

I. Medizinische Klinik und Poliklinik der
Technischen Universität München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

Gentherapeutischer Ansatz zur Expression heterologer Rezeptoren im Herzen

Peter Ueblacker

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. A. Schömig
2. Univ.-Prof. Dr. B. Gänsbacher

Die Dissertation wurde am 16.11.2000 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 07.02.2001 angenommen.

meinen Eltern
in Liebe und Dankbarkeit

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

AAV	Adeno-assoziiertes Virus
AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
Ad	Adenovirus
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ANP	Atrial Natriuretic Peptide
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AVP	Arginin-Vasopressin
β-Gal	Beta-Galaktosidase
bp	base pairs
BNP	Brain Natriuretic Peptide
°C	Grad Celsius
cAMP	Adenosin 3':5'-cyclic-Monophosphat
cDNA	complementary-Desoxyribonukleinsäure
Ci, mCi	Curie, Mikrocurie
CK	Creatinkinase
CMV	Cytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
COS-Zellen	CV1-Origin-SV40-Zellen
CsCl	Cäsiumchlorid
Da, kDa	Dalton, Kilodalton
DAG	1,2 Diacylglycerol
dest.	destilliert
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA/DNS	Desoxyribonukleinsäure
dp/dt _{max}	linksventrikulärer Druckerhöhung als Funktion der Zeit
D-PBS	Dulbeccos' Phosphate Buffered Saline

E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamino-Tetraacetat
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
et al.	et altera
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Erdbeschleunigung ($1g = 9,8 \text{ m/s}^2$)
g, mg, μg , ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
GFP	Green Fluorescent Protein
h	Stunde
$^3\text{H-cAMP}$	tritiertes cAMP
HBSS	Hanks Balanced Salt Solution
HCl	Salzsäure
HEK-Zellen	Human Embryonic Kidney Cells
HeLa-Zellen	Human Epitheloid Carcinoma Cells
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]Piperazin-N[2-Ethansulfonsäure])
IBMX	3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin
IP_3	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IRES	Internal Ribosome Entry Site
ISA	Intrinsische Sympathomimetische Aktivität
ITR	Inverted Terminal Repeats
IU	Infectious Unit
Kan	Kanamycin
KB-Zellen	Human Epidermal Carcinoma Cells
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
l, ml, μl	Liter, Milliliter, Mikroliter
lacZ	Beta-Galaktosidase-Gen
LVP	Left Ventricular Pressure
MgCl_2	Magnesiumchlorid
min	Minute
mmol, μmol , nmol	Millimol, Mikromol, Nanomol
mM, μM , nM	millimolar, mikromolar, nanomolar
MOI	Multiplicity Of Infection

mRNA/mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natronlauge
NYHA	New York Heart Association
ORF	Open Reading Frame
Ori	Origin
PCR	Polymerase Chain Reaction
pfu	plaque forming unit
PK	Proteinkinase
PLP	Parathyroidhormon-Like Protein
polyA	poly-Adenylation
PTH	Parathormon
PTH1-R	Parathormon/Parathormon-related-Protein-1-Rezeptor
PTHrP	Parathormon-related Protein
rAAV	rekombinanter Adeno-assoziiertes Virus
rAd	rekombinanter Adenovirus
RIA	Radio Immuno Assay
RNA/RNS	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
SAP	Shrimps Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SV40	Simian Virus
TBE	Tris Borat-EDTA
TCA	Trichlor-Acetic Acid
TE	Tris-EDTA
U	Unit
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V, mV	Volt, Millivolt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	Einleitung	8
2.	Methoden und Materialien	14
2.1.	Theoretische Überlegungen	14
2.2.	Polymerase-Kettenreaktion	15
2.3.	Umklonierung	15
2.3.1.	Restriktion	15
2.3.2.	Gelextraktion	16
2.3.3.	Ligationsansatz	17
2.3.4.	Transformation	17
2.4.	Reinigung und Anreicherung der DNA	18
2.5.1.	Herstellung rekombinanter Adenoviren	18
2.5.2.	Präparation größerer Adenoviren-Titer	21
2.6.1.	Herstellung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren - Transfektion in 293-Zellen	21
2.6.2.	Konzentrierung der rAAV Partikel	24
2.6.3.	Reinigung der rAAV Partikel	24
2.7.	Zellkultur und Zellsplitting	24
2.8.	Liposomale Transfektion	25
2.9.1.	Infektion von H9c2-Kardiomyoblasten mit Ad-βGal	25
2.9.2.	Färbung mit dem Chromogen X-Gal	26
2.10.	Infektion von HEK-Zellen mit AAVgfp	26
2.11.1.	Prinzip des cAMP-Assays	26
2.11.2.	cAMP-Assay - Versuch	27
2.12.	Präparation und Kultur isolierter adulter Kardiomyozyten	28
2.13.	Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit rekombinanten Adenoviren	29
2.14.	Messung der Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten	29
2.15.	Radioliganden-Bindung	30
2.16.	Verwendete Materialien	31
2.17.	Statistik	33

3.	Ergebnisse	34
3.1.	Expression eines funktionellen PTH/PTHrP-1-Rezeptors in Kardiomyoblasten	34
3.2.	Vergleich der intrazellulären cAMP-Bildung von H9c2-Kardiomyoblasten nach Stimulation mit PTH 1-34, PTH 1-84, PTHrP 1-34 und Osteostatin	34
3.3.	Konzentrations-/Wirkungskurve von PTHrP 1-34	36
3.4.	Funktionelle Messungen von Plasmiden mit cAMP-Assays	36
3.4.1.	Plasmid pcDNA-PTH1-R	37
3.4.2.	Ad-Proplasmid pdE1BCMV-PTH1-R	38
3.4.3.	Ad-Proplasmid pAdTrack-PTH1-R	39
3.4.4.	AAV-Proplasmid psub-PTH1-R	41
3.4.5.	AAV-Proplasmid psubgfp-PTH1-R	42
3.4.6.	AAV-Proplasmid AAV-PTH1-R-IRES-EGFP	43
3.5.	Effektivität eines adenoviralen Gentransfers	45
3.5.1.	Infektion von H9c2-Kardiomyoblasten mit Ad-βGal	45
3.5.2.	Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit Ad-βGal	47
3.5.3.	Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit Ad-PTH1-R-GFP	47
3.5.4.	Ultraschallgesteuerte intramyokardiale Injektion von Ad-βGal in vivo	50
3.6.	Effektivität eines Gentransfers mit Adeno-assoziierten Viren - Infektion von HEK-Zellen mit AAVgfp ohne und mit adenoviraler Coinfektion	52
3.7.	Effekte von PTH/PTHrP-1-R auf die Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten	55
4.	Diskussion	57
4.1.	Parathormon	57
4.2.	Parathormon-related Protein	58
4.3.	PTH und PTHrP im strukturellen Vergleich	61
4.4.	Wirksame Fragmente von PTH und PTHrP	61
4.5.	Bildung und Verteilung von PTHrP und seiner mRNA im kardiovaskulären System	63

4.6.	Wirkungen von PTH und PTHrP im kardiovaskulären System	64
4.7.	Parathormon/Parathormon-related-Protein-Rezeptor	65
4.7.1.	PTH/PTHrP-1-Rezeptor und andere Subtypen	65
4.7.2.	Verteilung des PTH/PTHrP-1-Rezeptors im Organismus	67
4.7.3.	Effektivität einer Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit rekombinanten Adenoviren	68
4.7.4.	Effekte von PTH/PTHrP-1-R auf die Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten	69
4.8.	Marker-/Reportergene für den viralen Gentransfer	70
4.9.	Effektivität einer Infektion von Kardiomyoblasten mit Ad-βGal	71
4.10.	Effektivität einer in vivo Infektion des Myokards mit rekombinanten Adenoviren	72
4.11.	Effektivität einer Infektion von HEK-Zellen mit AAVgfp	73
4.12.	Effektivität einer Infektion von Kardiomyozyten mit rekombinanten AAV	74
4.13.	Ad-/AAV-Proplasmide mit dem PTH/PTHrP-1-R - funktionelle Aspekte	75
4.14.	Transfektion der Plasmide in H9c2-Kardiomyoblasten und biochemischer Nachweis	76
4.15.	Gentherapie und Methoden der heutigen Gentherapie	77
4.16.	Nonvirale Methoden	78
4.17.	Virale Vektoren	80
4.17.1.	Adenoviren	81
4.17.1.1.	Struktur und Infektionszyklus	81
4.17.1.2.	Züchtung rekombinanter Adenoviren	83
4.17.1.3.	Vor- und Nachteile von rAd als Vektoren in der Gentherapie	85
4.17.2.	Adeno-assoziierte Viren	85
4.17.2.1.	Struktur und Infektionszyklus	86
4.17.2.2.	Züchtung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren	87
4.17.2.3.	Vor- und Nachteile von rAAV als Vektoren in der Gentherapie	88
4.18.	Andere molekulare Ansätze für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen	90

5.	Zusammenfassung	91
6.	Literaturverzeichnis	94
7.	Abbildungsverzeichnis	117
8.	Danksagung	118

1. Einleitung

Die *Weltgesundheitsorganisation (WHO)* definiert den Begriff *Herzinsuffizienz* als "verminderte körperliche Belastbarkeit aufgrund einer ventrikulären Funktionsstörung". Sie ist keine Krankheitsentität, sondern ein klinisches Syndrom unterschiedlicher Ätiologie. Unterschieden wird nach der betroffenen Kammer zwischen Linksherz-, Rechtsherz- und Globalinsuffizienz, nach dem Schweregrad zwischen Ruhe- und Belastungsinsuffizienz sowie zwischen akutem und chronischem Verlauf.

Funktionell wird die *Herzinsuffizienz* nach der *New York Heart Association* in vier Stadien eingeteilt: von Stadium *NYHA I*, welches eine Herzerkrankung ohne körperliche Einschränkung beschreibt, bis zu *NYHA IV* als Herzerkrankung mit Beschwerden in Ruhe. *Herzinsuffizienz* ist die häufigste Diagnose bei hospitalisierten Patienten über 65 Jahren. Weltweit leiden derzeit etwa 15 Millionen Menschen an dieser Krankheit - mit zunehmender Tendenz. Die Prävalenz liegt bei 1% der Bevölkerung mit Zunahme im höheren Lebensalter. Trotz der Fortschritte in der klinischen Therapie geht die *Herzinsuffizienz* mit einer hohen Morbidität und Mortalität einher (Garg et al. 1993). Die 1-Jahres-Sterblichkeit liegt im Stadium *NYHA II* bei 9-17%, im Stadium *NYHA IV* bei 36%; damit ist sie für die Medizin von großem Interesse.

Bei der chronischen *Herzinsuffizienz* unterscheidet man zwischen der *Herzinsuffizienz* mit Verminderung des Herzzeitvolumens ("low-output-failure") und der *Herzinsuffizienz*, die mit einer Erhöhung des Herzzeitvolumens einhergeht ("high-output-failure"). Die erste Form findet man bei Patienten mit koronarer Herzkrankheit, bei chronischer Druck- oder Volumenbelastung durch z. B. Klappenfehler oder Hypertonie, aber auch bei Myokarditiden oder Kardiomyopathien. Die zweite Form kommt vor bei Patienten mit Anämien, Hyperthyreose oder arteriovenösen Fisteln. Häufigste primäre Ursachen sind Hypertonie (etwa 90%) und koronare Herzkrankheit.

Pathophysiologisch ist die *Herzinsuffizienz* durch den Verlust der kontraktile Funktion des Herzmuskels gekennzeichnet. Das maximal erreichbare Herzzeitvolumen sinkt ab, das Schlagvolumen kann nur noch mit erhöhtem linksventrikulären enddiastolischen Druck aufrechterhalten werden. Bei systolischer Ventrikelfunktionsstörung sinkt die Ejektionsfraktion, bei diastolischer Ventrikelfunktionsstörung das Schlag- und Herzzeitvolumen. Dadurch ist die Blutversorgung und damit die Sauerstoffversorgung der Peripherie vermindert.

Zur Kompensation verfügt der Körper über folgende Möglichkeiten: Durch den sogenannten *Frank-Starling-Mechanismus* wird bei einer Zunahme der Vorlast die Kontraktionskraft und damit das Schlagvolumen des Herzens gesteigert. Die Wirksamkeit dieses körpereigenen Mechanismus vermindert sich aber bei zunehmender *Herzinsuffizienz*. Ferner wird das *sympatho-adrenerge System* aktiviert und so die Ausschüttung von *Katecholaminen*. Mit zunehmender Insuffizienz steigt der Plasma-Noradrenalin-Spiegel an, die *β -adrenerge Signalkaskade* wird aber funktionell inaktiviert durch eine selektive Downregulation β 1-adrenerger Rezeptoren (Bristow et al. 1982) und einer Upregulation der *β -adrenergen Rezeptorkinase*, einem Enzym, das die aktivierten β -adrenergen Rezeptoren spezifisch phosphoryliert und entkoppelt (Ungerer et al. 1993). Dadurch wirken die *Katecholamine* immer weniger inotrop, steigern aber den Arteriolentonus und somit die Nachlast. Auch das *Renin-Angiotensin-Aldosteron-System* wird zur Kompensation eingeschaltet. Außerdem werden *Arginin-Vasopressin (AVP)* und die kardialen Gewebshormone *Atrial Natriuretic Peptid (ANP)* und *Brain Natriuretic Peptid (BNP)* ausgeschüttet. Alle genannten erhöhten Hormonkonzentrationen stehen in engem Zusammenhang mit der Prognose des Herzversagens (Cohn et al. 1984, James et al. 1995). Durch die vermehrte Dehnung des Herzens wird auch *Parathormon-related-Protein (PTHrP)* ausgeschüttet (Deftos et al. 1993). Als weitere Kompensation versucht das Herz, durch eine Hypertrophie des Myokards seine Leistung zu steigern. Überschreitet die Myokardhypertrophie die kritische Grenze von 500 g, entwickelt sich eine relative Koronarinsuffizienz mit Abnahme der Leistungsfähigkeit des Herzens. Die in der Folge der *Insuffizienz* durch Volumenbelastung entstehende Dilatation des Herzens bringt weitere Nachteile mit sich. Versagen die Kompensationsmechanismen, kommt es zur *Dekompensation*.

Bis in die 70er Jahre stand die Therapie der Ödembildung als klinische Manifestation der *Herzinsuffizienz* im Vordergrund. Mit der Entwicklung invasiver Techniken wurde die Hämodynamik der Erkrankung besser charakterisiert, die Therapie wurde effizienter. Heute besteht die Behandlung im allgemeinen primär aus der Beseitigung der Ursache, d.h. in der Therapie einer eventuell vorhandenen arteriellen Hypertonie, einer Hyperthyreose, einer koronaren Herzkrankheit oder der Operation von Klappenfehlern. Ferner werden allgemeine und diätetische Maßnahmen wie Reduktion des Körpergewichtes, kochsalzarme Diät und Beschränkung der Trinkmenge empfohlen.

Medikamentös werden je nach *NYHA-Stadium* Inhibitoren *des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE)* in Kombination mit *Herzglykosiden* und *Diuretika* eingesetzt; außerdem *Nitrate* und *Kalziumantagonisten*, nach neueren Empfehlungen auch *Beta-Blocker* ohne intrinsische sympathomimetische Aktivität (ISA). Bei Unverträglichkeit von *ACE-Hemmern* werden *Blocker des Angiotensin-I* verabreicht.

Herzglykoside steigern über ihre positiv inotrope Wirkung die Kontraktionskraft, *Diuretika* senken Vor- und Nachlast durch Ausschwemmung. *ACE-Inhibitoren* senken Vor- und Nachlast durch Reduktion der vasokonstriktorischen Effekte von Angiotensin II und über präsynaptische Mechanismen durch eine Verringerung der Freisetzung von Noradrenalin im sympathischen Nervensystem, außerdem verringern sie die Aldosteronproduktion. In der *CONSENSUS-Studie* (Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study, 1987) wurde nachgewiesen, daß *ACE-Hemmer* die Mortalität von Patienten mit *Herzinsuffizienz* senken.

Vasodilatoren wie *Nitrate* und *Kalziumantagonisten* begegnen der vaskulären Komponente der *Herzinsuffizienz* und senken Vor- und Nachlast. Auch *Beta-Blocker* führen trotz ihrer negativ inotropen Wirkung zu einer funktionellen Verbesserung bei chronischer *Herzinsuffizienz* (Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study - CIBIS, 1994). Erklärt wird dieser Effekt der *Beta-Blocker* mit ihrer sauerstoffsparenden Wirkung und mit einer Resensibilisierung der Beta-Rezeptoren nach Verminderung ihrer Ansprechrate (Desensibilisierung) durch langanhaltend hohe Katecholaminspiegel.

Phosphodiesterasehemmer wie Amrinon oder Milrinon, die durch Hemmung des *cAMP-Abbaus* dessen Konzentration erhöhen, werden nur noch in der Intensivmedizin verwendet. Sie sind sonst obsolet (siehe unten). Eine Rückbildung der linksventrikulären Dilatation ließ sich nach Implantation elektromechanischer Kontraktionshilfen beobachten. Inwieweit sich diese Änderung auch positiv auf die Pumpfunktion auswirkt, ist Gegenstand weiterer Untersuchungen. Bei schwerer therapierefraktärer *Herzinsuffizienz* kommt nur noch eine *Herztransplantation* in Frage.

Mit der Entwicklung *molekularbiologischer* und *zellbiologischer Verfahren* wird die Ebene der Krankheitsprogression zurück zum Myokard geführt. Es konnte z. B. gezeigt werden, daß der neurohumorale und der hämodynamische "Streß" zu einer Expression von *Proto-Onkogenen* führen. Die persistierende Genexpression bedingt eine Zellhyperplasie. Im Gegensatz zu fetalem Gewebe führt diese Proliferation jedoch nicht zu einer *Mitose*; die Folge ist statt dessen die *Apoptose*.

Ziel der Versuche, über die die vorliegende Arbeit berichtet, war es, über einen Therapieansatz auf *molekularer Ebene* die Kontraktilität kardialer Zellen zu erhöhen. Dazu wurde über die heterologe Expression des *Parathormon/Parathormon-related-Protein-1-Rezeptors (PTH1-R)*, eines *G_s-Protein gekoppelten Rezeptors*, der normalerweise nicht im Myokard vorkommt, Einfluß auf die Bildung intrazellulären *zyklischen Adenosin 3':5'-Monophosphates (cAMP)* genommen.

Der *PTH/PTHrP-1-Rezeptor* verfügt über eine gute funktionelle Kopplung an sein *G_s-Protein* und damit an die intrazelluläre Signaltransduktion, d. h. es kommt zu einem *cAMP*-Anstieg nach Stimulation mit *PTH* oder *PTHrP* schon bei niedrigen Konzentrationen. Versuche haben gezeigt, daß *PTHrP* bei einer Zunahme der Dehnung des Herzens aus den Ventrikeln und Vorhöfen ausgeschüttet wird (Dzau 1992, Deftos et al. 1993, Bui et al. 1993, Burton et al. 1994, Takahashi et al. 1995). Da *PTHrP* am *PTH/PTHrP-1-Rezeptor* agonistisch wirkt, wäre es vorstellbar, daß durch eine heterologe Expression dieses ortsfremden Rezeptors im Herzen eine passagere *cAMP*-Erhöhung durch einen mechanischen Dehnungsreiz erreicht wird. Ein Anstieg intrazellulären *cAMPs* führt zu einer Phosphorylierung von Proteinen im Sarkolemm, im sarkoplasmatischen Retikulum und in den kontraktilen Filamenten. Dadurch werden der Einstrom extrazellulären Kalziums in die Zellen gesteigert, die Kalziumaufnahme des sarkoplasmatischen Retikulums erhöht und die kontraktilen Proteine für Kalzium sensitiver. Die beschriebenen Veränderungen des zellulären Kalziummetabolismus führen zu einem positiv inotropen Effekt (Evans 1986).

Damit wäre die inaktivierte β -adrenerge Signaltransduktion insuffizienter Herzen umgangen, und ein positiv inotroper parakriner Zyklus geschaffen.

Möglicherweise könnte durch eine pulsatile Konzentrationserhöhung von *cAMP* ein günstiger Langzeiteffekt bei schwer herzinsuffizienten Patienten erreicht werden, während bereits bekannt ist, daß eine dauerhafte Konzentrationserhöhung dieses *Second-Messengers* sich im Langzeitverlauf wohl eher ungünstig auswirkt. So erhöht der früher in der Therapie der schweren *Herzinsuffizienz* verwendete *Phosphodiesterasehemmer Milrinon* die Morbidität und Mortalität der Patienten trotz seines günstigen Einflusses auf die Hämodynamik (Packer et al. 1991).

Es könnte ferner sein, daß eine Downregulation nach Langzeitstimulierung, wie sie für β 1-Rezeptoren beschrieben wurde, bei heterologen Proteinen, wie es *der PTH/PTHrP-1-Rezeptor* in Herzzellen ist, in weniger starkem Maße auftritt. Dies wurde für den heterologen V2-Vasopressin-Rezeptor an Kardiomyozyten beschrieben (Laugwitz et al. 1999).

Physiologisch existiert im Herzen ein Rezeptor für Parathormon, der bisher noch nicht kloniert ist und deshalb hier als *(PTH/PTHrP)_x-Rezeptor* bezeichnet wird. Dieser führt nach Stimulation durch *Parathormon (PTH)* oder *Parathormon-related-Protein (PTHrP)* zur Aktivierung der *Proteinkinase C (PKC)* (Schlüter et al. 1997; Abbildung 1). Der *PTH/PTHrP-1-Rezeptor* dagegen führt, wie beschrieben, über die *G_s-Protein-Kopplung* zu einer Stimulierung der *Adenylatzyklase* und damit zur Bildung von cAMP (Abbildung 1). Außerdem aktiviert auch er die *Proteinkinase C* und erhöht das intrazelluläre Kalzium.

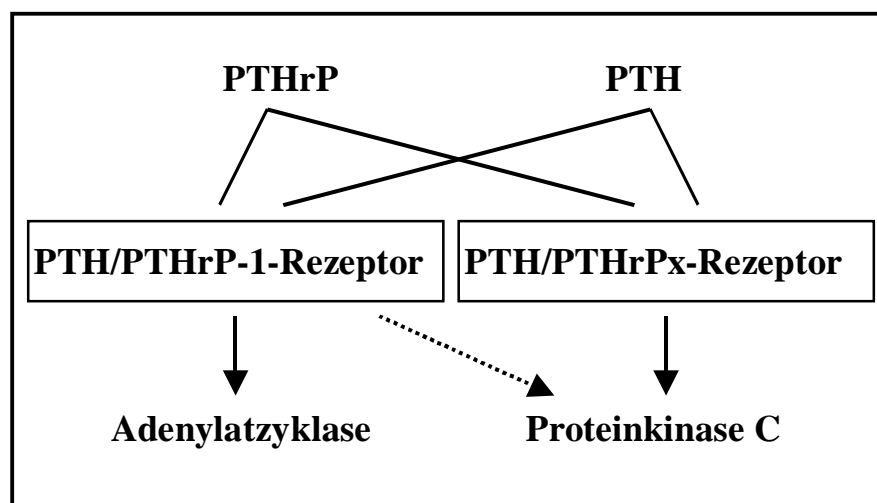


Abbildung 1

Der im Herzen vorkommende PTH/PTHrPx-Rezeptor aktiviert die Proteinkinase C. Der physiologisch nicht im Myokard existierende PTH/PTHrP-1-Rezeptor aktiviert über einen G-Protein-Mechanismus die Adenylatzyklase, ferner stimuliert auch er die Proteinkinase C.

Als Vektoren für die Gensequenz des *PTH/PTHrP-1-Rezeptors* wurden rekombinante *Adenoviren (AV)* bzw. *Adeno-assoziierte Viren (AAV)* verwendet. Durch einen Gentransfer mittels *Adeno-assoziiierter Viren* kann eine dauerhafte Expression des heterologen Rezeptors erreicht werden, während *Adenoviren* wegen der resultierenden zellulären und humoralen Immunantwort zu einer frühen Eliminierung des Transgens und damit nur zu einer kurzzeitigen Expression führen.

Im Gegensatz zur "klassischen" Gentherapie, die für Krankheiten mit erblich oder erworben verändertem Genom die einzig kausale Therapie darstellt, indem sie die veränderten Gene ersetzt oder ergänzt, versucht unser Ansatz über ein zusätzliches Gen, das für einen in Herzzellen normalerweise nicht vorkommenden Rezeptor codiert, in das molekulare Geschehen und damit in die intrazelluläre Signalübertragung im *G_s/Adenylatzyklase-System* und die *cAMP*-Bildung einzugreifen. Dazu werden u.a. in der vorliegenden Arbeit verschiedene *Plasmide* verglichen, die unter der Kontrolle unterschiedlicher Promotoren, teils mit zusätzlichen Reporter-Genen, zur Synthese *rekombinanter Adenoviren* und *Adeno-assoziiierter Viren* verwendet wurden.

Ferner wird die Effektivität eines Gentransfers in Herzzellen durch *Adenoviren* und *Adeno-assoziierte Viren* beschrieben, die anhand von *Marker*-, bzw. *Reporter*genen quantifiziert wurde.

2. Methoden und Materialien

2.1. Theoretische Überlegungen

Das Gen für den PTH/PTHrP- Rezeptor (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Prof. Schulz, Berlin) wurde zunächst mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Dazu kamen Primer für das Startcodon und das Stopcodon des Rezeptors zum Einsatz, die während der Amplifikation zusätzlich Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen in das DNA-Produkt einbauen. Am Startcodon wurde eine Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease EcoR I, am Stopcodon eine für das Enzym Xba I gewählt. Nach der Reinigung des Ansatzes von den Primerrückständen wurde das PTH/PTHrP-1-Rezeptor-Gen in die Polylinker-Sequenz des Plasmides pdE1BCMV, das Teile des Adenovirusgenoms, eine Ampicillinresistenz und den gewebeunspezifischen Cytomegalievirus-Promotor trägt, kloniert. Dieses Proplasmid kann zur Züchtung von rekombinanten Adenoviren mit dem Plasmid pJM17, das fast das gesamte adenovirale Genom enthält, in 293-Zellen cotransfiziert werden. Diese Methode verwendeten wir für die Herstellung der rekombinanten β Gal-Adenoviren. Für die Versuche mit den das PTH/PTHrP-1-Gen tragenden Adenoviren wandten wir aber eine neuere Methode an. Dazu mußte das Gen in das Plasmid pAdTrack einkloniert werden (weitere Schritte siehe unten).

Für die Züchtung von AAV wurden die Proplasmide psubPTH, psubgfpPTH und AAV-PTHrP-IRES-EGFP kloniert. Nur das zuletzt genannte Plasmid wurde dann zur endgültigen Herstellung der Viren verwendet.

Alle Proplasmide wurden funktionell in cAMP-Assays gemessen, um sie biochemisch auf die Funktion des PTH/PTHrP-1-Rezeptors zu testen. Als Kontrolle dienten nicht transfizierte Plasmide. Um die Effektivität eines Gentransfers durch Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren zu quantifizieren, wurden Marker- (GFP), bzw. Reportergene (β -Gal) einkloniert und die Expression gemessen. Nach der Herstellung von rekombinanten Adenoviren, bzw. Adeno-assoziierten Viren, die das PTH/PTHrP-1-R-Gen trugen, wurden diese zur Infektion von isolierten adulten Kardiomyozyten und zur Infektion eines Rattenmyokards in vivo verwendet und anschließend die Kontraktilität der Zellen, bzw. des Myokard gemessen und mit der Kontrolle verglichen.

2.2. Polymerase-Kettenreaktion

Der PCR-Ansatz bestand aus 200 μM dNTP (dATP/dCTP/dGTP/cTTP), 0,5 μM forward primer, 0,5 μM reversed primer, 1x Puffer, 2 U Klen tag Polymerase (Fa. Clontech), 0,1 ng template DNA (als Ausgangsplamid mit dem Insert).

Es wurden 35 Zyklen durchgeführt, jeder Zyklus lief für 1 min bei 94°C (der 1. Zyklus für 10 min) als Denaturierungsvorgang, 1 min bei 37°C (annealing temperature) und 3 min bei 72°C (der 35. Zyklus für 10 min); bei 72°C hat die Polymerase ihr Temperaturoptimum und die Strangverlängerung findet statt.

2.3. Umklonierung

Das Insert, mittels PCR amplifiziert (d.h. das PTH/PTHrP-Rezeptor-Gen aus dem Plasmid pcDNA I), wurde zunächst mit dem PCR-Purification-Kit (Fa. Qiagen, Nr. 28701) gereinigt.

2.3.1. Restriktion

Für die Umklonierung der Plasmide mußten zunächst zwei Restriktionsansätze für Vektor und Insert erstellt werden. Dazu wurden je 5 μg Plasmid-DNA, 5-10 U (Units) Restriktionsenzym 1 (je nach möglichen Schnittstellen in den Polylinker-Sequenzen), 5-10 U Restriktionsenzym 2, 5 μl Puffer (10-fach) ad Wasser dest. 50 μl angesetzt. Beide Ansätze ließen wir zum Schneiden der Plasmide ca. 1 bis 2 h bei 37°C stehen.

Es folgte die Reinigung des Inserts. Dazu wurden 2 ml TE-Puffer (0,6 g Tris, 8 ml 0,25 M EDTA ad 1 l H₂O, pH 7,5) mit dem Insert auf ein Reinigungsröhrchen Centricon 30 (Fa. Amicon) gegeben und 30 min bei 4°C und 3000 g zentrifugiert. Nach Zugabe von 50 μl TE-Puffer auf die Membran des Röhrchens wurde dieses umgedreht, verschlossen und wiederum 2 min bei 500 g zentrifugiert, so daß der überständige Rest der Inserts sich von der Membran löste und aufgefangen werden konnte.

Zur Überprüfung, ob beide Plasmide vollständig geschnitten waren, wurden Gelelektrophoresen mit entsprechenden Größenmarkern beider Restriktionsansätze auf 0,8% Agarosegel in TBE-Puffer (54 g Trisbase, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA ad 1 l H₂O, pH 8,0) angefertigt. Die

Poren in dem Gel lassen kleinere DNA-Moleküle schneller wandern als große und führen so zu einer Aufteilung nach Größe. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde dem Gel 50 ng/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Dieses interkaliert in die DNA-Doppelhelix und stellt sich unter der UV-Lampe bei 254 nm oder 300 nm Wellenlänge fluoreszierend im sichtbaren Licht rot-orangefarbig (590 nm) dar.

10 µl aus dem Restriktionsansatz des Vektors wurden mit 2 U Shrimps Alkaline Phosphatase (SAP) und 1,3 µl Puffer (10-fach) zum Entfernen der Phosphatreste von den 5'-Enden der aufgeschnittenen DNA ca. 1 h bei 37°C zusammenpipettiert. Um das Enzym zu inaktivieren, wurde die Temperatur anschließend für 30 min auf 65°C erhöht.

2.3.2. Gelextraktion

Mit den nicht PCR-amplifizierten Inserts wurde eine Gelextraktion durchgeführt, um diese von den Plasmidresten zu trennen. Dafür mußten 25 µl des Insert-Restriktionsansatzes, 10 µl Laufpuffer (0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylenecyanol, 50% Glycerin, 1mM EDTA in H₂O) und 50 µl Wasser dest. auf 0,8% Agarosegel in TBE-Puffer aufgebracht werden. Die Laufzeit betrug ca. 2 h bei 70 V.

Auf die Elektrophorese folgte die Färbung des Gels auf einem Schütteltisch für 20 min in 0,01 Vol% Ethidiumbromid und 200 ml TBE-Puffer. Die DNA-Bande des Inserts wurde anschließend unter einem UV-Schirm exakt ausgeschnitten und gewogen. Zur Extraktion der DNA aus dem Gel wurde das Boehringer Gelextraktionskit (Nr. 1696505) verwendet und die DNA in 50 µl TE-Puffer aufgenommen.

Zum Test auf Erfolg und Ausbeute der Extraktion trugen wir eine Gelelektrophorese mit 5 µl Extrakt, 2 µl Laufpuffer und 13 µl Wasser dest. in 0,8% Agarosegel in TBE-Puffer neben entsprechenden Größenmarkern auf. Nach ca. 2 h Laufzeit bei 70 V wurden die Banden unter der UV-Lampe anhand der Größenmarker beurteilt. Die DNA-Menge wurde dann anhand der Bandenintensität auf dem Checkgel eingeschätzt.

2.3.3. Ligationsansatz

Zur Ligation von Vektor und Insert wurden eine Kontrolle mit 1 Teil Vektor (1 µl, 1 U T4 DNA Ligase, 1 µl Puffer (10x Konzentrat) ad 10 µl Wasser dest.), ein Ligationsansatz 1:7 mit 1 Teil Vektor, 7 Teilen Insert, Rest analog und ein Ansatz 1:3 mit 1 Teil Vektor, 3 Teilen Insert, Rest analog für 16-20 h bei 4°C inkubiert.

2.3.4. Transformation

Für die Transformation jedes neuen Plasmides wurden je 5 µl der Ligationsansätze mit je 50 µl einer Kultur von chemisch kompetenter Escherichia coli (JM 109) in einem Röhrchen zusammengegeben, kurz vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Temperatur für 45 sec auf 42°C erhöht, danach der Ansatz wieder für 2 min auf Eis gestellt, 450 µl SOC-Medium (anfertigen von: 20 g Tryptone, 5 g Hefeextrakt, 0,6 g NaCl, 0,5 g KCl in 1 l H₂O lösen und autoklavieren = Medium; 1 M MgCl₂ mit 1 M MgSO₄ in 0,22 µm Filter sterilfiltriert; 18 g Glucose in 100 ml H₂O in 0,22 µm Filter sterilfiltriert; 970 ml Medium, 10 ml Mg²⁺ Stammlösung und 20 ml Glucoselösung mischen) zugegeben und dann für 1 h im Wasserbad bei 37°C mit 225 rpm geschüttelt. Zuletzt wurden 250 µl auf Luria-Bertani- (LB-) Medium- (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, 1 ml 1M NaOH/l) Agarplatten (15g Agar/l) mit 100 µg/ml Ampicillin oder mit 50 µg/ml Kanamycin (je nach Resistenz auf den verwendeten Plasmiden) ausplattiert und 16-20 h bei 37°C bebrütet.

Für ein Screening nach positiven Klonen nahmen wir nach der Transformation einige Kolonien von den Agarplatten mit einer Impföse auf, gaben sie in Falcon-Röhrchen mit 2 ml LB-Medium (mit selektivem Agens wie oben) und inkubierten sie 16-20 h unter Schütteln bei 37°C.

Danach wurden zur Identifikation von Rekombinanten Minipreps (Qiagen Qiaprep Spin, No. 27104, siehe Instruktionen des Herstellers) angefertigt und die DNA in 50 µl TE-Puffer aufgenommen. Zum Nachweis der Inserts wurden je 5 µl Eluat, 1-2 U Restriktionsenzym 1, 1-2 U Restriktionsenzym 2, 2 µl Puffer und 10 µl Wasser dest. für 1 h bei 37°C angesetzt und anschließend 1 h bei 70 V auf einem 0,8% Agarosegel getrennt. Unter der UV-Lampe wurden die Banden überprüft, und die positiven Klone in 400 µl LB-Medium + 10% Glycerin bei -80°C aufbewahrt.

2.4. Reinigung und Anreicherung der DNA aus dem Zellextrakt

Für die Reinigung der DNA von Proteinen und RNA aus dem Bakterienzellextrakt und die anschließende Anreicherung wurde das Qiagen Plasmid Maxi Kit (No. 12162) verwendet.

Dazu wurde zunächst ein Klon von der präparierten Agarplatte in ein Röhrchen mit 2 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin geimpft, gut verrührt und in einen Wasserbad-Schüttler mit 37°C bei 220 rpm gestellt. Zur Plasmid-Amplifikation kann man nach einigen Stunden dem Medium 2 µl Chloramphenicol hinzusetzen. Chloramphenicol hemmt die bakterielle Protein-Biosynthese und damit die von ihr abhängige und mit ihr gekoppelte Replikation des Bakterienchromosoms. Viele Plasmide benötigen außer der bakteriellen DNA-Polymerase I keinerlei spezielle Replikationsproteine, weswegen ihre Replikation durch Chloramphenicol nicht gehemmt wird und sich die Kopienzahl der Plasmide erhöht.

Nach 10-12 h wurde die Kultur in einen Erlenmeyerkolben mit 100 ml LB-Medium + 100 µg/ml Ampicillin umgeschüttet und wiederum in ein Wasserbad mit 37°C gestellt. Nach ca. 12 h bei ständigem Rühren (200 rpm) konnte die DNA-Präparation beginnen (Anleitung der Maxiprep siehe Handbuch der Fa. Qiagen).

Die Konzentration der vervielfältigten DNA wurde mittels Ultraviolettabsorptionsspektrometrie in einem Photometer gemessen und nach der Formel:

Extinktion bei 260 nm x 50 x Verdünnung der DNA = Konzentration in µg/ml

errechnet. Bei 260 nm entspricht ein Absorptionswert von 1,0 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der DNA wurde mittels der Formel A_{260}/A_{280} ermittelt. Der Quotient sollte 1,8-2,0 betragen. Zur Ergebniskontrolle wurde anschließend eine Gelelektrophorese angesetzt.

2.5.1. Herstellung rekombinanter Adenoviren

Für die Versuche mit den βGal-Adenoviren wurden E1-defiziente Adenoviren (Serotyp 5) hergestellt.

Für die Versuche mit den Ad-PTH1-R wurde eine neuere Methode zur Züchtung rekombinanter Adenoviren in Bakterien verwendet: Dazu wurden zunächst elektrokompente

E. coli BJ5183-Zellen vorbereitet: Mit einer frischen oder eingefrorenen Kolonie BJ5183-Zellen wurden 10 ml LB-Medium in einem 50 ml Röhrchen beimpft und in einem Schüttler über Nacht gezüchtet. 1 ml der Zellsuspension wurde mit 1000 ml LB-Medium verdünnt und auf acht 1-Liter-Flaschen verteilt. Für 4 bis 5 h sollten die Zellen anschließend bei guter Belüftung und 37°C wachsen bis die A_{550} etwa 0,8 betrug. Die Lösung wurde dann in vier 250 ml Zentrifugenröhrchen gegeben und auf Eis für 1 h inkubiert. Anschließend wurde bei 2600 g und 4°C für 10 min zentrifugiert, das Zellpellet mit 1000 ml sterilisiertem, eiskaltem WB (10% ultrareines Glycerol, 90% destilliertes Wasser) ausgewaschen und erneut bei 2500 g für 30 min zentrifugiert. Die letzten beiden Schritte wurden wiederholt. Dann wurde der Überstand abgegossen und die Reste vorsichtig abpipetiert bis etwa 20 ml verblieben. Die Zellsuspension überführten wir dann in ein 50 ml Röhrchen und zentrifugierten sie bei 3000 g für 10 min. Anschließend wurde der Überstand bis auf 5 ml abgenommen, das Zellpellet in dem verbliebenem WB resuspendiert, in 20 μ l Aliquots aufgeteilt und bei -80°C aufbewahrt.

Zur Prüfung der Elektrokompentenz der Zellen wurden 1 μ l gereinigte Plasmid-DNA (10 ng/ μ l) und 20 μ l kompetente BJ5183-Zellen mit dem Bio-Rad Gene Pulser (200 Ohm, 25 μ F, 2,5 kV) transformiert. 1 ml L-broth wurde zugegeben und die Zellen bei 37°C für eine Stunde in einem 50 ml Röhrchen geschüttelt. 100-fache und 1000-fache Verdünnungen der Zellen wurden in L-broth erstellt, die 100 μ l der Zellen auf L-Agar + 100 μ g/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Titer betragen dann über 10^8 Kolonien/ μ g.

10-20 μ g des Shuttleplasmides pAdTrack, in dessen Polylinker-Sequenz zuvor das Gen für den PTH/PTHrP-1-Rezeptor inkloniert war, wurden dann mit der Restriktionsendonuklease PmeI über Nacht linearisiert. Anschließend wurde die DNA mit 2x Phenol-Chloroform (1:1) extrahiert, mit 100%igem Ethanol präzipitiert, in 20 μ l H₂O resuspendiert und die Konzentration nach der Extraktion photometrisch überprüft. Für die Elektroporation wurden davon 0,5-1,0 μ g sowie 0,1 μ g AdEasy, das adenovirale Gene trägt (Ad5dE1/3), aufpipetiert, vermischt und schließlich 20 μ l elektrokompentener E. coli zugegeben. Die Elektroporation zur Transformation der Plasmide in die Bakterien erfolgte in 2 mm Küvetten bei 200 Ohm, 25 μ F und 2,5 kV im Bio-Rad E-coli-Pulser-Elektroporator. Die Lösung wurde dann in 500 μ l L-broth resuspendiert, bei 37°C für 15-20 min bei 200 rpm inkubiert und je 100-200 μ l der Zellsuspension auf vier LB-Agarplatten (mit 50 μ g/ml Kanamycin) ausplattiert.

Nach 16-20 Stunden Wachstum bei 37°C wurden 20-50 der kleineren Kolonien aufgenommen und in 2 ml L-broth mit 50 μ g Kanamycin für 10-15 h bei 225 rpm und 37°C inkubiert und

Minipräps nach den Instruktionen des Herstellers durchgeführt. Um die Größe der Plasmide zu bestimmen, wurde die Minipräp-DNA mit PacI geschnitten und Elektrophoresen auf 1% Agarosegel durchgeführt. Positive Klone enthalten ein großes (ca. 30 kb) und ein kleineres (3,0-4,5 kb) Fragment. 5 µl der positiven rekombinanten Plasmid-DNA wurden mit 50 µl chemisch kompetenter JM109-Zellen vermischt und eine Transformation, wie oben beschrieben, durchgeführt.

293-Zellen züchteten wir in T-25-Flaschen (25 cm², 2 x 10⁶ Zellen/Flasche). Die Konfluenz sollte 50-70% betragen. Kurz vor der Transfektion wurden die rekombinanten adenoviralen Plasmide mit der Restriktionsendonuklease PacI geschnitten, die nach der Restriktion für 20 min bei 65°C hitzeinaktiviert wurde. 4 µg des geschnittenen Plasmids wurden mit 30 µl Transfektionslösung aus dem Kit der Fa. Qiagen (SuperFect Transfection Reagent No. 301305) in 150 µl D-MEM vermischt und das Gemisch bei Raumtemperatur für 10-15 min inkubiert. Währenddessen wurde das Wachstumsmedium von den 293-Zellen aspiriert und diese mit 4 ml PBS gewaschen. Dann wurden 1000 µl D-MEM + 10% FBS zur Transfektionslösung zugegeben, diese auf die Zellen verteilt und wieder in den CO₂-Schrank zurückgestellt. Vier Stunden später saugten wir das Medium mit der Transfektionslösung ab und gaben 6 ml D-MEM (+ 10% FBS, 100 IU/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin) zu. Die Transfektionseffizienz und die virale Produktion konnten anhand des GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden.

7 bis 10 Tage nach der Transfektion wurden die Zellen aus den Flaschen geschabt, in 50 ml Röhren transferiert, zentrifugiert und das Pellet in 2 ml sterilem PBS resuspendiert. Anschließend wurden sie viermal hintereinander in einem Trockeneis/Methanolbad eingefroren, in 37°C warmen Wasser aufgetaut und im Vortex vermischt. Den Überstand bewahrten wir bei -20°C auf.

Zwei 50-70% konfluente 293-Zellen in T-25-Flaschen wurden dann mit 30-50% des Überstandes infiziert. Ein zytopathischer Effekt oder eine Zelllyse zeigten sich 2 bis 3 Tage nach der Infektion. Die Viren wurden gesammelt, sobald ein Drittel bis die Hälfte der Zellen sich löste, indem diese wiederum aus den Flaschen geschabt wurden. Wie oben beschrieben, konnte anschließend ein virushaltiger Überstand präpariert werden. Drei Viertel des Überstandes setzten wir ein, um 15 T-175-Flaschen HEK-293 zu infizieren.

2.5.2. Präparation größerer Adenoviren-Titer

HEK 293-Zellen wurden in T-175-Flaschen bis zu 80%iger (ca. 10^7 - 10^8 Zellen/T-175-Flasche) Konfluenz gezüchtet, mit dem Virus bei einer Multiplicity of Infection (MOI) von 3-6 pfu/Zelle infiziert und bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem ein zytopathischer Effekt sichtbar war, ca. 48 Stunden nach der Infektion, ernteten wir die Zellen durch Pipettieren des Mediums, zentrifugierten sie bei 500 g für 20 min und entfernten den Überstand. Das Pellet wurde in 7 ml sterilem PBS resuspendiert, 7 ml PBS + 1% Triton x 100 (Endkonzentration 0,5%) hinzugefügt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Lysat zentrifugierten wir bei 4000 g und 4°C für 20 min. Um es zu reinigen, wurden Cäsiumchlorid-Dichtegradienten in Ultrazentrifugenröhrchen (SW40-Rotor) gebildet:

- a) 45,41 g CsCl in 54,59 g TE ($1,5 \text{ g/cm}^3$) - 1 ml;
- b) 35,18 g CsCl in 64,82 g TE ($1,35 \text{ g/cm}^3$)- 2 ml;
- c) 26,99 g CsCl in 73,01 g TE ($1,25 \text{ g/cm}^3$) - 2 ml

und das Lysat mit PBS aufpipettiert. Bei 200.000 g und 10°C wurde für 30 min zentrifugiert. Die untere blaue Bande wurde anschließend durch Aufbrechen des Röhrchens tropfenweise gesammelt.

Um das Cäsiumchlorid zu entfernen, wurden mit 3 mM KCl, 135 mM NaCl, 1 mM MgCl, 10 mM Tris 8,0 und 10% Glycerol NAP25 Säulen äquilibriert, 1 ml der Virussuspension auf die Säulen gegeben, das Eluat verworfen, mit 1,7 ml Äquilibrierungspuffer gewaschen, dieses Eluat wiederum verworfen, 1,6 ml Äquilibrierungspuffer zugegeben und die trübe Virussuspension aufgefangen. Der Virus wurde in kleinen Aliquots bei -120°C eingefroren.

Die adenoviralen Titer bestimmten wir durch Plaques-Titration an HEK 293-Zellen.

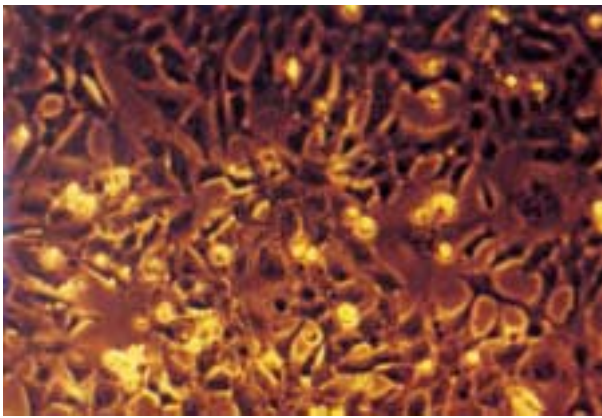
2.6.1. Züchtung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren - Transfektion in 293-Zellen

Zunächst wurden 293-Zellen in T-175-Flaschen ausgesät und nach 8-10 Stunden Inkubation bei 37°C, 5% CO₂ in Kultur gehalten. Für die Transfektion jeder der Flaschen wurden in einem Falcon-Röhrchen 12 µg des rAAV Vektorplasmides, 32 µg des AAV/Ad-Helferplasmides (pDG), 100 µl 2,8 M CaCl₂ ad 1 ml Wasser dest. angesetzt. Die Gesamtmenge der DNA sollte 35-40 µg pro Schälchen betragen, und das Verhältnis beider Plasmide bei 1:1 bis 1:5 liegen.

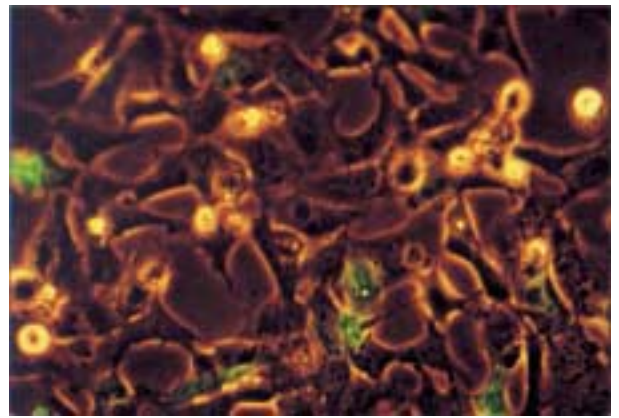
Anschließend wurde pro Flasche 1 ml von 2xBBS (50 mM BES, 280 mM NaCl, 0,75 mM Na₂HPO₄, 0,75 mM NaH₂PO₄, in Wasser dest., pH 6,95) zugefügt und 15-20 min bei Raumtemperatur inkubiert, bis sich ein gleichmäßiger Niederschlag bildete. 2 ml diesen Ansatzes gaben wir dann tropfenweise auf jede Flasche und schwenkten diese leicht. Für 16-18 Stunden wurden die Zellen bei 35°C und 3% CO₂ inkubiert (Transfektionsergebnis für AAVgfp siehe Abbildung 2). Das Medium wurde dann abgesaugt und 20 ml D-MEM mit 10% FBS und Pen/Strep zugegeben und die Zellen bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

72 Stunden später konnten die Zellen durch Abschaben aus den Flaschen geerntet werden. Sie wurden viermal bei -80°C eingefroren, im Wasserbad bei 37°C wieder aufgetaut und dann 20 min bei 4°C mit 4.000 g zentrifugiert, um die Zellrückstände abzusetzen. Den Überstand sammelten wir, während die Pellets verworfen wurden.

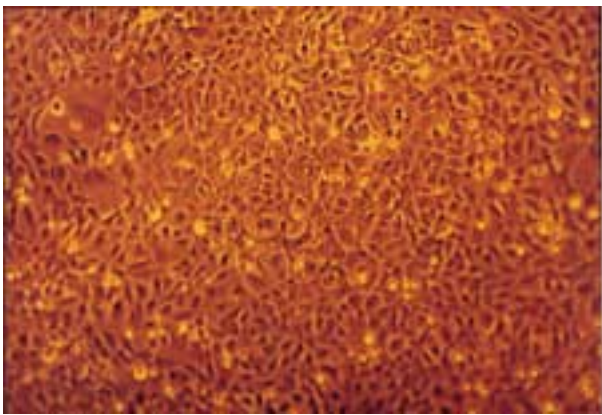
Cotransfektion von 293-Zellen mit AAVgfp



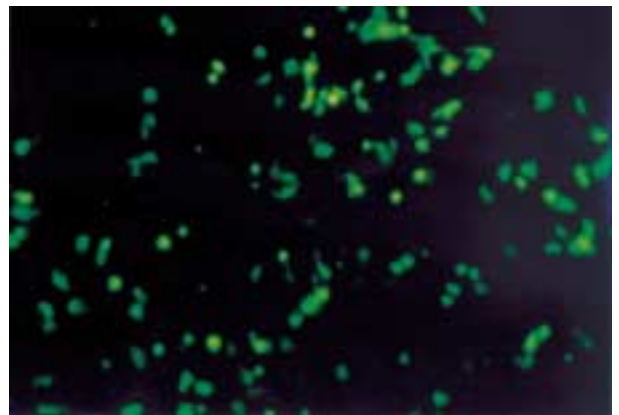
A



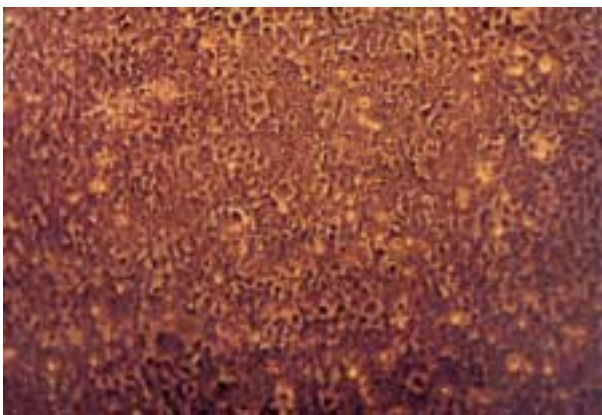
B



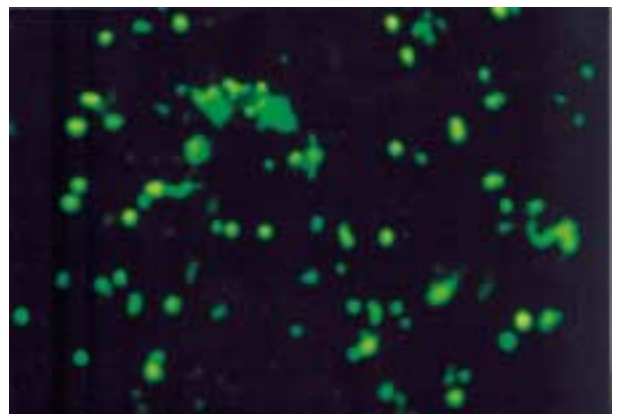
C



D



E



F

Abbildung 2

Lichtmikroskopische Aufnahmen von AAVgfp-cotransfizierten 293-Zellen.

Abbildung A - D wurden 24 Stunden, Abbildung E und F 72 Stunden nach der Transfektion aufgenommen.

Abbildung A zeigt die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop, in Abbildung B erscheint zusätzlich die Fluoreszenz durch das GFP. In den Aufnahmen 72 Stunden nach Cotransfektion zeigen deutlich mehr Zellen eine Fluoreszenz als 48 Stunden zuvor. Zu diesem Zeitpunkt wurden sie geerntet.

Abbildung A - B: 200fache Vergrößerung

Abbildung C - F: 100fache Vergrößerung

2.6.2. Konzentrierung der rAAV Partikel

Eine Konzentrierung der rAAV erreichten wir durch sulfonierte Zellulose-Säulenchromatographie. Die Säulen wurden zunächst mit 500 ml PBS gewaschen und dann 150 ml des Überstandes auf eine Sulfat-Säule (50 ml) gegeben, diese mit 300 ml PBS gewaschen und anschließend mit 10 mM Phosphatpuffer (28 ml 0,2 M NaH_2PO_4 , 72 ml 0,2 M Na_2HPO_4 , 1:10 verdünnt mit NaCl, pH 7,2) eluiert. Fraktionen von je 2 ml wurden gesammelt und die Absorption bei 280 nm in jeder Fraktion gemessen. Fraktionen mit einer Absorption, die größer als 1,5 war, wurden gepoolt, der Rest verworfen.

2.6.3. Reinigung der rAAV Partikel

15 ml 30%iger Sacharose in TE wurden mit 15 ml 50%iger Sacharose in TE unterlegt. 9 ml Fraktionen aus der Sulfat-Säulenchromatographie wurden dann auf das Saccharosekissen gegeben. Die Proben wurden anschließend bei 273.000 g in einem SW 40-Rotor (Beckmann) bei 4°C für 4 Stunden zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde dann in 1 ml Opti-MEM (+ Penicillin/Streptomycin) resuspendiert.

2.7. Zellkultur und Zellsplitting

Die H9c2 Kardiomyoblasten, bezogen von der American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA, wurden als Monolayer bei 10% CO_2 in 37°C warmer wassergesättigter Luft in D-MEM, 10% FBS, 2 mmol/l Glutamin, Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kultiviert.

HEK 293-Zellen erhielten wir ebenfalls von der American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA. Sie wurden bei 5% CO_2 in 37°C warmer wassergesättigter Luft in D-MEM, 10% FBS, 2 mmol/l Glutamin, Penicillin (100 IU/ml) und Streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) kultiviert.

Um für das Zellwachstum die Konfluenz der Zellen kleiner als 100% zu halten, war es notwendig, die Zellzahl regelmäßig durch Aufteilen auf mehrere Gewebekulturplatten zu verringern.

Dazu mußten die H9c2-Zellen nach Absaugen des alten Mediums zunächst ca. fünf Minuten lang mit 4 ml Trypsin-EDTA für 5 min im Brutschrank inkubiert werden, um eine Ablösung von den Gewebekulturplatten zu erreichen. Wenn mikroskopisch die schwimmenden, abgelösten Zellen nachgewiesen werden konnten, gab man 10 ml 37°C warmes Medium dazu, um die Trypsinisierung zu stoppen. Das Gemisch aus Zellen, Trypsin-EDTA und Medium wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und drei Minuten lang bei 750 g zentrifugiert, das gewonnene Pellet in Medium gelöst, auf mehrere Zellkulturschalen verteilt und anschließend bei 37°C und 10% CO₂ aufbewahrt.

Das Splitting der HEK-Zellen erfolgte nach derselben Methode.

2.8. Liposomale Transfektion

Transfiziert wurden H9c2 Kardiomyoblasten, die auf den Falcon-Six-well-Platten zu einer 60-70%igen Konfluenz gewachsen waren. Die liposomale Transfektion der Plamide wurde mit dem Transfektions-Kit der Fa. Qiagen (SuperFect Transfection Reagent No. 301305) als Doppel- oder Dreifachbestimmungen durchgeführt. Dazu wurde zunächst 100 µl D-MEM (ohne Zusätze) pro well mit 2 µg DNA pro well in einem Röhrchen kurz zentrifugiert und 10 µl Transfektions-Reagent pro well zugegeben und 10-15 min inkubiert. Anschließend wurden 600 µl H9c2-Medium pro well beigemischt.

Vor der Transfektion wurden die H9c2-Kardiomyoblasten nach Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen, dann pro well 700 µl der Transfektionslösung zugegeben. Eine Transfektionskontrolle wurde mit Plasmiden ohne funktionell aktive cDNA, d.h. ohne Insert, durchgeführt.

Die Zellen inkubierten wir für 3 h bei 37°C, saugten anschließend die Lösung ab und gaben 1 ml H9c2-Medium pro well zu.

2.9.1. Infektion von H9c2-Kardiomyoblasten mit Ad-βGal

Zur Infektion der H9c2-Kardiomyoblasten mit dem βGal-Adenovirus wurde zunächst das Medium von den Zellen entfernt und anschließend zweimal PBS zum Waschen zugegeben. Dann wurden die Kardiomyoblasten mit ca. 100 pfu/Zelle (in PBS) eine Stunde lang bei Raumtempera-

tur unter leichtem Schwenken inkubiert. Anschließend saugten wir das Inkubationsgemisch ab und ersetzten es durch normales Medium. 36 Stunden nach Infektion konnten die Kardiomyoblasten für die Versuche verwendet werden.

2.9.2. Färbung mit dem Chromogen X-Gal

36 Stunden nach der Infektion der Kardiomyoblasten durch die β Gal-Adenoviren wurden die Zellen zunächst zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 0,05% Glutaraldehyd für 10 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden sie erneut zweimal mit PBS gewaschen und mit der X-Gal-Färbelösung (0,044 M HEPES, pH 7,4, 15 mM NaCl, 1,3 mM MgCl₂, 0,625 mg/ml X-Gal in 100% DMSO, 3 mM K₃(Fe(CN)₆), 3 mM K₄(Fe(CN)₆), alles gelöst in dest. Wasser) für 4 h bei 37°C angefärbt.

2.10. Infektion der HEK-Zellen mit AAVgfp

Die Infektion der HEK-Zellen mit AAVgfp wurde nach derselben Methode wie die Infektion der H9c2-Kardiomyoblasten mit Ad- β Gal durchgeführt.

24-48 Stunden nach Infektion betrachteten wir die Platten unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 25, Fa. Zeiss) bei einem Licht von 488 nm Wellenlänge und verglichen die leuchtenden Zellen mit der Dichte des Zellwachstums bei normalem Licht.

2.11.1. Prinzip des cAMP-Assays

Durch die Vorinkubation der Kardiomyoblasten mit 3-Isobutyl-1-Methyl-Xanthin (IBMX) wird der schnell einsetzende cAMP-Abbau durch die Phosphodiesterase verhindert. Das nach der Transfektion zugegebene tritiierte Adenin wird in ATP eingebaut (³H-ATP) und von den Kardiomyoblasten inkorporiert. Nach Zugabe der Agonisten setzt die Adenylatzyklase an den Zellmembranen ³H-ATP zu ³H-cAMP um. Eisgekühlter 5%iger TCA-Puffer (5 g Trichloressigsäure, 35,12 mg cAMP und 60,52 mg ATP in 100 ml Wasser dest.) bricht die Zellmembranen auf, das

Zytosol wird in den Überstand freigesetzt. Kaltes cAMP und ATP im Überschuß dienen zum Schutz des ^3H -cAMP, damit es nicht abgebaut wird.

Obwohl Dowex negativ geladen ist, bindet es das saure cAMP, ferner AMP, ADP und Adenin. Das nicht zu ^3H -cAMP gebildete verbleibende ^3H -ATP wird mit 3 ml Wasser eluiert. Anschließend wird ^3H -cAMP mit 15 ml Wasser in die Alumina-Säulen gewaschen, in denen es gebunden wird, während AMP, ADP und Adenin ausgewaschen werden. Schließlich wird ^3H -cAMP durch 6 ml Tris-HCl in die Szintillationsbehälter eluiert und im Szintillationszähler gemessen.

2.11.2. cAMP-Assay - Versuch

24 h nach der liposomalen Transfektion der H9c2-Kardiomyoblasten mit den Plasmiden wurden pro well 1 ml H9c2-Medium + 2 μl titriertes Adenin (entspricht 2 μCi pro well) aufpipettiert und dieses über Nacht inkubiert.

Am nächsten Tag wurde zunächst ein Puffer mit 11 mg IBMX, gelöst in 100 μl DMSO und 50 ml PBS, hergestellt. Hierin wurden die Agonisten PTH und PTHrP in den benötigten Konzentrationen gelöst.

Von den transfizierten H9c2-Kardiomyoblasten auf den Six-well-Platten wurde das Medium abgesaugt und jede Platte mit 1 ml PBS, dann mit 1 ml des IBMX/PBS-Puffers gespült und 15 min bei 37°C stengelassen. Anschließend aspirierten wir den Puffer wieder, gaben je 1 ml der Agonisten, hier PTH, PTHrP oder deren wirksame Fragmente in ansteigenden Konzentrationen (für den Nullwert nur 1 ml des IBMX/PBS-Puffers) auf die Platten und inkubierten diese bei 37°C . Nach 30 min stoppten wir die Reaktion durch Aspiration der Agonisten und Zugabe von je 1 ml eiskühlem 5% TCA-Puffer und stellten die Platten 30 min auf Eis. Anschließend wurde die Lösung von den Platten einzeln abpipettiert und auf die Dowex-Säulen gegeben. Nach Spülung der Säulen mit je 3 ml Wasser dest. wurden diese über die Alumina-Säulen gestellt und mit 15 ml Wasser dest. gewaschen.

Als dieses durchgelaufen war, wurden Behälter mit 13 ml Szintillationsflüssigkeit unter die Aluminasäulen gestellt. Die Eluation des cAMP erfolgte mit je 6 ml Tris-HCl (12,1 g Trisbase in 1 l Wasser dest., pH 7,5).

Nachdem die Behälter gut geschüttelt und für ca. 10 min in den Kühlschrank gestellt waren, konnte der Gehalt an ^3H -cAMP im Liquid-Szintillation-Counter (Fa. LKB Wallac 1219 Rackbeta) gemessen werden.

Die Dowex-Säulen mußten zum Schluß mit je 2 ml 1 M Salzsäure und 10 ml Wasser dest., die Alumina-Säulen mit 10 ml Tris-HCl gespült werden, um sie zu regenerieren.

2.12. Präparation und Kultur isolierter adulter Kardiomyozyten

Kalziumtolerante ventrikuläre Myozyten wurden aus 12-16 Wochen alten Wistar-Ratten (300-450 g) für die in vitro Infektionen isoliert. Die herausgenommenen Herzen wurden über die Aorta mit kalziumfreiem Powell-Medium (110 mmol/l NaCl, 2,5 mmol/l KCl, 1,2 mmol/l KH_2PO_4 , 1,2 mmol/l MgSO_4 , 11 mmol/l Glucose, 25 mmol/l NaHCO_3 , äquilibriert mit 5% CO_2 , pH 7,4) mit einem konstanten Flow (12 ml/min pro Gramm Herzgewicht) perfundiert. Nach 10 min begann die enzymatische Auflösung durch Auswechseln des kalziumfreien Puffers durch Powell-Medium, das 110 IU/ml Kollagenase II (Worthington, Freehold, New Jersey) und 30 $\mu\text{mol/l}$ Ca^{2+} enthielt. Als das Gewebe gut verdaut schien, nahmen wir das Herz von der Perfusion, legten das ventrikuläre Myokard frei und trennten es mechanisch in Powell-Medium unter kontinuierlicher Oxigenierung. Nach einer Filtration über eine Nylonmembran (200 μm Maschengröße) wurde die Zellsuspension bei 20 g für 3 min zentrifugiert und das Pellet in Powell-Medium + 0,2 mmol/l Ca^{2+} resuspendiert. Nachdem die Zellen sedimentiert waren, wurde das Pellet in Powell-Medium + 0,4 mmol/l Ca^{2+} aufgenommen und vorsichtig auf einen 4%igen Rinderserum-Albumingradienten in Powell-Medium (1 mmol/l Ca^{2+}) gebracht.

Nach Zentrifugation wurden die isolierten Zellen in M199-Medium (angereichert mit Vitaminen, nichtessentiellen Aminosäuren, 25 mmol/l HEPES, 10 $\mu\text{g/ml}$ Insulin, 100 IU/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin und 100 $\mu\text{g/ml}$ Gentamicin) resuspendiert, auf Laminin-beschichtete Platten (5-10 $\mu\text{g/cm}^2$) bei einer Dichte von 10^5 Zellen/ cm^2 plattiert und in wassergesättigter Luft (5% CO_2) bei 37°C kultiviert.

2.13. Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit rekombinanten Adenoviren

Die Infektion der ventrikulären Kardiomyozyten mit den Viren wurde 6-8 Stunden nach der Isolierung und Kultivierung durchgeführt. Bei einer MOI von 80 pfu/Zelle gaben wir die Viruslösung (in PBS, 2mM MgCl₂) auf die Zellen und inkubierten diese 1 Stunde bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das virushaltige Medium aspiriert und die Zellen für 72 Stunden in den Brutschrank gestellt.

Die rekombinanten Adoviren mit dem bicistronischen Konstrukt PTH/PTHrP-1-R-GFP gaben wir in einer Konzentration von 50 pfu/ml zu den isolierten Kardiomyozyten.

2.14. Messung der Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten

Wir führten die Versuche an isolierten infizierten Kardiomyozyten in einer Anlage zur Untersuchung einzelner Zellen durch (Fa. Scientific Instruments, Heidelberg). Die Kontraktilität wurde durch ein elektro-optisches System gemessen, das digital die Amplitude und die Geschwindigkeit der Zellverkürzung und -relaxation erfasste, in einer Temperatur-kontrollierten Küvette (37°C), bei einem konstanten Flow des Mediums von 0,5 ml/min. und in einem konstanten elektrischen Feld. Eine 1,8 mmol/l Ca²⁺-Tyrod-Lösung wurde verwendet.

Durch eine externe Stimulation von 50 Volt und 800 msec Pulsdauer, reizten wir die Kardiomyozyten bis sie eine Kontraktionsfrequenz von 70/min erreicht hatten. Nachdem die Kontraktionsamplitude stabil war, wurden die Versuche mit ansteigenden Konzentrationen von PTH (1-34), PTHrP (1-34) und Isoproterenol begonnen. Alle Zellen bedeckten wir schliesslich mit Isoproterenol (0,1 µmol/l) um ihr Überleben zu kontrollieren.

Die intrazelluläre cAMP-Konzentrationen bestimmten wir mit ELISA-Assays an Kardiomyozyten, die in einer Dichte von 1 x 10⁵ Zellen/cm² ausplattiert waren (siehe Handbuch des Herstellers). Dazu verwendeten wir ein cAMP-bindendes Protein.

2.15. Radioliganden-Bindung

Die verwendeten Zellen wurden 48 Stunden nach der adenoviralen Infektion geerntet und die Membranen präpariert. Die Radioliganden-Bindung von ^{125}I -(Nle_{8,18})(Tyr₃₄)-PTH(1-34) mit oder ohne unmarkiertem PTH (1-34) (5×10^{-7} mol/l) wurde für 6 Stunden bei 4°C nach Zugabe von 100 mmol/l NaCl und 5 mmol/l KCl durchgeführt. Anschließend wurde der gebundene Radioligand über Whatman-C-Filter abgetrennt und dessen Aktivität in Szintillationsflüssigkeit (Roth) in einem Gamma-Counter bestimmt.

Den Proteingehalt jeder Probe bestimmten wir mit der Bradford-Methode (Bradford 1976).

2.16. Verwendete Materialien

Material	Firma	Bestellnummer
tritiertes Adenin	Amersham Life Science	TRK 343 B91
Agarose Serva	Boehringer Ingelheim	11404
Alumina	Sigma	A 9003
AMP	Sigma	A 1877
Ampicillin	Gibco BRL	
ATP	Sigma	A 2383
cAMP	Sigma	A 0703
Cellufine Sulfat	Amicon	19845
Chloramphenicol	Sigma	
D-MEM	Gibco BRL	41965-039
DMSO	Sigma	D 8779
DNA Molecular Weight Marker	Boehringer Mannheim	
Dowex	Sigma	1X2 100
E-coli JM109	Promega	L 1001
EDTA	Sigma	ED 455
FBS	Gibco BRL	100081-156
Gelextraktionskit	Boehringer	1696505
HCl	Merck	1.09057.1000
H9c2-Kardiomyoblasten (von Ratten)	American Type Culture Collection	CRL 1446
HEK-293-Zellen	American Type Culture Collection	
IBMX	Sigma	I 7018
L-broth	Life Technologies	
Maxiprep Kit	Qiagen	12162
Miniprep Kit	Qiagen	27104
NaH ₂ PO ₄	Merck	1.06346.1000
NaHCO ₃	Merck	1.06329.1000

Opti-MEM 1	Gibco BRL	31985-047
PBS	Sigma	D 5780
PCR Purification Kit	Qiagen	28701
Pen/Strep	Sigma	P 0906
Plasmide	Invitrogen	
PTH 1-84	Bachem	H 3086
PTH 1-34	Bachem	H 5460
PTHrP 1-34	Bachem	H 6630
PTHrP 107-111 (Osteostatin)	Bachem	H 8645
Reinigungsröhrchen für DNA (centricon 30)	Amicon	
Restriktionsendonukleasen	Boehringer Mannheim	
Säulen für cAMP-Assay (Volumen 10 ml)	Bio-Rad	731-1550
SAP	Boehringer Mannheim	
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen	301305
Szintillations-Probengefäße	Sarstedt	73.662
Szintillationsflüssigkeit	Roth	0016.1
T4 DNA Ligase	Gibco BRL	15224-025
T-25/175-Flaschen	Greiner	
TCA	Merck	807.0256
Transfektionsreagenz	Qiagen	301305
Tris-Puffer	Sigma	T 1503
Tryptone	Difco	0123-17-3
X-Gal	Boehringer Mannheim	

2.17. Statistik

Aus den in den Versuchen erhaltenen Daten wurden Mittelwerte gebildet und Standardabweichungen des Mittelwertes (S.E.M.) errechnet.

Die Ergebnisse wurden mit ANOVA (analysis of variance) für mehrfache Messungen und dem post-hoc-Test nach Scheffé ausgewertet.

Wo notwendig, wurde der Student-t-Test für unverbundene Stichproben durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Expression eines funktionellen PTH/PTHrP-1-Rezeptors in Kardiomyoblasten

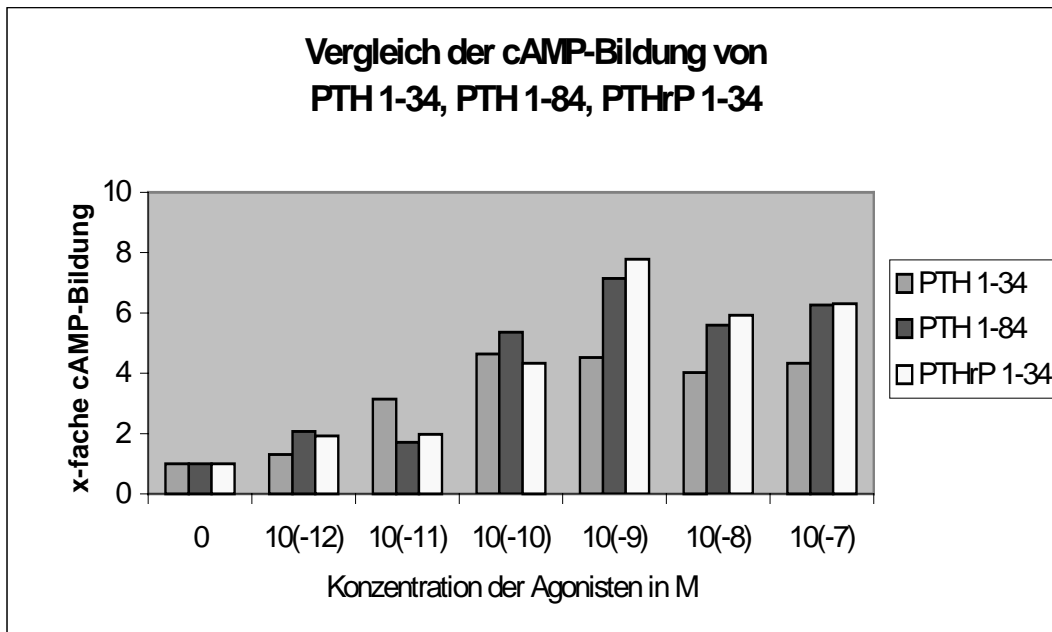
Die im folgenden besprochenen Ergebnisse zeigen, daß es möglich ist, einen funktionellen PTH/PTHrP-1-Rezeptor, der in ein Plasmid inkloniert ist, mittels viraler Vektoren in kardiale Zellen einzuschleusen und zu exprimieren.

Als Modell für die funktionellen Messungen verwendeten wir H9c2-Kardiomyoblasten, die ähnliche Charakteristika der β -adrenergen Signaltransduktion wie das humane Myokard besitzen. Ferner können sie in einer standardisierten Weise kultiviert werden und erleichtern so die Vergleichbarkeit der Experimente.

Der Versuch, Plasmide, die das Gen für den PTH/PTHrP-1-Rezeptor enthielten, in isolierte adulte Kardiomyozyten liposomal zu transfizieren, zerstörte die Zielzellen, so daß die funktionellen Messungen an Kardiomyoblasten durchgeführt wurden.

3.2. Vergleich der intrazellulären cAMP-Bildung nach Stimulation mit PTH 1-34, PTH 1-84, PTHrP 1-34 und Osteostatin

Die Bildung von cAMP wurde an mit pcDNA-PTH1-R transfizierten H9c2-Kardiomyoblasten nach Stimulation mit PTH 1-34, PTH 1-84, PTHrP 1-34 oder Osteostatin getrennt in Assays gemessen. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger, bis zu 8-facher Anstieg der cAMP-Bildung. Die Tatsache, daß die die AS 1-34 enthaltenden Fragmente aktiv sind, deckt sich mit den Ergebnissen von Nakamura et al. 1981, Wang et al. 1984, Shew et al. 1984, Sham et al. 1986 und Schlüter et al. 1997. PTHrP 1-34 war etwas potenter als PTH 1-34 oder PTH 1-84 cAMP zu bilden, Osteostatin dagegen hatte gegenüber der Kontrolle keinen Effekt auf seine Bildung (Abbildung 3 und 4).



□

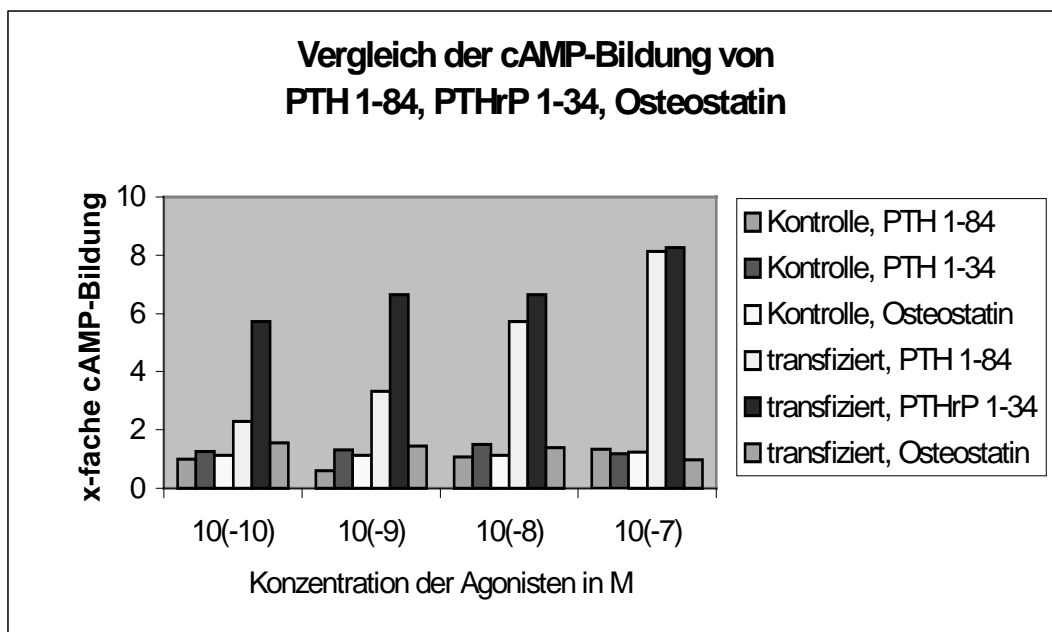


Abbildung 3 und 4

Vergleichende cAMP-Assays von mit pcDNA-PTH1-R transfizierten H9c2-Kardiomyoblasten nach Stimulation mit PTH 1-84, PTH 1-34, PTHrP 1-34 und Osteostatin.

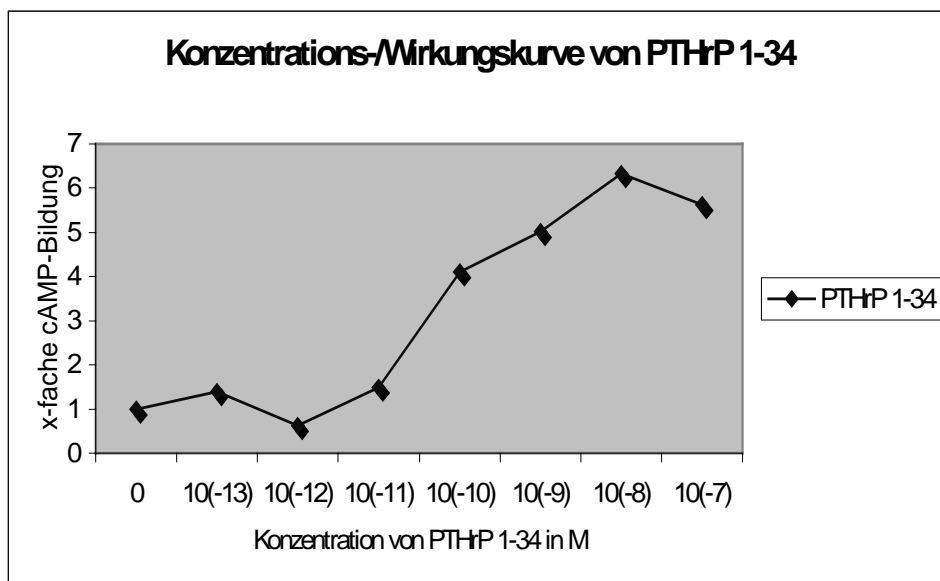
PTH 1-84, bzw. die Fragmente PTH 1-34 und PTHrP 1-34 führen konzentrationsabhängig zur Bildung von cAMP, wobei PTHrP 1-34 den stärksten Effekt zeigt. Zu bemerken ist, daß das C-terminale Ende des PTHrP, das die Aminosäuren 107-111 enthaltende Fragment Osteostatin keinen Einfluß auf die cAMP-Bildung hat.

Das Assay wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.

3.3. Konzentrations-/Wirkungskurve von PTHrP 1-34

PcDNA-PTH1-R transfizierte Kardiomyoblasten wurden in ansteigender Konzentration mit PTHrP 1-34 stimuliert, um eine Konzentrations-/Wirkungskurve zu bilden. Ergebnis war ein bis zu einer Konzentration von 10^{-8} M von ihr abhängiger bis zu 6,5-facher Anstieg der cAMP-Bildung und bei 10^{-7} M ein leichter Abfall (siehe Abbildung 5).

Der Versuch wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.



□

Abbildung 5

Anstieg der cAMP-Bildung nach Stimulation von H9c2-Kardiomyoblasten mit PTHrP 1-34. Die Zellen wurden zuvor mit dem Plasmid pcDNA-PTH1-R transfiziert. Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt, der bei 10^{-11} M beginnt. Das Assay wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.

3.4. Funktionelle Messung von Plasmiden mit cAMP-Assays

Es wurden sieben verschiedene Plasmide, die das Gen für den PTH/PTHrP-1-Rezeptor tragen, funktionell mit cAMP-Assays gemessen. Damit wiesen wir biochemisch über eine Messung der intrazellulären cAMP-Bildung erstens den Effekt der Transfektion der Plasmide und zweitens die Expression des Rezeptors nach. Bei allen Plasmiden zeigte sich ein cAMP-Anstieg nach Stimulation mit PTH 1-84 oder PTHrP 1-34.

Alle Plasmide tragen den gewebeunspezifischen Cytomegalievirus-(CMV-)Promotor und eine SV40-Polyadenylationssequenz.

3.4.1. Plasmid pcDNA-PTH1-R und Kontrollplasmid pcDNA III

Die funktionelle Messung des Plasmides pcDNA-PTH1-R (Abbildung 6) mit dem Assay zeigt deutlich, daß die mit pcDNA-PTH1-R transfizierten H9c2-Kardiomyoblasten nach Stimulation mit den Agonisten cAMP freisetzen, während die Stimulation des Leerplasmides keinen Effekt auf die Adenylatzyklase zeigt (Abbildung 7). Mit Restriktionsendonukleasen wurde das Gen im folgenden ausgeschnitten und in das Proplasmid pdE1BCMV, das Teile des Ad-Genoms trägt, kloniert.

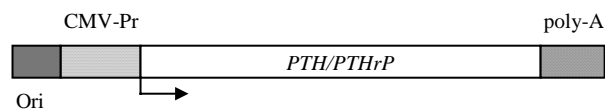


Abbildung 6

Kastengrafik des Plasmids pcDNA-PTH1-R

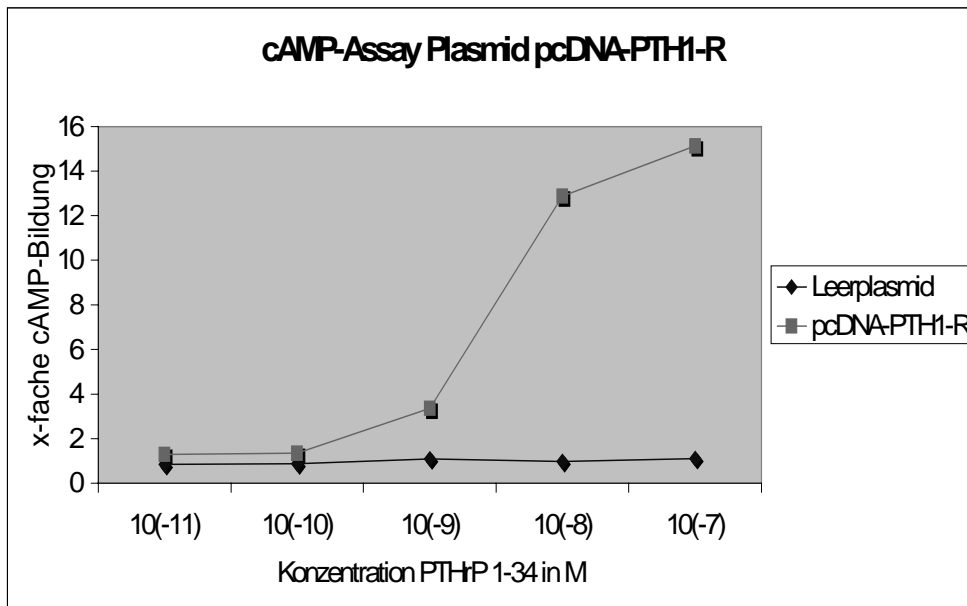


Abbildung 7

Vergleich der cAMP-Bildung von mit dem Leerplasmid pcDNA III-transfizierten H9c2-Kardiomyoblasten mit Kardiomyoblasten, in die das Plasmid pcDNA-PTH1-R mit dem Gen für den PTH/PTHrP-Rezeptor eingeschleust wurde. Man sieht, daß nur die pcDNA-PTH1-R-transfizierten Zellen cAMP bilden.

Das Assay wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.

3.4.2. Ad-Proplasmid pdE1BCMV-PTH1-R

Das Proplasmid pdE1BCMV-PTH1-R enthält den CMV-Promotor, das Gen für den PTH/PTHrP-Rezeptor, eine Ampicillinresistenz und Teile des Ad5-Genoms mit einer Deletion in den E1-Sequenzen (Abbildung 8). Es kann zur Züchtung rekombinanter Adenoviren, die das Insert in der Region E1 tragen, verwendet werden. Dazu muß es mit dem Plasmid pJM17, das ebenfalls adenovirale Gene enthält, in 293-Zellen cotransfiziert werden, in welchen dann replikationsdefiziente Viren entstehen. (Für die Versuche vorliegender Arbeit wurden die rekombinanten Adenoviren allerdings mit einer neueren Methode in *E. coli* erstellt.) Das Plasmid pdE1BCMV hat den Nachteil, kein Markergen zu enthalten, das die Expression des Transgens anzeigt.

Mit dem Proplasmid pdE1BCMV-PTH1-R transfizierte Kardiomyoblasten setzten im Assay nach Stimulation mit den Agonisten cAMP frei, was einer positiven funktionellen Messung entspricht. Die Kontrolle mit dem Leerplasmid führte zu keinem Anstieg des Second-Messengers (Abbildung 9).

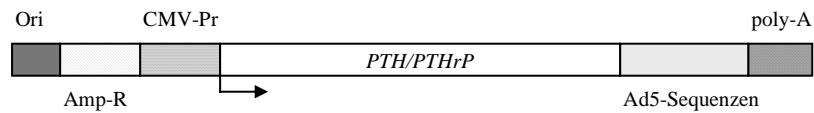
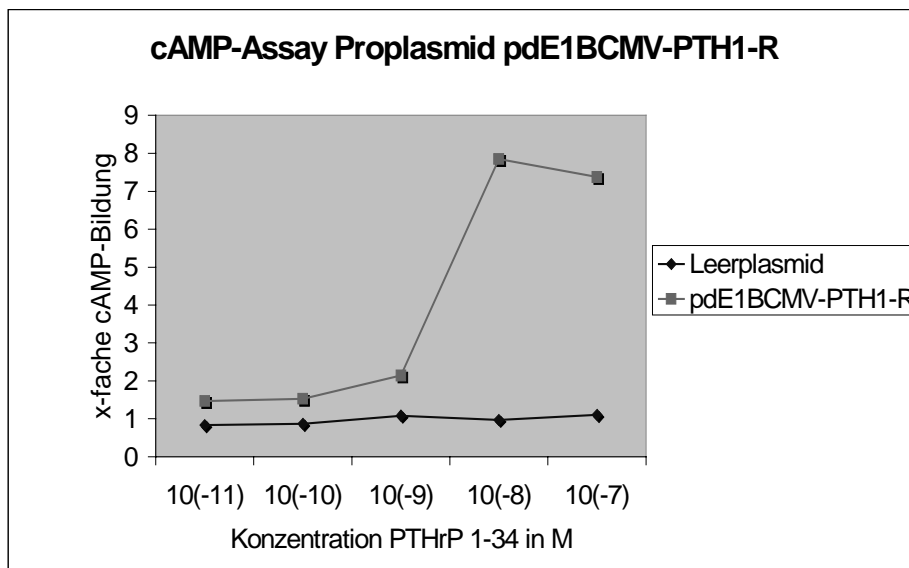


Abbildung 8

Kastengrafik des Plasmids pdE1BCMv-PTH1-R



□

Abbildung 9

Konzentrationsabhängiger Anstieg der cAMP-Bildung nach Stimulation von H9c2-Kardiomyoblasten mit PTH 1-84, die zuvor mit dem Plasmid pdE1BCMv-PTH1-R transfiziert worden waren. Die Kontrolle der mit einem Leerplasmid transfizierten Zellen zeigt keinen cAMP-Anstieg.

Das Assay wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.

3.4.3. Ad-Proplasmid pAdTrack-PTH1-R

Das Gen für den PTH/PTHrP-Rezeptor wurde in das Proplasmid pAdTrack, einen bi-cistronischen Vektor mit 2 CMV-Promotoren (Abbildung 10) kloniert und in H9c2-Kardiomyoblasten transfiziert. Da das Plasmid auch das Gen für das GFP enthält, konnte seine Expression in den Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert werden. Die erfolgreich transfizierten Zellen leuchteten auf, so daß die Transfektionsrate abgeschätzt werden konnte. Anschließend wurde das

Plasmid funktionell gemessen. Es zeigte eine bis zu 7-fache Bildung von cAMP nach Stimulation mit PTH 1-84 oder PTHrP 1-34 (Abbildung 11). Dieses Plasmid cotransformierten wir nach dem positiven Assay mit einem zweiten Plasmid, pAdEasy, zur Virusreplikation in E. coli (Methode siehe Diskussion).

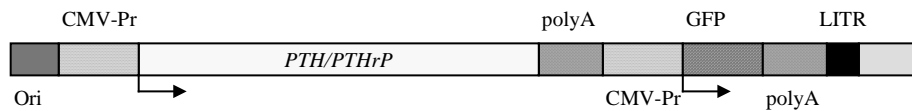


Abbildung 10

Kastengrafik des Plasmids pAdTrack-PTH1-R

□

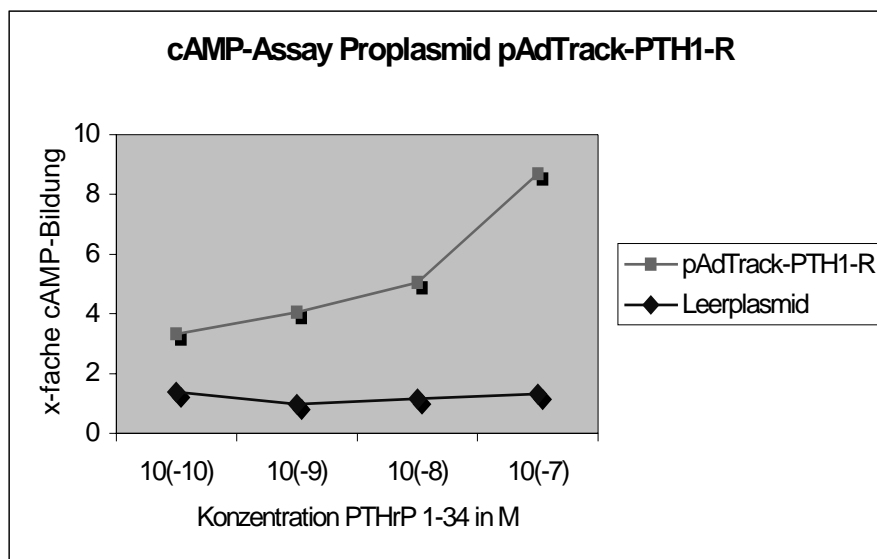


Abbildung 11

Bildung von cAMP durch H9c2-Kardiomyoblasten, die zuvor mit dem Plasmid pAdTrack-PTH1-R transfiziert worden waren, nach Stimulation mit PTHrP 1-34. Die Kontrolle zeigt keine Bildung des Second-Messengers.

Das Assay wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.

3.4.4. AAV-Proplasmid psub-PTH1-R

Als erstes Proplasmid für die Züchtung rekombinanter AAV wurde das Plasmid psub-PTH1-R kloniert (Abbildung 12). Im Assay zeigte es nach Stimulation mit PTH 1-84 eine konzentrationsabhängige, bis zu 11-fache Bildung von cAMP (Abbildung 13).



Abbildung 12

Kastengrafik des Plasmids psub-PTH1-R

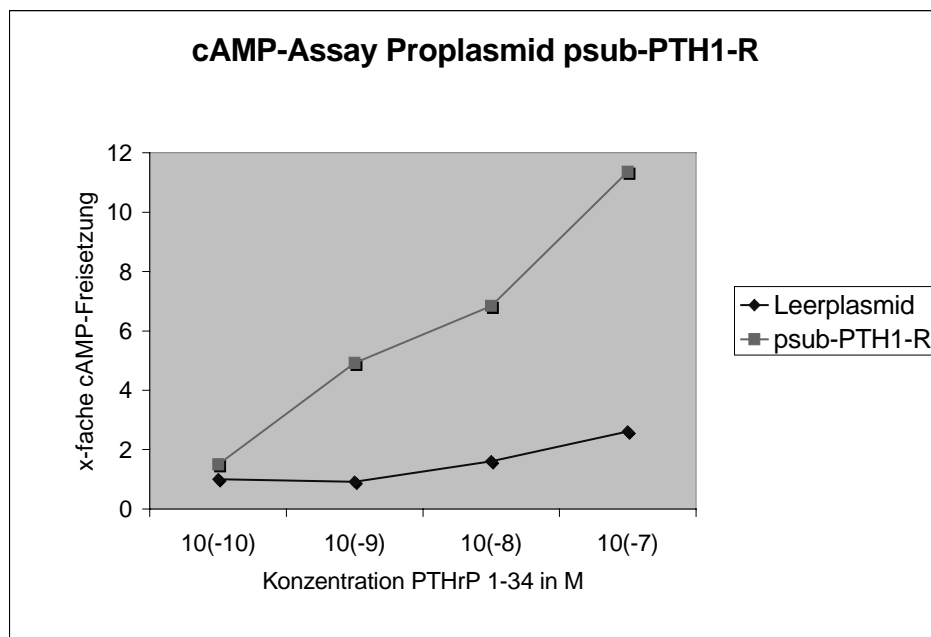


Abbildung 13

Bildung von cAMP durch H9c2-Kardiomyoblasten, die zuvor mit dem Plasmid psub-PTH1-R transfiziert worden waren, nach Stimulation mit PTHrP 1-34. Die Kontrolle zeigt keine Bildung des Second-Messengers. Das Assay wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.

3.4.5. AAV-Proplasmid psubgfp-PTH1-R

Um den mit AAV infizierten Zellen, in denen die eingeschleusten Fremdgene exprimiert werden, einen selektierbaren Phänotypen zu verleihen, wurde in das Proplasmid psub-PTH1-R zusätzlich das Gen für das Green Fluorescent Protein (GFP), das nach Expression in den Zielzellen unter UV-Licht fluoresziert, als Selektionsmarker inkloniert. Als Starter für seine Transkription wurde ein SV40-Promotor (aus dem Simian Virus 40, Gruppe der sogenannten Papovaviren stammend) eingefügt (Abbildung 14). Die funktionelle Messung im cAMP-Assay bewies eine positive Umklonierung, d.h. transfizierte Kardiomyoblasten bildeten cAMP (Abbildung 15).

Transfizierte Zielzellen leuchteten im Test auf Fluoreszenz aber nur sehr schwach auf. Dies liegt wohl daran, daß der Promotor SV40 nicht potent genug für die Steuerung der Transkription des Gens GFP ist. Üblicherweise wird dieser Promotor in COS-Zellen (CV1 Origin SV40) verwendet. Dies sind von der etablierten Affennieren-Zelllinie CV1 abgeleitete Zellen, die durch Behandlung mit einer Mutante des Affenvirus SV40 entstanden sind. Für die Transkription dieses Genoms ist die Stärke des Promotors ausreichend.

Das Ergebnis zeigt, daß das Gen für das GFP, das in das Proplasmid psubgfp-PTH1-R inkloniert war, durch den zu schwachen Promotor seinen Zweck verloren hat, infizierte Zellen zu markieren.

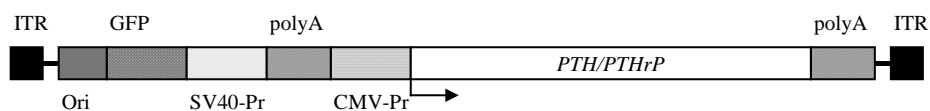


Abbildung 14

Kastengrafik des Plasmids psubgfp-PTH1-R

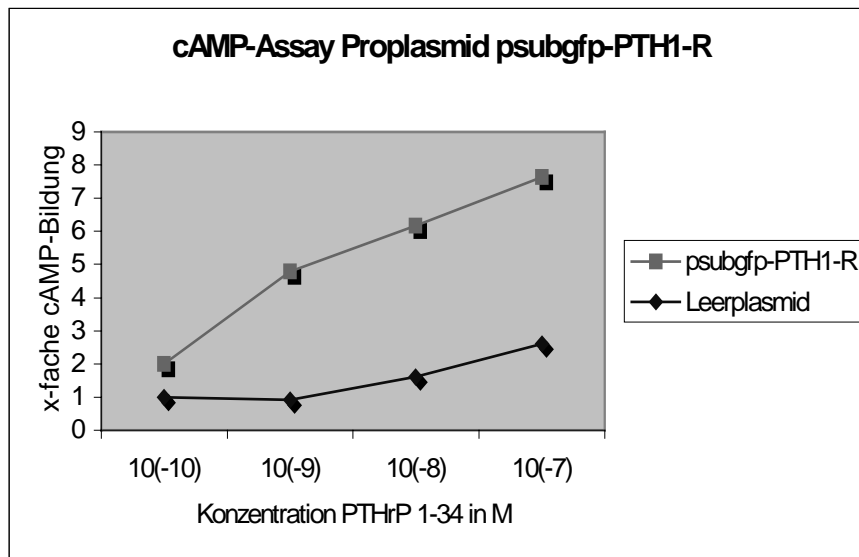


Abbildung 15

Anstieg der cAMP-Bildung nach Stimulation von H9c2-Kardiomyoblasten mit PTHrP 1-34. Die Zellen wurden zuvor mit dem AAV-Proplasmid psubgfp-PTH1-R transfiziert. Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt. Das Assay wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.

3.4.6. AAV-Proplasmid AAV-PTH1-R-IRES-EGFP

Da die Aufnahmekapazität von AAV-Vektoren auf etwa 4,5 kb begrenzt ist, muß für größere Transgene eine sogenannte Internal Ribosome Entry Site (IRES) inkloniert werden. Dieses aus einem Enzephalomyokarditisvirus stammende Gen erlaubt es, zwei Gene mit nur einem Promotor in die Transkription einzubringen. Es wird eine lange mRNA gebildet, die an die Ribosomen gelangt. Dort wird sie nach der Translation des ersten Gens durch die IRES wieder an das Ribosom angedockt, und die Proteinbildung des zweiten Gens beginnt. Der Vorteil liegt darin, einen zweiten Promotor und damit Transportkapazität des Vektors einzusparen.

Das von uns klonierte Proplasmid AAV-PTH1-R-IRES-EGFP (Abbildung 16) enthält eine solche IRES, den CMV-Promotor und, als Selektionsmarker der trans- oder infizierten Zielzellen, das Gen EGFP, das aus Mutationen des GFP entstanden ist und wesentlich heller aufleuchtet.

□□ Nach der Transfektion von Kardiomyoblasten mit dem Plasmid, leuchteten die erfolgreich transfizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf.

Auch dieses AAV-Proplasmid zeigte im cAMP-Assay eine Bildung des Second-Messengers nach Stimulation mit dem Agonisten PTHrP 1-34 (Abbildung 17).

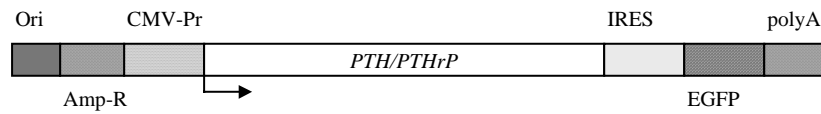


Abbildung 16

Kastengrafik des Plasmids AAV-PTH1-R-IRES-EGFP

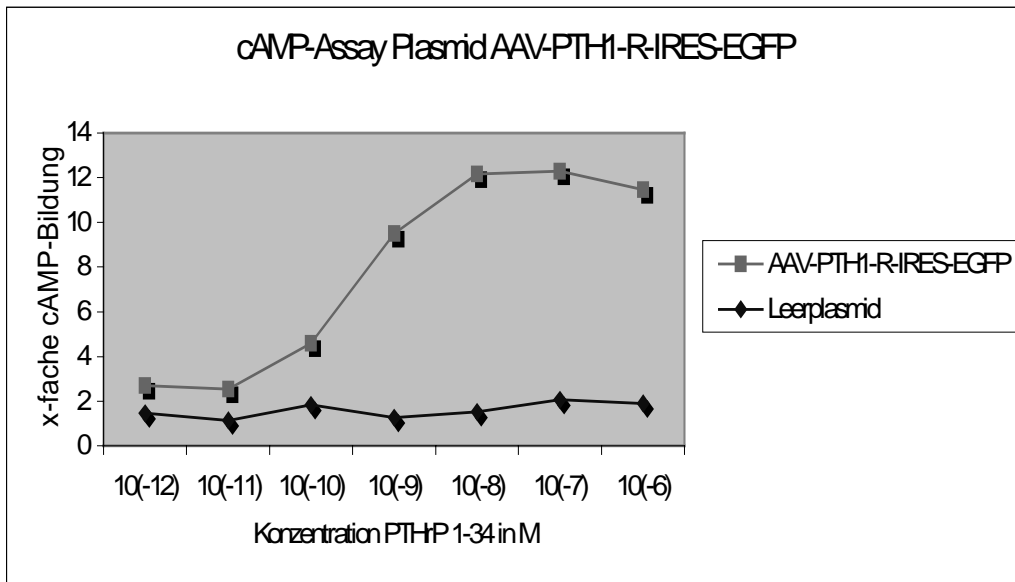


Abbildung 17

Anstieg der cAMP-Bildung nach Stimulation von H9c2-Kardiomyoblasten mit PTHrP 1-34. Die Zellen wurden zuvor mit dem AAV-Proplasmid AAV-PTH1-R-IRES-EGFP transfiziert. Es zeigt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt, der bei 10⁻¹¹ beginnt.

Das Assay wurde in Dreifachmessungen durchgeführt.

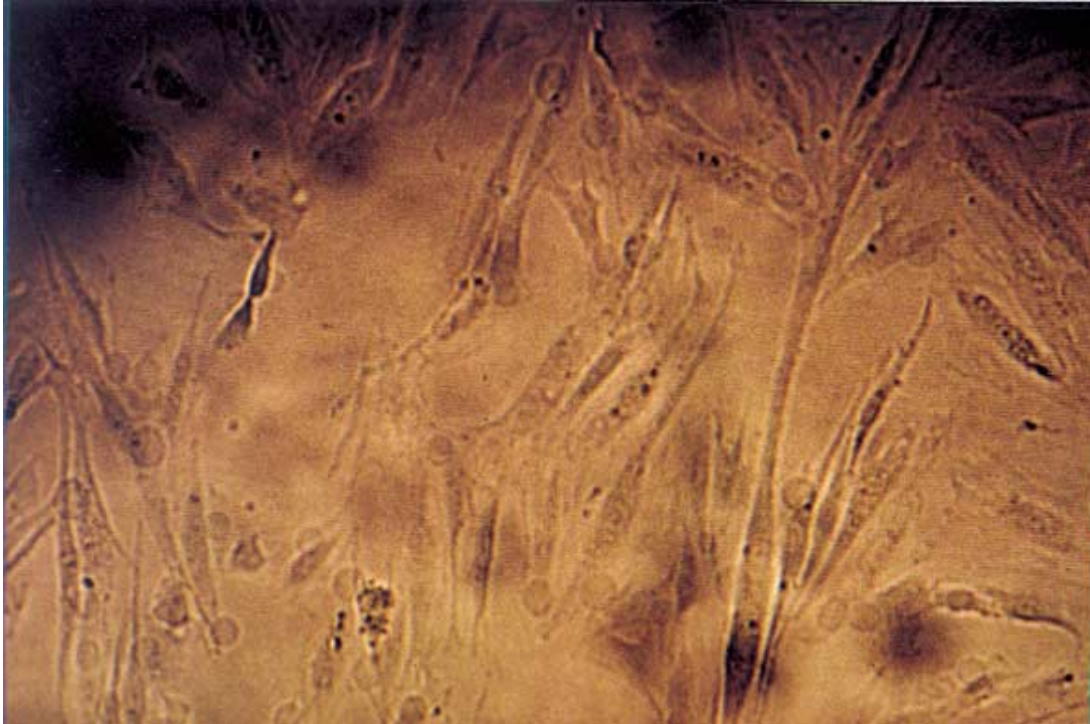
3.5. Effektivität eines adenoviralen Gentransfers

Für die Versuche wurden adenovirale Konstrukte (Serotyp 5) mit dem LacZ-Gen (Ad-βGal) verwendet.

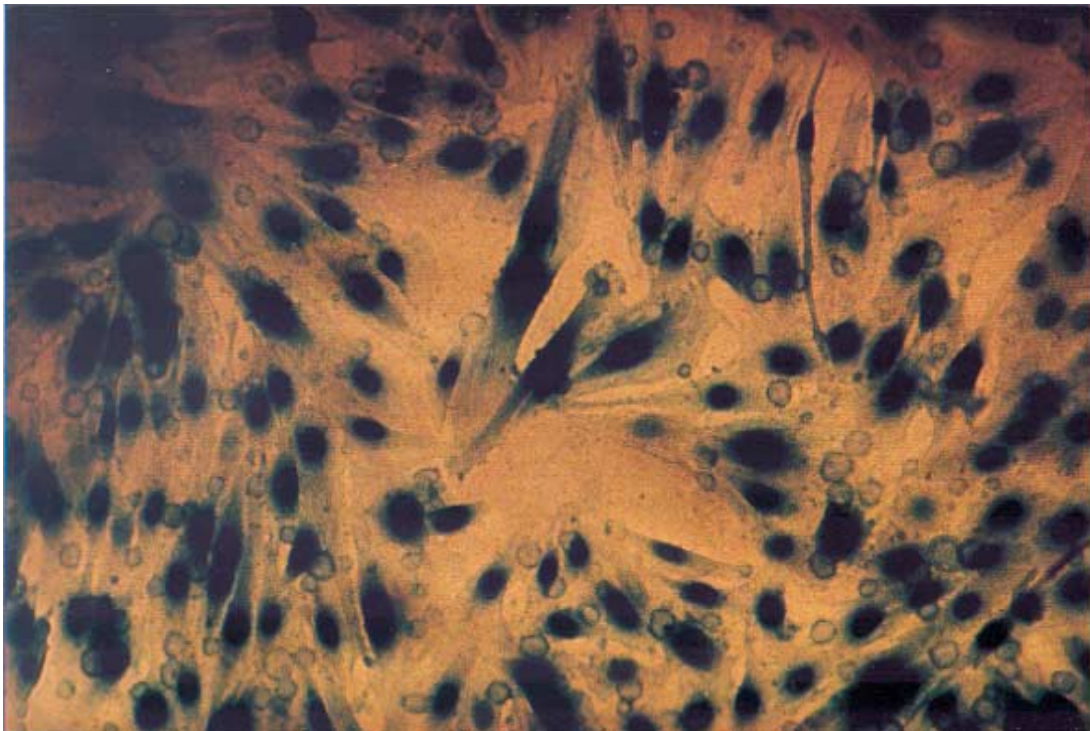
3.5.1. Infektion von H9c2-Kardiomyoblasten mit Ad-βGal

Zur Quantifizierung des adenoviralen Gentransfers wurden H9c2-Kardiomyoblasten mit βGal-Adenoviren (100 pfu/Zelle) infiziert und das Ergebnis mit der Kontrolle nichtinfizierter Zellen verglichen. Abbildung 18 B zeigt Kardiomyoblasten, die das von Adenoviren übertragene LacZ-Gen tragen. 36 Stunden nach Infektion mit dem Virus und folgender Anfärbung mit dem Chromogen X-Gal, zeigen nahezu 100% der Kardiomyoblasten eine positive blaue Färbung im Kern. Die Kontrollzellen, die nur mit PBS ohne Virus inkubiert worden waren, lassen sich dagegen nicht anfärben (Abbildung 18 A). Die Effektivität eines adenoviralen Gentransfers in Kardiomyoblasten beträgt demnach fast 100%.

Infektion von H9c2-Kardiomyoblasten mit β Gal-Adenoviren



A



B

Abbildung 18

Lichtmikroskopische Aufnahmen von H9c2-Kardiomyoblasten, die 36 Stunden mit β Gal-Adenoviren (100 pfu/Zelle) in PBS infiziert worden waren (B). Die Kontrolle wurde nur mit PBS inkubiert (A). Nach Inkubation wurden die Zellen mit X-Gal-Färbelösung gefärbt.

3.5.2. Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit Ad-βGal

Ferner infizierten wir adulte Kardiomyozyten, die aus dem Myokard einer Ratte isoliert worden waren, mit βGal-Adenoviren. Nach Zugabe von X-Gal zeigten die infizierten Zellen eine positive dunkelblaue Färbung, die Expressionsrate wurde auf ca. 50% geschätzt, d.h. sie war in den isolierten adulten Kardiomyozyten geringer als in den Kardiomyoblasten (Abbildung 19).

3.5.3. Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit Ad-PTH1-R-GFP

Gleiche Zellen infizierten wir mit rekombinanten Adenoviren, in die wir zuvor ein bicistronisches Konstrukt, bestehend aus dem PTH/PTHrP-1-Rezeptor und dem Markergen GFP, das infizierte Zellen grün fluoreszierend erkennen lässt, inkliniert hatten. Abbildung 20 zeigt grün fluoreszierende Kardiomyozyten, die das PTH/PTHrP-1-Gen exprimiert haben.

Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit β Gal-Adenoviren

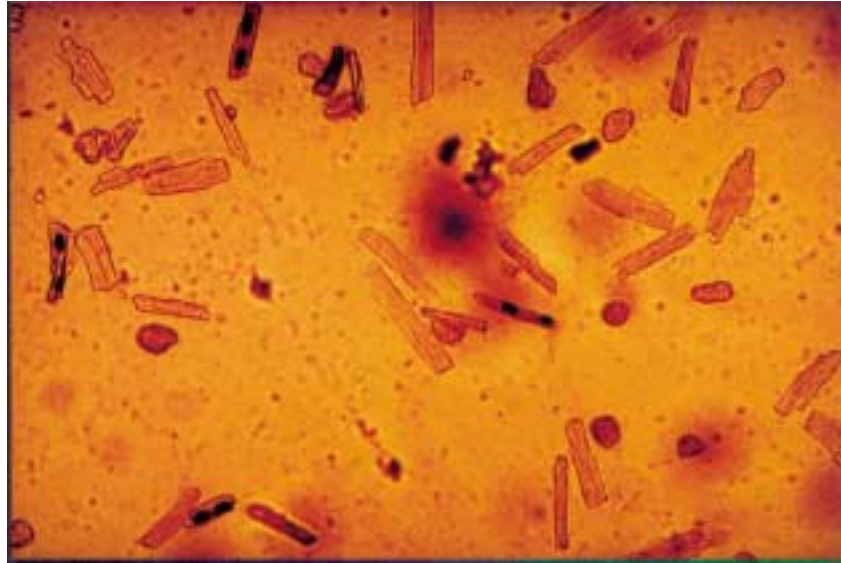


Abbildung 19

Lichtmikroskopische Aufnahmen adulter Kardiomyozyten, die nach direkter Injektion von β Gal-Adenoviren aus dem Myokard einer Ratte isoliert worden waren.

Die Zellen, die das lacZ-Gen exprimiert haben, zeigen eine positive Anfärbung nach Zugabe von X-Gal-Färbelösung. Die Expression des Reportergens wurde auf ca. 50% der intakten Zellen geschätzt.

Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit Ad-PTH1-R-GFP



A



B

Abbildung 20

Lichtmikroskopische Aufnahmen adulter Kardiomyozyten, die mit Ad-PTH1-R-GFP infiziert worden waren.

Abbildung A zeigt eine normale lichtmikroskopische Aufnahme, Abbildung B die Ansicht unter dem Fluoreszenzmikroskop. Infizierte Zellen leuchten durch das exprimierte GFP grün auf. Die Expressionsrate kann auf nahezu 100% geschätzt werden.

Eine durchgeführte Radioliganden-Bindung mit ^{125}I -PTH(1-34) zeigte eine Überexpression der PTH/PTHrP-1-Rezeptoren gegenüber den physiologischen PTH-Rezeptoren der Kontrollen (Abbildung 21). Der K_d -Wert der Bindung von ^{125}I -PTH zu dem PTH/PTHrP-1-R betrug 2 nmol/l. Dies entspricht den in der Literatur angegebenen Werten (Jüppner et al. 1991).

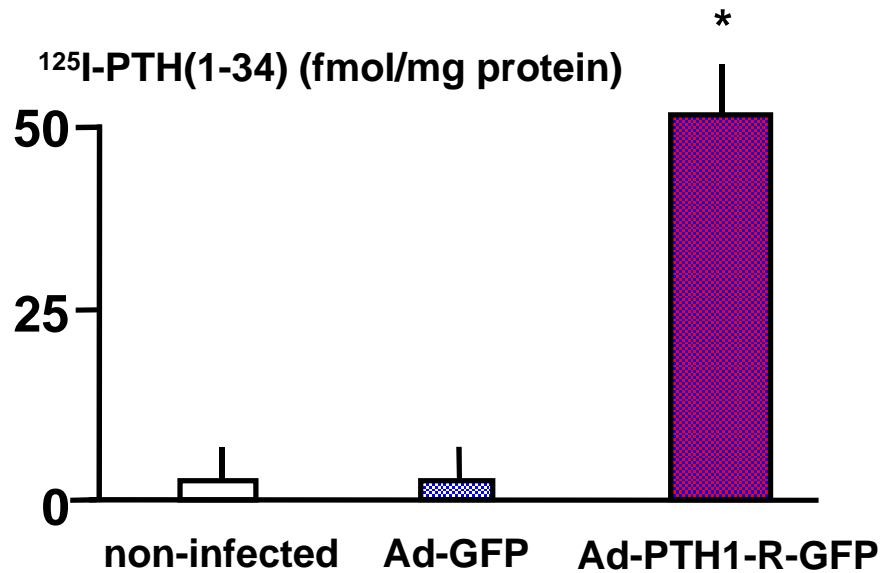


Abbildung 21

Ermittlung der Expression von PTH1-R in Ad-PTH1-R-GFP-infizierten Kardiomyzyten mittels Radioligandenbindung. Zur Bestimmung der B_{\max} -Werte wurden Membranen mit ^{125}I -PTH bei Konzentrationen zwischen 0,2 bis 8 nmol/l in An- und Abwesenheit von unmarkiertem PTH (5 $\mu\text{mol/l}$) inkubiert.

Die Daten wurden aus den Mittelwerten drei voneinander unabhängiger Experimente gebildet, die jeweils in Triplets durchgeführt wurden.

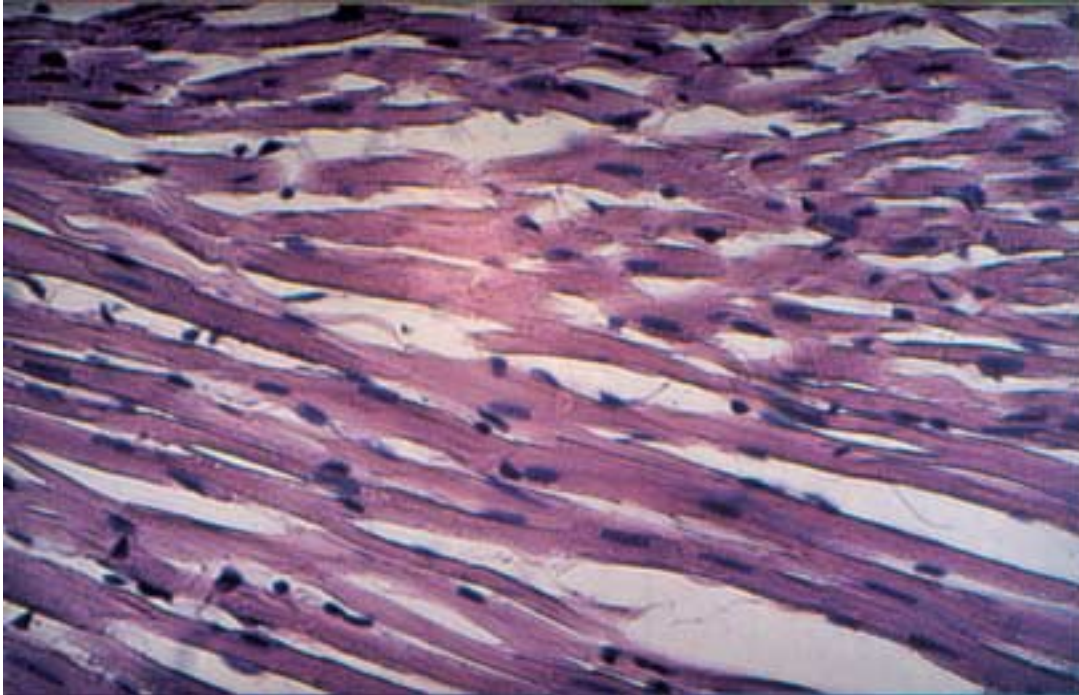
3.5.4. Ultraschallgesteuerte intramyokardiale Injektion von Ad- β Gal in vivo

Zur Infektion des Rattenmyokards mit Ad- β Gal in vivo wurde eine ultraschallgesteuerte Injektionsmethode entwickelt. Dabei führten wir die Nadel unter dem Xyphoid ein und punktierten unter echokardiographischer Kontrolle die untere Wand des linken Ventrikels. Der Sitz der Nadel und die korrekte Injektion konnten so in Echtzeit überprüft werden. Falsche Injektionen waren am Ausbleiben einer Echokontrastverstärkung zu erkennen. Bei korrektem Sitz wurden 10^9 pfu des Ad- β Gal injiziert.

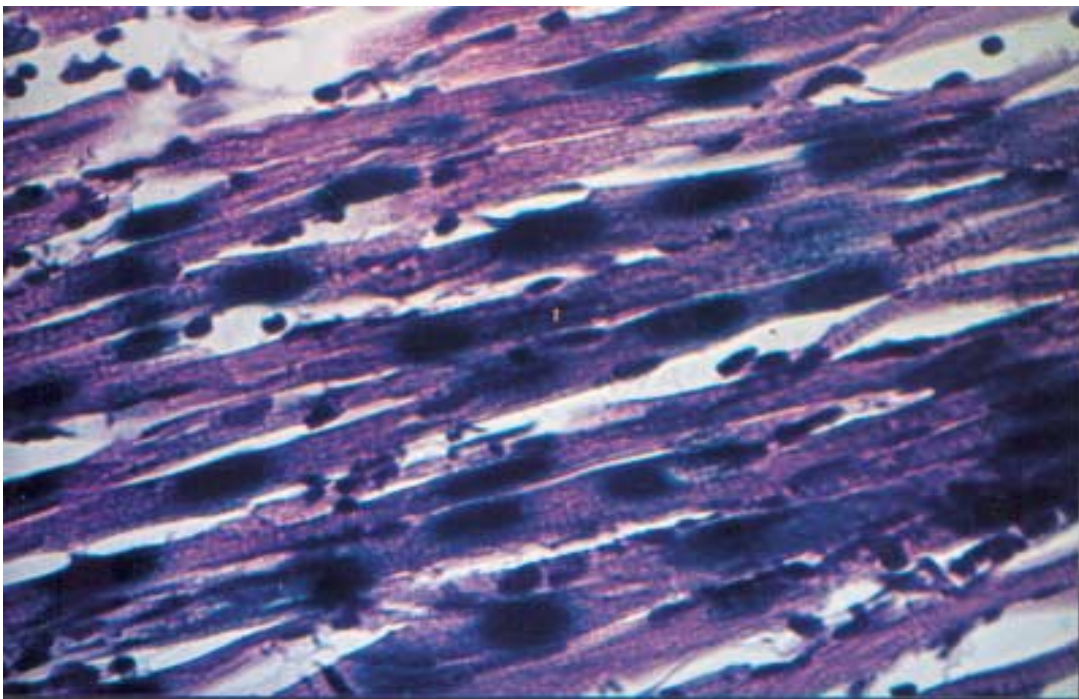
48 Stunden später wurde die Ratte geopfert, das Herz tiefgefroren, in 7 μ m dicke Scheiben geschnitten und mit X-Gal gefärbt. Eine Serie von Versuchen zeigte, daß ca. ein Fünftel des gesamten Myokards durch eine einzelne, fraktionierte Direktinjektion erreicht werden kann. Unter dem Mikroskop zeigten ca. 50% der Kardiomyozyten eine positive dunkelblaue Färbung, die Zellen der Kontrollschnitte blieben ungefärbt (Abbildung 22).

Entlang des Nadelkanals war eine schmale nekrotische Zone nachweisbar, um sie herum eine deutlich größere Fläche, in der das Transgen exprimiert worden war. Eine Expression der Beta-Galaktosidase in Leber, Milz, Aorta oder den Lungen der Tiere war nicht auszumachen.

Infektion eines Rattenmyokards mit β Gal Adenoviren in vivo



A



B

Abbildung 22

Lichtmikroskopische Aufnahmen von Schnitten durch das Myokard einer Ratte.

Abbildung A zeigt ein nicht infiziertes Myokard zur Kontrolle.

Abbildung B zeigt einen Schnitt durch ein Myokard, das 48 Stunden zuvor mit β -Gal Adenoviren (10^9 pfu) in vivo per direkter Injektion infiziert worden war. Ca. 50 % der Zellen exprimierten das Reportergen lacZ und weisen damit nach Behandlung mit X-Gal eine positive blaue Färbung auf.

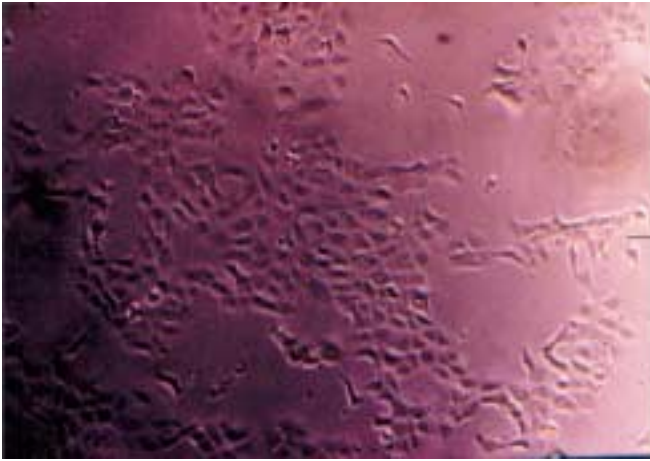
3.6. Effektivität eines Gentransfers mit Adeno-assoziierten Viren -

Infektion von HEK-Zellen mit AAVgfp ohne und mit adenoviraler Coinfektion

Zur Quantifizierung eines Gentransfers mit Adeno-assoziierten Viren infizierten wir in einer Versuchsreihe HEK-Zellen mit AAVgfp, zum Teil in Kombination mit Adenoviren. 24 Stunden später beurteilten wir unter dem Fluoreszenzmikroskop die Expressionsrate. Die AAV wurden in den Mengen 10, 20, 50 und 100 μ l verwendet, die Ad zur Coinfektion in den Konzentrationen 4 und 100 pfu/Zelle.

HEK-Zellen, die mit hohen Konzentrationen an Ad infiziert worden waren, zeigten zwar eine gute Expressionsrate, d.h. ein großer Prozentsatz der Zellen leuchtete unter dem Fluoreszenzmikroskop, sie wurden aber nach einiger Zeit rund als Zeichen ihrer Zerstörung durch die Adenoviren. Die besten Ergebnisse mit intakten Zellen und einer Expressionsrate von bis zu 70% zeigte die Infektion mit 10 μ l AAV und 4 pfu/Zelle Ad. Die Expressionsrate war in jedem Fall abhängig von den verwendeten Virustitern (Abbildung 23).

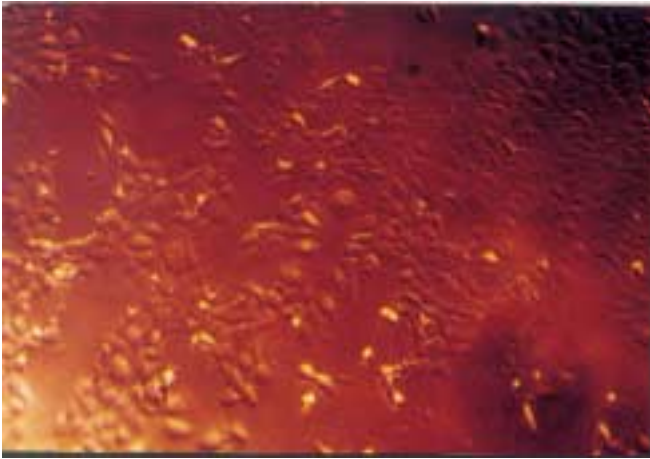
Infektion von HEK-Zellen mit AAVgfp



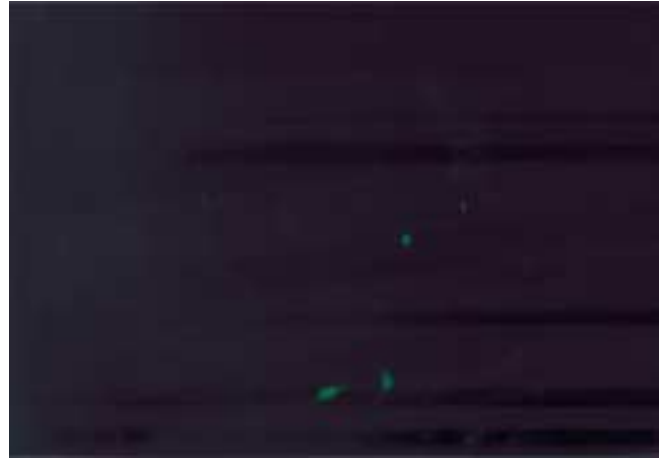
A



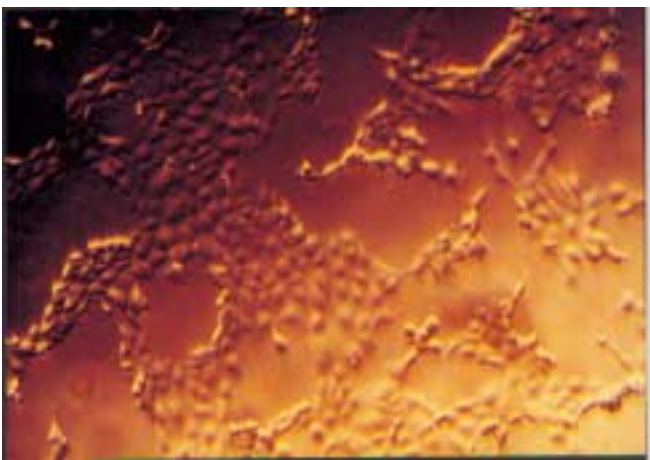
B



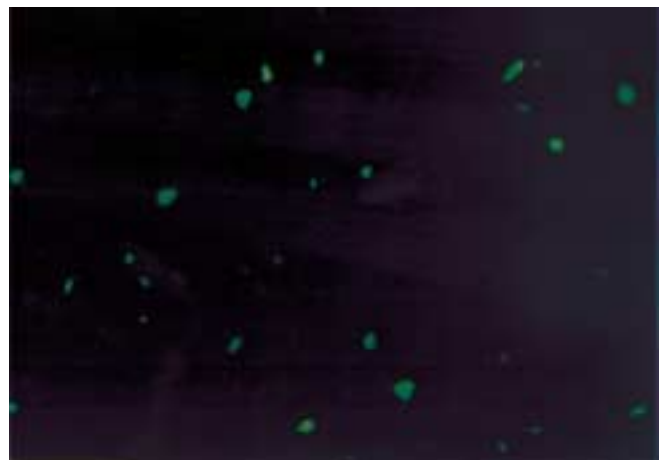
C



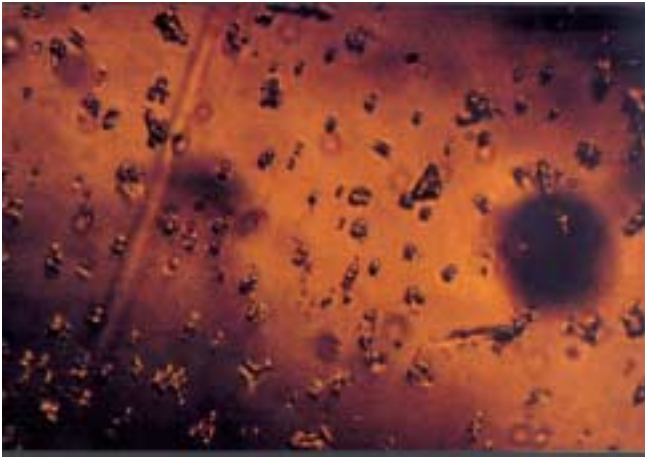
D



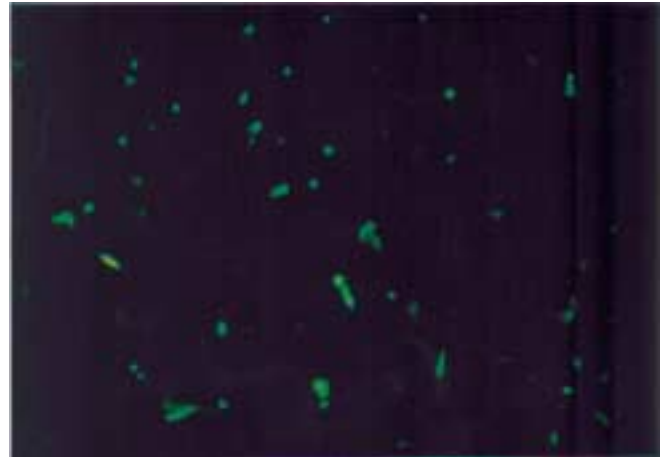
E



F



G



H

Abbildung 23

Lichtmikroskopische Darstellung von HEK-Zellen nach Infektion mit rekombinanten Adeno-assoziierten Viren, in die das Gen für das Green Fluorescenting Protein (GFP) einkloniert worden war. Die linken Bilder zeigen die Zellen unter dem Phasenkontrastmikroskop, die rechten Bilder die Ansicht unter dem Fluoreszenzmikroskop.

Abbildung A und B: nicht infizierte Kontroll-Zellen.

Abbildung C und D: mit 10 μ l AAV ohne Ad infizierte Zellen.

Abbildung E und F: mit 100 μ l AAV ohne Ad infizierte Zellen.

Abbildung G und H: mit 10 μ l AAV und 4 pfu Ad coinfizierte Zellen.

Abbildung G zeigt runde, durch Adenoviren zerstörte HEK-Zellen.

Vergrößerung 100-fach.

3.7. Effekte von PTH/PTHrP-1-R auf die Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten

Um den Effekt der heterologen Expression des PTH/PTHrP-1-Rezeptors auf die kontraktile Antwort ventrikulärer Kardiomyozyten zu testen, wurde nach Infektion mit einem rekombinanten Virus die Zellverkürzung gemessen. Als Modell wählten wir isolierte adulte Kardiomyozyten. Diese Zellen verfügen noch über die meisten der kontraktile Eigenschaften des intakten adulten Myokards.

Die Bedingungen der Zellkultur wurden so gewählt, daß jeweils die gleiche Kontraktionscharakteristik der Zellen gewährleistet war. Die Kardiomyozyten wurden elektrisch mit einer Frequenz von 70 Impulsen pro Minute stimuliert. Die basale Kontraktionsamplitude reichte von 3,4 bis 3,8 μm , die basale Kontraktilität betrug $+120\pm 30 \mu\text{m}/\text{sec}$ (dp/dt_{max}) und $-130\pm 45 \mu\text{m}/\text{sec}$ (dp/dt_{min}). Durch eine Infektion mit Ad-GFP (Kontrolle) veränderten sich diese Parameter nicht signifikant.

Weder die basale noch die Isoproterenol-abhängige Kontraktionsamplitude und Kontraktilität veränderten sich signifikant bei frisch isolierten Kardiomyozyten und isolierten Kardiomyozyten nach 48 bis 72-stündiger Kultur. Kontrollzellen, die mit Ad-GFP infiziert wurden, zeigten keine kontraktile Antwort nach Stimulation mit PTH oder PTHrP in sub-millimolaren Konzentrationen (siehe Abbildung 24)

Nach der Infektion mit Ad-PTH1-R erhöhte sich die basale Kontraktilität der Zellen ohne Zugabe der Agonisten bereits 3,5-fach. Nach Zugabe der PTH/PTHrP-1-R-Antagonisten Asn-Leu-Trp-PTHrP (7-34) oder His-Tyr-PTH (3-34) in der Konzentration 0,1 $\mu\text{mol}/\text{l}$ veränderte sich die Kontraktilität nicht signifikant.

Eine Zugabe der spezifischen PTH/PTHrP-1-R-Agonisten PTH 1-34 oder PTHrP 1-34 führte zu keiner weiteren Kontraktilitätszunahme (siehe Abbildung 24).

Die basale intrazelluläre cAMP-Bildung war nach Infektion der Kardiomyozyten mit dem Virus 2-fach gesteigert und wurde eindeutig weiter durch submillimolare Konzentrationen von PTH oder PTHrP erhöht, während in den Kontrollen sich kein Anstieg zeigte.

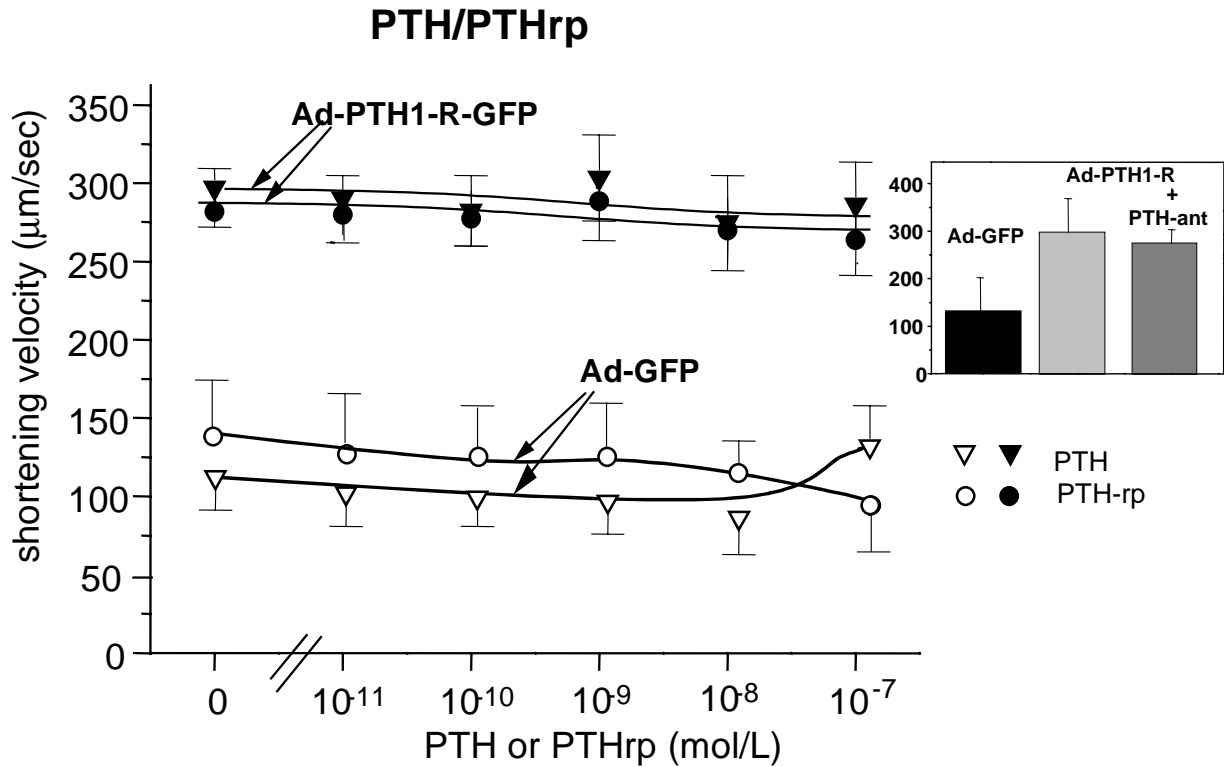


Abbildung 24

Messung der Kontraktionsamplituden und der Kontraktilität (dp/dt_{max}) an ventrikulären Kardiomyozyten.

Ad-PTH1-R-GFP- bzw. Ad-GFP-infizierte Zellen wurden mit ansteigenden Konzentrationen von PTH, PTHrP oder Isoproterenol (10 pmol/l bis 0,1 µmol/l) stimuliert.

Die kleine Abbildung zeigt den Effekt von PTH-Antagonisten auf die Kontraktilität der Kardiomyozyten.

dp/dt_{max} ist gezeigt als x-facher Anstieg über die Basalwerte. Die Daten sind aus den Mittelwerten \pm Standardabweichung von 30 unabhängigen Versuchsreihen gebildet worden.

4. Diskussion

In vorliegender Arbeit soll gezeigt werden, daß es möglich ist, einen heterologen Rezeptor - den PTH/PTHrP-1-Rezeptor – über rekombinante Viren in Herzzellen einzuschleusen. Damit wird die Signaltransduktion der kardiomyozytären Adenylatzyklase moduliert und ein positiv inotrop wirkender parakriner Zyklus geschaffen. Es wird gezeigt, daß so die Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten gesteigert werden kann.

Ferner wird die Effektivität eines Gentransfers sowohl durch Adenoviren als auch durch Adeno-assoziierte Viren anhand von Marker- und Reportergenen beschrieben.

4.1. Parathormon

Das Parathormon (PTH) wurde 1925 entdeckt. Es wird in den Glandulae Parathyroideae (Epithelkörperchen, Nebenschilddrüse) gebildet und reguliert den Kalzium-Haushalt. Es führt zu einer Kalzium-Mobilisierung aus dem Knochen, zu einer vermehrten tubulären Rückresorption von Kalzium in der Niere und zu einer Erhöhung seiner Resorption im Darm. Die Kalzium-Regulation an Knochen und Niere verläuft über PTH-Rezeptoren, die Wirkung an Darm über Vitamin D, dessen Synthese wiederum über PTH gesteuert wird.

PTH besteht aus 84 Aminosäuren (AS). Initial wird es als 115 AS PräproPTH synthetisiert (Habener et al. 1978, Rosenblatt et al. 1979, 1980, Handy et al. 1981, Vasicek 1983). Nach Abspaltung von 25 AS, v.a. in der Leber, wird es als Prosequenz bezeichnet, es folgt eine weitere Abspaltung von 6 AS. Die biologisch aktive Form wird in Granula gespeichert. Die weitere Spaltung von PTH verläuft vornehmlich in den Kupffer-Zellen der Leber. Es kommt v.a. zu Spaltungen zwischen den AS 33 und 43, beschrieben wurden aber auch andere Spaltorte (Macgregor et al. 1986). Die C-terminalen Fragmente verbleiben für einige Stunden im Serum (Goltzman et al. 1984), das intakte Hormon und das N-terminale Ende verschwinden dagegen sofort aus dem Kreislauf (Canterbury et al. 1974, Habener et al. 1984).

PTH hat β -adrenerge Effekte am vaskulären Gewebe und an Zellen der glatten Muskulatur (Pang et al. 1986). Es wirkt stark vasodilatatorisch. Darüberhinaus zeigt PTH dosisabhängig

relaxierende Effekte an anderen Geweben mit glatter Muskulatur, so z. B. am Uterus (Pang et al. 1981), im Gastrointestinal-Trakt (Yang et al. 1985), an der Trachea (Yen et al. 1983) und am Vas deferens (Zhang et al. 1985). Auch eine Stimulation der Reninfreisetzung wurde beschrieben (Lindner et al. 1978).

Bei Patienten mit Nierenversagen akkumulieren PTH-Fragmente, die den C-Terminus und den mittleren Teil des Hormons enthalten (Papapoulos et al. 1977, Goltzman et al. 1984). Auch ein kleines, den N-Terminus enthaltendes Fragment akkumuliert. Dieses kann bei Patienten mit chronischem Nierenversagen bis zu 60% der Bioaktivität von PTH erreichen (Goltzman et al. 1980).

4.2. Parathormon-related-Protein

Parathormon-related-Protein (PTHrP, Review: Martin et al. 1991) wurde als Tumorprodukt entdeckt, das zum Hyperkalzämie-Syndrom bei Malignomen führt (Rabbani et al. 1986, Moseley et al. 1987, Suva et al. 1987). Die Aminosäuresequenz des Parathormon-related-Protein wurde 1987 entschlüsselt. Es wurde zunächst als Parathyroidhormon-like Protein (PLP) oder Humaner Hyperkalzämie-Faktor bezeichnet.

Das Hyperkalzämie-Syndrom wurde 1941 zum ersten Mal beschrieben. Es ist eine gewöhnliche Komplikation, die bei Plattenepithelkarzinomen von z.B. Lunge, Niere, Ovar oder Harnblase auftritt. Dabei kommt es, wie beim primären Hyperparathyreoidismus, zu einem erhöhten Spiegel von cAMP, zu erhöhter Ausscheidung von cAMP im Urin, zu einer osteoklastischen Knochenresorption, zu Hyperkalzämie, erhöhtem Phosphat Spiegel im Urin, zu Hypophosphatämie und erhöhtem Serumspiegel von 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (Ralston 1987, Broadus et al. 1988, McKee et al. 1989).

Immunoassays zeigten, daß Patienten mit Hyperkalzämie-Syndrom PTHrP-Blutspiegel von bis zu 10⁻¹² bis 10⁻¹¹ M aufweisen können, d.h. ähnlich hohe Konzentrationen wie die von PTH (Stewart et al. 1990). Auch Burtis et al. (1990) wiesen im Blut zirkulierendes PTHrP bei Patienten mit dem Syndrom nach. Sie berichteten ferner, daß die PTHrP-Spiegel sich bei denjenigen Patienten senkten, bei denen ein chirurgischer Eingriff oder palliative Interventionen durchgeführt worden waren. Dieses Ergebnis deckt sich mit dem von Budayr et al. (1990).

Keratinocyten waren die ersten normalen Zellen, in denen PTHrP gefunden wurde. Hier wirkt es wohl als Wachstumsfaktor.

Das humane Gen für PTHrP ist ein Single-Copy-Gen, das auf dem kurzen Arm des Chromosoms 12-12,1-p11,2 sitzt und 19 kb genomischer DNA umfaßt (Mangin et al. 1988). Das von der cDNA abgeleitete PTHrP hat in seiner Länge 177 Aminosäuren, 36 davon als Prekursorsequenz, 141 als Hauptprotein. Durch alternatives Splicing der mRNA des humanen PTHrP können drei verschiedene PTHrP entstehen, die sich in ihrer C-terminalen Region unterscheiden und aus 139, 141 oder 173 Aminosäuren bestehen (Yasuda et al. 1989). Als Produkt von menschlichen Tumoren findet sich v.a. das PTHrP mit 141 Aminosäuren (Thorikay et al. 1989).

Die Gene für das PTHrP von Maus und Ratte sind einfacher organisiert, aus ihrer mRNA kann nur ein Protein mit 141 Aminosäuren entstehen.

Die erste Domäne von PTHrP läßt sich in zwei Subregionen einteilen: die Aminosäuresequenz 1-13 und 14-34. Die zweite Domäne besteht wiederum aus zwei Anteilen: von AS 34-88 und von AS 88-108, welche hochangereichert ist an essentiellen Aminosäuren und mutmaßliche zwei Amidierungssignale enthält. Die dritte Domäne erstreckt sich von den Aminosäuren 118 bis zum C-Terminus, sie ist wenig konstant.

Die Homologie von humanem PTHrP zu dem von Nagetieren beträgt in den ersten 111 Aminosäuren 98%, in der dritten Domäne nur 25% (Stewart et al. 1990).

Unter normalen physiologischen Umständen wird PTHrP, im Gegensatz zu PTH nicht im Kreislauf gefunden (Ogino et al. 1995). Es wird aber in vielen Geweben einschließlich dem humanen, sowohl fetalen als auch adulten Herz unter bestimmten Bedingungen vorübergehend gebildet (Bui et al. 1993, Takahashi et al. 1995), so daß es als autokriner oder parokriner Faktor bezeichnet werden kann.

Zellen der glatten Muskulatur antworten auf einen mechanischen Reiz mit einer Bildung der mRNA von PTHrP (Hongo et al. 1991, Thiede et al. 1991, Daifotis et al. 1992, Deftos et al. 1993). Auch Vasokonstriktoren, wie z. B. Angiotensin II induzieren eine Genexpression von PTHrP in den Zellen der Muskulatur der Ratten-Aorta (Pirola et al. 1993).

Die Funktion von PTHrP unter physiologischen Umständen ist noch unklar. Es wird vermutet, daß es eine Rolle im fetalen und neonatalen Kalziummetabolismus spielt (Thiede et al. 1988, Abbas et al. 1989, Budayr et al. 1989, McKee et al. 1989, Burton et al. 1990). So vermag es die plazen-

taren Kalziumpumpen zu stimulieren, die den Kalziumgradienten aufrechterhalten, der für die Mineralisation den fetalen Skeletts vonnöten ist (Stewart et al. 1990).

Auch eine wachstumsfaktorähnliche Funktion für normale Zellen im Beisein von Endothelium-Growth-Factor (EGF) wurde beschrieben (Insogna et al. 1989). Immunocytochemisch wurde für PTHrP eine ähnliche Lokalisation wie für andere Wachstumsfaktoren gefunden (Heine et al. 1987).

PTHrP kommt auch in sekretorischen Vesikeln von Kardiomyozyten vor (Dzau 1992). Dies führt zu der Frage, ob das Hormon einen agonistischen Effekt an Kardiomyozyten und damit eine Bedeutung im kardiovaskulären System besitzt. Schlüter et al. (1995) zeigten an Kardiomyozyten, daß PTHrP im Gegensatz zu PTH keinen Effekt auf die Creatinkinase, die mit kardialer Hypertrophie assoziiert wird, hat. Daraus läßt sich die Vermutung ableiten, ob PTHrP, das im Herzen selber gebildet wird, nicht ein parakriner Modulator des hypertrophen Effekts von PTH ist. Auch PTHrP ist, wie PTH, ein starker Vasodilatator (Nickols et al. 1990). Versuche von Nickols et al. (1989) zeigen, daß PTHrP sogar eine bis zu 3-fach stärkere dilatatorische Potenz hat.

Die mRNA von PTHrP wurde darüberhinaus in Neuronen des Zentralen Nervensystems, in Zellen der glatten Muskulatur, dem Uterus und der Harnblase gefunden (Mangin et al. 1989). In der laktierenden Mamma wird die mRNA durch Saugen exprimiert, verschwindet aber sehr schnell wieder, sobald der Stimulus aufhört. In der Muttermilch kann PTHrP eine sehr hohe Konzentration von 10^{-8} M erreichen (Stewart et al. 1990).

Orloff et al. (1993) berichteten, daß C-terminale Fragmente von PTHrP, die die AS 107-111 einschließen, im Blut von dialysepflichtigen Patienten mit chronischem Nierenversagen zu finden sind. Linksventrikuläre Hypertrophie ist eine der kardialen Manifestationen, die bei Patienten nach langjähriger Dialyse zu finden sind. Schlüter et al. ziehen den Schluß, daß PTHrP einer der verursachenden Faktoren für die linksventrikuläre Hypertrophie sein könnte.

4.3. PTH und PTHrP im strukturellen Vergleich

Obwohl das Gen von PTH auf Chromosom 11 und das Gen von PTHrP auf Chromosom 12 liegt (Mangin et al. 1988), sind beide ähnlich in ihrer strukturellen Organisation, was auf einen gemeinsamen Ursprung in der Evolution schließen läßt (Broadus et al. 1988, Yasuda et al. 1989).

Es sind aber physikochemisch und immunologisch verschiedene Moleküle, homolog in ihrer Sequenz sind sie nur in 8 der ersten 13 Aminosäuren am N-terminalen, rezeptorbindenden Ende. Nach der 13. Aminosäure unterscheiden sich die Sequenzen völlig, die Aminosäuren 14-34 von PTH und PTHrP scheinen aber funktionelle Ähnlichkeit zu haben. Beide haben eine ähnliche Sekundärstruktur in der Domäne zwischen den AS 28 und 34 mit Ausnahme der AS 29, hier ist das hydrophile Glutamin (in PTH) gegen ein hydrophobes Alanin (PTHrP) ausgetauscht.

4.4. Wirksame Fragmente von PTH und PTHrP

Unsere Versuche an transfizierten Kardiomyoblasten zeigen, daß die Fragmente PTHrP 1-34 und PTH 1-34 funktionell aktiv sind, d.h. die Adenylatzyklase stimulieren. Dabei führte die Stimulation mit PTHrP 1-34 bis zu einem 8-fachen Anstieg der cAMP-Bildung. Dies deckt sich mit den Ergebnissen, die an Knochen und Nieren erzielt wurden (Nakamura et al. 1981, Wang et al. 1984, Shew et al. 1984, Sham et al. 1986, Schlüter et al. 1997). PTHrP 1-34 war potenter als PTH 1-84 und dieses wiederum potenter als PTH 1-34, den Second-Messenger zu bilden; Untersuchungen von Kemp et al. (1987) kamen zu demselben Ergebnis. Eine Stimulation der Zellen mit dem die Aminosäuren 107-111 enthaltenden C-terminalen Fragment Osteostatin hatte keinen Effekt. Hammonds et al. (1989) veröffentlichten, daß PTHrP 1-84, PTHrP 1-108 und PTHrP 1-141 etwa alle die gleiche Potenz haben, cAMP zu bilden. PTHrP 1-29 besitzt ca. 10% der Aktivität von PTHrP 1-34, kürzere Peptide sind nicht aktiv (Kemp et al. 1987).

Schlüter et al. (1997) untersuchten an isolierten adulten Kardiomyozyten der Ratte die Effekte von PTHrP und seiner Fragmente auf Kontraktionsfrequenz (Schläge pro Minute) und Hypertrophie. Allerdings wurden alle genannte Versuche an den Kardiomyozyten mit unphysiologisch hohen Konzentrationen an PTH und PTHrP (1 µM) durchgeführt:

PTHrP 1-34 oder PTHrP 7-34 führten zu einer Zunahme der spontanen Kontraktionsfrequenz, die aber geringer war als die von mit Isoprenalin stimulierten Kontrollzellen. PTHrP 1-34 führte

darüberhinaus zu einem cAMP-Anstieg. PTH 1-34 zeigte in den Kontrollversuchen keine Wirkungen auf die Kontraktionsaktivität, führte aber ebenso zu einem cAMP-Anstieg. PTHrP 107-111 hatte weder einen direkten Effekt auf die Kontraktionsaktivität noch auf die cAMP-Bildung.

Dieselben Autoren berichteten auch über einen hypertrophen Effekt der C-terminalen Teile von PTHrP (AS 107-111) auf Kardiomyozyten durch Induktion der Proteinsynthese, der Proteinmasse, des Zellvolumens und der CK-BB-Aktivität. Die C-terminale Region von PTHrP (AS 107-139) ist auch ein extrem potenter Inhibitor der Knochenresorption (Fenton et al. 1991).

Schlüter et al. zeigten somit, daß PTHrP 1-34 zur cAMP-Steigerung und anderen, von der Proteinkinase A (PKA) abhängigen Fähigkeiten von adulten Kardiomyozyten (Stimulierung der maximalen Zellverkürzung und Induktion der spontanen Kontraktilität) führt. Diese Effekte konnten mit PTHrP 7-34 nachgeahmt werden, d.h. daß sie nicht mit der klassischen Adenylatzyklase-aktivierenden Domäne von PTH und PTHrP (nämlich den ersten beiden Aminosäuren) in Beziehung stehen. Dieser Teil des PTHrP verfügt nur über eine limitierte strukturelle Ähnlichkeit zu PTH. PTHrP enthält folglich eine bis jetzt nicht identifizierte Domäne innerhalb der Aminosäuren 7-34, mit der es cAMP-abhängige Funktionen in Kardiomyozyten beeinflusst.

Versuche unseres Labor an isolierten adulten Kardiomyozyten der Ratte zeigten allerdings, daß weder PTH noch PTHrP bis zu einer physiologisch relevanten Konzentration von 100 nM zu einer Zunahme der Kontraktilität der vorher infizierten Zellen führen. Die basale Kontraktilität der Zellen wurde allerdings nach Infektion mit Ad-PTH1-R schon ohne Zugabe der Agonisten 3,5-fach gesteigert (siehe 3.7. und 4.7.4.).

Ogino et al. (1995) führten Versuche an isolierten perfundierten Rattenherzen durch, wobei sie nachwiesen, daß PTH 1-34 und PTHrP 1-34 zwar positiv inotrop über ihre Wirkung auf den koronaren Fluß, den koronaren Perfusionsdruck und die Herzfrequenz sind, aber keinen direkten inotropen Effekt auf die kontraktile Elemente haben. Dabei wurden Versuche an drei Gruppen von Tieren durchgeführt:

In der Gruppe 1 wurde der koronare Perfusionsdruck konstant gehalten. Abhängig von der Dosis von PTH oder PTHrP zeigte sich ein Anstieg der Herzfrequenz, des Koronarflusses, des maximalen linksventrikulären Druckes (LVP_{max}) und des linksventrikulären Druckanstieges gegen die Zeit (dp/dt_{max}).

In der Gruppe 2 wurde die Herzfrequenz konstant gehalten. Wiederum abhängig von der Dosis von PTH oder PTHrP stiegen der Koronarfluß, der LVP_{\max} und der dp/dt_{\max} an. Der Effekt auf PTH 1-34 war größer als der auf PTHrP 1-34.

In der Gruppe 3 schließlich wurde die Herzfrequenz konstant gehalten und die Koronarien mit Nitroprussid maximal dilatiert. Hier zeigte sich kein Einfluß von PTH oder PTHrP auf den LVP_{\max} und den dp/dt_{\max} . Die Positivkontrolle mit Isoprenalin zeigte dagegen auch in dieser Gruppe einen Anstieg von LVP_{\max} und dp/dt_{\max} .

4.5. Bildung und Verteilung von PTHrP und seiner mRNA im kardiovaskulären System

Das Vorkommen von PTHrP in sekretorischen Vesikeln von Kardiomyozyten und im kardiovaskulären System und die Tatsache, daß PTHrP eine Wirkung auf den Kalziummetabolismus des Herzens hat, lassen eine wichtige Rolle dieses Hormons in diesem System vermuten (Dzau 1992, Burton et al. 1994). So kommt es bei chronischer Herzinsuffizienz zu einem Anstieg von PTHrP (Burton et al. 1993, Deftos et al. 1993, Lerman et al. 1993, Motwani et al. 1993).

Wie oben beschrieben, antworten Zellen der glatten Muskulatur auf einen mechanischen Reiz mit einer Bildung der mRNA von PTHrP (Hongo et al. 1991, Thiede et al. 1991, Daifotis et al. 1992, Deftos et al. 1993). Pirola et al. (1994) zeigten, daß eine Ballondilatation der abdominalen Aorta adulter Ratten zu einem schnellen und anhaltendem Anstieg der mRNA von PTHrP führt. Der Peak war 2 Stunden nach Dehnung erreicht, anschließend kam es zu einer schnellen Senkung der mRNA-Konzentration. Dies deckt sich mit früheren Versuchen von Pirola et al. (1993), die eine Halbwertszeit der mRNA von PTHrP in Zellen der glatten Muskulatur von 45 Minuten unter serumfreien Bedingungen nachwiesen.

Burton et al. (1994) führten Versuche an Ratten, Kaninchen, Schweinen und auch an menschlichen Herzzellen durch, wobei sie die Konzentration von PTHrP und seiner mRNA im kardiovaskulären System immunohistologisch mit Antikörpern in Radio Immuno Assays (RIA) und Polymerase Kettenreaktion (PCR) maßen. Die höchsten Konzentrationen wurden in den Herzatrien nachgewiesen. Sie entsprachen der Menge der dort gebildeten mRNA. Hohe Konzentrationen wurden ferner in Aorta und Vena cava gemessen, die aber nicht mit der dort gebildeten mRNA-Menge korrelierten. In den Ventrikeln und im Skelettmuskel war die Konzentration von PTHrP

niedriger und entsprach wieder der mRNA-Konzentration. Ähnliche Ergebnisse lieferten selektive RIAs für PTHrP 1-34, 38-64, 109-141. Auch Deftos et al. (1993) fanden in den Atrien höhere Konzentrationen von PTHrP als in den Ventrikeln.

Als Erklärung für die Unterschiede in den Konzentrationen kann die Tatsache dienen, daß die Atrien während der Herzkontraktion mehr gedehnt und deformiert werden als die Ventrikel und dadurch in ihnen, dehnungsbedingt, mehr PTHrP aus den sekretorischen Vesikeln abgegeben wird, was wiederum zu einem höherem Druck und zu größerem Volumen führt. Die Konzentrationen von PTHrP und seiner mRNA in Aorta und Vena cava können aber nicht direkt auf das Dehnungsphänomen bezogen werden. Die Aorta als dickwandiges Gefäß, erfährt wenig, die dünnwandige Vena cava dagegen mehr Dehnung, in beiden sind aber die Konzentrationen vergleichbar hoch. Hier müssen andere Regelmechanismen vorherrschen, die noch nicht völlig verstanden sind.

Die Verteilung von PTHrP in den verschiedenen Herzkammern entspricht in etwa der Verteilung der kardialen Gewebshormone Atrial Natriuretic Peptids (ANP) und Brain Natriuretic Peptids (BNP) (Deftos et al. 1993), deren Spiegel mit zunehmender Herzinsuffizienz ansteigt. ANP wird nach Dehnung der Vorhöfe, BNP nach Dehnung der Kammern ausgeschüttet.

4.6. Wirkungen von PTH und PTHrP im kardiovaskulären System

Wie oben beschrieben, haben PTH und PTHrP β -adrenerge Rezeptoren ähnliche Effekte am vaskulären Gewebe und an Zellen der glatten Muskulatur (Pang et al. 1986). Beide sind Vasodilatoren, sind somit dosisabhängig blutdrucksenkend und erhöhen die Herzfrequenz (Bogin et al. 1981, Tenner et al. 1983, Nickols et al. 1989, Chiu et al. 1991, Roca-Cusachs et al. 1991, Dipette et al. 1992). Außerdem erhöhen sie den koronaren Fluß (Nickols et al. 1989) und die Sensibilität des glatten Muskels auf mechanischen Stress (Pirola et al. 1994).

PTHrP kann als autokriner oder parokriner endogener Regulator für die kardiovaskuläre Physiologie des Herzens bezeichnet werden. Erhöhte Konzentrationen von PTHrP wurden dehnungsabhängig in insuffizienten Herzen gefunden (Burton et al. 1993, Deftos et al. 1993, Lerman et al. 1993, Motwani et al. 1993). Es ist möglich, daß PTHrP an der Entstehung der Hypertrophie des insuffizienten Herzens und der korrespondierenden onkofetalen Genexpression mitwirkt.

4.7. Parathormon/Parathormon-related-Protein-Rezeptor

Von verschiedenen Autoren wurde beschrieben, daß PTH und PTHrP ihre Wirkung über ein und denselben Rezeptor, den sogenannten PTH/PTHrP-Rezeptor entfalten (McKee et al. 1989, Thorikay et al. 1989, Horiuchi et al. 1987). Zu demselben Ergebnis kamen auch Studien an Radiorezeptoren und Analysen von Ligandenrezeptorkomplexen, die zuvor mittels "Crosslinking" aneinander gebunden wurden (Jüppner et al. 1988, Nissenson et al. 1988, Orloff et al. 1989). Diese Tatsache leuchtet auch wegen der ähnlichen biologischen Aktivitäten von PTH und PTHrP ein. Die Entdeckung, daß zwei Proteine mit substantiell unterschiedlicher Sequenz ähnliche Affinität für denselben Rezeptor zeigen, ist bis heute einzigartig.

PTH und PTHrP interagieren mit ähnlicher Affinität an ihrem Rezeptor. Dies wurde nachgewiesen an Knochenzellen der Ratte (Jüppner et al. 1988, Nissenson et al. 1988) und an renalen Zellen des Hundes (Orloff et al. 1989). Andere Versuche zeigten, daß PTHrP und PTH an Knochenzellen der Ratte äquipotent sind, die Adenylatzyklase zu stimulieren (Horiuchi et al. 1987, Nissenson et al. 1988, Orloff et al. 1989, Blind et al. 1993).

Blind et al. (1993) zeigten, daß humanes PTH 1-34 5,6 bis 6,5-fach weniger stark die cAMP-Bildung an Nieren- und Knochenzellen bewirkt als das PTH 1-34 der Ratte. Eine C-terminale Verlängerung von PTHrP 1-34 auf PTHrP 1-86 bewirkte eine 7,7-fach reduzierte Bioaktivität in Osteoblast-like Zellen, die Ursache dafür ist unklar. Dies läßt den Schluß zu, daß es nicht nur eine einzige PTHrP-vermittelte Signaltransduktion auf die Adenylatzyklase gibt. Smogorzewski et al. wiesen 1993 einen rezeptorvermittelten dosisabhängigen Kalziumanstieg nach PTH-Stimulation auch an adulten Kardiomyozyten der Ratte nach. Der Effekt von PTH 1-84 war signifikant höher als der von PTH 1-34.

4.7.1. PTH/PTHrP-1-Rezeptor und andere Subtypen

Jüppner et al. (1991) charakterisierten in Zellen- und Membranpräparationen von Knochen und Niere einen Subtypus des PTH/PTHrP-Rezeptors, den PTH/PTHrP-1-Rezeptor. Die RNA des Rezeptors wurde aus Opposum-Nierenzellen (OK) und aus Ratten-Osteosarkomzellen (ROS 17/2.8.) präpariert. 78% der Aminosäuren des Rezeptors der Osteosarkomzellen und der Nierenzellen sind identisch. Die cDNA des PTH/PTHrP-1 Rezeptors ist 585 Aminosäuren lang.

Der PTH/PTHrP-1-Rezeptor ist ein Plasmamembranglykoprotein, mit Oligosacchariden über Asparagin verbunden und hat ein Molekulargewicht von 60-80 kD (Wright et al. 1987, Shigeno et al. 1988). Er besitzt 10 hydrophobe Domänen A-C und I-VII. I-VII sind transmembran und enthalten in ihrer Sekundärstruktur Helices. N-terminal gibt es extrazelluläre Verlängerungen von ca. 155 Aminosäuren. Die N-Glykosylierung des Rezeptors ist weder für die Expression des Rezeptors an der Plasmamembran noch für die Ligandenbindung essentiell (Bisello et al. 1996).

Die 70 C-terminalen Aminosäuren beeinflussen weder die Ligandenbindung noch die Adenylatzyklasestimulierung.

Der PTH/PTHrP-1-Rezeptor ist nur zu ca. 10% homolog mit den ca. 120 anderen bekannten G-Protein gekoppelten Rezeptoren, die untereinander zu ca. 80% homolog sind (Attwood et al. 1991, Kolakowski unveröffentlicht). Einteilen läßt sich der Rezeptor in eine Untergruppe der Familie der G-Protein-Rezeptoren, in der auch der Glucagon-, der Glucagon-like Peptide-1-, der Vasoactive Intestinal Protein-, der CRF-, der Secretin-, der Calcitonin-Rezeptor und einige andere vertreten sind (Segre und Goldring 1993).

Der wichtigste Effekt des PTH/PTHrP-1-Rezeptors nach Stimulation durch PTH oder PTHrP ist die Kopplung an sein G-Protein und damit eine Stimulierung der Adenylatzyklase, die aus freiem intrazellulärem ATP cAMP bildet. Sowohl die funktionelle als auch die effektive Kopplung des Rezeptors an seine G_s -Proteine sind gut, d. h. es kommt zu einem cAMP-Anstieg nach Stimulation mit PTH oder PTHrP schon in niedrigen Konzentrationen.

Über den PTH/PTHrP-1-Rezeptor und ein G_q -Protein wird auch die Phospholipase C aktiviert, die Inositol-4,5-bisphosphat in Diacylglycerol (DAG) und 1,4,5 Inositoltrisphosphat spaltet (Civitelli et al. 1988). DAG führt dann zu einer Translokation der Proteinkinase C vom Zytosol in die Membran (Abou-Samra et al. 1989, Fujimori et al. 1992).

Als weiterer Second-Messenger steigt nach einer Stimulation mit den Agonisten auch das intrazelluläre freie Kalzium an (Yamaguchi et al. 1987, Hruska et al. 1987, Civitelli et al. 1989, Yamada et al. 1989).

Versuche haben gezeigt, daß PTHrP bei einer Zunahme der Dehnung des Herzens aus den Ventrikeln und Vorhöfen ausgeschüttet wird (Dzau 1992, Deftos et al. 1993, Bui et al. 1993, Burton et al. 1994, Takahashi et al. 1995). Da PTHrP wie PTH Agonist am PTH/PTHrP-1-Rezeptor ist, kann über eine Einklonierung dieses ortsfremden Rezeptors in das Myokard eine

passagere cAMP-Erhöhung durch einen mechanischen Dehnungsreiz erreicht werden. Ein Anstieg intrazellulären cAMPs führt zu einer Phosphorylierung von Proteinen im Sarkolemm, im sarkoplasmatischen Retikulum und in den kontraktilen Filamenten. Durch diese Phosphorylierungen werden der Einstrom extrazellulären Kalziums in die Zellen gesteigert, die Kalziumaufnahme des sarkoplasmatischen Retikulums erhöht und die kontraktilen Proteine für Kalzium sensitiver. Beschriebene Veränderungen des zellulären Kalziummetabolismus führen zu einem positiv inotropen Effekt (Evans 1986).

Usdin et al. (1995) identifizierten einen weiteren Subtypen dieser Rezeptorfamilie, den humanen PTH2 (hPTH2)-Rezeptor. Dieser kann nur von PTH, nicht aber von PTHrP stimuliert werden (Behar et al. 1996) und weist eine limitiertere Ligandenbindung auf (Usdin et al. 1995), aktiviert aber auch über ein G-Protein die Adenylatzyklase und eine Kalziumfreisetzung. Zwischen beiden Rezeptor-Subtypen besteht eine Sequenzidentität von ca. 70% (Behar et al. 1996). Gardella et al. (1996) tauschten zwei AS in PTHrP durch die in PTH entsprechend an diesen Stellen vorkommenden aus (Histidin durch Isoleucin an Position 5 und Phenylalanin durch Tryptophan an Position 23) und erreichten dadurch, daß PTHrP ebenfalls an den Rezeptor binden und cAMP bilden konnte. Offensichtlich spielen die Positionen 5 und 23 eine Schlüsselrolle bei der Rezeptorbindung. Der PTH2-Rezeptor kommt v.a. in der Niere vor, Northern Blots vom Herz zeigten wenig oder keine mRNA des Rezeptors (Schneider et al. 1993).

Physiologisch existiert im Herzen ein Rezeptor für Parathormon, der bisher noch nicht kloniert ist und deshalb hier als PTH/PTHrPx-Rezeptor bezeichnet wird. Dieser führt nach Stimulation durch Parathormon (PTH) oder Parathormon-related-Protein (PTHrP) zur Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) (Schlüter et al.).

4.7.2. Verteilung des PTH/PTHrP-1-Rezeptors im Organismus

Tian et al. (1993) wiesen mit Northern Blots unter der Verwendung einer PTH/PTHrP-1-Rezeptorsonde 2,4 kB große Transkripte der mRNA eines PTH/PTHrP-Rezeptors in Herz, Hirn, Milz, Lunge, Leber, Skelettmuskel und Hoden, v.a. aber in der Niere nach. Kleinere Transkripte fanden sich in Niere und Hoden, möglicherweise entstanden durch alternatives Splicing. Der Gehalt der mRNA des Rezeptors in Herz und Leber machte 10,7%, bzw. 11,1% der Menge der

mRNA, die in der Niere gefunden wurde, aus und ist damit signifikant höher als in den anderen Geweben.

Allerdings zeigten Versuche unseres Labors, daß isolierte adulte Kardiomyozyten nach Stimulation mit PTH oder PTHrP keine Kontraktilitätsverstärkung aufweisen. Deshalb gehen wir davon aus, daß die beschriebenen Northern-Blot-Ergebnisse am ehesten auf Kreuz-Hybridisierung mit anderen, noch nicht klonierten PTH-Rezeptorsubtypen zurückzuführen sind oder daß es sich um Pseudogene oder um mRNA handelte, die zwar in Northern Blots nachweisbar ist, aber nicht transkribiert wird.

4.7.3. Effektivität einer Infektion isolierter adulter Kardiomyozyten mit rekombinanten Adenoviren

Versuche aus unserem Labor, rekombinante Plasmide in isolierte adulte Kardiomyozyten ohne die Hilfe von Viren liposomal zu transfizieren, scheiterten. Die Zielzellen wurden wahrscheinlich wegen der Toxizität der Lipidkomplexe zerstört. Dies entspricht den Ergebnissen, die in der Literatur zu finden sind (Kirshenbaum 1997).

Um die Effizienz eines adenoviralen Gentransfers in Herzzellen abzuschätzen, applizierten wir rekombinante Viren sowohl auf isolierte adulte Kardiomyozyten als auch per direkter Injektion in das Myokard einer Ratte *in vivo*.

Für die *in vitro* Versuche wurden Kardiomyozyten aus einem Rattenherz isoliert und sowohl mit Ad- β Gal als auch mit Adenoviren, die in einem bicistronischen Konstrukt den PTH/PTHrP-1-Rezeptor und das Markergen GFP trugen, infiziert. Nach 72 Stunden wurden die Ad- β Gal-infizierten Zellen mit X-Gal gefärbt, positive Zellen zeigten eine dunkelblaue Färbung. Die Expressionsrate des Reportergens β Gal wurde auf etwa 50% geschätzt.

In der Literatur werden bessere Expressionsergebnisse beschrieben: Nach einer *in vitro* Infektion fetaler und adulter Rattenkardiomyozyten mit der Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) (1pfu/Zelle) exprimieren fast alle Zellen das Reportergen (Kass-Eisler et al. 1993). Kirshenbaum et al. (1993) infizierten adulte Kardiomyozyten mit Ad- β Gal (pfu 10^8) und wiesen in 90% der Zellen eine positive Färbung nach. Der Gentransfer mittels dieses Weges läßt sich also optimieren.

Die Expression der Ad-PTH1-R-GFP wurde sowohl optisch mit dem grün fluoreszierenden Markergen GFP als auch durch spezifische Radioliganden-Bindung gemessen. Die Radioliganden-Bindung zeigte eine Überexpression des PTH/PTHrP-1-Rezeptors gegenüber den natürlichen PTH-Rezeptoren im Verhältnis von ungefähr 10:1. Die Zugabe der Agonisten bewirkte eine starke Stimulierung der Adenylatzyklase, erkennbar an dem Anstieg intrazellulären cAMPs in den intakten Myozyten. Der Effekt entsprach dem, was durch natürlich vorkommende β -adrenerge Rezeptoren erreicht werden kann. Schon die alleinige Infektion der Kardiomyozyten mit den rekombinanten Viren und die Expression des PTH/PTHrP-1-Rezeptors steigerte die basale cAMP-Bildung um ungefähr das 3,5-fache.

4.7.4. Effekte von PTH/PTHrP-1-R auf die Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten

Um den Effekt der heterologen Expression des PTH/PTHrP-1-Rezeptors auf die Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten zu untersuchen, wurde nach Infektion mit Adenoviren (100 pfu/Zelle) deren Zellverkürzung gemessen. Als Modell wurden isolierte adulte Kardiomyozyten verwendet, da diese über die meisten der kontraktilen Eigenschaften des intakten adulten Myokards verfügen. Die Messungen zeigten eine signifikante Kontraktilitätszunahme derjenigen Zellen, die mit dem Ad-PTH1-R infiziert worden waren bereits ohne Zugabe der Agonisten des Rezeptors um das 3,5-fache. Eine externe Zugabe der Agonisten PTH 1-34 oder PTHrP 1-34 führte zu keinem weiteren Anstieg der Kontraktilität der Zellen.

Es kann angenommen werden, daß die gleichzeitige Stimulation der Adenylatzyklase und der Phospholipase C durch Zugabe der Agonisten des PTH/PTHrP-1-Rezeptors einen weiteren Anstieg der Kontraktilität der Kardiomyozyten verhindert.

Ergebnisse aus einer anderen Versuchsreihe unseres Labors zeigen, daß die heterologe Überexpression von V2-Vasopressin-Rezeptoren, die allein an G_s -Proteine koppeln, in isolierten adulten Kardiomyozyten nicht schon die basale Kontraktilität der Zellen steigern. Erst die Zugabe von AVP oder des V2-selektiven Agonisten DDAVP (Desmopressin) führte zu einem signifikanten Anstieg der Kontraktilität, die der Wirkung β -adrenerger Stimulation gleichkommt. Die cAMP-Bildung durch die Adenylatzyklase dieser infizierten Zellen wurde 4-fach durch die Zugabe von AVP oder DDAVP gesteigert.

Ob dieser Unterschied durch die unterschiedliche Kopplung der Rezeptoren an ihre G-Proteine entsteht, ist noch ungeklärt. Es scheint, daß weder der PTH/PTHrP-1-Rezeptor noch der V2-Vasopressin-Rezeptor in Abwesenheit ihrer jeweiligen Agonisten ein zweites G-Protein, G_q oder G_i aktivieren. Nun stellt sich die Frage, ob die Fähigkeit an mehrere G-Proteine zu koppeln – wie es beim PTH/PTHrP-1-Rezeptor der Fall ist - einem rekombinanten Rezeptor einen Grundzustand verleiht, der auch in Abwesenheit von Agonisten aktiviert bleibt und nicht weiter gesteigert werden kann.

In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, daß eine gefäßspezifische Überexpression des PTH/PTHrP-1-Rezeptors in transgenen Mäusen auch zu einem dauerhaft aktivierten Zustand des Rezeptors führte, der nicht weiter durch seine Agonisten gesteigert werden konnte (Qian et al. 1999).

Laugwitz et al. (1999) zeigten, daß die Dichte von V2-Vasopressin-Rezeptoren in Kardiomyozyten auch nach Langzeitstimulation mit dem Agonisten (über 20 Stunden), nach der gewöhnlicherweise eine vollständige Rezeptor-Downregulation erwartet wird, gleich bleibt. Die Ursache hierfür ist unklar, es erscheint jedoch möglich, daß der Cytomegalievirus-Promotor, der die Rezeptorexpression kontrolliert, nicht dem endogenen Downregulationsmechanismus in den Kardiomyozyten unterliegt.

Nimmt man dies auch für den PTH/PTHrP-1-Rezeptor an Kardiomyozyten und am Herzen an, so heißt das, daß seine Funktion durch langfristig hohe Konzentrationen des Agonisten nicht eingeschränkt wird. Ob dies allerdings ebenso für die Langzeitexpression des PTH/PTHrP-1-Rezeptors am Herzen in vivo gilt, muß noch gezeigt werden.

4.8. Marker-/Reporter gene für den viralen Gentransfer

Da die Expression heterologer Rezeptoren also offensichtlich potente biologische Effekte im Myokard erreichen kann, wurden verschiedene Gentransfervektoren verglichen:

Um denjenigen Zellen, in denen ein eingeschleustes Fremdgen exprimiert wird, einen selektierbaren Phänotypen zu verleihen, können in die viralen Vektoren an den Klonierungsstellen zusätzlich sogenannte Reportergene, wie das für die Beta-Galaktosidase codierende lacZ-Gen, einkloniert werden. Durch Zugabe von X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid), einem unphysiologischen Substrat, das von der Beta-Galaktosidase gespalten wird und dunkelblaue

Reaktionsprodukte ergibt, können so infizierte Zellen angefärbt und histochemisch nachgewiesen werden.

Für denselben Zweck eignen sich Selektionsmarker, z.B. das Green Fluorescent Protein (GFP), das nach Expression in den Zielzellen unter UV-Licht fluoresziert. Dieses aus der Qualle *Aequorea victoria* gewonnene Protein ist weniger sensitiv im Nachweis von exprimierten Genen als die Beta-Galaktosidase. Durch Einführung von chromophoren Mutationen konnte aber eine Variante des GFP, das sogenannte Enhanced GFP (EGFP) entwickelt werden, das 35-mal heller ist. Es ist etwa 16-24 h nach Transfektion nachweisbar und weist eine höhere Sensitivität auf als die Methode der X-Gal-Färbung (Zhang et al. 1996).

4.9. Effektivität einer Infektion von Kardiomyoblasten mit Ad- β Gal

Die vorliegende Arbeit soll auch zeigen, daß es möglich ist, H9c2-Kardiomyoblasten mit einer hohen Effektivität mit β Gal-Adenoviren zu infizieren. Dazu wurden die Zellen mit 100 pfu der Viren pro Zelle beladen und für 36 Stunden inkubiert. Nach der Färbung mit X-Gal zeigten fast 100% der Kardiomyoblasten eine positive blaue Färbung im Kern. Die Kontrollzellen, die nur mit PBS ohne Virus inkubiert worden waren, blieben dagegen ungefärbt.

Immunofluoreszenzversuche an H9c2-Kardiomyoblasten haben gezeigt, daß ein mit Adenoviren eingebrachtes Rezeptorgen (rV2R) in ca. 80% der infizierten Zellen nachweisbar ist (Laugwitz et al. 1999). Es läßt sich ein konzentrationsabhängiger Effekt der Expressionsrate feststellen. Höhere adenovirale Titer als 100 pfu/Zelle sind toxisch für die Zielzellen und zerstören diese.

4.10. Effektivität einer in vivo Infektion des Myokards mit rekombinanten Adenoviren

Eine direkte myokardiale Injektion wurde an lebenden, sedierten Ratten mit einer Viruskonzentration von 10^9 pfu durchgeführt. Die mit einem hochauflösenden Schallkopf echokardiographische gesteuerte Injektion des Virus in die Herzwand erlaubte eine Kontrolle sowohl des Injektionsortes als auch des Injektionserfolges. Nach 48 Stunden wurden die Tiere geopfert, die Herzen entnommen, tiefgefroren, geschnitten und mit X-Gal gefärbt. Ca. 50% der Zellen des Myokards zeigten eine positive Färbung, was der Expressionsrate des Transgens entspricht.

Die Ergebnisse zeigen, daß nicht nur Kardiomyoblasten, sondern auch isolierte adulte Kardiomyozyten und das Myokard in vivo von rekombinanten Viren infiziert werden können und sich das Transgen exprimiert, ohne daß die Zielzellen zerstört werden.

In der Literatur finden sich Arbeiten sowohl über die direkte myokardiale Injektion (Guzman et al. 1993, French et al. 1994, Gilgenkrantz et al. 1995, Li et al. 1995, Magovern et al. 1996, Mühlhauser et al. 1996), als auch über die Applikation der Viren über die Koronararterien (Barr et al. 1994, Mühlhauser et al. 1996, Hajjar et al. 1998). Auch über eine intravenöse Injektion der rekombinanten Viren zum Gentransfer in Rattenmyokard ist berichtet worden (Stratford-Perricaudet et al. 1992). Die blinde intramyokardiale Injektion des Virus erzielt eine gute lokale Genaussat, die aber auf ein Gebiet 1-2 mm neben der injizierenden Nadel begrenzt bleibt. Dagegen zeigt die Applikation in die Koronarien eine weniger effektive, dafür aber diffusere Verteilung des Transgens. Mühlhauser et al. (1996) verglichen an Schweinen die Effizienz direkter intramuskulärer Injektion von Viren mit der intrakoronaren Applikation. Es zeigte sich, daß die intramuskuläre Injektion geeigneter ist, einen lokalisierten Teil des Herzens zu infizieren. Die Aktivität des eingebrachten Transgens lacZ erreichte 3-6 Tage nach Injektion ihren Höhepunkt und fiel innerhalb eines Monats auf ihr Ausgangsniveau zurück.

Eine direkte Injektion von rAd, die das Reportergen Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) tragen, in adulte Rattenmyokardien führt zu einer fast 100%igen Expression in den Zielzellen. Die Aktivität der CAT ist eine Woche nach Infektion gleich hoch wie initial und noch 55 Tage danach nachweisbar (Kass-Eisler et al. 1993). Obwohl andere Arbeiten zeigen, daß 1000 pfu pro Zelle notwendig sind, um eine ca. 90%ige Infektion in einem Rattenherz zu erzielen (Kirshenbaum et al. 1993), konnten Kass-Eisler et al. ähnliche Ergebnisse mit 1 pfu/Zelle vorweisen.

Johns et al. (1995) berichteten über einen effizienten Gentransfer durch rekombinante Adenoviren (AdShK), die sie transthorakal in das Myokard neonataler Ratten applizierten.

Donahue et al. (1998) wiesen in ex vivo Versuchen, in denen sie Ad intrakoronar in perfundierte Langendorff-Herzen von Kaninchen applizierten, eine Expressionsrate von 96% nach. Zur Verkürzung der dazu erforderlichen Virus-Perfusionszeit von anfangs 60 Minuten modifizierten sie die Endothelbarriere. Dazu erhöhten sie die Viruskonzentration, verringerten die Kalziumkonzentration (zur Verbesserung der Viruspassage aus den Gefäßen) oder applizierten zuvor Serotonin oder Bradykinin (zur Verbesserung der mikrovaskulären Permeabilität). Durch eine Vorbehandlung mit Serotonin und eine Reduktion der Kalziumkonzentration auf 50 µmol/l konnten sie bei einer Viruskonzentration von $1,6 \times 10^9$ pfu/ml nach 2 Minuten eine nahezu globale Genexpression in den Kardiomyozyten nachweisen. Dieses Vorgehen könnte in vivo durch eine entsprechende Medikamentenapplikation während Ballondilatation nachgeahmt werden.

Diese Ergebnisse zeigen, daß ein Gentransfer mittels rekombinanter Adenoviren zu einer hohen Expression des Transgens im Herzen führt. Allerdings bleibt sie auf einige Wochen beschränkt. Keine der o.g. Gruppen beschrieb die Expression eines Transgens mit inotroper Wirkung.

4.11. Effektivität einer Infektion von HEK-Zellen mit AAVgfp

Zur Quantifizierung eines Gentransfers mittels Adeno-assoziiierter Viren infizierten wir in einer Versuchsreihe HEK-Zellen mit AAVgfp, zum Teil in Kombination mit Adenoviren und beurteilten 24 Stunden später unter dem Fluoreszenzmikroskop die Expressionsrate. Die AAV wurden in den Mengen 10, 20, 50 und 100 µl verwendet, die Ad zur Coinfektion in den Konzentrationen 4 und 100 pfu/Zelle.

HEK-Zellen, die mit hohen Konzentrationen an Ad infiziert worden waren, zeigten zwar eine gute Expressionsrate, d.h. ein großer Prozentsatz der Zellen leuchtete unter dem Fluoreszenzmikroskop, sie wurden aber nach einiger Zeit rund als Zeichen ihrer Zerstörung durch die Adenoviren. Die besten Ergebnisse mit intakten Zellen und einer Expressionsrate von bis zu 70% zeigte die Infektion mit 10 µl AAV und 4 pfu/Zelle Ad.

Die Expressionsrate war in jedem Fall abhängig von den verwendeten Virustitern.

4.12. Effektivität einer Infektion von Kardiomyozyten mit rekombinanten AAV -

Anwendung von rAAV in der Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen

Eine sehr hohe Expressionsrate AAV-infizierter Kardiomyozyten und Kardiomyoblasten erreichten Svensson et al. (1999). Sie infizierten primäre neonatale Rattenkardiomyozyten mit rAAV, die das lacZ-Gen unter Kontrolle des CMV-Promotor trugen. Bei einer MOI von 100 IU pro Zelle und 24 Stunden nach Infektion zeigten ca. 10% der Zellen eine positive β Gal-Färbung. Eine zweite Reihe wurde zusätzlich mit 2 pfu/Zelle eines E3-defizienten Ad coinfiziert. Von diesen Zellen zeigten ca. 50% eine positive β Gal-Färbung.

Ferner applizierte die Gruppe die Viren direkt intramyokardial und intrakoronar in Mäuseherzen. Den Tieren wurden 1×10^8 infektiöse Einheiten (IU) in den linken Ventrikel injiziert. Nach 2, 4 bzw. 8 Wochen wurden sie geopfert, das Myokard mit X-Gal gefärbt und mit einer adenoviral infizierten Kontrollgruppe verglichen. Die mit rAAV infizierten Myokardien zeigten bis zu 25% der β Gal-Aktivität, die in den adenoviral infizierten Kontrollherzen nachgewiesen wurde. In mit Ad infizierten Kontrollherzen war vier Wochen nach Infektion keine Expression des Transgens mehr nachweisbar. Eine myokardiale Entzündung oder eine immunologische Reaktion war nicht auszumachen.

Weiter wurden explantierte Mäuseherzen über die Koronararterien für 15 min bei 4°C mit $1,5 \times 10^9$ IU des AAV-lacZ perfundiert und anschließend replantiert. Nach 2 Wochen war das Gen in weniger als 1% der Kardiomyozyten exprimiert, 4 Wochen nach Perfusion der Koronarien waren aber bis zu 40% und 8 Wochen danach bis 50% der Zellen positiv gefärbt.

Eine Langzeit-Expression nach AAV-vermitteltem Gentransfer wurde von Flotte et al. (1993), Kaplitt et al. (1994), Kessler et al. (1996) und Clark et al. (1997) beschrieben. Kaplitt et al. (1996) führten in vivo Versuche durch, in denen sie rAAV über die Standard-Kathetertechnik in die Koronarien von Schweinen und direkt in das Myokard von Ratten applizierten. Sie erreichten aber nur eine geringe Effizienz der Expression des Transgens (ca. 0,2%). Sechs Monate nach der intrakoronaren Applikation und zwei Monate nach der direkten Injektion war das Transgen in den Tierherzen noch nachweisbar.

Maeda et al. berichteten 1998 über Versuche mit AAV-lacZ, die isolierte Rattenkardiomyozyten infizierten. Sie erreichten eine Infektionsrate von 60% bei einer MOI (Partikel/Zelle) von 1×10^6 , das Maximum fiel auf den dritten Tag, die Expression blieb bis zum vierzehnten Tag so hoch wie am ersten.

Alle genannten Arbeiten zeigen, daß die Expression des Transgens mit den verwendeten Virus-titern korreliert. Da es aber schwierig ist, hohe Titer von rekombinanten AAV zu erzielen, bleibt eine Expressionsrate des Fremdgens in über 50% der Zielzellen weiterhin ein Problem. Im Gegensatz zum adenoviral-assoziierten Gentransfer führen die AAV als Vektoren zu einer Langzeitexpression.

4.13. Ad-/AAV-Proplasmide mit dem PTH/PTHrP-1-R - funktionelle Aspekte

Als Modell für die funktionellen Messungen der rekombinanten Plasmide, wurden H9c2-Kardiomyoblasten verwendet, die ähnliche Charakteristika der β -adrenergen Signaltransduktion besitzen wie das humane Myokard. Ferner können sie in einer standardisierten Weise kultiviert werden und erleichtern so die Vergleichbarkeit der Experimente.

Das Ad-Proplasmid pdE1BCMV enthält den gewebeunspezifischen CMV-Promotor und Teile des Ad5-Genoms mit einer Deletion in den E1-Sequenzen. Es kann zur Züchtung rekombinanter Adenoviren, die das Insert in der Region E1 tragen, verwendet werden. Dazu muß es mit dem Plasmid pJM17, das fast das gesamte adenovirale Genom enthält, in 293-Zellen cotransfiziert werden, in welchen dann replikationsdefiziente Viren entstehen. Der Nachteil dieses Proplasmides liegt darin, daß es kein Markergen enthält. Eine vereinfachte Methode zur Züchtung von rekombinanten Adenoviren erlaubt das Proplasmid pAdTrack (siehe 2.5.1. und 4.17.1.2.), ein bi-cistronischer Vektor mit 2 CMV-Promotoren, das die Gensequenz für das Markergen GFP enthält.

Das AAV-Proplasmid psubgfp-PTH1-R enthält ebenfalls das Gen für das GFP, das nach Expression in den Zielzellen unter UV-Licht fluoresziert. Als Starter für seine Transkription klonierten wir einen SV40-Promotor (aus dem Simian Virus 40, Gruppe der sogenannten Papovaviren stammend) ein. Transfizierte Zielzellen leuchteten im Test auf Fluoreszenz nur sehr schwach auf. Dies liegt wohl daran, daß der Promotor SV40 nicht potent genug für die Steuerung der Transkription des Gens GFP ist. Üblicherweise wird dieser Promotor in COS-Zellen (CV1 Origin SV40) verwendet. Dies sind von der etablierten Affennieren-Zelllinie CV1 abgeleitete Zellen, die durch Behandlung mit einer Mutante des Affenvirus SV40 entstanden sind. Für die Transkription dieses Genoms ist die Stärke des Promotors ausreichend. Damit ist das GFP in diesem Proplasmid als Markergen nicht verwendbar.

Das von uns klonierte Proplasmid AAV-PTH1-R-IRES-EGFP enthält eine sogenannte Internal-Ribosome-Entry-Site, die es erlaubt, zwei Gene unter der Kontrolle eines Promotors zu transkribieren und zu translatieren. Die IRES läßt die lange mRNA nach Translation des ersten Gens wieder an das Ribosom andocken. Der Vorteil liegt darin, Basenpaare für die begrenzte Aufnahmekapazität der AAV (4,5 kb) zu sparen. Das von uns verwendete IRES-Gen stammt aus dem Genom eines Enzephalomyokarditisvirus. Ferner enthält das Proplasmid AAV-PTH1-R-IRES-EGFP als Selektionsmarker der trans- oder infizierten Zielzellen, das Gen EGFP, das aus Mutationen des GFP entstanden ist und wesentlich heller aufleuchtet.

Alle Plasmide zeigten bei den funktionellen biochemischen Versuchen in H9c2-Kardiomyoblasten nach Stimulation mit PTHrP 1-34 einen konzentrationsabhängigen Anstieg der cAMP-Bildung. Als Kontrollen wurden die jeweiligen Plasmide ohne Insert verwendet; sie zeigten keinen Effekt auf die Adenylatzyklase.

4.14. Transfektion der Plasmide in H9c2-Kardiomyoblasten und biochemischer Nachweis

Nach der liposomalen Transfektion der rekombinanten Plasmide in Kardiomyoblasten wurden cAMP-Assays angefertigt. Damit wurde biochemisch über eine Messung der intrazellulären cAMP-Bildung erstens der Effekt der Transfektion der Plasmide und zweitens die Expression des Rezeptors nachgewiesen. Die Kontrollen zeigten keine Veränderung in den Assays, damit ist ein Anstieg der cAMP-Bildung auf die Expression des PTH/PTHrP-1-Rezeptors zurückzuführen. Eine Kopplung des Rezeptors an die zelleigene Adenylatzyklase-Signaltransduktion war nachgewiesen.

4.15. Gentherapie und Methoden der heutigen Gentherapie

Gentherapie im einfachsten Sinne bedeutet die Korrektur bzw. Auswechslung eines defekten Gens durch ein normales. Praktisch heißt dies, daß das intakte Gen in die genetisch defekten Zellen eingeschleust und zur Expression gebracht werden muß, um die Fehlfunktionen des defekten Gens auszugleichen. Auf einem Papier, das 1932 auf dem sechsten Internationalen Genkongreß unter dem Namen „Gentechnik“ (genetic engineering) erschien, wurde dieser Begriff mit zum ersten Mal verwendet. „Genetic Engineering“ wurde als die Anwendung genetischer Prinzipien auf die Zucht von Tieren und Pflanzen definiert.

1966 sagte Tatum in New York voraus, daß Viren benutzt werden könnten, um Gene zu übertragen. Aposhian beschrieb 1969 die Bedeutung des Erbgutes so: „Wenn jemand den Zweck eines Medikamentes darin sieht, die normale Funktion eines bestimmten Prozesses im Körper wiederherzustellen, dann könnte die DNA als das ultimative Medikament betrachtet werden.“

In den 80er Jahren entwickelten unabhängig voneinander drei verschiedene Gruppen rekombinante Retroviren als Vektoren für Transgene (Shimotohno und Temin 1981, Tabin et al. 1982, Wei et al. 1981). Diese wurden weiterentwickelt und für klinische Studien verwendet. In der Folgezeit konzentrierte sich die Forschung vermehrt auf Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren, die gegenüber Retroviren Vorteile für die Gentherapie haben.

Neben der therapeutischen Anwendung für verschiedene andere Erkrankungen haben gentherapeutische Techniken auch ein großes therapeutisches Potential in der Behandlung von kardiovaskulären Störungen, so z.B. für ischämische Kardiomyopathien, für die kongestive Herzinsuffizienz und für maligne Arrhythmien (O'Brien et al. 1991, Schneider und French 1993, Nabel 1995).

Um ein heterogenes, eukaryontisches Gen in Mikroorganismen einzuschleusen und zur Expression zu bringen, wird cDNA (complementary DNA = einzel- oder doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls) benötigt, da Mikroorganismen die Intronbereiche nicht aus der RNA ausschneiden können. Die cDNA dient als einzige Quelle intronfreier DNA, in ihr sind alle codierenden Regionen eines Gens in zusammenhängender Form enthalten. Damit aus dem Transgen Proteine gebildet werden, muß zusätzlich ein starker Fremdpromotor einkloniert werden, der die Transkription steuert. Er dient als Erkennungs- und Anheftungsstelle für die RNA-Polymerasen. Für die Fremdgene der Versuche in dieser Arbeit wurde der Promotor des Cytomegalievirus (CMV) verwendet.

Als Träger für das in die Zielzellen einzuschleusende Fremdgen, hier die cDNA, wird ein Klonierungsvektor benötigt, der eine eigenständige, vermehrungsfähige Einheit bildet, die in geeigneten Wirtszellen die Fähigkeit zur DNA-Replikation besitzt. Nicht replizierfähige Fremd-DNA, die in einen Klonierungsvektor eingebaut wurde, wird so passiv mitrepliziert und kann anschließend zusammen mit dem Vektor isoliert und gereinigt werden. Als solche Klonierungsvektoren dienen in der Regel synthetisch hergestellte Plasmide. Da das genetische Material in den Kern der Zielzelle gelangen muß, um repliziert zu werden, wird ein Vektor oder Träger gebraucht. Hierfür sind verschiedene Mechanismen entwickelt worden. Wichtig für ihre Beurteilung sind ihre Effizienz, Fremd-DNA in Zellen einzuschleusen und, ob sie die Gene in therapeutisch relevanter Höhe exprimieren. Bei solchen Mechanismen, die Vor- und Nachteile haben, unterscheidet man zwischen viralen und nonviralen Methoden.

Ein idealer Vektor zur Übertragung von DNA in das Myokard sollte zu einer hohen Genexpression in der Wirtszelle nach direkter intramyokardialer oder intrakoronarer Applikation führen, d.h. effizient sein. Er sollte weder immunogen noch toxisch sein und einen stabilen Einbau des Transgens gewährleisten, ferner sollte der Vektor sein rekombinantes Genom spezifisch einbauen, d.h. nicht mutagen durch zufällige Integration in andere Zellen sein. Als nonvirale Mechanismen stehen der liposomale Gentransfer, DNA-Protein-Konjugate, die Kalzium-Phosphat-Präzipitation (nur *in vitro* möglich), DNA auf Gold- oder Wolframpartikeln, das Elektroporationsverfahren, der sogenannte Chromosomen-vermittelte Gentransfer und die Injektion von gereinigter nackter DNA zur Verfügung. Für die viralen Methoden dienen als Vektoren Retroviren, Adenoviren, Adeno-assoziierte Viren, Herpes-Simplex Typ 1-Viren, Vaccinia- (Pox)viren und andere.

In den Versuchen vorliegender Arbeit wurden Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren als Vektoren verwendet.

4.16. Nonvirale Methoden

Die direkte Genübertragung in Tierzellen zwar möglich, aber nicht besonders effizient.

Einige Arbeiten berichten über Versuche direkter intramuskulärer Injektion von Plasmid-DNA ins Myokard (Lin et al. 1990, Kitsis et al. 1991, Buttrick et al. 1992, v. Harsdorf et al. 1993, Gal et al. 1993). Kitsis et al. beschrieben aber 1993, daß nur 0,02% der Myozyten eines adulten Rattenherzens die direkt injizierte DNA aufnehmen und exprimieren.

Bei der Technik der Mikroinjektion werden DNA-Moleküle mit Hilfe einer feinen Glaskapillare unmittelbar in den Kern der Zelle injiziert. Diese Methode ist sicher und möglich bei Tier- und Pflanzenzellen, eignet sich aber nicht für die Anwendung bei großen Zellzahlen.

Eine einfache Möglichkeit, DNA zu übertragen, ist die liposomale Transfektion. Hierbei kommt es zu einer Komplexbildung der negativ geladenen Fremd-DNA mit positiv geladenen Lipidpartikeln, den uni- oder multilamellaren Liposomen, die mit der Membran der Empfängerzelle verschmelzen und dabei das genetische Material endozytotisch in die Zelle entlassen. Dieses Verfahren ist weder toxisch noch immunogen, erlaubt aber keinen gezielten Transfer in bestimmte Zellen und kann nur kleinere DNA-Partikel transportieren.

Der Transfer eines Fremdgens kann auch erreicht werden durch Bombardements der Zellen mit stark beschleunigten Gold- oder Wolframpartikeln, die mit DNA überzogen sind und aus einer Partikelkanone abgeschossen werden. Der Durchmesser der Partikel beträgt hierbei ca. 1 μm . Allerdings kann man mit dieser Methode nur oberflächliche Gewebeschichten erreichen.

Mit Liganden-DNA-Komplexen erreicht man eine höhere Zellspezifität des Gentransfers, allerdings ebenfalls bei geringerer Effizienz als mit den viralen Vektoren. Hierbei wird die Fremd-DNA an Liganden von Oberflächenrezeptoren der Zielzelle gebunden. Bindet der Komplex dann mit dem Liganden an seinen Rezeptor, wird er endozytotisch in die Zielzelle aufgenommen. Mit dieser Methode stellt sich das Problem, daß die aufgenommene DNA von zelleigenen Lysosomen abgebaut werden kann.

Bei der Kalziumphosphat-Technik wird die DNA in der Form von feinkörnigen Kalziumphosphat-Präzipitaten auf die Zellen aufgebracht und von diesen durch Endozytose aufgenommen. Das Präzipitat erhält man durch Mischung einer DNA/Kalziumchlorid-Lösung mit einer Lösung, die Phosphat-Ionen enthält.

Beim Elektroporationsverfahren werden die Zellmembranen der in Suspension befindlichen, exponentiell wachsenden Empfängerzellen durch kurze (10 μs) elektrische Pulse hoher Feldstärke (ca. 12,5 kV/cm) für hochmolekulare Moleküle durchlässig gemacht, bevor man sie der DNA-Lösung aussetzt. Dieses Verfahren, das auch als Elektrotransfektion bezeichnet wird, eignet sich für eine Vielzahl von Zellsorten und Spezies und ist in vielen Fällen auch dann anwendbar, wenn andere Methoden versagen.

Eine Variante der Transfektionstechniken ist der sogenannte Chromosomen-vermittelte Gentransfer, bei dem nicht DNA, sondern Chromosomen in die Zellen eingeschleust werden.

Alle genannten nonviralen Mechanismen sind nicht effizient genug, Transgene in sich nicht teilende Zellen mit einer guten Expressionsrate einzuschleusen.

4.17. Virale Vektoren

Der Gentransfer mit Hilfe viraler Vektoren ist effizienter als der mit nonviralen Methoden. Werden Viren verwendet, so muß man sie verändern, so daß sie sich in der Zielzelle nicht mehr replizieren können und somit nicht selbst weitere Zellen infizieren. Die für die Vermehrung fehlenden Funktionen werden bei der Synthese dieser Viren entweder durch Helferviren bereitgestellt oder durch sogenannte Verpackungszelllinien (KB-, HeLa, HEK-, oder 293-Zellen), die ein in ihr Genom integriertes, mutiertes Provirus tragen, das die fehlenden Funktionen ersetzt.

Retroviren waren die ersten viralen Vektoren. Ihre einzelsträngige RNA muß in der Wirtszelle zu Beginn der Virusinfektion erst mit Hilfe der viruseigenen reversen Transkriptase in doppelsträngige DNA umgeschrieben werden, bevor ein eingeschleustes Fremdgen exprimiert werden kann. Deshalb können Retroviren als Vektoren für die Gentherapie nur in sich teilenden Zellen verwendet werden, z.B. in der Tumorthherapie oder für die Modifikation sich teilender Zellen vor einer Transplantation, in der Hämatologie etc. Da die virale DNA in einer oder auch mehrerer Kopien ins Genom der Wirtszelle integriert wird (Provirus), kommt es zu einer lange andauernden Expression des Fremdgens. Dies ist ein Vorteil der retroviralen Vektoren für die Gentherapie. Außerdem sterben infizierte Zellen nicht ab, wie z.B. nach Infektion durch Adenoviren. Retroviren wurden bisher für die meisten klinischen Versuche als Vektoren verwendet.

Vaccinia-Viren gehören zur Gruppe der Poxviridae. Sie besitzen ein lineare Doppelstrang-DNA, die im Zytoplasma der Zielzellen repliziert wird. Für Vaccinia-Viren gibt es kein natürliches Reservoir, sie können nur unter Laborbedingungen gezüchtet werden. Die Größe des Genoms dieser Viren (187 kb) erlaubt keine direkte Konstruktion von Rekombinanten, man muß sich daher einer Zweischritt-Technik bedienen. Mit Vaccinia-Viren können sowohl sich teilende als auch ruhende Zellen infiziert werden, sie besitzen ein breites Wirtsspektrum, verursachen aber nur eine kurzdauernde Expression des Transgens. Vaccinia-Viren sind sehr stabil und können somit gut aufbewahrt werden.

Auch Herpes-Simplex-Viren Typ I können als Vektoren für die Gentherapie verwendet werden. Sie besitzen eine Doppelstrang-DNA, werden im Zellkern repliziert und können sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende Zellen infizieren. Ein weiterer Vorteil dieser Vektoren ist, daß sie große Mengen Fremd-DNA transportieren können. Die Nachteile liegen in einer Zytotoxizität und einer nur kurzen Expression des Fremdgens.

4.17.1. Adenoviren

Adenoviren (Ad) wurden ursprünglich als zytopathogenes Agens in Zellkulturen menschlicher adenoider Wucherungen (Tonsillen) entdeckt und später auch bei vielen Säugern gefunden. Sie wurden 1953 charakterisiert (Rowe et al. 1953). Sie gehören zur Familie der Adenoviridae. Mittlerweile sind in Vertebraten mehr als 80 durch typenspezifische Antigene serologisch unterscheidbare Serotypen gefunden und charakterisiert worden, die in die Gruppen A-F eingeteilt werden. Ad besitzen einen natürlichen Tropismus für den oberen Respirations- und den Intestinaltrakt.

Das klinische Spektrum ihrer Infektionen erstreckt sich von selbstlimitierenden Erkältungskrankheiten im Respirationstrakt über gastrointestinale, hepatische, urogenitale bis zu Augen- und ZNS-Infektionen (Horwitz, 1990). Viele Erwachsene sind seropositiv für adenovirale Antikörper. 5% der akuten respiratorischen Erkrankungen bei Kindern unter 5 Jahren gehen auf Rechnung der Ad (Kremer et al. 1995).

4.17.1.1. Struktur und Infektionszyklus

Ad sind membranlos und bestehen aus einem inneren, komplex aufgebauten DNA-Protein-Zentralkörper (Core) und einer äußeren, ikosaederförmigen Proteinhülle (Kapsid), die ihrerseits aus 252 Untereinheiten (Kapsomeren) zusammengesetzt ist. An den durch die Kapsomeren gebildeten Eckstellen des Ikosaeders ragen bei den meisten Virustypen spitze, filamentöse Fortsätze (Antennen) heraus, die an der Adsorption der Viren an die Zelloberfläche beteiligt sind. Das genetische Material der Ad besteht aus doppelsträngiger, linearer DNA mit ca. 36.000 Basenpaaren. Sie kodiert für ungefähr 15 Proteine. Die DNA-Enden sind charakterisiert durch sequenzhomologe Bereiche, sogenannten Umgekehrten Terminalen Repetitionen (Inverted Terminal

Repeats = ITR), deren Länge bei den einzelnen Serotypen zwischen 63 und 165 Basenpaaren schwankt, aber untereinander ausgeprägte Homologie aufweist. Die Größe eines eingesetzten Fremdgens in Ad kann bis zu 7,5 kb betragen (Jolly 1994). Der Durchmesser der Viren beträgt 73,1 nm (Predescu et al. 1997).

Ad vermehren sich in der Regel am besten in Epithelzellen der Spezies, aus denen sie isoliert wurden und erzeugen dabei charakteristische Zellveränderungen (zytopathischer Effekt). Zur Infektion bindet der Adenovirus mit seinem Fiberprotein, das sich aus dem ikosaederförmigen Kapsid fortsetzt, an spezifische Rezeptoren der Zielzelle an. Peptidsequenzen in der Pentonbasis des Kapsids binden an Integrin-Rezeptor-Domänen an der Zelloberfläche. Der Virus drängt sich endozytotisch in die Zellmembran, es entsteht ein "coated pit", im Zytosol entsteht ein Endosom. Der niedrige pH-Wert in dessen Inneren führt zur Dissoziation und Freigabe der DNA ins Zytosol. Die virale DNA dringt in den Zellkern ein; weder sie noch das Transgen bauen sich im Regelfall in das Wirtsgenom ein. Die Transkription viraler mRNA findet unabhängig vom Wirtszellzyklus statt und beginnt an den Promotoren der Region E1. Der Infektionszyklus läßt sich in zwei Phasen gliedern: Während der frühen (early) Phase (0-6 Stunden nach der Infektion bei Ad2; 12-15 Stunden bei Ad12) wird die Wirtszelle auf die Vermehrung der viralen DNA vorbereitet. In der mit der Replikation viraler DNA beginnenden späten (late) Infektionsphase (bis ca. 36 Stunden nach der Infektion) werden vor allem die zellulären Funktionen weitgehend unterdrückt und die für die Strukturproteine codierenden, viralen Gene exprimiert.

Funktional läßt sich das Genom der Ad demnach in zwei sich überlappende Regionen, "early" und "late" einteilen. Die "early"-Region kann wiederum in sechs Unterregionen E1A, E1B, E2A, E2B, E3 und E4 eingeteilt werden, die "late"-Region in die Einheiten L1-L5 (Kremer et al. 1995).

Die virale Genexpression und Replikation wird über die Gene E1A und E1B, die am 5'-Ende des adenoviralen Genoms liegen, gesteuert.

Nach erfolgreicher Infektion lysieren Ad die infizierte Zelle. Pro Wirtszelle entstehen innerhalb von 36 –72 Stunden ca. 200.000 neue Viruspartikel. Schaltet man die E1A- und E1B-Regulationsgene aus und ersetzt diese durch Fremdgene, so verliert der Virus seine Replikationsfähigkeit, die Zellen bleiben intakt und die Fremdgene können über eine gewisse Zeit exprimiert werden, gehen aber früher oder später unweigerlich verloren, was nur für manche Anwendungen ein willkommenes Sicherheitsargument liefert. Auch die Substitution des E3- oder E4-Gens durch ein Fremdgen ist möglich. Die Züchtung der Viren muß dann allerdings in Zelllinien erfolgen, deren Genom Teile des viralen Genoms in stabil integrierter Form enthalten. Eine solche Zelllinie sind

z.B. 293-Zellen, die durch Einführung eines Teils des Genoms von Ad5 in menschliche embryonale Nierenzellen (Human Embryonic Kidney cells = HEK-Zellen) entstanden sind und einen kleinen DNA-Bereich (11%) aus dem linken Ende des viralen Genoms ins zelluläre Genom integriert haben. Die Verwendung dieser Zellen als Wirtszellen erlaubt das Arbeiten mit defekten Ad als Klonierungsvektoren, in denen das linke Ende des viralen Genoms mit der E1-, E3- oder E4-Region durch einklonierte Fremd-DNA ersetzt wurde.

4.17.1.2. Züchtung rekombinanter Adenoviren

Adenovirale Vektoren der ersten Generation werden durch direkte Ligation der DNA-Fragmente des adenoviralen Genoms mit Fragmenten von Restriktionsendonukleasen, die das Transgen enthalten, gebildet. Diese Methode ist aufgrund der niedrigen Effizienz bei der Ligation technisch schwierig.

Adenovirale Vektoren mit einer Deletion im E1-Gen werden vielfach verwendet. Hierbei wird das Transgen in die E1-Region eines adenoviralen Vektorkonstruktes einkloniert und dieses mit dem Plasmid pJM 17, das das Genom des Adenovirus Typ 5 mit einer kleinen Deletion in der Region E3 (map units 79 und 85) enthält, zur homologen Rekombination in 293-Zellen cotransfiziert, die das defekte adenovirale Genom komplettieren können. Die Größe des pJM17 überschreitet 105% der Größe von Wildtyp-Adenoviren, deshalb kann es nicht in infektiöse Virione gepackt werden. Einige Stunden nach Transfektion entstehen durch den zytopathischen Effekt der Ad im konfluenten und daher trüb erscheinenden Zellrasen runde Löcher, sogenannte Plaques, aus denen die Viren isoliert und gereinigt werden können. Bei der Anwendung dieser Adenoviren kommt es aber durch homologe Rekombination häufiger zu replikationskompetenten Ad und einem zytotoxischen Effekt in den Zielzellen, der eine Langzeitexpression verhindert. Für unsere Versuche mit den β Gal-Adenoviren wurden E1-defiziente Adenoviren (Serotyp 5) verwendet. Andere Protokolle beschreiben den Einbau einer temperatursensitiven Mutation in das E2A-Gen, die bei nonpermissiven Temperaturen die Spätexpression der viralen Proteine und damit die Komplikationen verringert. Die Temperaturen in vivo sind aber dennoch permissiv für die E2A-ts Mutanten.

Die nächste Generation der Ad für die Gentherapie verfügt über Deletionen in den Genen E1 und E4. Dies führt zu einer deutlichen Verringerung des zytopathischen Effekts und zu einer

geringeren zellulären Immunantwort der Zielzellen und damit zu einer längeren Genexpression (Wang et al. 1996)

Eine neue Methode sieht eine vereinfachte Züchtung rekombinanter Ad in *Escherichia coli* vor. Dabei wird das Fremdgen zunächst in ein Shuttleplasmid, z.B. pAdTrack-CMV, das eine Kanamycinresistenz und ein GFP-Gen trägt, kloniert. Das resultierende Plasmid wird mit einer Restriktionsendonuklease linearisiert und in *E. coli* mit einem zweiten Plasmid pAdEasy, das den großen Teil des adenoviralen Genoms enthält, per Elektroporation zur homologen Rekombination in *E. coli* cotransfiziert. Die Rekombination in den Bakterien ist wesentlich effizienter als in anderen Zelllinien, wie z.B. 293-Zellen. Rekombinante werden über eine Kanamycinresistenz selektiert und anschließend linearisiert um ihre ITR-Regionen freizulegen. Das linearisierte neue Plasmid wird dann zur Verpackung in 293-Zellen transfiziert. Nach 7-12 Tagen können die rekombinanten Adenoviren aus Plaques gepickt werden. Dieses System erlaubt die Züchtung der Adenoviren bei einem Minimum an enzymatischen Manipulationen. Außerdem kann das Ergebnis einer Transfektion oder Infektion in den Zielzellen direkt durch die Fluoreszenz des inklonierten GFP beurteilt werden (He et al. 1998).

Eine Züchtung von rAd mit kardial-spezifischen Promotoren ist von Franz et al. (1997) beschrieben worden: Sie konstruierten adenovirale Vektoren mit dem Reporter-gen Luziferase unter der Kontrolle des ventrikel-spezifischen Myosin-Leichte-Ketten-2 (mlc-2c)-Promotors und unter Kontrolle des atrial- und ventrikular-spezifischen Alpha-Myosin-Schwere-Ketten (alpha-mhc)-Promotors. Als Kontrolle wurden Adenoviren ohne Promotor und rAd mit dem Luziferase-Gen unter Kontrolle des Rous Sarkoma Virus verwendet. Nach Injektion der Viren in Herzen und in den Musculus quadrizeps femoris von neonatalen Ratten zeigten die unter der Kontrolle der kardial-spezifischen Promotoren stehenden Gene eine signifikant höhere Expression und Aktivität als die Kontrollen. Ähnliche Versuche führten Griscelli et al. (1997) mit rekombinanten Adenoviren durch, die das lacZ-Gen unter Kontrolle des mlc-2c-Promotors enthielten. Eine direkte Injektion in Skelettmuskel oder Leber führte zu keiner Expression des Gens. Nach Applikation ins Herz dagegen zeigten die Kardiomyozyten eine positive Färbung.

4.17.1.3. Vor- und Nachteile von rAd als Vektoren in der Gentherapie

Ad sind fähig, ein breites Spektrum sowohl replizierender als auch nicht-replizierender Zellen zu infizieren (Horwitz 1990). Hohe Expressionsraten ihrer Gene und Transgene können in sich teilenden und sich nicht teilenden Zellen erreicht werden. Ein weiterer großer Vorteil von Ad ist, daß sie als Vektoren biologisch sicher sind, was in Reihenimpfungen an Tausenden Rekruten der US-Army gegen Infektionen des Respirationstraktes bewiesen wurde (Meiklejohn 1983). Die bisher als Vektoren eingesetzten Ad waren nicht tumorgen, sie führten aber zu – harmlosen - respiratorischen Problemen (Horwitz 1990). Ein Nachteil des Gentransfers durch Adenoviren ist eine zelluläre und humorale Immunantwort nach Expression der adenoviralen Proteine (Schulick et al. 1995, Wang et al. 1996).

Im Gegensatz zu Retroviren bringen Ad das Genmaterial nicht in einer dauerhaft stabilen Form in den Zellkern ein. Verschiedene Faktoren, wie zytotoxische T-Zellen und andere Entzündungszellen tragen dazu bei, daß die Expression der viralen DNA und des Transgens zwar initial hoch ist, dann aber innerhalb 2 bis 4 Wochen rasch abfällt (Yang et al. 1994). Da eine Teilung der Wirtszelle nicht zwingend zu einer Replikation des Transgens führt, tragen nicht alle Tochterzellen eine Kopie des Fremdgens. Genannte Tatsachen verhindern eine Langzeit-Behandlung, eine wiederholte Applikation ist notwendig. Weil aber, wie oben erwähnt, Infektionen mit Ad-Wildtypen häufig sind (50% der 2-Jahre alten Kinder und 95% der 16-34 Jahre alten Erwachsenen in Washington D.C., Huebner et al. 1954), besteht die unerwünschte Möglichkeit, daß Wildtypen sich mit replikationsdefekten Viren rekombinieren und einen replikationskompetenten, neuen Virus bilden.

4.17.2. Adeno-assoziierte Viren

Adeno-assoziierte Viren (AAV) wurden 1966 charakterisiert (Hoggan et al. 1966). Sie gehören zur Familie der Parvoviridae und kommen ubiquitär vor. Es sind 5 humane Serotypen (AAV 1-5) bekannt. Als virale Vektoren werden meist AAV der Gruppe 2 verwendet. AAV besitzen einen natürlichen Tropismus für den respiratorischen und den Gastrointestinaltrakt; über 80% der Erwachsenen sind seropositiv (Rolling und Samulski 1995).

4.17.2.1. Struktur und Infektionszyklus

AAV sind membranlose, im Durchmesser ca. 20 nm messende Viren (Rolling und Samulski 1990), die gegen eine Vielzahl chemischer und physikalischer Einflüsse stabil sind, so daß sie gereinigt und konzentriert für längere Zeit aufbewahrt werden können.

Sie verfügen über eine 4,6 kb große lineare Einzelstrang-DNA mit drei Promotoren, die an den Kartenpositionen p5 (für rep68 und rep78), p19 (für rep40 und rep52) und p40 (für die cap-Gene) liegen (Berns 1990, Vincent et al. 1997). Die Struktur des Genoms besteht aus den zwei Offenen-Leserahmen (Open-Reading-Frames = ORF) rep und cap, die von Umgekehrten-Terminalen-Repetitionen (Inverted-Terminal-Repeats = ITR) umgeben sind.

Die Region von rep kodiert für vier Proteine (rep40, rep52, rep68 und rep78), die die Replikation, Transkription und Endonuklease-Funktion des AAV im Genom von Wirtszellen steuern. Ohne eine Coinfektion durch einen Helfervirus arbeitet eines der rep-Gene als Transkriptions-Repressor für einige der Promotoren (Labow et al. 1987, Tratschin et al. 1986). Es konnte gezeigt werden, daß eine Überexpression der rep 78/68 Proteine durch Substitution des p5-Promotors mit starken heterologen Promotoren bei der Vermehrung von rekombinanten AAV (rAAV) zu beträchtlich kleineren Erträgen führte. Analog dazu führt eine Reduktion der rep78/68 Proteine durch einen abgeschwächten Translationsbeginn (Mutation eines ATG zu ACG) zu einer höheren Ausbeute an rAAV (Li et al. 1997).

Die cap Sequenz kodiert für mindestens drei Strukturproteine, die das virale Kapsid bilden. Vincent et al zeigten 1997, daß eine erhöhte Synthese der cap-Proteine zu einem zehnfachen Ertragsanstieg an rAAV führte. Daraus kann gefolgert werden, daß die Bildung der cap-Proteine einen limitierenden Faktor darstellt.

Die ITR sind je 145 Basen lang und agieren als aktive Signale in cis (genetische Elemente liegen auf ein und demselben DNA-Molekül), sie enthalten die viralen Ursprünge (Origins) für die Replikation (Bohenzky et al. 1988) und Enkapsidation (Samulski et al. 1989) und nehmen an der Integration der viralen DNA teil. Die ersten 125 Basen stellen eine palindrome Sequenz dar, die eine Haarnadelstruktur ausbilden kann und so als Primer für den Beginn der Replikation dient. Die ITR haben nur eine geringe Promotoraktivität, so daß meist AAV-Vektoren mit Transkriptionskontrollen gezüchtet werden.

4.17.2.2. Züchtung rekombinanter Adeno-assoziiierter Viren

AAV sind replikationsdefekt, d.h. sie benötigen zu ihrer Vermehrung Helferviren. Die Zellen, in denen rAAV repliziert und vermehrt werden (Human Embryonal Kidney (HEK) 293-Zellen oder HeLa-Zellen) müssen also coinfiziert sein mit Adeno- (Atchinson et al. 1965), Herpes- (Buller et al. 1981), oder Vacciniaviren, was zu den Nachteilen entsprechend den jeweiligen Monoinfektionen der Viren führen kann. Vacciniaviren dienen nur als Partialhelfer (Schlehofer et al. 1996). Als Vektoren eingesetzte AAV beinhalten die ITR, zwischen denen das Fremdgen einkloniert ist (Tratschin et al. 1985, Samulski et al. 1989, Muzyczka, 1992).

Studien an Mutanten der AAV zeigten, daß für einen produktiven Lebenszyklus der Viren nur die Gene rep, cap und die terminalen Repeats in cis notwendig sind (Rolling und Samulski 1995).

Um rAAV zu vermehren, muß man ein System aus dem rekombinanten Plasmid und einem Helferplasmid bilden. Dazu transfiziert man 293-Zellen mit einem Plasmid, das die rep und cap Gene und AAV-Promotoren (p5, p19 und p40) in trans enthält, aber nicht die ITR (Helferplasmid). Obwohl die ITR in die Genexpression von AAV involviert sind, dürfen sie nicht auf dem Helferplasmid kloniert sein, um eine Bildung von Wildtyp-Rekombinanten zu vermeiden. Das Helferplasmid kann nicht in Virionen gepackt werden, da ihm die dafür notwendige terminale Domäne in cis fehlt. Die Fremd-DNA, umgeben von den ITR, transfiziert man zur selben Zeit. Durch eine folgende Coinfektion mit einem Helfervirus werden die Expression der rep Gene durch die adenovirale Genexpression aktiviert und die Synthese der rep Proteine induziert. Die Rep-Proteine aktivieren daraufhin die Expression des p40-Promotors, der die Bildung der viralen Strukturproteine erlaubt. Die rep-Genprodukte erkennen ferner die terminalen Repeats der AAV, schneiden die rekombinante Sequenz aus dem Plasmid und replizieren sie. Daraufhin wird die Synthese der Kapsidproteine aktiviert, sie sammeln sich im Nukleus der Zelle an und erkennen die AAV Signale in cis, die an den terminalen AAV-Repeats liegen und zur Enkapsidation der rekombinanten Sequenz in das Virion führen. Anschließend wird das Transgen mit den ITR in virale Partikel gepackt. Nach einer Inkubationszeit von 48 h werden die Adenoviren von der Viruspräparation durch eine einfache Erwärmung auf 56°C für 30 min entfernt. Alternativ dazu können Ad-Partikel durch Chromatographie oder andere physikalische Verfahren getrennt werden.

Aber sogar nach Reinigung der Zellysate durch Dichtegradientenzentrifugation mit Cäsium-Chlorid (CsCl), wobei die Makromoleküle je nach ihrer Schwimmdichte im Konzentrationsgefälle der CsCl-Lösung Banden bilden, sind die AAV nicht völlig rein von adenoviralen Struktur-

proteinen. Damit die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Wildtyp-AAV möglichst gering gehalten wird, sollten das Helferplasmid, auf dem die rep und cap Gene liegen und das Transgen mit den ITR wenig homolog sein.

Durch die Anwendung neuerer Methoden kann auf eine Coinfektion des Helfervirus verzichtet werden (Xiao et al. 1998). Dazu wird ein Plasmidkonstrukt mit einem Miniadenovirusgenom verwendet, das die für eine Vermehrung der rAAV notwendigen adenoviralen Helfergene enthält. Auf diesem Plasmid fehlen jedoch einige der early und die meisten der late Gene der Ad, d.h. Struktur- und Replikationsgene, so daß keine infektiösen Adenoviren entstehen können. Studien dazu zeigen, daß bei der Replikation der AAV-2 nur die adenoviralen Gene E1A, E1B, VA RNA, E2A und E4 involviert sind (Matsushita et al. 1998). Weil 293-Zellen selber die E1A und E1B Proteine exprimieren (Graham et al. 1997), werden in das Plasmidkonstrukt nur die Regionen E2A, E4 und VA RNA kloniert. Während alle drei der Gene benötigt werden, um eine größere Menge von AAV erzielen zu können, findet eine kleinere Vektorproduktion auch in Abwesenheit von jedem der drei Gene statt, d.h. daß keines von ihnen essentiell für die Vermehrung der AAV ist (Matsushita et al. 1998). Die Produktion von AAV-Vektoren, die mit diesem Helferplasmid, den rep und cap Genen und dem AAV Vektor selber entsteht, ist vergleichbar mit der Bildung von AAV bei adenoviraler Cotransfektion (Matsushita et al. 1998).

Das Verfahren, Helferfunktionen von dem Virus auf ein Plasmidkonstrukt zu verlagern, hat einige Vorteile: nach einer Transfektion von 293-Zellen kommt es bei bestimmten Plasmiden zu einem, gegenüber einer Ad-Coinfektion signifikant höheren Ertrag an rAAV. Außerdem sind die erzeugten rAAV frei von Ad-Partikeln und unnötige Gene der Ad sind von vornherein eliminiert.

Diese Versuche mit Miniplasmiden zeigen, daß es wohl möglich sein wird, Zelllinien herzustellen, die alle, für eine effiziente rAAV-Produktion notwendigen Komponenten enthalten, d.h. den rAAV-Vektor, ein Plasmid für die Enkapsidation sowie die rep und cap Funktionen. Dadurch könnten AAV unkomplizierter und effizienter erstellt und vermehrt werden.

4.17.2.3. Vor- und Nachteile von rAAV als Vektoren in der Gentherapie

Die Kapazität der AAV zur Übertragung fremder DNA ist mit 4,5 kb geringer als die von Adeno- oder Retroviren (Jolly 1994). Sie haben jedoch die Eigenschaft, in Abwesenheit eines Helfervirus als Provirus, DNA selektiv in eine definierte Region des menschlichen Chromosoms

19 (19q13.3-qter), Region AAVS1 (Kotin et al. 1990, Samulski et al. 1991) zu integrieren, was zu einer Langzeit-Expression führt. Andere als Vektoren verwendete Viren bauen ihr Genom nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit in die Chromosomen der Wirtszellen ein. Hauptvorteil der definierten Integration der AAV sind Berechenbarkeit und Stabilität. Wildtyp-AAV integrieren ihre DNA zu 70% in das Chromosom 19 und nur zu 30% in andere Chromosomen (Jolly 1994). Dies scheint abhängig zu sein von der Anwesenheit des rep-Gens, das zur Integration in das Chromosom 19 führt (Muzyczka, 1992). Das Phänomen der selektiven Integration kommt aber bei AAV, die als virale Vektoren verwendet werden, viel seltener vor (Flotte und Carter 1995). In Anwesenheit eines Helfervirus lysieren AAV die infizierte Zelle. Diese lytische Phase ist abhängig von der Expression der DNA des Helfervirus und führt zu einer aktiven Virusreplikation (Buller et al. 1981, Janik et al. 1981).

Nach einer Applikation von rAAV kommt es zu keiner zellulären oder humoralen immunologischen Antwort des Zielgewebes (Fisher et al. 1997), da rAAV als Vektor keine Gene tragen, die für virale Proteine kodieren, sie enthalten also auch weder rep noch cap-Sequenzen. Für die Replikation und damit die Herstellung von rekombinanten AAV für die Gentherapie ist aber, wie erwähnt, eine Coinfektion mit einem Helfervirus notwendig, was wiederum zu einer immunologischen Antwort auf z.B. adenovirale Proteine führen kann. Deshalb ist es Ziel, Systeme zur Vermehrung von rAAV zu entwickeln, die auf die adenovirale Coinfektion verzichten können.

Die Integration der DNA des AAV und die Persistenz der viralen DNA in der Zelle sind nicht mit pathogenen Folgen behaftet (Blacklow et al. 1968) und nicht tumorgen (Berns 1990). Infizierte Zellen weisen aber Veränderungen hinsichtlich der Genexpression und anderen Eigenschaften auf (Walz et al. 1992). Ein weiterer Vorteil der AAV ist, daß sie ihre DNA in ein breites Spektrum sich teilender und sich nicht teilender Zellen integrieren (Flotte et al. 1994, Podsakoff et al. 1994).

Die Herstellung von AAV in größeren Mengen ist wesentlich aufwendiger als die von Ad da, wie oben beschrieben, die AAV-Reproduktion die Expression von Proteinen aus dem Genom des Helfervirus benötigt. Darin liegt ein Nachteil der AAV. Die Ad-Reproduktion dagegen verläuft über einfache virale Replikation. Für Ad werden Titer bis zu 10^{11} pfu/ml (Guzman et al. 1993), für AAV nur Titer bis $1,5 \times 10^9$ pfu/ml erreicht (Svensson et al. 1999). Setzt man die Anzahl der positiv infizierten Zellen mit der Anzahl der applizierten Vektorpartikel in Relation, so zeigt sich aber, daß AAV als Vektoren ähnlich effizient sind wie Ad. Zu diesem Ergebnis kamen Studien an

verschiedenen Organsystemen (Kaplitt et al. 1996, Kaplitt et al. 1994, McCown et al. 1996, Miller et al. 1994).

In präklinischen Studien wurden rAAV für die Therapie verschiedener Erkrankungen an Lunge (Afione et al. 1996, Flotte et al. 1993, Flotte et al. 1996), Muskel (Clark et al. 1997, Fisher et al. 1997, Herzog et al. 1997, Kessler et al. 1996, Xiao et al. 1996), Zentralnervösem System (Kaplitt et al. 1994, McCown et al. 1996, Peel et al. 1997, Xiao et al. 1997), Leber (Koeberl et al. 1997, Okada et al. 1996, Ponnazhagan et al. 1997, Snyder et al. 1997) und Retina (Flannery et al. 1997) verwendet. Meist zeigte sich der Grad der Expression des Transgens linear abhängig von der Menge der applizierten Viren.

4.18. Andere molekulare Ansätze für die Therapie kardiovaskulärer Erkrankungen

Auf molekularer Ebene gibt es mittlerweile mehrere Ansätze für die Therapie der Herzinsuffizienz:

Es können Kalzium-gekoppelte Rezeptoren eingebracht werden, die über die Freisetzung von Kalzium die Kontraktion des Herzens erhöhen. Eingeschleuste Gene, die für Apoptosehemmer codieren, reduzieren den programmierten Zelltod, der bei der Herzinsuffizienz und beim Herzinfarkt eine große Rolle spielt. Die Produkte von im Herzen exprimierten β ARK- (β -adrenerge Rezeptorkinase) Mini-Genen, die den C-Terminus der β -ARK1 enthalten, verhindern eine Desensibilisierung β -adrenerger Rezeptoren (Laugwitz et al. 1997). Schließlich kann durch eingeschleuste G_s -Protein-gekoppelte Rezeptoren die cAMP-Bildung und damit die Kontraktionskraft des Herzens gesteigert werden.

Diesen Ansatz verfolgten wir weiter, indem wir den PTH/PTHrP-1-Rezeptor in Plasmide klonierten und rekombinante Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren herstellten. Wie beschrieben, ist es grundsätzlich möglich, mit diesen Viren als Vektoren, fremde Gene in Herzzellen einzuschleusen und zur Expression zu bringen. Dabei haben AAV den Vorteil, nicht immunogen zu sein und die Transgene so einzubauen, daß sie über lange Zeit exprimiert werden. Es ist aber schwierig, rAAV in hohen Titern herzustellen. Die bisher erreichten Titer genügen nur, um ca. 50% der Zellen des Zielgewebes zu infizieren.

5. Zusammenfassung

Die Therapie der kardiovaskulären Störungen einschließlich der Herzinsuffizienz wird wohl in Zukunft vermehrt auf molekularer Ebene erfolgen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt den Versuch, das für den PTH/PTHrP-1-Rezeptor codierende Gen mit Hilfe von viralen Vektoren in Herzzellen einzuschleusen. Dazu wurden zunächst Plasmide, ausgehend von dem Plasmid pcDNA I, umklontiert und in Proplasmide für Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren integriert. Zusätzlich wurden als Selektionsmarker in einige der Proplasmide das Reporterogen Beta-Galaktosidase oder die Gene für das Chromogen Green Fluorescent Protein (GFP) bzw. Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP) einkloniert. Alle Plasmide wurden mit Assays funktionell auf cAMP-Bildung gemessen.

Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren können als Vektoren Transgene auch in sich nicht teilende Zellen einbringen. Wir verwendeten sie deshalb zur Einschleusung des PTH/PTHrP-1-Rezeptorgens in Herzzellen. Wenn auch in Zukunft Adenoviren und Adeno-assoziierte Viren als Vektorsysteme wohl noch verbessert werden, eignen sie sich schon heute, Fremd-DNA mit ausreichender (AAV), bzw. guter (Ad) Effizienz in Kardiomyozyten einzubringen, so daß die Fremdgene exprimiert werden. Obwohl Adeno-assoziierte Viren Nachteile haben, wie die auf 4,5 kb limitierte Aufnahmekapazität für Fremd-DNA und die Schwierigkeit, höhere Virustiter herzustellen, erweisen sie sich doch als das bessere Vektorsystem, da sie einen stabilen Einbau und damit eine Langzeitexpression des Transgens gewährleisten. Außerdem induzieren sie keine immunologische Antwort des Zielgewebes.

Die cDNA des PTH/PTHrP-1-Rezeptors ist mit 585 Aminosäuren (Gesamtlänge des Gens 2,2 kb) so lang, daß sie ohne weiteres in das Genom von Adenoviren als auch in das Genom von Adeno-assoziierten Viren einkloniert werden kann. Da der Rezeptor im Herzen heterolog ist, kann angenommen werden, daß er nicht so rasch downreguliert wird wie physiologisch vorkommende, z.B. Beta-Rezeptoren. Dies ist so für den heterologen V2-Vasopressin-Rezeptor an Kardiomyozyten gezeigt worden (Laugwitz et al. 1999).

Einer der Agonisten des Rezeptors, das Parathormon-related-Protein, wird dehnungsabhängig aus sekretorischen Vesikeln des Herzens ausgeschüttet und verbleibt nur kurz im Blut. Im Laufe

der Herzinsuffizienz kommt es zunächst durch die verminderte Schlagkraft des Myokards und die resultierende Volumenbelastung zu einer vermehrten Dehnung seiner Wandung. Werden nun heterogene PTH/PTHrP-1-Rezeptoren in Herzzellen eingebracht, so kann durch die Bindung von PTHrP an diesen Rezeptor seine Adenylatzyklase aktiviert werden, die aus ATP cAMP bildet. Dadurch kommt es zu einer Kontraktilitätssteigerung der rezeptorbesetzten Zellen. So könnte es zu einer Verbesserung der Pumpleistung des gesamten insuffizienten Organs kommen.

Vorliegende Arbeit zeigt, daß es möglich ist, den PTH/PTHrP-1-Rezeptor mit geeigneten viralen Vektoren in Herzzellen einzuschleusen, zur Expression zu bringen und damit die endogene Signaltransduktionskaskade der Adenylatzyklase zu modulieren. Allerdings führt die Überexpression des Rezeptors in den Herzzellen, wohl durch die Kopplung an sowohl G_s - als auch G_q -Proteine, bereits zu einer erhöhten basalen Kontraktilität, die durch externe Zugabe der Agonisten des Rezeptors nicht weiter gesteigert werden kann.

Darüber hinaus wird in dieser Arbeit die Effektivität eines Gentransfers in Herzzellen mittels Adenoviren und Adeno-assoziierten Viren mit Hilfe von Marker- bzw. Reporter genen quantifiziert. Dazu wurden H9c2-Kardiomyoblasten, isolierte adulte Kardiomyozyten und ein Rattenmyokard in vivo mit rekombinanten Adenoviren, in die das Markergen β -Gal einkloniert war, infiziert. Eine anschließende Färbung mit X-Gal zeigte eine positive Reaktion von nahezu 100% der Kardiomyoblasten. Die Expression des Reporter gens in den isolierten Kardiomyozyten wurde auf ca. 50% geschätzt, in dem in vivo infizierten Myokard ebenfalls auf ca. 50%.

Eine Infektion von isolierten Kardiomyozyten mit Adenoviren, die das bicistronische Konstrukt PTHrP1-R-GFP trugen, führte zu einer Expression des Gens in über 96% der Zellen.

Außerdem wurden HEK-Zellen mit rekombinanten Adeno-assoziierten Viren, die das GFP enthielten, infiziert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop ließ sich eine bis zu 70%ige Genexpression nachweisen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Gentransfer mittels Adenoviren und Adeno-assoziiierter Viren eine effiziente und durchführbare Methode zur Einschleusung von Transgenen in kardiale Zellen sowohl in vitro als auch in vivo darstellt. Spezifische molekulare Interventionen im G-Protein-gekoppelten Rezeptorsystem des Herzens, die zu erhöhter cAMP-Bildung führen, könnten möglicherweise eine neue Strategie in der Behandlung von Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz darstellen, da mit ihrer Hilfe das inaktivierte β -adrenerge Rezeptorsystem umgangen werden kann.

In Zukunft wird es vielleicht möglich sein, auf bestimmte Anforderungen zugeschnittene Chimärrezeptoren zu bilden, die unter der Kontrolle von kardial-spezifischen Promotoren in Proteine übersetzt und mit verbesserten viralen Vektorsystemen in Herzzellen eingebracht werden. Damit ließe sich ein Maximum des Effekts des Agonisten bei einem minimalen Risiko systemischer Nebenwirkungen erreichen.

6. Literaturverzeichnis

S.K. Abbas, D.W. Pickard, C.P. Rodda, J.A. Heith, R.G. Hammonds, W.I. Wood, I.W. Caple, T.J. Martin, A.D. Care: Stimulation of ovine placental calcium transport by purified natural and recombinant parathyroid hormone-related protein preparations. *Q J Exp Physiol* 74: 549-552 (1989)

A.B. Abou-Samra, H. Jüppner, D.W. Weserberg, J.T. Potts, Jr., G.V. Segre: Parathyroid hormone causes translocation of protein kinase-C from cytosol to membranes in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology* 124 (3): 1107-1113 (1989)

S.A. Afione, C.K. Conrad, W.G. Kearns, S. Chunduru, R. Adams, T.C. Reynolds, W.B. Guggino, G.R. Cutting, B.J. Carter, T.R. Flotte: In vivo model of adeno-associated virus vector persistence and rescue. *J Virol* 70: 3235-3241 (1996)

R. Atchinson, B. Castro, W. Hammon: Adeno-associated defective virus particles. *Science* 194: 754-756 (1965)

T.K. Attwood, E.E. Eliopoulos, J.B.C. Findlay: Multiple sequence alignment of protein families showing low sequence homology: a methodological approach using database pattern-matching discriminators for G-protein-linked receptors. *Gene* 98 (2): 153-159 (1991)

E. Barr, J. Carroll, A.M. Kalynych, S.K. Tripathy, K. Kozarsky, J.M. Wilson, J.M. Leiden: Efficient catheter-mediated gene transfer into the heart using replication-defective adenovirus. *Gene Ther* 1: 51-58 (1994)

V. Behar, M. Pines, C. Nakamoto, Z. Greenberg, A. Bisello, S.M. Stueckle, R. Bessalle, T.B. Usdin, M. Chorev, M. Rosenblatt, L.J. Suva: The human PTH2 Receptor: binding and signal transduction properties of the stably expressed recombinant receptor. *Endocrinology* 137: 2748-2757 (1996)

K.I. Berns: Parvovirus replication. *Microbiol Rev* 54 (3): 316-329 (1990)

A. Bisello, Z. Greenberg, V. Behar, M. Rosenblatt, L.J. Suva, M. Chorev: Role of glycosylation in expression and function of the human parathyroid hormone/parathyroid hormone-related protein receptor. *Biochemistry* 35 (49): 15890-15895 (1996)

N.R. Blacklow, M.D. Hoggan, A.Z. Kapikian, J.B. Austin, W.P. Rowe: Epidemiology of adeno-associated virus infection in a nursery population. *Am J Epidemiol* 8: 368-378 (1968)

E. Blind, F. Raue, V. Knappe, J. Schroth, R. Ziegler: Cyclic AMP formation in rat bone and kidney cells is stimulated equally by parathyroid hormone-related protein 1-34 and parathyroid hormone 1-34. *Exp Clin Endocrinol* 101: 150-155 (1993)

E. Bogin, S.G. Massry, I. Harary: Effects of parathyroid hormone on rat heart cell: *J Clin Invest* 67: 1215-1227 (1981)

R.A. Bohenzky, R.B. Lefebvre, K.I. Berns: Sequence and symmetry requirements within the internal palindromic sequences of the adeno-associated virus terminal repeat. *Virology* 166: 316-327 (1988)

M.M. Bradford: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254 (1976)

M.R. Bristow, R. Ginsburg, W. Minobe, R.S. Cubicciotti, W.S. Sageman, K. Lurie, M.E. Billingham, D.C. Harrison, E.B. Stinson: Decreased catecholamine sensitivity and β -adrenergic receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 307: 205-211 (1982)

M.R. Bristow, R. Ginsberg, V. Umans, W. Fowler, W. Minobe, R. Rasmussen, P. Zera, R. Menlove, P. Shah, S. Jamieson: β 1- und β 2-adrenergic receptor subpopulation in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective β 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res* 59: 297-309 (1986)

A.E. Broadus, M. Mangin, K.L. Insogna, E.C. Weir, W.J. Burtis, A.F. Stewart: Humoral hypercalcemia of cancer. Identification of a novel parathyroid hormone-like peptide. *New Engl J Med* 319: 556-563 (1988)

A.A. Budayr, R.A. Nissenson, R.F. Klein, K.K. Pun, O.H. Clark, D.Kiep, C.D. Arnaud, G.A. Strewler: Increased serum levels of a parathyroid hormone-like protein in malignancy-associated hypercalcemia. *Ann Int Med* 111: 807-812 (1989)

T.D. Bui, A. Shallal, A.N. Malik, S. Al-Madhawi, G. Moscoso, M.E.S. Bailey, P.B.J. Burton, C. Moniz: PTHrP gene expression in human fetal and adult heart. *Cardiovasc Res* 27: 1204-1208 (1993)

R.M. Buller, J.A. Janik, E.D. Sebring, J.A. Rose: Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* 40: 241-247 (1981)

W.J. Burtis, T.G. Brady, J.J. Orloff et al.: Immunochemical characterization of circulating parathyroid hormone-related protein in patients with humoral hypercalcemia of cancer. *N Engl J Med* 322: 1106-1112 (1990)

P.B.J. Burton, C. Moniz, P. Quirke, C. Tzannatos, A. Pickles, M. Dixit, J.T. Triffit, H. Jüppner, G.V. Segre, D.E. Knight: Parathyroid hormone-related peptide in the human fetal uro-genital tract. *Mol Cell Endocrinol* 69 (2-3): R 13-17 (1990)

D.W. Burton, A. Perricone, W.F. Penny, A. Shvets, B. Ito, D. Nguyen, L.J. Deftos: Parathyroid hormone-like protein is expressed in the cardiovascular system of humans and other mammals: studies by immunohistology. *J Bone Miner Res* 8 (Suppl. 1): 256 (1993)

D.W. Burton, S.W. Brandt, L.J. Deftos: Parathyroid hormone-related protein in the cardiovascular system. *Endocrinology* 135: 253-261 (1994)

P.M. Buttrick et al.: Behavior of genes directly injected into the rat heart in vivo. *Circ Res* 70: 193-198 (1992)

J.M. Canterbury, L.A. Bricker, G.S. Levey et al.: Metabolism of bovine parathyroid hormone. Immunological and biological characterisation of fragments generated by liver perfusion. *J Clin Invest* 55: 1245-1253 (1975)

K.W. Chiu, T.Y. Chung, P.K.T. Pang: Cardiovascular effects of bPTH 1-34 and isoproterenol in the frog *Rana tigrina*. *Comp Biochem Physiol C* 100 (3): 547-552 (1991)

CIBIS Investigators and Committees: A randomized trial of β -blockade in heart failure: the Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study (CIBIS). *Circulation* 92: 1499-1509 (1995)

R. Civitelli, I.R. Reid, S.L. Westbrook, L.V. Avioli, K.A. Hruska: PTH elevates inositol polyphosphates and diacylglycerol in a rat osteoblast-like cell line. *Am J Physiol* 255: E660-667 (1988)

R. Civitelli, T.J. Martin, A. Fausto, S.L. Gunsten, K.A. Hruska, L.V. Avioli: Parathyroid hormone-related peptide transiently increases cytosolic calcium in osteoblastlike cells: comparison with parathyroid hormone. *Endocrinology* 125: 1204-1210 (1989)

K.R. Clark, T.J. Sferra, P.R. Johnson: Recombinant adeno-associated virus vectors mediate long-term transgene expression in muscle. *Hum Gene Ther* 8: 659-669 (1997)

J.N. Cohn, B. Levine, M.T. Olivari, V. Garberg, D. Lura, G.S. Francis, A.B. Simon, T. Rector: Plasma noradrenaline as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *New Engl J Med* 311: 819-823 (1984)

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

A.G. Dai Fotis, E.C. Weir, B.E. Dreyer, A.E. Broadus: Stretch-induced PTHrP gene expression in the rat uterus. *J Biol Chem* 267: 23455-23458 (1992)

L.J. Deftos, D.W. Burton, D.W. Brandt: PTHrP is a secretory product of atrial myocytes. *J Clin Invest* 92: 727-735 (1993)

L.J. Deftos, D.W. Brandt, W.Y. Lew, H.K. Hammond, A. Maisel, R.W. Engler, B. Ito, D.W. Burton: Parathyroid hormone-like protein is produced by the heart and is present in atrial secretory vesicles. *75th Annual Meeting of The Endocrine Society, Las Vegas NV, p1979 (1993)*

D.J. Dipette, W. Christenson, M.A. Nickols, G.A. Nickols: Cardiovascular responsiveness to parathyroid hormone and PTHrP in genetic hypertension. *Endocrinology* 130: 2045-2051 (1992)

J.K. Donahue, K. Kikkawa, A.D. Thomas, E. Marban, J.H. Lawrence: Acceleration of widespread adenoviral gene transfer to intact rabbit hearts by coronary perfusion with low calcium and serotonin. *Gene Therapy* 5: 630-634 (1998)

V.J. Dzau: Autocrine and paracrine mechanisms in the pathophysiology of heart failure. *Am J Cardiol* 70: 4C-11C (1992)

D.B. Evans: Modulation of cAMP: mechanism for positive inotropic action. *J Cardiovasc Pharmacol* 8 (Suppl. 9): 22-29 (1986)

A.J. Fenton, B.E. Kemp, G.N. Kent, J.M. Moseley, M.H. Zheng, D.J. Rowe, J.M. Britto, T.J. Martin, G.C. Nicholson: A carboxyl terminal peptide from the parathyroid related protein inhibits bone resorption by osteoclasts. *Endocrinology* 129 (4): 1762-1768 (1991)

K.J. Fisher, K. Jooss, J. Alston, Y. Yang, S.E. Haecker, K. High, R. Pathak, S.E. Raper, J.M. Wilson: Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy. *Nat Med* 3: 306-312 (1997)

J.G. Flannery, S. Zolotukhin, M.I. Vaquero, M.M. LaVail, N. Muzyczka, W.W. Hauswirth: Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6916-6921 (1997)

T.R. Flotte, S.A. Afione, C. Conrad, S.A. McGrath, R. Solow, H. Oka, P.L. Zeitlin, W.B. Guggino, B.J. Carter: Stable in vivo expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator with an adeno-associated virus vector. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 10613-10617 (1993)

T.R. Flotte, S.A. Afione, P.L. Zeitlin: Adeno-associated virus vector gene expression occurs in nondividing cells in the absence of vector DNA integration. *Am J Respir Cell Mol Biol* 11: 517-521 (1994)

T.R. Flotte, B.J. Carter: Adeno-associated virus vectors for gene therapy. *Gene Ther* 2: 357-362 (1995)

T.R. Flotte, B. Carter, C. Conrad, W. Guggino, T. Reynolds, B. Rosenstein, G. Tylor, S. Walden, R. Wetzel: A Phase I study of an adeno-associated virus-CFTR gene vector in adult CF patients with mild lung disease. *Hum Gene Ther* 7: 1145-1159 (1996)

W.M. Franz, T. Rothmann, N. Frey, H.A. Katus: Analysis of tissue-specific gene delivery by recombinant adenoviruses containing cardiac-specific promoters. *Cardiovasc Res* 35 (3): 560-566 (1997)

B.A. French, W. Mazur, R.S. Geske, R. Bolli: Direct in vivo gene transfer into porcine myocardium using replication-deficient adenoviral vectors. *Circulation* 90: 2414-2424 (1994)

A. Fujimori, S.L. Cheng, L.V. Avioli, R. Civitelli: Structure-function relationship of parathyroid hormone: activation of phospholipase-C, protein kinase-A and -C in osteosarcoma cells. *Endocrinology* 130 (1): 29-36 (1992)

L. Gagnon, H. Jouishomme, J.F. Whitfield, J.P. Durkin, S. MacLean, S.W. Neugebauer, G. Willick, R.H. Rixon, B. Chakravarthy: Protein kinase C-activating domains of PTHrP. *J Bone Mineral Res* 8: 497-503 (1993)

D. Gal et al.: Direct myocardial transfection in two animal models: evaluation of parameters affecting gene expression ad percutaneous gene delivery. *Lab Invest* 68: 18-25 (1993)

T.J. Gardella, M.D. Luck, G.S. Jensen, T.B. Usdin, H. Jüppner: Converting parathyroid hormone-related peptide into a potent PTH-2 receptor agonist. *J Biol Chem* 271 (33): 19888-19893 (1996)

R. Garg, M. Packer, B. Pitt, S. Yusuf: Heart failure in the 1990s: evolution of a major public health problem in cardiovascular medicine. *J Am Coll Cardiol* 22 (Suppl A): 3A-5A (1993)

H. Gilgenkrantz, D. Duboc, V. Juillard, D. Couton, A. Pavirani, J.G. Guillet, P. Briand, A. Kahn: Transient expression of genes transferred in vivo into heart using first-generation adenoviral vectors: role of the immune response. *Hum Gene Ther* 6: 1265-1274 (1995)

D. Goltzman, B. Henderson, N. Loveridge: Cytochemical bioassay of parathyroid hormone. Characteristics of the assay and analysis of circulating forms. *J Clin Invest* 65: 1309-1317 (1980)

D. Goltzman, H. Gomolin, A. DeLean, M. Wexler, J. Meakins: Discordant disappearance of bioactive and immunoreactive parathyroid hormone after parathyroidectomy. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 70-75 (1984)

F.L. Graham et al.: Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-72 (1997)

F. Griscelli, P. Opolon, C. Chianale, N. Di Falco, W.M. Franz, M. Perricaudet, T. Ragot: Expression from cardiomyocyte-specific promoter after adenovirus-mediated gene transfer in vitro and in vivo. *C R Acad Sci III* 320 (2): 103-112 (1997)

R.J. Guzman, P. Lemarchand, R.G. Crystal, S.E. Epstein, T. Finkel: Efficient gene transfer into myocardium by direct injection of adenovirus vectors. *Circ Res* 73: 1202-1207 (1993)

J.F. Habener, M. Rosenblatt, B. Kemper, H.M. Kronenberg, A. Rich and J.T. Potts, Jr.: Preproparathyroid hormone: Amino acid sequence, chemical synthesis and some biological studies of the precursor region. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2616-2620 (1978)

J.F. Habener, M. Rosenblatt, J.T. Potts, Jr.: Parathyroid hormone: biochemical aspects of biosynthesis, secretion, action and metabolism. *Physiol Rev* 64: 985-1053 (1984)

R.J. Hajjar, U. Schmidt, T. Matsui, J.L. Guerrero, K.H. Lee, J.K. Gwathmey, G.W. Dec, M.J. Semigran, A. Rosenzweig: Modulation of ventricular function through gene transfer in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (9): 5251-5256 (1998)

R.G. Hammonds, P. McKay, G.A. Winslow, H. Diefenbach-Jagger, V. Grill, J.A. Glatz, C.P. Rodda, J.M. Moseley, W.I. Wood, T.J. Martin: Purification and characterization of recombinant human parathyroid hormone-related protein. *J Biol Chem* 264: 14806 (1989)

R. von Harsdorf et al.: Gene injection into canine myocardium as a useful model for studying gene expression in the heart of large mammals. *Circ Res* 72: 688-695 (1993)

T.C. He, S. Zhou, L.T. da Costa, J. Yu, K.W. Kinzler, B. Vogelstein: A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95 (5): 2509-2514 (1998)

U.I. Heine, E.F. Munoz, K.C. Flanders et al.: Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo. *J Cell Biol* 105: 2861-2876 (1987)

G.N. Hendy, H.M. Kronenberg, J.T. Potts, Jr, A. Rich: Nucleotide sequence of cloned cDNAs encoding human preproparathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7365-7369 (1981)

R.W. Herzog, J.N. Hagstrom, S.H. Kung, S.J. Tai, J.M. Wilson, K.J. Fisher, K.A. High: Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular infection of recombinant adono-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 5804-5809 (1997)

M. Hoggan, N. Blacklow, W. Rowe: Studies of small DNA virus found in various Ad preparations: physical, biological and immunological characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 55: 1467-1474 (1966)

T. Hongo, J. Kupfer, H. Enomoto, B. Charifi, D. Giannella-Neto, J.S. Forrester, S.R. Singer, D. Goltzman, G.N. Hendy, C. Pirola, J.A. Fagin, T. L. Clemens: Abundant expression of PTHrP in primary rat aortic smooth muscle cells accompanies serum-induced proliferation. *J Clin Invest* 88: 1841-1847 (1991)

N. Horiuchi, M.P. Caulfield, J.E. Fisher, M.E. Goldman, R.L. McKee, J.E. Reagan, J.U.J. Levy, R.F. Nutt, S.B. Rodan, T.L. Schofield, T.L. Clemens, M. Rosenblatt: Similarity of synthetic peptide from human tumor to parathyroid hormone in vivo and in vitro. *Science* 238: 1566-1568 (1987)

M.S. Horwitz: Adenoviruses. *Virology, 2nd Ed. Raven Press, New York, 1723-1740 (1990)*

K.A. Hruska, D. Moskowitz, P. Esbrit, R. Civatelli, S. Westbrook, M. Huskey: Stimulation of inositol trisphosphate and diacylglycerol production in renal tubular cells by parathyroid hormone. *J Clin Invest* 79 (1): 230-239 (1987)

J.R. Huebner, W.P. Rowe, T.G. Ward, R.H. Parrott, J.A. Bell: Adenoidal-pharyngeal conjunctival agents. *New Engl J Med* 251: 1077-1086 (1954)

K.L. Insogna, A.F. Stewart, C.A. Morris, L.M. Hough, L.M. Milstone, M. Centrella: Native and a synthetic analogue of the malignancy-associated parathyroid hormone-like protein have in vitro transforming growth factor-like properties. *J Clin Invest* 83: 1057-1060 (1989)

K.B. James, P.M. McCarthy, J.D. Thomas, R. Vargo, R.E. Hobbs, S. Sapp, E. Bravo: Effect of implantable left ventricular assist device on neuroendocrine activation in heart failure. *Circulation* 92 (Suppl. 9) II: 191-195 (1995)

J.E. Janik, M.M. Huston, J.A. Rose: Locations of adenovirus genes required for replication of adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 1925-1930 (1981)

C.J. Johns, H. Bradley Nuss, N. Chiamvimonvat, B.M. Ramza, E. Marban, J.H. Lawrence: Adenovirus-mediated expression of a voltage-gated potassium channel in vitro (rat cardiac myocytes) and in vivo (rat liver). *J Clin Invest* 96: 1152-1158 (1995)

- D. Jolly: Viral vector systems for gene therapy. *Cancer Gene Therapy 1: 51-64 (1994)*
- H. Jouishomme, J.F. Whitfield, B. Chakravarthy, J.P. Durkin, L. Gagnon, R.J. Isaacs, S. MacLean, W. Neugebauer, G. Willick, R.H. Rixon: The protein kinase C-activating domain of the parathyroid hormone. *Endocrinology 130: 53-60 (1992)*
- H. Jüppner, A.B. Abou-Samra, S. Uneno, W.X. Gu, J.T. Potts, Jr., G.V. Segre: The parathyroid hormone-like peptide associated with humoral hypercalcemia of malignancy and parathyroid hormone bind to the same receptor on the plasma membrane of ROS 17/2.8 cells. *J Biol Chem. 263 (18): 8557-8560 (1988)*
- H. Jüppner, A.B. Abou-Samra, M. Freeman, X.F. Kong, E. Schipani, J. Richards, L.F. Kolakowski, Jr., U.J. Hock, J.T. Potts, Jr., H. M. Kronenberg, G. V. Segre: A G-protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science 254: 1024-1026 (1991)*
- M.G. Kaplitt, P. Leone, R.J. Samulski, X. Xiao, D.W Pfaff, K.L. O'Malley, M.J. During: Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain. *Nat Genet 8: 148-154 (1994)*
- M.G. Kaplitt, X. Xiao, R.J. Samulski, J. Li, K. Ojamaa, I.L.Klein, H. Makimura, M.J. Kaplitt, R.K. Strumpf, E.B. Diethrich: Long-term gene transfer in porcine myocardium after coronary infusion of an adeno-associated virus vector. *Ann Thorac Surg 62: 1669-1676 (1996)*
- A. Kass- Eisler, P.E. Falck, M. Alvira, J. Rivera, P.M. Buttrick, B.A. Wittenberg, L. Cipriani, L.A. Leinwand: Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA 90: 11498-11502 (1993)*
- B.E. Kemp, J.M. Moseley, C.P. Rodda, P.R. Ebeling, R.E.H. Wettenhall, D. Stapleton, H. Diefenbach-Jagger, F. Ure, V.P. Michelangeli, H.A. Simmons, L.G. Raisz, T.J. Martin: Parathyroid hormone-related protein of malignancy: active synthetic fragments. *Science 238: 1568-1570 (1987)*

P.D. Kessler, G.M. Podsakoff, X. Chen, S.A. McQuiston, P.C. Colosi, L.A. Matelis, G.J. Kurtzman, B.J. Byrne: Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 14082-14087 (1996)

L.A. Kirshenbaum, W.R. MacLellan, W. Mazur, B.A. French, M.D. Schneider: Highly efficient gene transfer into adult ventricular myocytes by recombinant adenovirus. *J Clin Invest* 92: 381-387 (1993)

L.A. Kirshenbaum: Adenovirus mediated-gene transfer into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 172 (1-2): 13-21 (1997)

R.N. Kitsis et al.: Hormonal modulation of a gene infected into rat heart in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 4138-4142 (1991)

R.N. Kitsis, P.M. Buttrick, A.A. Kass, M.L Kaplan, L.A. Leinwand. *Methods in Molecular Genetics*, ed. Adolph, K.W. (Academic, New York) Vol. 1: 374-392 (1993)

D.D. Koeberl, I.E. Alexander, C.L. Halbert, D.W. Russell, A.D. Miller: Persistent expression of human clotting factor IX from mouse liver after intravenous injection of adeno-associated virus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1426-1431 (1997)

L.F. Kolakowski, Jr. *unpublished data*

R.M. Kotin, M. Siniscalco, R.J. Samulski, X. Zhu, L. Hunter, C.A. Laughlin, S. McLaughlin, N. Muzycka, L. Rocchi, K.I. Berns: Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 2211-2215 (1990)

E.J. Kremer, M. Perricaudet: Adenovirus and adeno-associated virus mediated gene transfer. *British Medical Bulletin* 51 (1): 31-44 (1995)

M. Labow, L. Graf, K. Berns: Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol Cell Biol* 7 (4): 1320-1325 (1987)

K.-L. Laugwitz, K. Kronsbein, M. Schmitt, K. Hoffmann, M. Seyfarth, A. Schömig, M. Ungerer: Characterization and inhibition of β -adrenergic receptor kinase in intact myocytes. *Cardiovasc Res* 35: 324-333 (1997)

K.-L. Laugwitz, M. Ungerer, T. Schöneberg, H.-J. Weig, K. Kronsbein, A. Moretti, K. Hoffmann, M. Seyfarth, G. Schultz, A. Schömig: Adenoviral gene transfer of the human V2 vasopressin receptor improves contractile force of rat cardiomyocytes. *Circulation* 99 (7): 925-933 (1999)

A. Lerman, R.J. Gibbons, R.J. Rodeheffer, K.R. Bailey, L.J. McKinley, D.M. Heublein, J.C. Burnette, Jr.: Circulating N-terminal atrial natriuretic peptide is a marker for symptomless left-ventricular dysfunction. *Lancet* 2: 1105-1109 (1993)

J.J. Li, H. Ueno, Y. Pan, H. Tomita, H. Yamamoto, Y. Kanegae, O. Saito, A. Takeshita: Percutaneous transluminal gene transfer into canine myocardium in vivo by replication-defective adenovirus. *Cardiovasc Res* 30: 97-105 (1995)

J. Li, R.J. Samulski, X. Xiao: Role of highly regulated rep gene expression in adeno-associated virus vector production. *J Virol* 71: 5236-5243 (1997)

H. Lin et al.: Expression of recombinant genes in myocardium in vivo after direct injection of DNA. *Circulation* 82: 2217-2221 (1990)

A. Lindner, J.A. Tremann, J. Plantier, W. Chapman, A.W. Forrey, G. Haines, G.M. Palmieri. *Mineral Electrolyte Metab* 1: 155-165 (1978)

R.R. Macgregor, R.L. Jilka, J.W. Hamilton: Formation and secretion of fragments of parathyroid hormone. Identification of cleavage sites. *J Biol Chem* 261: 1929-1934 (1986)

Y. Maeda, U. Ikeda, M. Shimpo, S. Ueno, Y. Ogasawara, M. Urabe, A. Kume, T. Takizawa, T. Saito, P. Colosi, G. Kurtzman, K. Shimada, K. Ozawa: Efficient gene transfer into cardiac myocytes using adeno-associated virus vectors. *J Mol Cell Cardiol* 30: 1341-1348 (1998)

C.J. Magovern, C.A. Mack, J. Zhang, R.T. Hahn, W. Ko, O.W. Isom, R.G. Crystal, T.K. Rosengart: Direct in vivo gene transfer to canine myocardium using a replication-deficient adenovirus vector. *Ann Thorac Surg* 62: 425-433 (1996)

M. Mangin, A.C. Webb, B.E. Dreyer et al.: Identification of a cDNA encoding a parathyroid hormone-like peptide from a human tumor associated with humoral hypercalcemia of malignancy. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 591-601 (1988)

M. Mangin, K. Ikeda, B.E. Dreyer, A.E. Broadus: Isolation and characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2408-2412 (1989)

T.J. Martin, J.M. Moseley, M.T. Gillespie: Parathyroid hormone-related protein: Biochemistry and molecular biology. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 26: 277-295 (1991)

T. Matsushita, S. Elliger, C. Elliger, G. Podsakoff, L. Villarreal, G.J. Kurtzman, Y. Iwaki, P. Colosi: Adeno-associated virus vectors can be efficiently produced without helper virus. *Gene Ther* 5: 938-945 (1998)

T.J. McCown, X. Xiao, J. Li, G.R. Breese, R.J. Samulski: Differential and persistent expression patterns of CNS gene transfer by an adeno-associated virus vector. *Brain Res* 713: 99-107 (1996)

R.L. McKee, M.P. Caulfield: Synthetic peptides as tools for investigating the pathogenicity of disease: humoral hypercalcemia of malignancy. *Peptide Res* 2: 161-166 (1989)

G. Meiklejohn: Viral respiratory disease at Lowry Air Force Base in Denver, 1952-1982. *J Infect Dis* 148: 775-784 (1983)

J.L. Miller, R.E. Donahue, S.E. Sellers, R.J. Samulski, N.S. Young, A.W. Nienhuis: Recombinant adeno-associated virus-mediated expression of a human gamma-globin gene in human progenitor-derived erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10183-10187 (1994)

J.M. Moseley, M. Kubota, H. Diefenbach-Jagger, R.E.H. Wettenhall, B.E. Kemp, L.J. Suva, C.P. Rodda, P.R. Ebeling, P.J. Hudson, J.D. Zajac, T.J. Martin: Parathyroid hormone-related protein purified from a human lung cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 5048-5052 (1987)

J.G. Motwani, H. McAlpine, N. Kennedy, A.D. Struthers: Plasma brain natriuretic peptide as an indicator for angiotensin-converting-enzyme inhibition after myocardial infarction. *Lancet* 2: 1109-1113 (1993)

J. Mühlhauser, M. Jones, I. Yamada, C. Cirielli, P. Lemarchand, T.R. Gloe, B. Bewig, S. Signoretti, R.G. Crystal, M.C. Capogrossi: Safety and efficacy of in vivo gene transfer into the porcine heart with replication-deficient, recombinant adenovirus vectors. *Gene Ther* 3: 145-153 (1996)

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

E.G. Nabel: Gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 91: 541-548 (1995)

R. Nakamura, T.X. Watanabe, H. Sokabe: Acute hypotensive action of parathyroid hormone (1-34) fragments in hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med* 168: 168-171 (1981)

G.A. Nickols, A.D. Nana, M.A. Nickols, D.J. Dipette, G.K. Asimakis: Hypotension and cardiac stimulation due to the parathyroid hormone-related protein, humoral hypercalcemia of malignancy factor. *Endocrinology* 125: 834-841 (1989)

G.A. Nickols, M.A. Nickols, J.J. Helwig: Binding of parathyroid hormone and parathyroid hormone-related protein to vascular smooth muscle of rabbit renal microvessels. *Endocrinology* 126: 721-727 (1990)

R.A. Nissenson, D. Diep, G.J. Strewler: Synthetic peptides comprising the aminoterminal sequence of a parathyroid hormone-like protein from human malignancies. Binding to parathyroid hormone receptors and activation of adenylate cyclase in bone cells and kidney. *J Biol Chem* 263: 12866-12871 (1988)

T.X. O'Brien, J.J. Hunter, E. Dyson, K.R. Chien: Heart-to heart: new approaches for gene transfer in the myocardium. *Circulation* 83: 2133-2136 (1991)

K. Ogino, D. Burkhoff, J.P. Bilezikian: The hemodynamic basis for the cardiac effects of PTH and PTHrP. *Endocrinology* 136 (7): 3024-3030 (1995)

H. Okada, K. Miyamura, T. Itoh, M. Hagiwara, T. Wakabayashi, M. Mizuno, P. Colosi, G. Kurtzman, J. Yoshida: Gene therapy against an experimental glioma using adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* 3: 957-964 (1996)

J.J. Orloff, T.L. Wu, H.W. Heath, T.G. Brady, M.L. Brines, A.F. Stewart: Characterization of canine renal receptors for the parathyroid hormone-like protein associated with humoral hypercalcemia or malignancy. *J Biol Chem* 264: 6097-6103 (1989)

J.J. Orloff, N.E. Soifer, J.P. Fodero, P. Dann, W.J. Burtis: Accumulation of carboxy-terminal fragments of parathyroid hormone-related protein in renal failure. *Kidney Int* 43: 1371-1376 (1993)

M. Packer, J.R. Carver, R.J. Rodeheffer, F.J. Ivanhoe, R. DiBianco, S.M. Zeldis, G.H. Hendrix, W.J. Bommer, U. Elkayam, M.L. Kukin et al.: Effect of oral milrinone on mortality in severe chronic heart failure. The PROMISE Study Research Group. *N Engl J. Med* 325 (21): 1468-1475 (1991)

P.K.T. Pang, R.L. Shew, W.H. Sawyer: Inhibition of uterine contraction by synthetic parathyroid hormone fragment. *Life Sci* 28 (12): 1317-1321 (1981)

P.K.T. Pang, M.C.M. Yang, T.E. Tenner, Jr.: β -adrenergic-like actions of parathyroid hormone. *Trends Pharmacol Sci* 9: 340-341 (1986).

S.E. Papapoulos, G.N. Hendy, S. Tomlinson, I.G. Lewin, J.L.H. O'Riordan: Clearance of exogenous parathyroid hormone in normal and uraemic man. *Clin Endocrinol* 7: 211-225 (1977)

A.L. Peel, S. Zolotukhin, G.W. Schrimsher, N. Muzyczka, P.J. Reier: Efficient transduction of green fluorescent protein in spinal cord neurons using adeno-associated virus vectors containing cell type-specific promoters. *Gene Ther* 4: 16-24 (1997)

C.J. Pirola, H.M. Wang, A. Kamyar, S. Wu, H. Enomoto, B. Sharifi, J.S. Forrester, T.L. Clemens, J.A. Fagin: Angiotensin II regulates parathyroid hormone-related protein expression in cultured rat aortic smooth muscle cells through both transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *J Biol Chem* 268: 1987-1994 (1993)

C.J. Pirola, H.M. Wang, M.I. Strgacich, A. Kamyar, B. Cercek, J.S. Forrester, T.L. Clemens, J. A. Fagin: Mechanical stimuli induce vascular PTHrP gene expression in vivo and in vitro. *Endocrinology* 134: 2230-2236 (1994)

G. Podsakoff, K.K. Wong Jr., S. Chatterjee: Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. *J Virol* 68: 5656-5666 (1994)

S. Ponnazhagan, P. Mukherjee, M.C. Yoder, X.S. Wang, S.Z. Zhou, J. Kaplan, S. Wadsworth, A. Srivastava: Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in vivo: organ-tropism and expression of transduced sequences in mice. *Gene* 190: 203-210 (1997)

S.A. Predescu, D.N. Predescu, G.E. Palade: Plasmalemmal vesicles function as transcytotic carriers for small proteins in the continuous endothelium. *Am J Physiol* 41: H937-H949 (1997)

J. Qian, J.N. Lorenz, S. Maeda, R.L. Sutliff, C. Weber, T. Nakayama, M.C. Colbert, R.J. Paul, J.A. Fagin, T.L. Clemens: Reduced blood pressure and increased sensitivity of the vasculature to parathyroid hormone-related protein (PTHrP) in transgenic mice overexpressing the PTH/PTHrP receptor in vascular smooth muscle. *Endocrinology* 140 (4): 1826-1833 (1999)

S.A. Rabbani, J. Mitchell, D.R. Roy, R. Kremer, H.P.J. Bennett, D. Goltzman: Purification of peptides with parathyroid hormone like bioactivity from human and rat malignancies associated with hypercalcemia. *Endocrinology* 118: 1200-1210 (1986)

S.H. Ralston: The pathogenesis of humoral hypercalcemia of malignancy. *Lancet* 2: 1443-1446 (1987)

A. Roca-Cusachs, D.J. Dipette, G.A. Nickols: Regional and systemic hemodynamic effects of parathyroid hormone-related protein: preservation of cardiac function and coronary and renal flow with reduced blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 110-118 (1991)

F. Rolling, R.J. Samulski: AAV as a viral vector for human gene therapy. *Mol Biotech* 3: 9-15 (1995)

M. Rosenblatt, J.F. Habener, G.A. Tyler, G.L. Shepard, and J.T. Potts, Jr.: Chemical synthesis of the precursor-specific region of preproparathyroid hormone. *J Biol Chem* 254: 1414-1421 (1979)

M. Rosenblatt, N.V. Beaudette G.D. Fasman: Conformational studies of the synthetic precursor-specific region of preproparathyroid hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 3983-3987 (1980)

W.P. Rowe, R.J. Huebner, L.K. Gimore, R.H. Parrott, T.G. Ward: Isolation of a cytopathogenic agent from human adenoids undergoing spontaneous degeneration in tissue culture. *Proc Soc Exp Biol Med* 84: 570-573 (1953)

R.J. Samulski, L.S. Chang, T. Shenk: Helper-free stocks of recombinant adeno-associated viruses: Normal integration does not require viral gene expression. *J Virol* 63: 3822-3828 (1989)

R.J. Samulski, X. Zhu, X. Xiao, J.D. Brook, D.E. Housman, N. Epstein, L.A. Hunter: Targeted integration of adeno-associated virus into chromosome 19. *EMBO J* 10: 3941-3950 (1991)

J.R. Schlehofer, M. Ehrbar, H. zur Hausen: Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* 152: 110-117 (1986)

K.D. Schlüter, M. Weber, H.M. Piper: Parathyroid hormone induces protein kinase C but not adenylate cyclase in adult cardiomyocytes and regulates cyclic AMP via protein kinase C-dependent phosphodiesterase activity. *Biochem J* 310: 439-444 (1995)

K.D. Schlüter, M. Weber, H.M. Piper: Effects of PTHrP 107-111 and PTHrP 7-34 on adult cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29: 3057-3065 (1997)

H. Schneider, J.H.M. Feyen, K. Seuwen, N.R. Movva: Cloning and functional expression of a human parathyroid hormone receptor. *Eur J Pharmacol* 246: 149-155 (1993)

M.D. Schneider, B.Y. French: The advent of adenovirus; gene therapy for cardiovascular disease. *Circulation* 88: 1937-1942 (1993)

A.H. Schulick, K.D. Newman, R. Virmani, D.A. Dichek: In vivo gene transfer into injured carotid arteries. Optimization and evaluation of acute toxicity. *Circulation* 91: 2407-2414 (1995)

G. Segre, S.R. Goldring: Receptors for secretin, calcitonin, parathyroid hormone (PTH)/PTH-related peptide (PTHrP), vasoactive intestinal peptide, glucagon-like peptide, growth hormone-releasing hormone and glucagon belong to a newly discovered G-protein-linked receptor family. *Trends Endocrinol Metab* 4: 309-314 (1993)

J.S.K. Sham, V.C.K. Wong, K.W. Chiu, P.K.T. Pang: Comparative study on the cardiac actions of bovine parathyroid hormone (1-34). *Gen Comp Endocrinol* 61: 148-152 (1986)

R.L. Shew, P.K.T. Pang: Effects of bPTH fragments (1-34), (3-34) and (7-34) on uterine contraction. *Peptides* 5: 485-488 (1984)

C. Shigeno, Y. Hiraki, D.P. Westerberg, J.T. Potts, Jr., G.V. Segre: Photoaffinity labeling of parathyroid hormone receptors in clonal rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 263: 3864-3872 (1988)

C. Shigeno, I. Yamamoto, N. Kitamura, T. Noda, K. Lee, T. Sone, K. Shiomi, A. Ohtaka, N. Fujii, H. Yajima, J. Konishi: Interaction of human parathyroid hormone-related peptide with parathyroid hormone receptors in clonal rat osteosarcoma cells. *J Biol Chem* 263: 18369-18377 (1988)

K. Shimotohno, H.M. Temin: Formation of infectious progeny virus after insertion of herpes simplex thymidine kinase gene into DNA of an avian retrovirus. *Cell* 26: 67-77 (1981)

M. Smogorzewski, M. Zayed, Y.B. Zhang, J. Roe, S.G. Massry: Parathyroid hormone increases cytosolic calcium concentration in adult rat cardiac myocytes. *Am J Physiol* 264: H1998-H2006 (1993)

R.O. Snyder, C.H. Miao, G.A. Patijn, S.K. Spratt, O. Danos, D. Nagy, A.M. Gown, B. Winther, L. Meuse, L.K. Cohen, A.R. Thompson, M.A. Kay: Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors. *Nat Genet* 16: 270-276 (1997)

A.F. Stewart, A.E. Broadus: Parathyroid hormone-related proteins: Coming of Age in the 1990s. *J Clin Endocrinol Metab* 71: 1410-1414 (1990)

L.D. Stratford-Perricaudet, I. Makeh, M. Perricaudet, P. Briand: Widespread long-term gene transfer to mouse skeletal muscles and heart. *J Clin Invest* 90: 626-630 (1992)

L.J. Suva, G.A. Winslow, B.E. Kemp, H. Rodriguez, E.Y. Chen, P.J. Hudson, T.J. Martin: A parathyroid hormone-related protein implicated in malignancy hypercalcemia: cloning and expression. *Science* 237: 893-896 (1987)

E.C. Svensson, D.J. Marshall, K. Woodard, H. Lin, F. Jiang, L. Chu, J.M. Leiden: Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors. *Circulation* 99: 201-205 (1999)

C.J. Tabin, J.W. Hoffmann, S.P. Goff, R.A. Weinberg: Adaptation of a retrovirus as a eucaryotic vector transmitting the herpes simplex virus thymidine kinase gene. *Mol Cell Biol* 2: 426-436 (1982)

K. Takahashi, D. Inoue, K. Ando, T. Matsumoto, K. Ikeda, T. Fujita: PTHrP as a locally produced vasorelaxant: regulation of its mRNA by hypertension in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 208: 447-455 (1995)

- T.E. Tenner, Jr., S. Ramanadham, M.C.M. Yang, P.K. Pang: Chronotropic actions of bPTH 1-34 in the right atrium of the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 61: 1162-1167 (1983)
- M.A. Thiede, G.A. Rodan: Expression of a calcium-mobilizing parathyroid hormone-like peptide in lactating mammary gland. *Science* 242: 278-280 (1988)
- M.A. Thiede, S.C. Harm, R.L. McKee, W.A. Grasser, L.T. Duong, R.M. Leach, Jr.: Expression of the PTHrP in the avian oviduct: potential role as a local modulator of vascular smooth muscle tension and shell gland motility during the egg-laying cycle. *Endocrinology* 129: 1958-1966 (1991)
- M. Thorikay, S. Kramer, F.H. Reynolds, J.M. Sorvillo, L. Doescher, T. Wu, C.A. Morris, W.J. Burtis, K.L. Insogna, D.M. Valenzuela, A.F. Stewart: Synthesis of a gene encoding parathyroid hormone-like protein (1-141): Purification and biological characterization of the expressed protein. *Endocrinology* 124: 111-118 (1989)
- J. Tian, M. Smogorzewski, L. Kedes, S.G. Massry: Parathyroid hormone-parathyroid hormone related protein receptor mRNA is present in many tissues besides the kidney. *Am J Nephrol* 13(3): 210-213 (1993)
- J.D. Tratschin, I.L. Miler, M.G. Smith: Adeno-associated virus vector for high-frequency integration, expression, and rescue of genes in mammalian cells. *Mol Cell Biol* 5: 3251-3260 (1985)
- J. Tratschin, J. Tal, B. Carter: Negative and positive regulation in trans of gene expression from AAV vectors in mammalian cells by a rep gene product. *Mol Cell Biol* 6: 2884 (1986)
- M. Ungerer, M. Böhm, J.S. Elce, E. Erdmann, M.J. Lohse: Altered expression of β -adrenergic receptor kinase and β 1-adrenergic receptors in failing human heart. *Circulation* 87: 454-463 (1993)

T.B. Usdin, C. Gruber, T.I. Bonner: Identification and functional characterization of a receptor selectively recognizing parathyroid hormone, the PTH2 receptor. *J Biol Chem* 270: 15455-1545 (1995)

T.J. Vasicek, B.E. McDevitt, M.W. Freeman, B.J. Fennick, G.N. Hendy, J.T. Potts Jr., A. Rich, H.M. Kronenberg: Nucleotide sequence of the human parathyroid hormone gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 2127-2131 (1983)

K.A. Vincent, S.T. Piraino, S.C. Wadsworth: Analysis of recombinant adeno-associated virus packaging and requirements for rep and cap gene products. *J Virol* 71: 1897-1905 (1997)

C. Walz, J.R. Schlehofer: Modification of some biological properties of HeLa cells containing adeno-associated virus DNA integrated into chromosome 17. *J Virol* 66: 2990-3002 (1992)

H.H. Wang, E.D. Drugge, Y.C. Yen, M.R. Blumenthal, P.K.T. Pang: Effects of synthetic parathyroid hormone on hemodynamic and regional blood flows. *Eur J Pharmacol* 97: 209-215 (1984)

Q. Wang, M.I. Finer: Second generation adenovirus vectors. *Nat Med* 2: 714-716 (1996)

C.M. Wei, M. Gibson, P.G. Spear, E.M. Scolnick: Construction and isolation of a transmissible retrovirus containing the src gene of harvey murine sarcoma virus and the thymidine kinase gene of herpes simplex virus type. *I J Virol* 39: 935-944 (1981)

J.F. Whitfield, R.J. Isaacs, H. Jouishomme, S. MacLean, B.R. Chakravarthy, P., Marley, D. Barisoni, E. Regalia, U. Armato: C-terminal fragment of PTHrP (107-111) stimulates membrane-associated protein kinase C activity and modulates the proliferation of human and murines skin keratinocytes. *J Cell Physiol* 166: 1-11 (1996)

B.S. Wright, G.A. Tyler, R. O'Brien, L.H. Caporale, M. Rosenblatt: Immunoprecipitation of the parathyroid hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 (1): 26-30 (1987)

X. Xiao, J. Li, R. J. Samulski: Efficient long-term gene transfer into muscle tissue of immunocompetent mice by adeno-associated virus vector. *J Virol* 70: 8098-8108 (1996)

X. Xiao, T.J. McCown, J. Li, G.R. Breese, A.L. Morrow, R.J. Samulski: Adeno-associated virus vector antisense gene transfer in vivo decreases GABA (A) alpha1 containing receptors and increases inferior collicular seizure sensitivity. *Brain Res* 756: 76-83 (1997)

X. Xiao, J. Li, R.J. Samulski: Production of high-titer recombinant Adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72: 2224-2232 (1998)

H. Yamada, M. Tsutsumi, M. Fukase, A. Fujimori, Y. Yamamoto, A. Miyauchi, Y. Fujii, T. Noda, N. Fujii, T. Fujita: Effects of human PTH-related peptide and human PTH on cyclic AMP production and cytosolic free calcium in an osteoblastic cell clone. *Bone Miner* 6: 45-54 (1989)

D.T. Yamaguchi, T.J. Hahn, A. Iida-Klein, C.R. Kleeman, S. Muallem: Parathyroid hormone-activated calcium channels in an osteoblast-like clonal osteosarcoma cell line. cAMP-dependent and cAMP-independent calcium channels. *J Biol Chem* 262 (16): 7711-7718 (1987)

M.C.M. Yang, A.D. Kenny, P.K.T. Pang. *Current Trends in Comparative Endocrinology, Vol. 2: 1029-1030, Hong Kong University Press (1985)*

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

T. Yasuda, D. Banville, G.N. Hendy, D. Goltzman: Characterization of the human parathyroid hormone-like peptide gene: functional and evolutionary aspects. *J Biol Chem* 264: 7720-7725 (1989)

Y.C. Yen, M.C.M. Yang, A.D. Kenny, P.K.T. Pang: Parathyroid hormone (PTH) fragments relax the guinea-pig trachea in vitro. *Can J Physiol Pharmacol* 61 (11): 1324-1328 (1983)

G. Zhang, V. Gurtu, S.R. Kain: An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 23; 227 (3): 707-711 (1996)

R.H. Zhang, M.C.M. Yang, P.K.T. Pang. *Fed Proc* 44: 1650 (1985)

7. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 PTH-Rx-/PTH/PTHrP-Rezeptor (Schema)
- Abbildung 2 Cotransfektion von 293-Zellen mit AAVgfp
- Abbildung 3 Vergleich der cAMP-Freisetzung von PTH 1-34, PTH 1-84, PTHrP 1-34
- Abbildung 4 Vergleich der cAMP-Freisetzung von PTH 1-84, PTHrP 1-34, Osteostatin
- Abbildung 5 Konzentration-Wirkungskurve von PTHrP 1-34
- Abbildung 6 Kastengrafik Plasmid pcDNA-PTH1-R
- Abbildung 7 cAMP-Assay Plasmid pcDNA-PTH1-R
- Abbildung 8 Kastengrafik Ad-Proplasmid pdE1BCMV-PTH1-R
- Abbildung 9 cAMP-Assay Ad-Proplasmid pdE1BCMV-PTH1-R
- Abbildung 10 Kastengrafik Ad-Proplasmid pAdTrack-PTH1-R
- Abbildung 11 cAMP-Assay Ad-Proplasmid pAdTrack-PTH1-R
- Abbildung 12 Kastengrafik Plasmid psub-PTH1-R
- Abbildung 13 cAMP-Assay Ad-Proplasmid psub-PTH1-R
- Abbildung 14 Kastengrafik AAV-Proplasmid psubgfp-PTH1-R
- Abbildung 15 cAMP-Assay AAV-Proplasmid psubgfp-PTH1-R
- Abbildung 16 Kastengrafik AAV-Proplasmid AAV-PTH1-R-IRES-EGFP
- Abbildung 17 cAMP-Assay AAV-Proplasmid AAV-PTH1-R-IRES-EGFP
- Abbildung 18 Ad- β Gal-infizierte H9c2-Kardiomyoblasten
- Abbildung 19 Ad- β Gal-infizierte isolierte adulte Kardiomyozyten
- Abbildung 20 Ad-PTH1-R-GFP-infizierte isolierte adulte Kardiomyozyten
- Abbildung 21 Radioligandenbindung Ad-PTH1-R-GFP-infizierter Kardiomyozyten
- Abbildung 22 Ad- β Gal in vivo infizierte Kardiomyozyten
- Abbildung 23 AAVgfp infizierte HEK-Zellen mit und ohne Ad-Coinfektion
- Abbildung 24 Effekte von PTH/PTHrP-1-R auf die Kontraktilität isolierter adulter Kardiomyozyten

8. Danksagung

Für die Überlassung des Themas, Hinweise und Anregungen und die Forschungsmöglichkeiten in dem Labor für experimentelle Kardiologie möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Univ.-Prof. Dr. Albert Schömig sehr herzlich danken. Mein wissenschaftlichen Betreuer, Herr PD Dr. Martin Ungerer stand mir sehr engagiert jederzeit mit Rat und Tat zur Seite, hierfür gilt ihm mein besonderer Dank.

Sehr hilfreich und gern angenommen waren auch die Ratschläge von Herrn Dr. Karl-Ludwig Laugwitz und Herrn Dr. Hans-Jörg Weig.

Ebenso möchte ich mich bei Frau Kai Rosport, Frau Alessandra Moretti und Frau Sonja Scherzinger für ihre Ratschläge und ihre immer zuverlässige und freundliche Hilfsbereitschaft danken.

Größter Dank gilt natürlich meinen Eltern, die mir das Studium und vieles mehr ermöglicht haben.