human S100A1. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 57, 882-883.

Webster, D. R., and Patrick, D. L. (2000). Beating rate of isolated neonatal cardiomyocytes is regulated by the stable microtubule subset. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H1653-1661.

Wilson, G. (1993). The NEB Transcript. *The NEB Transcript* 5:1, 1-5.

Yamazaki, T., and Yazaki, Y. (1997). [Molecular mechanism of cardiac hypertrophy and dysfunction]. *Nippon Rinsho* 55, 1988-1993.

Zannad, F., Braincon, S., Juilliere, Y., Mertes, P. M., Villemot, J. P., Alla, F., and Virion, J. M. (1999). Incidence, clinical and etiologic features, and outcomes of advanced chronic heart failure: the EPICAL Study. *Epidemiologie de l'Insuffisance Cardiaque Avancee en Lorraine. J Am Coll Cardiol* 33, 734-742.

## VII. Literaturverzeichnis

---

Zimmer, D. B., Cornwall, E. H., Landar, A., and Song, W. (1995). The S100 protein family: history, function, and expression. *Brain Res Bull* 37, 417-429.

Zimmermann, W. H., Didie, M., Wasmeier, G. H., Nixdorff, U., Hess, A., Melnychenko, I., Boy, O., Neuhuber, W. L., Weyand, M., and Eschenhagen, T. (2002a). Cardiac grafting of engineered heart tissue in syngenic rats. *Circulation* 106, 1151-157.

Zimmermann, W. H., Fink, C., Kralisch, D., Remmers, U., Weil, J., and Eschenhagen, T. (2000). Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* 68, 106-114.

Zimmermann, W. H., Schneiderbanger, K., Schubert, P., Didie, M., Munzel, F., Heubach, J. F., Kostin, S., Neuhuber, W. L., and Eschenhagen, T. (2002b). Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 90, 223-230.

### VIII. Danksagung

Herrn **Dr. med. P. Most** möchte ich für sein Engagement bezüglich meiner wissenschaftlichen Ausbildung und für seine konstruktive Kritik bei der Entwicklung und Umsetzung wissenschaftlicher Konzepte danken. Die Zusammenarbeit mit Ihm hat zu der Weiterentwicklung meiner Persönlichkeit beigetragen. Herrn **Prof. Dr. med. H.A. Katus** möchte ich für die Überlassung des Themas und insbesondere für die hervorragende Unterstützung meiner klinischen und wissenschaftlichen Ausbildung sowie für das in mich gesetzte Vertrauen sehr herzlich danken. In gleicher Weise gilt auch mein Dank Herrn **PD Dr. med. B.A. Remppis** für das in mich gesetzte Vertrauen, die fruchtbaren wissenschaftlichen Diskussionen, die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe tätig zu sein und für den Freiraum, den er mir bei der Durchführung dieser Arbeit gewährt hat. Herrn **Prof. Dr. rer. nat. W.J. Koch** (Duke University, USA) möchte ich herzlich für die konstruktive Unterstützung während meines Aufenthaltes in seinem Labor bei der Durchführung der myokardialen in vivo Gentherapie danken. Herrn **Prof. Dr. med. T. Eschenhagen** (Universität Hamburg) möchte ich herzlich für die fruchtbaren Diskussionen und die Unterstützung bezüglich des Erlernens der Konstitution der engineered heart tissue`s (EHT`s) im Rahmen meines Aufenthaltes in seinem Labor danken. Mein freundschaftlicher Dank gilt Herrn **Dr. med. P.B.H. Ehlermann** für die hervorragende Zusammenarbeit. In besonderer Weise möchte ich mich bei Frau **Wiebke Bubert** für die wichtige private Unterstützung und Ihr Verständnis bedanken, auf das ich mich jederzeit verlassen konnte.

## Curriculum Vitae

---

### Persönliche Daten:

Name: Sven Torsten Pleger  
Geburtsdatum: 03.07.1973  
Geburtsort: Bremen  
Vater: Karl-Heinz Pleger  
Mutter: Christa Pleger, geb. Brandin  
Familienstand: ledig  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### Schulischer Werdegang:

August 1980 - Juni 1984 Findorff Grundschule in Osterholz-Scharmbeck  
August 1984 – Juni 1986 Orientierungsstufe in Osterholz-Scharmbeck  
August 1986 – Mai 1993 Gymnasium in Osterholz-Scharmbeck  
10. Mai 1993 Hochschulreife

### Ersatzdienst:

Juli 1993 – September 1994 Betreuung bosnischer Flüchtlinge

### Universitärer Werdegang:

Studium der Humanmedizin  
Oktober 1994 – Juni 2001 Medizinische Universität zu Lübeck

### Arzt im Praktikum:

August 2001 – März 2002 Medizinische Klinik II, MUZL  
März 2002 – Januar 2003 Medizinische Klinik III, Universität Heidelberg

### Assistenzarzt:

Seit Februar 2003 Medizinische Klinik III, Universität Heidelberg

### Stipendien und Auszeichnungen:

Stipendien des Boehringer Ingelheim Fonds als finanzielle Unterstützung für das Erlernen von Gentransferstrategien in Myokard an in vivo Modellen (2000).

Ludolph-Brauer-Posterpreis der Nordwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin für die Arbeit „S100A1 Gentherapie steigert die myokardiale Kontraktilität“. (Pleger ST, Manning BS, Hata J, Most P, Koch WJ, Katus HA, Remppis A.). Hamburg, 2000.

### Publikationsliste

1. Most P, Bernotat J, Ehlermann P, **Pleger ST**, Reppel M, Boerries M, Niroomand F, Pieske B, Janssen PML, Eschenhagen T, Karczewski P, Smith GL, Koch WJ, Katus HA, Remppis A. S100A1: A novel regulator of myocardial contractility. Proc Natl Acad Sci USA. 2001 Nov 20;98(24):13889-94.
2. Remppis A, Most P, Löffler EK, Ehlermann P, Bernotat J, **Pleger ST**, Börries M, Reppel M, Fischer J, Koch WJ, Smith GL, Katus HA. The small EF-hand Ca<sup>2+</sup> binding protein S100A1 increases contractility and Ca<sup>2+</sup> cycling in rat cardiac myocytes. Volume 97, Issue 7, pp I56-I62. Basic Research in Cardiology.
3. Most P\*, Remppis A\*, Löffler EK, Ehlermann P, **Pleger ST**, Bernotat J, Kleuss C, Heierhorst J, Karczewski P, Mao L, Rockman H, Duncan SJ, Koch WJ, Katus HA. Transgenic overexpression of the Ca<sup>2+</sup> binding protein S100A1 in the heart leads to increased in vivo myocardial contractile performance. Submitted to JCI.
4. Most P\*, Remppis A\*, Weber C, Bernotat J, Ehlermann P, **Pleger ST**, Kirsch W, Uttenweiler D, Smith GL, Katus HA, Fink RHA. S100A1 modulates isometric force development and sarcoplasmic reticulum function in mammalian skeletal muscle fibres. Submitted to JBC.
5. **Pleger ST\***, Remppis A\*, Most P, Lindenkamp J, Ehlermann P, Löffler EK, Weichenhan D, Zimmermann W, Eschenhagen T, Koch WJ, Katus HA. Genetic modification of engineered heart tissue (EHT): S100A1 gene transfer strengthens EHT. Submitted to Cardiovascular Research.

\* both authors contributed equally

### Ausgewählte nationale und internationale Kongreßbeiträge

1. **Pleger ST**, Manning BS, Hata J, Most P, Koch WJ, Katus HA, Remppis A. S100A1 Gentherapie steigert die myokardiale Kontraktilität. Nordwestdeutsche Tagung für Innere Medizin, Hamburg, 2000, Verleihung des Ludolph-Brauer Posterpreises 2000.
2. **Pleger ST**, Weil J, Most P, Ehlermann P, Boerries M, Eschenhagen T, Remppis A, Katus HA. S100A1 Gentransfer steigert die Kontraktilität an einem neuen Modell eines rekonstituierten Herzmuskelgewebsverbandes. Zeitschrift für Kardiologie, Band 89, Supplement 5 (2000) (Abstract 1253).
3. Most P, **Pleger ST**, Koch WJ, Pieske B, Katus HA, Remppis A. Steigerung der Kontraktilität in adulten Kardiomyozyten der Ratte und des Kaninchens nach adenoviralen Gentransfer von S100A1. Zeitschrift für Kardiologie, Band 89, Supplement 5 (2000) (Abstract 607)
4. **Pleger ST**, Weil J, Most P, Ehlermann P, Eschenhagen T, Remppis A, Katus HA. S100A1 gene addition increases contractility of an engineered heart tissue (EHT). Eur Heart J 21 (Suppl.): 472 (Abstract).
5. Most P, Bernotat J, **Pleger ST**, Ehlermann P, Pieske B, Smith GL, Katus HA, Remppis A. S100A1 improves cardiac contractility by increasing SERCA2a activity. Eur Heart J 22 (Suppl.): 940 (Abstract).
6. **Pleger ST**, Lindenkamp J, Löffler EK, Most P, Eschenhagen T, Koch WJ, Katus HA, Remppis A. S100A1 gene transfer augments Frank-Starling mechanism,  $Ca^{2+}$  and  $\beta$ -adrenergic response in engineered heart tissue (EHT). (2002) Eur Heart J 23 (Suppl.): 1725 (Abstract).
7. **Pleger ST**, Most P, Lindenkamp J, Ehlermann P, Koch WJ, Remppis A. S100A1 gene transfer augments contractile performance of engineered heart tissue (EHT). Circulation 106 (19 Suppl.): I-539 (Abstract).