

**Expression und transkriptionelle Regulation von RGS16 im
Modell der Kardiomyozyten neonataler Wistar Ratten
(*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769)**

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften,
Department Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von
Sabine Stübe

Hamburg 2008

Genehmigt vom Department Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Professor Dr. med. T. MEINERTZ
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ
Tag der Disputation: 21. Dezember 2007

Hamburg, den 07. Dezember 2007



A handwritten signature in black ink, consisting of stylized, cursive letters that appear to read 'R. Lieberei'.

Professor Dr. Reinhard Lieberei
Leiter des Departments Biologie

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS	Seite
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V - X
1. EINLEITUNG	1
1.1.1 Physiologische Regulationsmechanismen der myokardialen Kontraktilität	3
1.1.2 Definition Herzinsuffizienz	4
1.1.3 Pathophysiologische Grundlagen der Herzinsuffizienz	4
1.2 Kardiale Signaltransduktion	7
1.2.1 G-Proteine	7
1.2.2 Mechanismus der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine	9
1.2.3 G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion im Herzen	11
1.3 Regulation der Signaltransduktion	15
1.3.1 Regulation der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion	15
1.3.2 RGS-Proteine	17
1.4 Genregulation	24
1.4.1 Transkriptionsregulation	24
1.4.1.1 Promotor, Definition	25
1.4.1.2 Promotoraufbau	25
1.4.1.3 Transkriptionsfaktoren	27
1.5 Fragestellung der Arbeit	30
2. MATERIAL UND METHODEN	32
2.1 Material	32
2.1.1 Zellkultur	32
2.1.2 Bakterienstämme	32
2.1.3 Vektoren	32
2.1.4 synthetische Oligonukleotide und Längenstandards	32
2.1.5 Chemikalien	34
2.1.6 Enzyme	35
2.1.7 Reaktionskits	35
2.1.8 Antikörper und rekombinante Proteine	36
2.1.9 Medien, Puffer und Lösungen	36

	Seite
2.1.10 Verbrauchsmaterial	40
2.1.11 Laborgeräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör	41
2.2 Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i> Bakterien) und Herstellung von Stammkulturen (Glycerolstocks)	45
2.2.2 Transformation von TOP10 <i>E. coli</i> Bakterien	45
2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> Bakterien	46
2.2.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA	46
2.2.3.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA	47
2.2.4 Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA	48
2.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel	49
2.2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen	51
2.2.7 DNA-Klonierungstechniken	52
2.2.7.1 Restriktion von DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen	52
2.2.7.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA	52
2.2.7.3 DNA-Ligationsmethoden	53
2.2.8 Polymerase-Kettenverlängerung (PCR)	55
2.2.8.1 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion (PCR)	55
2.2.8.2 PCR-basierte Analyse rekombinanter Bakterienklone	56
2.2.8.3 Primer-Design	57
2.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten	58
2.2.10 DNA-Sequenzierung	58
2.3 Zellbiologische Methoden	60
2.3.1 Isolierung von Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten	60
2.3.2 Aussäen und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten	63
2.3.3 Transfektion der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit RGS16-Promotorkonstrukten	63
2.3.4 Stimulation der neonatalen Rattenkardiomyozyten	65

	Seite
2.3.5 Gewinnung von Zelllysaten aus neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Messung der RGS16-Promotoraktivität mittels Luciferase Assay	66
2.3.6 Luciferase Assay	66
2.4 Proteinbiochemische Methoden	67
2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford	67
2.4.2 Gewinnung von Membranproteinen für Western-Blot-Analysen	69
2.4.3 SDS-PAA-Gelelektrophorese	70
2.4.4 Western Blot	71
2.4.5 Ponceaurotfärbung von Proteinen auf Western Blots	72
2.4.6 Immundetektion	73
2.4.7 Gewinnung von Zellkulturüberständen und Proteinhomogenaten aus neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Quantifizierung der Zytokine IL-1 β und TNF α	75
2.4.8 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration	75
2.4.9 Quantifizierung von TNF α und IL-1 β in Zellkulturüberständen und Proteinhomogenaten mittels enzymgekoppelten Immunoassays (ELISA)	76
2.5 Statistik	78
3. ERGEBNISSE	79
3.0 Überblick	79
3.1.1 Einfluß von LPS, TNF α und IL-1 β auf die RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten	80
3.1.2 ELISA-Experimente zum Nachweis der Expression und Sekretion von IL-1 β und TNF α in neonatalen Rattenkardiomyozyten	86
3.2 Herstellung und Klonierung überlappender, putativer RGS16-Promotor-konstrukte	92
3.2.1 Klonierungsstrategie	92
3.2.2 Herstellung der RGS16-Promotordeletionskonstrukte	97
3.3 Untersuchung der Promotoraktivität und transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors	104

	Seite	
3.3.1	Untersuchung der Promotoraktivität der RGS16-Promotorkonstrukte	104
3.3.2	Untersuchung der transkriptionellen Regulation des RGS16-Promotors	108
4.	DISKUSSION	117
4.1.1	Einfluß von LPS, TNF α und IL-1 β auf die RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten	118
4.1.2	ELISA-Experimente zum Nachweis der Expression und Sekretion von IL-1 β und TNF α in neonatalen Rattenkardiomyozyten	121
4.2	RGS16-Promotoranalyse	127
4.2.1	Klonierung von DNA und Gentransfer	128
4.2.2	Plasmide in der Gentechnologie	131
4.2.3	Reportergen-Assays	131
4.2.4	Identifikation essentieller RGS16-Promotorelemente	133
4.3	Transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors	134
4.3.1	Der RGS16-Promotor wird nicht transkriptionell reguliert durch LPS, IL-1 β oder TNF α	134
4.3.2	Der RGS16-Promotor unterliegt der transkriptionellen Regulation durch Serum	137
4.3.3	Transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors durch Sphingosin 1-Phosphat (S1-P)	139
4.3.4	Weiterführende Experimente unserer Arbeitsgruppe	142
4.4	Bedeutung von RGS-Proteinen Pharmakologische Regulation von pathophysiologisch relevanten RGS-Proteinen?	147
5.	ZUSAMMENFASSUNG	150
6.	LITERATURVERZEICHNIS	153
7.	ANHANG	
	Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten	174
	Erklärung	175
	Danksagung	176

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
α	Alpha
ACE	angiotensin converting enzyme
ADH	antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
Ag	Agonist
Amp	Ampicillin
Amp ^r	Ampicillinresistenzgen
ANP	atrial natriuretic peptide
AP-1	activator protein 1
APC	Adenomatous Polyposis coli
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Adrenorezeptor
ARE	adenylate uridylate rich element
ATP	Adenosintriphosphat
AU-reich	Adenin, Uracil-reich
β	Beta
BAC	bacterial artificial chromosome
bHLH Transkriptionsfaktoren	basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren
bHLH-ZIP Transkriptionsfaktoren	basische Helix-Loop-Helix / Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren
BNP	brain natriuretic peptide
bp	Basenpaare
Brdu	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
BSA	bovine serum albumin
bZIP Transkriptionsfaktoren	basische Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	Calcium

CaCl ₂	Calciumchlorid
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
CBFHH	Calcium und Bicarbonat freier Hanks Puffer mit HEPES
cDNA	copy desoxyribonucleic acid
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
cm	Zentimeter
CMV	Cytomegalovirus
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
Cys	Cystein
DAG	Diacylglycerol
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DEP domain	dishevelled/EGL-10/pleckstrin homology domain
d.h.	das heißt
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDG	endothelial differentiation gene-encoded
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno-sorbent assay
FCS	foetal calf serum
g	Gramm
G	Guanosin
Gal	Galactosidase
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDI	guanine nucleotide dissociation inhibitor
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanine nucleotide exchange factor
GFP	green fluorescent protein
GGL	G-protein gamma-like domain

G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GPCR	G-protein-coupled receptor
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
GUS	Glucuronidase
h	hour
H	Wasserstoff
HATs	Histon-Acetyltransferasen
HCl	Salzsäure
His	Histidin
HMG	high mobility group
H ₂ O	Wasser
IFN	Interferon
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist
Inr	Initiator
InsP ₃ -Rezeptor	Inositoltrisphosphat-Rezeptor
IP ₃	Inositoltrisphosphat
K	Kalium
Kan ^r	Kanamycinresistenzgen
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
l	Liter
LAR II	Luciferase Assay Reagent II
LIF	leukemia inhibitory factor
LPA	lysophosphatidic acid / 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphat
LPS	Lipopolysaccharid
LUC	Luciferase
luc ⁺	Luciferasereporter gen

m	Meter
μ	Mikro
M	molar
MAP	mitogen-activated protein
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCS	multiple cloning site
MEM	Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
min.	Minute
MKP1	mitogen-activated protein kinase phosphatase-1
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mRNA	messenger ribonucleic acid
MW	Mittelwert
MyBP-C	Myosin-Bindungsprotein C
n	Anzahl der unabhängigen Experimente
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NF-1	nuclear factor 1
NF-κB	nuclear factor kappaB
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
OD	optical density
ori	origin of replication
PAA	Polyacrylamid
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung

PCR	polymerase chain reaction
pg	Picogramm
PH	Pleckstrin-Homologie
PIP ₂	Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat
P lac	Locus des lacZ α -Gens
PLB	passive lysis buffer
PTB	phosphotyrosine-binding domain
PTX	Pertussis Toxin
PX	Phosphatidylinositol-Bindedomäne
PXA	Phosphatidylinositol-assozierte Bindedomäne
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
R9AP	RGS9 anchoring protein
RBDs	Ras-Bindedomänen
rekomb.	rekombinant
RGS	regulator of G-protein signalling
RHR	Rel-Homologie-Region
RNA	ribonucleic acid
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
SAP-Puffer	shrimp alkaline phosphatase
SDS	sodium dodecylsulfate
Sec.	Sekunde
SEM	Standardabweichung der Mittelwerte
Ser	Serin
SERCA	sakroplasmatische ATPase
SIE	sis-inducible element
SMART	simple modular architecture tool
S1-P	Sphingosin 1-Phosphat
SR	sakroplasmatisches Retikulum
SRE	serum response element
SRF	serum response factor
Sst2	supersensitivity to pheromone 2
STAT	signal transducers and activators of transcription

Stx	Shiga Toxin
sTNFr	soluble tumor necrosis factor receptor
T	Thymin
T ₃	Triiodthyronin
Taq DNA Polymerase	DNA Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBP	TATA-Bindeprotein
Thr	Threonin
TLR4	Toll-like receptor 4
TM	Transmembranregion
TNF	Tumor-Nekrosis-Faktor
Tub.	Tubulin
U	units
ÜN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galactosid
YAC	yeast artificial chromosome
YY1	Yin Yang 1
z. B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Herzinsuffizienz mit ihren vielfältigen Ursachen, ihrer steigenden Prävalenz und Inzidenz im höheren Alter, ist eine der häufigsten internistischen Erkrankungen mit mehreren Millionen Patienten weltweit. Mehr als 1 % der Bevölkerung westlicher Länder leiden an Herzinsuffizienz (Levy et al. 2002; Roger et al. 2004). Daten der Framingham-Studie, einer Langzeitstudie, die seit 1948 durchgeführt wird, belegen, daß die Fünfjahres-Mortalität der an Herzinsuffizienz erkrankten Patienten 50 % beträgt. Aufgrund der demographischen Entwicklung in vielen westlichen Ländern wird sich die Problematik noch weiter verschärfen und weiterhin intensive Maßnahmen im diagnostischen, präventiven und therapeutischen Bereich erfordern.

Nicht nur in der Pathogenese der akut entzündlichen Herzinsuffizienz bei Patienten mit gram-negativer Sepsis (Müller-Werdan et al. 1996), sondern auch bei chronischer Herzinsuffizienz mehren sich die Hinweise, daß der Freisetzung von bakteriellem Endotoxin (LPS, Lipopolysaccharid), der Hauptkomponente der Zellwand gram-negativer Bakterien, eine wichtige pathophysiologische Rolle zukommt (Rauchhaus et al. 2000; Anker et al. 1997; Niebauer et al. 1999). Bei septischen Patienten wird durch LPS-Freisetzung eine schwere Hypotension sowie kardiogene Schocksymptomatik ausgelöst, die mit einer verminderten myokardialen Kontraktilität einhergeht (Parker und Adams, 1985). Dies ist gekennzeichnet durch Reduktion des biventrikulären Auswurfvolumens, Dilatation beider Herzventrikel mit konsekutiv erhöhtem enddiastolischen Druck (Court et al. 2002; Parker et al. 1984; Kimchi A. et al. 1984; Schneider et al. 1988; Parker et al. 1990; Vincent et al. 1989).

Die oben beschriebenen Phänomene werden vermutlich durch die LPS-induzierte Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren aus Makrophagen und anderen Zellen vermittelt. Eine zentrale Rolle kommt dabei den Zytokinen, insbesondere den pro-inflammatorischen Zytokinen wie z. B. Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-8 (IL-8), Tumornekrosisfaktor (TNF) und Interferon- γ (IFN γ), zu (Blackwell T.S. und Christman J.W. 1996; Wheeler A.P. und Bernard G.R. 1999). Diesen werden ebenso wie LPS kardiodepressive Effekte zugeschrieben (Kumar et al. 1996; Granton et al. 1997; Natanson et al. 1989; Müller-Werdan et al. 1998; Finkel et al. 1992; Sun et al. 1998; Cain et al. 1999), wobei unklar ist, ob LPS direkt oder erst über Induktion dieser Zytokine auf die Herzmuskelzellen wirkt.

Herzinsuffizienz ist begleitet von einer Reihe molekularer Veränderungen, die die kardiale G-Protein-vermittelte Signaltransduktion betreffen. So kommt es in diesem Rahmen zu einer „Down-Regulation“ von β -Adrenorezeptoren, Entkopplung von β -adrenergen Rezeptoren durch Rezeptor-Phosphorylierungsprozesse, einer sowohl bei chronischer Herzinsuffizienz als auch bei akut entzündlicher Herzinsuffizienz nachgewiesenen Induktion der inhibitorischen $G\alpha_i$ -Untereinheit im Herzgewebe (Pieske 1998; Castellano et al. 1997; Böhm et al. 1995) sowie zu einer Induktion von RGS-Proteinen (regulators of G protein signalling), insbesondere von RGS4 und RGS16 (Mittmann et al. 2002; Wieland et al. 2003). Derartige Veränderungen innerhalb der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion am Herzen sind sowohl unter LPS- als auch unter Zytokin-Gabe auch im Tiermodell und Zellkultur nachgewiesen worden (Patten et al. 2002; Patten et al. 2003; Reithmann et al. 1991).

Veränderungen innerhalb der kardialen G-Protein-vermittelten Signaltransduktion haben somit einen zentralen Stellenwert in der Pathogenese der Herzinsuffizienz und stellen einen wichtigen Ansatzpunkt für therapeutische Maßnahmen dar. Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation war die Untersuchung des Einflusses von LPS und von LPS-induzierten pro-inflammatorischen Zytokinen auf die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion im Herzen bei akut entzündlicher Herzinsuffizienz mit besonderem Hinblick auf Veränderungen der RGS16-Proteinexpression. *In vivo* Experimente an adulten Ratten haben gezeigt, daß mehrere Zytokine wie IL-1 β , TNF α , IL-6 und IFN γ sowie die RGS-Proteine, RGS4 und RGS16, nach LPS-Gabe vermehrt im Herzen adulter Ratten exprimiert werden (Patten et al. 2001; Patten et al. 2002). Durch Zellkulturexperimente an neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte nachgewiesen werden, daß die RGS16-Proteinexpression durch LPS sowie durch die beiden Zytokine IL-1 β und TNF α , jedoch nicht durch IL-6 und IFN γ induziert wird. Aus diesem Grunde sollte der Einfluß von IL-1 β und TNF α auf die RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten näher untersucht werden. Hierbei sollte die Frage geklärt werden, ob LPS direkt oder durch Induktion von TNF α und IL-1 β zur Steigerung der RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten führt. Da bisher nur sehr wenig über die transkriptionelle Regulation der RGS-Proteine im Herzen bekannt ist, sollten im zweiten Teil der Dissertation die Minimalsequenz, welche die RGS16-Promotoraktivität reguliert sowie essentielle regulatorische Promotorelemente identifiziert werden und die transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors, exemplarisch für andere RGS-Proteine, untersucht werden.

Im Folgenden werden die physiologischen Regulationsmechanismen der myokardialen Kontraktilität beschrieben, der Begriff Herzinsuffizienz definiert sowie deren pathophysiologischen Grundlagen erläutert. Im Anschluß daran wird die kardiale Signaltransduktion über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Regulation der G-Protein-gekoppelten Signaltransduktion mit besonderem Hinblick auf RGS-Proteine, Aufbau von Promotoren sowie deren transkriptionelle Regulation beschrieben.

1.1.1 Physiologische Regulationsmechanismen der myokardialen Kontraktilität

Die Regulation der myokardialen Kontraktilität ermöglicht eine Anpassung der Herzauswurfleistung an veränderte Bedingungen wie z. B. Mehrbelastung. Im humanen Myokard wird sie im Wesentlichen über drei sich gegenseitig beeinflussende Mechanismen reguliert:

1. dem Frank-Starling-Mechanismus: Eine erhöhte Herzmuskelvordehnung aufgrund eines erhöhten enddiastolischen Füllungsdruckes (Vorlast) im Myokard führt innerhalb physiologischer Grenzen zur Kontraktionssteigerung (Frank 1895; Starling 1918). Bei Überschreiten der physiologischen Grenzen, wie dies bei ausgeprägter Herzinsuffizienz auftritt, verliert der Frank-Starling-Mechanismus jedoch seine Bedeutung und es kommt zu keiner weiteren Kontraktionssteigerung, da die optimale Vorlast überschritten wird.
2. der Aktivierung des sympathischen Nervensystems, dadurch kommt es zur vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen. Diese wirken im Herzen hauptsächlich über β -adrenerge Rezeptoren jedoch auch über α -adrenerge Rezeptoren positiv inotrop (erhöhte Kontraktionskraft des Herzens) und positiv chronotrop (erhöhte Herzfrequenz).
3. und der positiven Kraft-Frequenz-Beziehung (Bowditch-Effekt): Eine Erhöhung der Herzfrequenz führt über Aktivierung von L-Typ- Ca^{2+} -Kanälen und $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschern zu einer Inotropiezunahme (Pieske et al. 1995; Piot et al. 1996; Maier et al. 1997). Beim insuffizienten Herzen kommt es dagegen zu einer Abnahme der Kontraktilität mit hohen Herzfrequenzen als Kompensationsmechanismus.

1.1.2 Definition Herzinsuffizienz

Pathophysiologisch ist Herzinsuffizienz definiert als das Unvermögen des Herzens, trotz ausreichendem Volumenangebot genügend Blut für die metabolischen und zirkulatorischen Anforderungen des Organismus zu pumpen (Scholz et al. 1987; Cohn et al. 1996). Aus klinischer Sicht ist sie ein Syndrom vielfältigster kardialer Erkrankungen. Allen Ursachen gemeinsam ist die verminderte Auswurfleistung des Herzens. Symptomatisch kommt es zu Stauungserscheinungen im Lungen- und Körperkreislauf „Rückwärtsversagen“ sowie Zeichen der Minderperfusion von Organen „Vorwärtsversagen“.

1.1.3 Pathophysiologische Grundlagen der Herzinsuffizienz

Auslösend für Herzinsuffizienz ist eine primäre Einschränkung der kardialen Pumpleistung. Dies führt nachfolgend zu neurohumoralen Anpassungsmechanismen (Kompensationsmechanismen), die zunächst die Perfusion lebenswichtiger Organe gewährleisten, später jedoch der kardialen Dekompensation Vorschub leisten (Francis et al. 1984; Benedict et al. 1994). Als Kompensationsmechanismen sind insbesondere die Aktivierung des sympathischen Nervensystems (Francis et al. 1984; Cohn et al. 1984), Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) (Francis et al. 1984) sowie die vermehrte Ausschüttung weiterer vasokonstriktiver Substanzen wie des antidiuretischen Hormons (ADH oder Vasopressin) (Francis et al. 1984) zu nennen. Mit Hilfe des RAAS, einer Kaskade von verschiedenen Hormonen und Enzymen, wird der Salz- und Wasserhaushalt des Körpers gesteuert. Es gehört zu einem der wichtigsten blutdruckregulierenden Systeme des Körpers. Die Überaktivierung des sympathischen Nervensystems und des RAAS nehmen in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz einen zentralen Stellenwert ein und stellen einen wichtigen Ansatzpunkt zur Behandlung der Herzinsuffizienz mit Hilfe von

- Betablockern: Hemmung der schädlichen Auswirkungen einer Überstimulation des sympathischen Nervensystems durch Blockierung der kardialen Betarezeptoren (Hein 2004; Griffin et al. 2004; Maack et al. 2004)
- ACE-Hemmern: Inhibierung des Angiotensin-Converting-Enzyms und somit Blockade der Bildung von Angiotensin II
- und Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten (AT1-Antagonisten) (Cusham & Ondetti 1991; Mutschler et al. 2001; Nemeč & Schubert-Zsilavec 2003)

dar.

Die Aktivierung des sympathischen Nervensystems führt zur vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen, die über β -Adrenorezeptoren vermittelt die Chronotropie (Herzfrequenz) und Inotropie (Kontraktionskraft) des Herzens zunächst steigern. Bei anhaltender Aktivierung wird jedoch durch „Down-Regulation“ der β_1 -Adrenorezeptoren, der Entkopplung von β_2 -Adrenorezeptoren durch eine erhöhte Rezeptor-Phosphorylierungsrate sowie durch Induktion der inhibitorischen $G\alpha_i$ -Untereinheit die Ansprechbarkeit auf Katecholamine verringert (Böhm 1998; Pieske 1998). Hierdurch nimmt die Inotropie und Chronotropie des Myokards letztendlich ab. Es mehren sich jedoch auch Hinweise, daß es sich bei diesem auch als Desensitivierung der β -adrenergen Signaltransduktion bezeichneten Mechanismus gleichzeitig um einen protektiven Mechanismus handelt, der das unter verstärkter β -adrenerger Stimulation stehende Herz vor den nachteiligen Wirkungen von Katecholaminen, wie β -adrenerg-induzierte Arrhythmien, schützen kann (Eschenhagen et al. 1996; Penny 1984; Corr et al. 1986).

Die Stimulation des RAAS führt zunächst durch Vasokonstriktion damit verbundener Erhöhung des arteriellen Blutdrucks (α -adrenerg vermittelt durch Angiotensin II) und Volumenretention (aufgrund der Wirkung von Aldosteron, Salz- und Wasserretention durch die Niere) (Eckert Tierphysiologie 1993) zur vermehrten Blutfüllung des Myokards. Hierdurch kommt es zu einer stärkeren Herzmuskelvordehnung, woraus wiederum eine temporäre Erhöhung der myokardialen Inotropie und Steigerung der Auswurfraction des Herzens (Frank-Starling-Mechanismus, Frank 1895; Starling 1918) resultieren. Auf längere Sicht kommt es jedoch zur kardialen Überlastung und Dekompensation in Folge einer vermehrten myokardialen Arbeit bei Volumenüberangebot und Vasokonstriktion. Höhere Füllungsvolumina und damit Füllungsdrücke haben langfristig gesehen nicht nur negative Effekte auf die Funktion des Myokards, sondern auch auf dessen Struktur (Katz 1990; Geha et al. 2004). Überhöhte Druckbelastung führt zur Herzmuskelhypertrophie, überhöhte Volumenbelastung zur Myokarddilatation. Erhöhte Wandspannung im Myokard und Muskelhypertrophie begünstigen die Entstehung myokardialer Ischämien, da die Zahl der Blutgefäße und Kapillaren im hypertrophen Muskel nicht zunehmen.

Um den Auswirkungen der Stimulation des sympathischen Nervensystems, des RAAS sowie weiterer vasoaktiver Substanzen, wie antidiuretisches Hormon (ADH) und Endothelin, entgegenzuwirken, kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von kardialen natriuretischen Hormonen, wie ANP (artial natriuretic peptide) und BNP (brain natriuretic peptide). Sie haben neben der Inhibition verschiedener pathophysiologischer Mechanismen, die z. B. für ventrikuläre und vaskuläre Hypertrophie und Remodeling verantwortlich sind, vor allem hypotensive und vasodilatative Effekte, fördern Natriurese und Diurese, inhibieren das sympathische Nervensystems und das RAAS (Clerico und Emdin 2004). Sie können jedoch die durch das sympathische Nervensystem und durch das RAAS vermittelten Effekte, die durch einen hohen arteriellen Gefäßwiderstand sowie Wasserretention gekennzeichnet sind, nicht kompensieren, sind aber dennoch in diesem Zusammenhang erwähnenswert, da sie Markerproteine für eine progrediente Herzinsuffizienz darstellen (Anand et al. 2003; Benedict et al. 1994; Clerico und Emdin 2004).

Neben der oben erwähnten Aktivierung des RAAS und des sympathischen Nervensystems haben zusätzlich weitere Faktoren, insbesondere die Freisetzung inflammatorischer Mediatoren schädigende Einflüsse auf Struktur und Funktion des Myokards (Pieske et al. 2000; Rauchhaus et al. 2001). In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, daß der Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-1 β , welchen kardiodepressive Effekte zugeschrieben werden, eine besondere pathophysiologische Relevanz zukommt (Rauchhaus et al. 2001; Court et al. 2002; Kumar et al. 1999; Finkel et al. 1992). Diese Effekte werden vermittelt durch Induktion einer Reihe von Molekülen und Prozessen, welche sowohl zu Zellschäden im Myokard als auch zur Herabsetzung der Kontraktilität von Kardiomyozyten beitragen. Hierunter fällt nicht nur die Aktivierung der Expression von Molekülen wie von RGS-Proteinen (Patten et al. 2003; Wieland et al. 2003; Mittmann et al. 2002; Michalek 2003) und der inhibitorischen G α_i -Untereinheit (Reithmann et al. 1991), welche G-Protein-vermittelte Signaltransduktionsprozesse wie Kontraktilität, Herzfrequenz und Herzmuskelzellenwachstum regulieren (Zolk et al. 2000), sondern vor allem auch die vermehrte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies, insbesondere von Stickstoffmonoxid (Conrad 2004; Finkel et al. 1992; Kumar et al. 1999; Court et al. 2002).

Unter physiologischen Bedingungen ist Stickstoffmonoxid als Vasodilatator zusammen mit Endothelin als Vasokonstriktor an der bedarfsgerechten Regulation des Vasotonus beteiligt (Conrad 2004; Pfannenschmidt 2000), darüber hinaus besitzt Stickstoffmonoxid im Rahmen einiger kardiovaskulärer Erkrankungen z. B. Artherosklerose aufgrund seiner vasodilatativen und antiinflammatorischen Eigenschaften (inhibiert die Expression von Adhäsionsmolekülen auf der Membran von Endothelzellen sowie die Aggregation von Thrombozyten) protektive Effekte (Baldus und Meinertz 2006). Im Myokard jedoch hat die durch die Zytokine TNF α und IL-1 β induzierte vermehrte Freisetzung von Stickstoffmonoxid kardiodepressive Effekte (Finkel et al. 1992; Court et al. 2002). Durch die NO-vermittelte Stimulation der Guanylatzyklase kommt es zur vermehrten Generierung von Guanosinmonophosphat, welches cAMP-spezifische Phosphodiesterasen aktiviert, somit die cAMP-Konzentration in Kardiomyozyten verringert und hierdurch letztendlich die durch cAMP regulierte Kontraktilität der Kardiomyozyten herabsetzt (Weißelberg 2001). Darüber hinaus trägt die zytokinvermittelte übermäßige Generierung reaktiver Sauerstoffspezies, insbesondere von Superoxidanionen und Peroxynitrit (Reaktionsprodukt aus Stickstoffmonoxid und Superoxidanionen) in vielfältiger Weise z. B. durch Induktion inflammatorischer Mediatoren, Beeinflussung zellphysiologischer Prozesse durch Änderung der katalytischen Aktivität von Enzymen bzw. Enzyminhibierung, Verursachung oxidativer Schäden an biologischen Makromolekülen sowie durch Generierung zytotoxischer Produkte zu Zellschäden und Dysfunktionen im Myokard bei (Conrad 2004).

1.2 Kardiale Signaltransduktion

1.2.1 G-Proteine

Guaninnukleotid-bindende Proteine (G-Proteine) leiten extrazelluläre Signale durch Interaktion mit 7 α -Helix-Transmembranrezeptoren, sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR), an „downstream“ gelegene Effektormoleküle weiter. Signaltransduktion über G-Proteine ist in der Natur nicht nur bei *Eukaryonten* im Tier- und Pflanzenreich, bei Pilzen, sondern auch bei *Protozoen* wie z. B. Amöben sehr weit verbreitet. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind nicht nur Zielstrukturen für Hormone wie Adrenalin oder Glucagon und Neurotransmitter wie Serotonin und Acetylcholin, sondern auch an der Weiterleitung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen beteiligt (Ivey et al. 1996; Birnbaumer et al. 1990; Dohlmann et al. 1991; Ji et al. 1998). Beim Menschen sind derzeit über 800 verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren bekannt (Fredriksson et al. 2003).

Im Herzen sind G-Proteine an der Regulation der Inotropie (Kontraktionskraft), Chronotropie (Herzfrequenz) und des Zellwachstums beteiligt. Diese zentrale Rolle macht sie zu Kandidaten, die in der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine Rolle spielen könnten (Übersicht bei Zolk et al. 2000).

Die Superfamilie der G-Proteine läßt sich aufgrund von Sequenzhomologie, Molekulargewicht und Struktur der Untereinheiten in drei Gruppen unterteilen (Zolk et al. 2000):

1. heterotrimere G-Proteine
2. monomere G-Proteine wie Ras, Rho, Rab, Ran und Arf mit einem Molekulargewicht von ca. 20 kDa und
3. die Translationsfaktoren wie eIF2, EF-Tu und EF-G.

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten, einer α -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 39 – 46 kDa, einer β -Untereinheit (36 kDa) und einer γ -Untereinheit (8 kDa) (Krauss 2003). Die α -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Guanosintriphosphat (GTP)/Guanosindiphosphat (GDP) und weist intrinsische GTPase-Aktivität auf. $G\alpha$ kann in einem inaktiven Zustand als $G\alpha$ -GDP oder in einem aktiven Zustand als $G\alpha$ -GTP, nach Interaktion mit einem aktivierten Liganden-Rezeptor-Komplex, vorliegen. Die β - und γ -Untereinheit liegen als fest assoziierter Komplex vor (Krauss 2003). Sowohl die α -Untereinheit als auch der β,γ -Komplex sind an der Signaltransduktion beteiligt (Neer 1995; Ivey et al. 1996; Krauss 2003). Alle drei Untereinheiten zeichnen sich durch große Diversität aus. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurden beim Menschen 20 verschiedene Gene für die α -Untereinheit, 5 für die β -Untereinheit und 12 für die γ -Untereinheit detektiert (Krauss 2003; Jones et al. 2004). Aufgrund von Aminosäuresequenzhomologien und Funktionshomologie werden $G\alpha$ -Proteine in vier Familien unterteilt (Downes et al. 1999; Simon et al. 1991):

1. die Cholera Toxin-sensitive $G\alpha_s$ -Familie
2. die Pertussis Toxin-sensitive $G\alpha_i/G\alpha_o$ -Familie
3. die Cholera Toxin- und Pertussis Toxin-insensitive $G\alpha_{q/11}$ -Familie und
4. die Toxin-insensitive $G_{12/13}$ -Familie.

Die beiden bakteriellen Toxine Cholera und Pertussis Toxin sind von großer experimenteller Bedeutung für die Charakterisierung der an der jeweiligen Signaltransduktionskaskade beteiligten G-Proteine (Krauss 2003). Beide Toxine katalysieren die ADP-Ribosylierung an Proteinen. Die durch Cholera Toxin katalysierte ADP-Ribosylierung von Arginin in α -Untereinheiten von G_s -Proteinen führt zur Inhibition der intrinsischen GTPase-Aktivität von $G\alpha_s$ und dadurch zur permanenten Aktivierung des über $G\alpha_s$ -vermittelten Signaltransduktionsweges. Pertussis Toxin hingegen verhindert durch Katalisierung der ADP-Ribosylierung von Cystein in der Nähe des C-terminalen Endes der $G\alpha_i$ -Untereinheit die Interaktion des Rezeptors mit der $G\alpha_i$ -Untereinheit und blockiert hierdurch die Signaltransduktion (Krauss 2003).

Die wichtigsten im Herzen exprimierte G-Proteine sind $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/0}$ und $G\alpha_q$. Ihre Funktion am Herzen wird im Anschluß an die Beschreibung des Mechanismus der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine (1.2.2) unter G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion im Herzen (1.2.3) näher beschrieben.

1.2.2 Mechanismus der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine

Bindung eines Agonisten (Ag) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) führt zu dessen Konformationsänderung und zur Interaktion des Liganden-Rezeptor-Komplexes mit einem heterotrimeren G-Protein. Diese Interaktion löst den Austausch von GDP gegen GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit aus, wobei der G-Protein-gekoppelte Rezeptor als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) wirkt (Krauss 2003; Ferguson 2001; Neer 1995; Surya et al. 1998). Die $G\alpha$ -Untereinheit und der $G\beta,\gamma$ -Komplex dissoziieren vom Rezeptor und leiten die extrazellulären Signale an „downstream“ gelegene Effektormoleküle, wie z. B. Adenylatzyklasen, Phospholipasen und zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängige Phosphodiesterasen, weiter oder regulieren direkt die Aktivität von Ionenkanälen (Schneider et al. 1997; Jan et al. 1997; Ivey et al. 1996; Neer 1995; Hamm 1997; Gautam et al. 1998). Aktivierung der Effektormoleküle führt zur Freisetzung von sogenannten „second messengern“, wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Diacylglycerol (DAG), Inositoltrisphosphat (IP_3) und Ca^{2+} , die weitere spezifische Reaktionen auslösen (Krauss 2003).

Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird GTP zu GDP hydrolysiert. Dies führt zur Reassoziation der G-Protein-Untereinheiten α , β und γ und somit zur Terminierung der Signaltransduktion. Eine Erhöhung der GTP-Hydrolysegeschwindigkeit durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs), zu denen auch die unter 1.3.2 näher beschriebenen RGS-Proteine (regulators of G-protein signalling) gehören, verkürzt die Aktivierungsdauer und Signalweiterleitung von G-Proteinen und spielt bei der Regulation der Dauer und Stärke der Signalübertragung eine wichtige Rolle (Krauss 2003). Abbildung 1 skizziert den Reaktionsablauf nach Bindung eines Agonisten (Ag) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR).

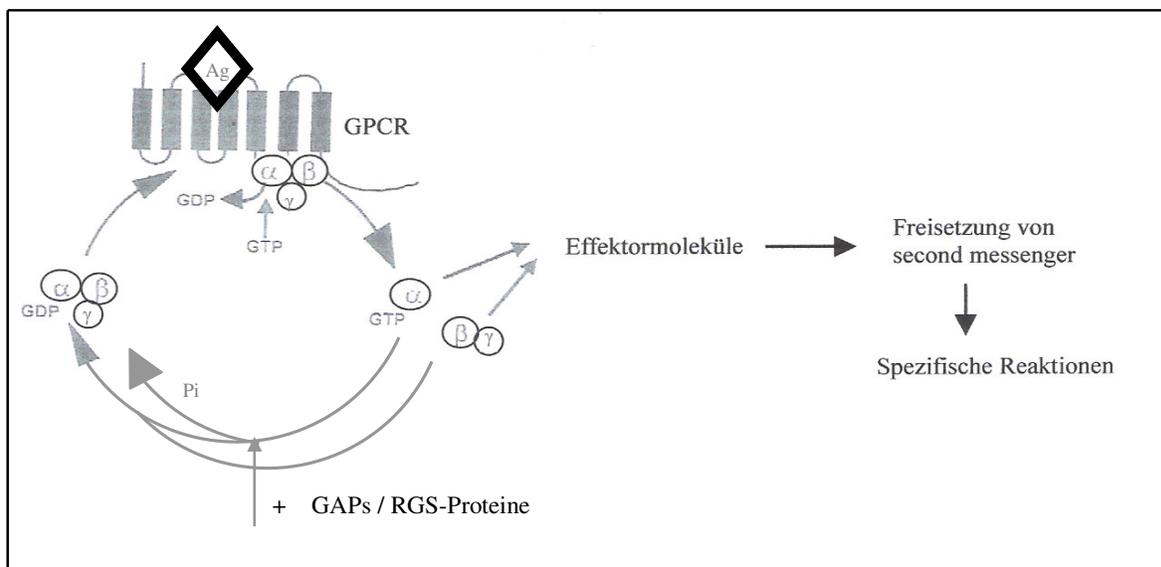


Abbildung 1: Reaktionsablauf nach Bindung eines Agonisten an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor

Die durch die Bindung eines Agonisten (Ag) an einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GPCR) bedingte Konformationsänderung des Rezeptors führt zur Interaktion des Liganden-Rezeptor-Komplexes mit einem heterotrimeren G-Protein ($\alpha\beta\gamma$). Dabei kommt es zum Austausch von Guanosindiphosphat (GDP) gegen Guanosintriphosphat (GTP) an der $G\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins. Dies führt zur Dissoziation der $G\alpha$ -Untereinheit sowie des β,γ -Komplexes vom Rezeptor und zur Signalweiterleitung an „downstream“ gelegene Effektormoleküle. Aktivierung der Effektormoleküle führt zur Freisetzung von sogenannten „second messengern“, die weitere spezifische Reaktionen auslösen. Durch die intrinsische GTPase-Aktivität der $G\alpha$ -Untereinheit wird GTP unter Freisetzung von anorganischem Phosphat (P_i) zu GDP hydrolysiert, dadurch kommt es zur Reassoziation der $G\alpha$ -Untereinheit mit dem β,γ -Komplex und somit zur Reformierung des inaktiven heterotrimeren G-Proteins. Die GTP-Hydrolysegeschwindigkeit wird gesteigert durch GTPase aktivierende Proteine (GAPs), zu denen auch die unter 1.3.2 näher beschriebenen RGS-Proteine (regulators of G-protein signalling) gehören (modifiziert nach Wieland und Chen 1999).

1.2.3 G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion im Herzen

Im Herzen spielen zwei G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionswege eine wichtige Rolle:

1. die β -adrenerge Signaltransduktionskaskade, welche über $G\alpha_s$ einen stimulatorischen oder über $G\alpha_i$ einen inhibitorischen Einfluß auf das Effektormolekül Adenylatzyklase ausübt
2. die $G_{q/11}$ -gekoppelte Signaltransduktionskaskade

Die β -adrenerge Signaltransduktionskaskade stellt die Verbindung zwischen dem sympathischen Nervensystem und der Myokardfunktion dar. Über diesen Signaltransduktionsweg wird sowohl die Inotropie (Kontraktionskraft) als auch die Chronotropie (Herzfrequenz) reguliert (Lohse et al. 2003; Castellano et al. 1997). Die verschiedenen β -Adrenorezeptor-Subtypen, im humanen Myokard β_1 - und β_2 -Adrenorezeptoren, regulieren die Aktivität der im Herzen nachgewiesenen Adenylatzyklasen des Subtyps V und VI (Tang und Gilman 1992; Sunahara 1996) entweder stimulatorisch durch Kopplung an $G\alpha_s$ (β_1 - und β_2 -Adrenorezeptor) oder inhibitorisch durch Kopplung an $G\alpha_i$ (β_2 -Adrenorezeptor, nach dessen Proteinkinase A-vermittelter Phosphorylierung) (Lohse et al. 2003; Lefkowitz et al. 2000; Kuschel et al. 1999). Neben den β -Adrenorezeptoren koppeln im Herzen unter anderem H₂-Histamin- und Glucagon-Rezeptoren über $G\alpha_s$ stimulatorisch (Remmers 2000) und M₂-Acetylcholin (ACh)-, A₁-Adenosin- sowie Somatostatin-Rezeptoren über $G\alpha_i$ inhibitorisch an die beiden Adenylatzyklase-Subtypen (Eschenhagen 1993; Remmers 2000). Stimulation der oben genannten Adenylatzyklase-Subtypen katalysiert die Bildung des „second messengers“ cAMP aus Adenosintriphosphat (ATP) durch Abspaltung von Pyrophosphat. Erhöhung der cAMP-Konzentration aktiviert die Proteinkinase A durch Bindung von jeweils zwei cAMP-Molekülen an ihre beiden regulatorischen Untereinheiten. Dies katalysiert die Dissoziation der Proteinkinase A in eine dimere regulatorische Untereinheit und zwei freie katalytischen Untereinheiten (Krauss 2003). Die freien katalytischen Untereinheiten können weitere Funktionsproteine, welche für die kardiale Funktion und Kontraktilität der einzelnen Myozyten essentiell sind, phosphorylieren. So wird in der Literatur:

- eine Phosphorylierung des sarkolemmalen L-Typ Ca^{2+} -Kanals und dadurch Erhöhung des Ca^{2+} Influx in die Zelle (Zhao et al. 1994; Gerhardstein et al. 1999)

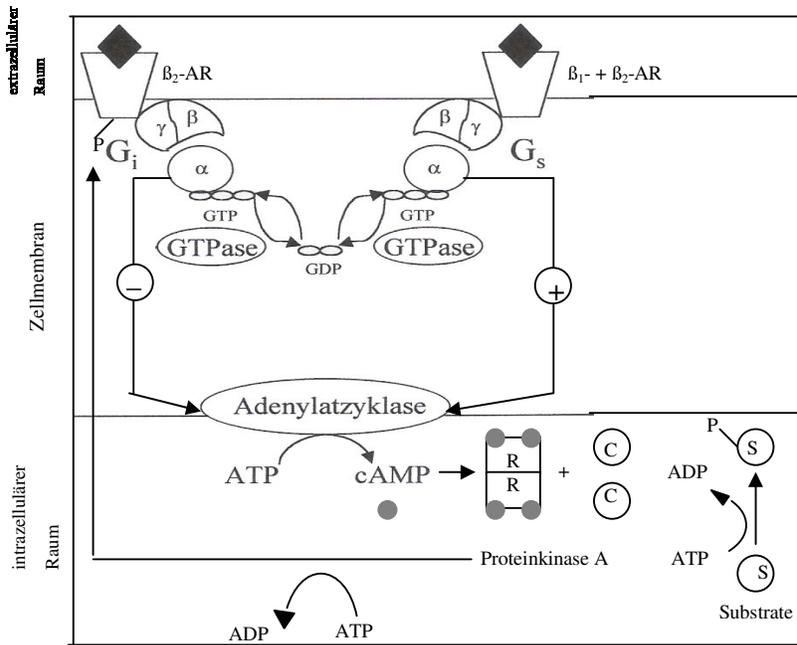
- Phosphorylierung von Phospholamban mit damit verbundener Erhöhung der Ca^{2+} Wiederaufnahme ins sarkoplasmatische Retikulum durch die sarkoplasmatische ATPase (SERCA) und Phospholamban (Simmernan et al. 1998)
- Phosphorylierung von Troponin I (Sulakhe et al. 1995) und des Myosin-Bindungsproteins C (MyBP-C) (Kunst et al. 2000), hierdurch wird die Sensivität der Myofilamente gegenüber Ca^{2+} moduliert.
- Phosphorylierung von Ryanodin-Rezeptoren, welche für den Ca^{2+} -induzierten Ca^{2+} -Influx in Zelle verantwortlich sind (weitere Erhöhung des Ca^{2+} -Influx nach vermehrtem Einstrom von Ca^{2+} durch L-Typ Ca^{2+} -Kanäle) (Marx et al. 2000; Krauss 2003)

beschrieben. Funktionell resultiert hieraus ein positiv inotroper Effekt, der im Wesentlichen auf einem gesteigerten und beschleunigten Ca^{2+} -Umsatz zurückzuführen ist. Abbildung 2 A zeigt schematisch die β -adrenerge Signaltransduktionskaskade.

Induktion der $G_{q/11}$ -Signaltransduktionskaskade spielt sowohl bei der Regulation der Inotropie (Kontraktionskraft des Herzens) und Chronotropie (Herzfrequenz) (Scholz 1989; Scholz et al. 1988) als auch bei der α_1 -Adrenorezeptor sowie durch andere $G_{q/11}$ -gekoppelte Agonisten, wie Endothelin-1 oder Angiotensin II, vermittelten Induktion der kardialen Hypertrophie eine Rolle (Maruyama et al. 2002; Sugden et al. 1998). Aktivierung des $G_{q/11}$ -Signaltransduktionsweges führt zur Stimulation des Effektormoleküls Phospholipase C- β . Diese spaltet das Substrat Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2) und setzt dadurch die beiden „second messenger“ Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) frei (Scholz J. 1989; Wu et al. 1992; Krauss 2003). Das membranständige DAG aktiviert die membranständige Proteinkinase C, deren Substrate unter anderem an der Kontrolle der Zellproliferation beteiligt sind. So induziert Proteinkinase C durch Stimulation monomerer G-Proteine, wie Ras oder Rac (Stimulation über Ras oder zelluläre Streßfaktoren), und daraus resultierender Aktivierung von Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK-Mitglieder), wie extrazellulär Signal regulierten Kinasen (ERKs), c-Jun NH_2 terminalen Kinasen (JNKs) oder p38 Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (p38-MAPKs), neben anderen physiologischen Wirkungen, wie z. B. Zellprotektion oder allgemeine Regulation der Transkription, kardiale Hypertrophie (Maruyama et al. 2002; Sugden et al. 1998).

Bindung von IP_3 an den Inositoltrisphosphat-Rezeptor ($InsP_3$ -Rezeptor) induziert die Freisetzung von Ca^{2+} aus cytoplasmatischen Speichern, wie dem sarkoplasmatischen Retikulum, und den Ca^{2+} -Einwärtsstrom, womit unter anderem die Kontraktion der Muskelzelle eingeleitet wird (Scholz et al. 1988). Ca^{2+} ist, als ein zentrales Signalmolekül, jedoch nicht nur am Prozeß der Muskelkontraktion, sondern auch am Sehprozeß, Zellproliferation, Sekretion, Zellmotilität, Formation des Zytoskeletts, Genexpression und Reaktionen des intermediären Stoffwechsels beteiligt (Krauss 2003). Abbildung 2 B zeigt schematisch die $G_{q/11}$ -vermittelte Signaltransduktionskaskade.

2 A



2 B

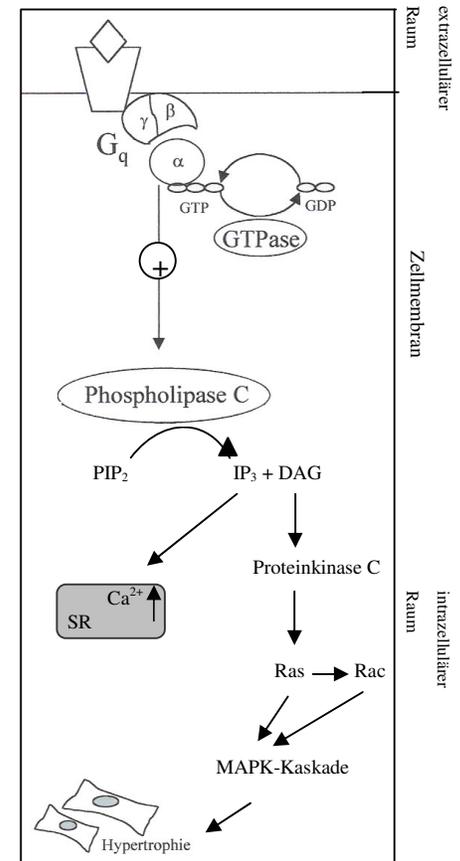


Abbildung 2: Kardiale Signaltransduktionskaskaden

Abbildung 2 A zeigt die β -adrenerge Signaltransduktionskaskade. Die β_1 - bzw. β_2 -Adrenorezeptor- (β_1 - und β_2 -AR) induzierte Aktivierung von $G\alpha_s$ oder die β_2 -Adrenorezeptor- (β_2 -AR) induzierte Aktivierung von $G\alpha_i$ (nach Proteinkinase A-vermittelter Phosphorylierung von β_2 -AR) führt zur Stimulation bzw. Inhibition der Adenylatzyklase (Lohse et al. 2003; Lefkowitz et al. 2000). Die Adenylatzyklase katalysiert die Bildung von zyklischem Adenosinmonophosphat (cAMP) aus Adenosintriphosphat (ATP). Erhöhte cAMP-Konzentrationen aktivieren die Proteinkinase A durch Bindung von jeweils zwei Molekülen cAMP an ihre beiden regulatorischen Untereinheiten (R). Dies katalysiert die Dissoziation der Proteinkinase A in eine dimere regulatorische Untereinheit (R) und zwei freie katalytische Untereinheiten (C), die weitere Substrate (S), welche unter anderem für die kardiale Funktion essentiell sind, phosphorylieren können (Krauss 2003). Abbildung 2 B zeigt schematisch die $G_{q/11}$ -vermittelte Signaltransduktionskaskade. Rezeptorinduzierte Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges führt durch Stimulation des Effektormoleküls Phospholipase C- β zur Spaltung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2) und somit zur Freisetzung der beiden „second messenger“ Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Scholz J. 1989; Wu et al. 1992; Krauss 2003). Das membranständige DAG aktiviert die membranständige Proteinkinase C. Diese stimuliert monomere G-Proteine, wie Ras oder Rac (indirekt über Ras), welche verschiedene Mitglieder einer zellinternen Phosphorylierungskaskade, die sogenannten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK-Mitglieder), aktivieren und als Folge hiervon, neben anderen physiologischen Wirkungen, kardiale Hypertrophie induzieren (Sudgen et al. 1998). Bindung von IP_3 an seinen spezifischen Rezeptor, Inositoltrisphosphat-Rezeptor ($InsP_3$ -Rezeptor), induziert die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR) und den Ca^{2+} -Einwärtsstrom, womit unter anderem die Kontraktion der Muskelzelle eingeleitet wird (Scholz et al. 1988).

1.3 Regulation der Signaltransduktion

Ein wichtiger Aspekt der Signaltransduktion ist ihre Regulierbarkeit. Im Rahmen dieser Arbeit wird allein die Regulation der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion näher erörtert. Desensitivierung dieser Signaltransduktionskaskade, d. h. Verringerung der Ansprechbarkeit auf einen Agonisten, stellt einen wichtigen Mechanismus zur Protektion gegen akute oder chronische rezeptorvermittelte Überstimulation, zum Filter, Integrieren und Koordinieren von Signalen über viele verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) sowie letztendlich zur Determinierung der Dauer und Stärke der Signaltransduktion dar (Ferguson 2001).

1.3.1 Regulation der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion

G-Protein-vermittelte Signaltransduktionsprozesse lassen sich auf jeder Stufe ihres Verlaufes regulieren. Auf der Stufe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) sind die Prozesse der „Down-Regulation“ von Rezeptoren (Hadcock and Malbon 1988, Valiquette et al.1990, Pak et al. 1999) und der Entkopplung von Rezeptoren von heterotrimeren G-Proteinen in Folge von Rezeptor-Phosphorylierungsprozessen zu nennen (Krauss 2003; Bouvier et al. 1988; Hausdorff et al. 1989; Lohse et al. 1990). Die Rezeptoren werden entweder durch „second messenger“ abhängige Proteinkinasen, wie durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A oder durch die Proteinkinase C, über einen negativen „Feedback-Mechanismus“, oder durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) (Krauss 2003; Lefkowitz 1993; Ferguson et al. 1996; Ferguson und Caron 1998; Krupnick und Benovic 1998) phosphoryliert. Desensitivierung dieser Signaltransduktionskaskade durch „Down-Regulation“ von β_1 -Rezeptoren und durch Entkopplung von β -Rezeptoren in Folge von Rezeptor-Phosphorylierungsprozessen durch Proteinkinase A sowie durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen spielt unter anderem im Rahmen der Pathogenese der Herzinsuffizienz eine wichtige Rolle (Lohse et al. 2003; Castellano et al. 1997). Durch die Proteinkinase A-vermittelte Phosphorylierung des β_2 -adrenergen Rezeptors im Herzen ändert sich das Kopplungsverhalten des Rezeptors von $G\alpha_s$ zu $G\alpha_i$, hierdurch wird ein inhibitorischer Einfluß auf die Adenylatzyklase ausgeübt (Lohse et al. 2003; Daaka et al. 1997). Rezeptor-Phosphorylierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) fördert die Bindung von cytosolischen Proteinen, den sogenannten Arrestinen. Diese verhindern durch sterische Effekte eine Kopplung des Rezeptors an das jeweilige G-Protein (Benovic et al. 1983; Ferguson 2001).

In der Literatur werden der Bindung von Arrestinen darüber hinaus weitere Funktionen zugeschrieben. So führt die Bindung von Arrestinen an einen Rezeptor zur Endozytose des Rezeptors in membrangebundener Form als „Clathrin-coated vesicle“ sowie zur Dephosphorylierung, Regenerierung und Rücktransport des Rezeptors zur Zellmembran (Krauss 2003; Ferguson 2001). Des Weiteren stellen Arrestine ein Bindeglied zu G-Protein-unabhängigen Signaltransduktionskaskaden wie der MAPK-Kaskade dar. Innerhalb dieser Signaltransduktionskaskade dienen sie als Gerüstproteine für die verschiedenen MAP-Kinasen (Mc Donald and Lefkowitz 2001; Ferguson 2001). G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) liefern somit ein Beispiel für die komplexen Regulationsmechanismen und Interaktion von verschiedenen Signaltransduktionskaskaden. Die oben genannten Desensitivierungsprozesse verlaufen innerhalb eines unterschiedlichen Zeitrahmens von Sekunden (Phosphorylierungsprozesse) über Minuten (Endozytose) bis hin zu Stunden (Down-Regulation von Rezeptoren) und ermöglichen eine kurz- oder längerfristige Regulation der Rezeptoraktivität (Ferguson 2001; Krauss 2003).

Die Aktivität von heterotrimeren G-Proteinen ist davon abhängig, ob sie in einem aktiven $G\alpha$ -GTP gebundenen Zustand mit einer freien β,γ -dimeren Untereinheit oder in einem inaktiven $G\alpha$ -GDP gebundenen Zustand als Heterotrimer vorliegen. Ihre Aktivität wird, neben der Regulation durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs), welche als GEFs, Guaninnukleotid-Austauschfaktoren, wirken, reguliert durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs). Diese erhöhen die intrinsische GTPase-Aktivität der α -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine (Krauss 2003; Wieland und Chen 1999). Zwei Klassen von Proteinen wirken als GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) (Wieland und Chen 1999; Krauss 2003; Scholich et al. 1999):

1. spezifische GTPase-aktivierende Proteine, bezeichnet als RGS-Proteine (regulators of G protein signalling, siehe 1.3.2)
2. Effektorenzyme wie
 - Phospholipase C- β 1. Sie stimuliert die intrinsische GTPase Aktivität von $G\alpha_q$.
 - bestimmte Isoformen der Adenylatzyklase. Sie können GTPase Aktivität gegenüber der monomeren $G\alpha_s$ -Untereinheit aufweisen.
 - die γ -Untereinheit der cGMP-abhängigen Phosphodiesterase.

Die Signalweiterleitung durch die β,γ -Untereinheit kann durch Abfangen dieser dimeren Untereinheit durch Proteine wie Phosducin (Bauer et al. 1992; Gaudet et al. 1996) oder Calmodulin (Asano et al 1986; Liu et al. 1997) abgeschwächt werden.

Die Aktivität von Effektormolekülen, wie Adenylatzyklasen und Phospholipasen, wird einerseits reguliert durch α -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine ($G\alpha_s$, $G\alpha_i$ im Falle der Adenylatzyklasen, $G\alpha_q$ im Falle der Phospholipase C- β) als zentralem Regulator, andererseits aber auch durch eine weite Bandbreite weiterer Faktoren, welche einen stimulatorischen oder inhibitorischen Einfluß auf das jeweilige Effektormolekül haben. Dies beinhaltet sowohl die Regulation durch „downstream“ gelegene Effektoren sowie durch „second messenger“ als auch andere Faktoren. So unterliegen beispielsweise mehrere Subtypen der Adenylatzyklase dem stimulatorischen Einfluß des Diterpens Forskolin (alle Subtypen außer Adenylatzyklase IX), andere wiederum dem stimulatorischen oder inhibitorischen Einfluß von Ca^{2+} /Calmodulin, Proteinkinase C, β,γ -Untereinheiten von G-Proteinen, Ca^{2+} , wobei kein Adenylatzyklase-Subtyp einem identischen Regulationsmechanismus folgt (Krauss 2003).

Die Konzentration an „second messengern“, wie cAMP, cGMP, IP_3 , DAG oder Ca^{2+} , wird reguliert durch „upstream“ gelegene Effektormoleküle, aber auch durch andere Prozesse wie z. B. Hydrolyse durch Phosphodiesterasen im Falle von cAMP, cGMP (Krauss 2003).

1.3.2 RGS-Proteine

Seit ihrer Entdeckung als negative Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion (RGS-Proteine, regulators of G protein signalling), welche die intrinsische GTPase-Aktivität (GAP-Aktivität, Hydrolyse von GTP zu GDP) der $G\alpha$ -Untereinheit heterotrimerer G-Proteine bis zu hundertfach erhöhen können (siehe Abbildung 1) und somit die Dauer der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion drastisch verringern, mehrten sich die Hinweise, daß RGS-Proteine neben ihrer GAP-Aktivität weitere wichtige Funktionen aufweisen können. Dies beinhaltet unter anderem die Inhibition der Guaninnukleotid-Dissoziation (GDI-Aktivität, guanine nucleotide dissociation inhibitor) durch GoLoco Motif enthaltene RGS-Proteine oder die Guaninnukleotid-Austauschfunktion der RGS-RhoGEFs (GEF, guanine nucleotide exchange factor), die nach Bindung an spezifische aktivierte $G\alpha$ -Untereinheiten, $G\alpha_q$ -GTP, $G\alpha_{12}$ -GTP, $G\alpha_{13}$ -GTP, Effektorfunktion haben und den Austausch von GDP gegen GTP an RhoA katalysieren und somit RhoA aktivieren (Siderovski und Willard 2005).

RGS-Proteine sind in einem weiten Spezies-Spektrum, welches über Hefe, Pilze, Pflanzen, Nematoden bis hin zu Säugetiervertretern einschließlich des Menschen reicht, vertreten (Dohlman und Thorner 1997; Wieland und Chen 1999; Siderovski und Willard 2005). Bis heute sind mehr als 30 RGS-Proteine, davon 20 im humanen Myokard, detektiert worden (Riddle et al. 2005; Siderovski und Willard 2005).

Charakteristisch für alle RGS-Proteine ist eine konservierte aus 120 Aminosäuren bestehende RGS-Domäne, die sowohl für die Bindung an $G\alpha$ -Untereinheiten als auch für die GTPase-Aktivität verantwortlich ist (Popov et al. 1997; Riddle et al. 2005). Die RGS-Domäne besteht aus neun α -helikalen Bereichen, über welche sie mit $G\alpha$ -GTP interagiert. Die hohe Affinität gegenüber dem Transitionsphase-Analogon $[G\alpha GDP-AlF_4]^-$ deutet darauf hin, daß RGS-Proteine ihre GAP-Aktivität über eine Stabilisierung der Transitionsphase der GTP-Hydrolyse ausüben. In dem oben erwähnten Komplex imitiert das $[AlF_4]^-$ -Ion das in einer S_N2 -Reaktion abzuspaltende γ -Phosphat. Mit Hilfe des Aluminium-Ions wird die Abgangsgruppe $OR^- = GDP$ stabilisiert (Wieland und Chen 1999; Krauss 2003).

Die meisten RGS-Proteine weisen GAP-Aktivität gegenüber $G\alpha_i$ - und $G\alpha_{q/11}$ -Familienmitgliedern auf (Riddle et al. 2005). Darüber hinaus wurden jedoch auch RGS-Proteine, die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren sogenannte RhoGEFs, welche GTPase-Aktivität gegenüber $G\alpha_{12/13}$ -Untereinheiten aufweisen, identifiziert (Hart et al. 1998; Siderovski und Willard 2005; Riddle et al. 2005). Bisher konnte lediglich ein einziges RGS-Protein, RGS-PX1, das GAP-Aktivität gegenüber $G\alpha_s$ aufweist, detektiert werden (Riddle et al. 2005; Zheng et al. 2001). Trotz ihrer geringen Spezifität gegenüber einer bestimmten $G\alpha$ -Untereinheit *in vitro*, mehren sich die Hinweise, daß RGS-Proteine *in vivo* höhere Selektivität gegenüber einem spezifischen G-Protein-vermittelten Signaltransduktionsweg aufweisen. Gründe hierfür beinhalten gewebe- und zelltypspezifische Expression von RGS-Proteine, unterschiedliche Expressionslevel während verschiedener Entwicklungsstadien sowie Veränderungen in der subzellulären Lokalisation, Proteinstabilität und GAP-Aktivität durch post-translationale Modifikationen wie z. B. Phosphorylierung oder Palmitoylierung (Riddle et al. 2005).

Im kardiovaskulären System sind RGS-Proteine unter anderem an der Regulation des Vasotonus, der Kontraktilität von Kardiomyozyten und von G-Protein-regulierten K^+ -Kanälen im Herzen sowie an der Regulation des Zellwachstums von Kardiomyozyten beteiligt (Riddle et al. 2005; Michalek 2003). Insbesondere RGS2 und RGS4 werden hierbei wichtige Funktionen zugeschrieben (Riddle et al. 2005). RGS2 inhibiert aufgrund seiner GAP-Aktivität gegenüber $G\alpha_q$ die G_q -vermittelte Vasokonstriktion von G_q -Agonisten wie Angiotensin II, Endothelin-1 und Norepinephrin (Heximer et al. 2003; Riddle et al. 2005). Die NO-vermittelte Vasodilatation ist auf verschiedene Mechanismen unter anderem auf die cGMP-abhängige, Proteinkinase I- α -vermittelte Aktivierung von RGS2 zurückzuführen (Tang et al. 2003; Riddle et al. 2005). RGS4 deaktiviert G-Protein-regulierte K^+ -Kanäle im Herzen. Aktivierung dieser Kanäle über vagal freigesetztes Acetylcholin führt durch Öffnung der Kanäle zum Kalium-Efflux und dadurch zur Hyperpolarisation der Schrittmacherzellen im Sinus- und Atrioventrikularknoten. Hieraus resultiert die vagal vermittelte negative Chronotropie (Riddle et al. 2005; Timmer-Stranghöner 2004). Des Weiteren inhibiert RGS4 die G_q -vermittelte Hypertrophie von Herzmuskelzellen (Riddle et al. 2005; Rogers et al. 1999) und den Endothelin-1-induzierten, G_q -vermittelten positiv inotropen Effekt auf Kardiomyozyten (Michalek 2003). In der Pathogenese verschiedener Herzerkrankungen, wie Herzinsuffizienz und Hypertonie, spielen vom physiologischen Niveau abweichende Expressionslevel von RGS-Proteinen eine wichtige Rolle. Im Rahmen einer chronischen oder akut entzündlichen Herzinsuffizienz wird insbesondere dem erhöhten Expressionsniveau der RGS-Proteine RGS4 und RGS16 pathophysiologische Relevanz zugeschrieben (Mittmann et al. 2002; Patten et al. 2002; Patten et al. 2003). RGS2-Defizienz scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Hypertonie zu spielen (Heximer et al. 2003).

Aufgrund von Ähnlichkeiten in der Struktur und Funktion lassen sich RGS-Proteine in mehrere Subfamilien unterteilen (Übersicht bei Siderovski und Willard 2005; Riddle et al. 2005). Allen Familien ist grundsätzlich die für RGS-Proteine charakteristische RGS-Domäne gemeinsam. Ihr Aufbau aus unterschiedlichen Protein-Interaktionsdomänen eröffnet RGS-Proteinen eine Vielzahl von Funktionen, die weit über ihre GTPase-aktivierende Funktion hinausgehen, und macht sie somit zu multifunktionalen Proteinen

1. RZ-Subfamilie

Zu dieser Subfamilie gehören die RGS-Proteine RGS19, RGS20 und RGS17. Sie weist, neben einer N-terminal gelegenen Poly-Cystein-Region, als einziges Strukturmerkmal die RGS-Domäne auf.

2. R4-Subfamilie

Mitglieder dieser Familie, RGS13, RGS21, RGS1, RGS2, RGS5, RGS3, RGS4, RGS8, RGS16 und RGS18, besitzen lediglich die RGS-Domäne. Zu dieser Gruppe gehört auch das mit einer Länge von 152 Aminosäuren kürzeste RGS-Protein, RGS21.

3. R7-Subfamilie

Diese RGS-Protein-Subfamilie beinhaltet RGS6, RGS7, RGS11 und RGS9. Als charakteristische Protein-Interaktionsdomänen sind die GGL-Domäne (G-protein γ -like domain) und eine N-terminal gelegene DEP-Domäne (Dishevelled/EGL-10/Pleckstrin homology domain) zu nennen (Siderovski und Willard 2005). Die GGL-Domäne besteht aus 64 Aminosäuren und weist große Ähnlichkeit zur G-Protein γ -Untereinheit auf. Sie kann Dimere mit bestimmten G-Protein-Untereinheiten z. B. mit $G\beta_5$ in neuronalen Zellen, jedoch nicht mit $G\beta_1$ oder $G\beta_3$ bilden (Snow et al. 1998 a; Riddle et al. 2005). Über die Funktion der aus 70 Aminosäuren bestehenden DEP-Domäne ist bisher wenig bekannt. Viele an Signaltransduktionsprozessen beteiligte Proteine enthalten jedoch diese Protein-Interaktionsdomäne. So scheint die DEP-Domäne des Retina-spezifischen RGS9-1-Protein essentiell für die Interaktion mit R9AP (RGS9 anchoring protein), einem membran-assoziierten Protein, und somit zur gezielten Positionierung von RGS9-1 an der Membran zu sein (Martemyanov et al. 2003).

4. R12-Subfamilie

Zu dieser Familie zählt als kleinstes Mitglied RGS10 (Hunt et al. 1996). Die ebenfalls dieser Gruppe zugehörigen RGS-Proteine, RGS12 und RGS14, weisen als Protein-Interaktionsdomänen Tandem Ras-Bindedomänen (RBDs) und eine C-terminal gelegene GoLoco-Motif Interaktionsdomäne auf (Siderovski et al. 1999). RGS12 beinhaltet zusätzlich eine N-terminale PDZ (PSD95/Dlg/ZO-1 homology) und eine PTB (phosphotyrosine-binding) Domäne (Schiff et al. 2000).

Das GoLoco-Motif ist eine aus 19 Aminosäuren bestehende, hochkonservierte Domäne, die an $G\alpha_i$ -Untereinheiten bindet. GoLoco-Motif enthaltende Proteine agieren als Inhibitoren der Guaninnukleotid-Dissoziation (GDI-Aktivität) durch Bindung und Stabilisierung von $G\alpha_i$ -GDP und Verringerung der Austauschrate von GDP gegen GTP (Riddle et al. 2005; De Vries et al. 2000). Des Weiteren inhibiert die Bindung von GoLoco-Motif enthaltenden RGS-Proteinen an $G\alpha_i$ -GDP die Assoziation der $G\alpha$ -Untereinheit mit β,γ -Dimeren (Siderovski und Willard 2005). PDZ-Domänen bestehen aus ca. 90 Aminosäuren und sind involviert an der Bildung von Clustern großer Protein-Komplexe, die an der Signaltransduktion beteiligt sind (Zhang et al. 2003). PDZ-Domänen können an Rezeptoren binden, die sich vom C-terminalen Ende der 7-Transmembranrezeptoren, G-Proteingekoppelte Rezeptoren (GPCR), ableiten lassen (Siderovski und Willard 2005). So bindet beispielsweise RGS12 mit Hilfe seiner PDZ-Domäne selektiv an den Interleukin-8-Rezeptor B (CXCR2), einem Gi-gekoppelten Rezeptor (Snow et al. 1998 b). Mit Hilfe von PTB-Domänen (phosphotyrosine-binding domains) ist eine Erkennung von Phosphotyrosin-Motiven, wie beispielsweise in aktivierten Rezeptoren für Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Antigenen vorhanden, möglich.

5. RA-Subfamilie

Axin und Axin2 (Axil) sind die einzigen Familienmitglieder und negative Regulatoren des Wnt / Wingless Signaltransduktionsweges. Dieser in verschiedenen Organismen einschließlich des Menschen konservierte Signaltransduktionspfad spielt eine wichtige Rolle in Prozessen wie Entwicklung, Proliferation und Differenzierung (Spink et al 2000; Siderovski et al. 2005). Beide oben erwähnten RGS-Proteine zeigen mit Hilfe der RGS-Domäne Interaktionen mit dem Tumorsuppressorprotein Adenomatous Polyposis coli (APC, Bestandteil des Wnt Signaltransduktionsweges), jedoch nicht mit $G\alpha$ -Untereinheiten. Axin und Axin2 besitzen Domänen mit deren Hilfe sie mit weiteren Bestandteilen des Wnt Signaltransduktionsweges, wie β -Catenin, der Kinase GSK3 β , der Phosphatase PP2A und dem Protein Dishevelled (DIX-Domäne), interagieren können (Siderovski und Willard 2005).

6. GEF-Subfamilie

Zu dieser Gruppe gehören die drei RhoA-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren: p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF und leukemia-associated RhoGEF (LARG) (Siderovski und Willard 2005).

Im Gegensatz zu den meisten RGS-Proteine, die durch ihre GTPase-aktivierende Funktion gegenüber $G\alpha$ -GTP-Untereinheiten oder durch Konkurrenz mit Effektormolekülen um die Bindung an $G\alpha$ -GTP als negative Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion bekannt sind (Hepler et al. 1997; Anger et al. 2004), stellen die drei oben erwähnten Rho-GEFs positive Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion dar. Sie fungieren als Effektoren spezifischer $G\alpha$ -Untereinheiten, $G\alpha_q$ -GTP, $G\alpha_{12}$ -GTP und / oder $G\alpha_{13}$ -GTP, indem sie gebunden an die oben erwähnten aktivierten $G\alpha$ -GTP-Untereinheiten den Guaninnukleotid-Austausch, GDP gegen GTP, an der monomeren GTPase RhoA katalysieren. RhoA ist an der Regulation einer Reihe zellulärer Antworten, wie z. B. Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, Stimulation der Zellmigration, Zellteilung und Zellwachstum beteiligt (Siderovski und Willard 2005). Rho-GEFs zeigen jedoch auch GAP-Aktivität gegenüber den oben erwähnten $G\alpha$ -Untereinheiten. Sie vereinen diese Aktivität mit ihrer Funktion als Effektormoleküle. Alle drei Rho-GEFs besitzen eine Dbl-Homologie (DH) und Pleckstrin-Homologie (PH) Domäne, welche den Guaninnukleotid-Austausch an RhoA katalysieren und RhoA in seine aktive GTP-gebundene Form überführen (Snyder et al. 2000; Siderovski und Willard 2005). PDZ-RhoGEF und LARG besitzen zusätzlich eine N-terminale PDZ-Domäne (Siderovski und Willard 2005).

7. GRK-Subfamilie

Die Mitglieder dieser Subfamilie, GRK1, GRK7, GRK4, GRK5, GRK6, GRK3 und GRK2, sind ursprünglich als G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs) bekannt. Neben einer Domäne mit Ser/Thr-Kinase Funktion, welche der Phosphorylierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRs) dient, weisen sie eine N-terminal gelegene RGS-Domäne auf und sind unter diesem Aspekt den RGS-Proteinen zuzuordnen (Siderovski et al. 2005).

8. SNX-Subfamilie

Zu dieser Gruppe zählen die drei Nexine SNX13, SNX14 und SNX25. Alle drei Nexine weisen, neben der RGS-Domäne, als für diese Familie typische Protein-Interaktionsdomänen eine Phosphatidylinositol-Bindedomäne (PX) und eine PX-assoziierte Domäne (PXA) auf. Des Weiteren besitzen sie putative Transmembranregionen (TM) (Siderovski und Willard 2005).

Die beiden multiple RGS-Domänen enthaltenden RGS-Proteine, D-AKAP2 und RGS22, sind keiner der oben genannten RGS-Subfamilien zuzuordnen (Siderovski und Willard 2005).

Abbildung 3 zeigt eine kurze Übersicht der RGS-Protein-Subfamilien. 3 A zeigt ein Dendrogramm der einzelnen Subfamilien und 3 B gibt Aufschluß über den strukturellen Aufbau.

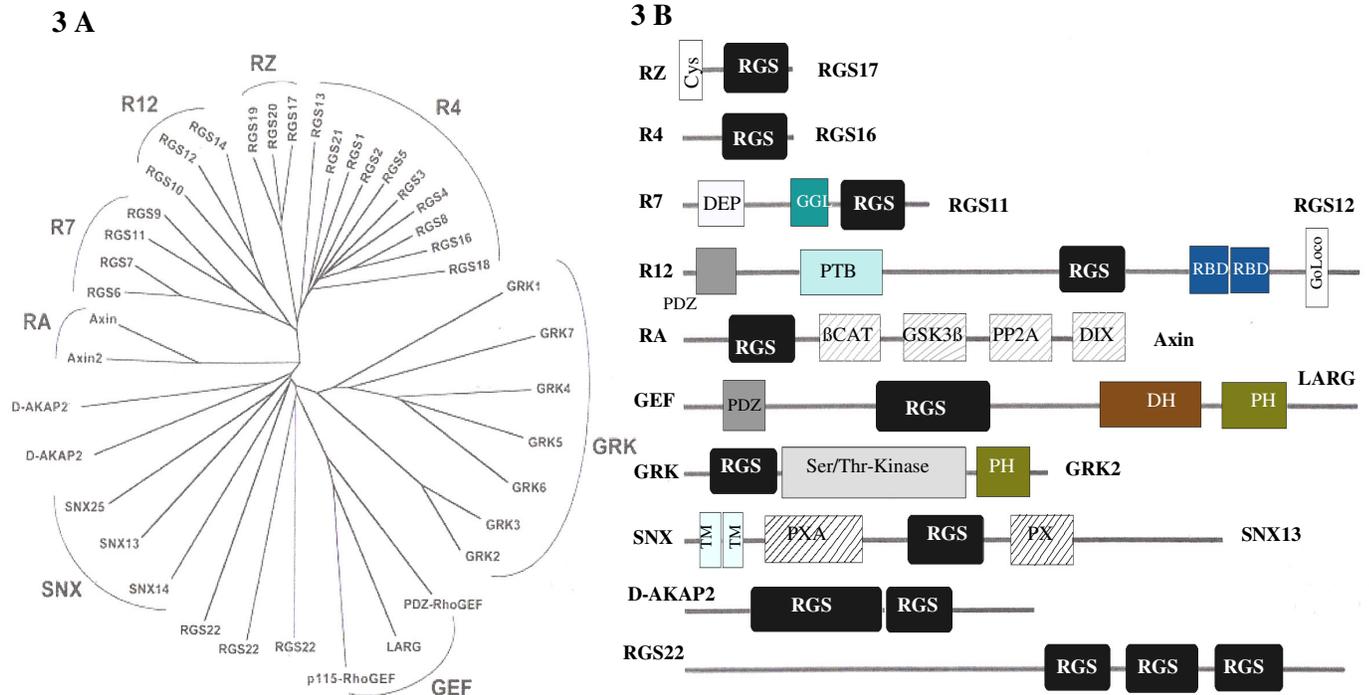


Abbildung 3: RGS-Proteinfamilien

Abbildung 3 A zeigt ein Dendrogramm der verschiedenen RGS-Protein-Subfamilien. Das Dendrogramm wurde anhand von Sequenzdaten, welche durch SMART (Simple Modular Architecture Research Tool, <http://smart.embl-heidelberg.de>) identifiziert wurden, generiert. Mit Hilfe von SMART ist eine Analyse des Aufbaus verschiedener Proteindomänen mit besonderem Hinblick auf Proteindomänen *eukaryontischer* Organismen möglich (Letunic et al. 2002). Abbildung 3 B zeigt anhand eines Vertreters der jeweiligen RGS-Protein-Subfamilie die typischen Protein-Interaktionsdomänen der dargestellten Proteinfamilie. Allen RGS-Proteinfamilien ist grundsätzlich die für RGS-Proteine charakteristische RGS-Domäne gemeinsam. Die RZ- und R4-Subfamilien weisen, abweichend von den anderen RGS-Protein-Subfamilien, mit der RGS-Domäne lediglich eine einzige Protein-Interaktionsdomäne auf. Mitglieder der RZ-Subfamilie besitzen zusätzlich eine N-terminal gelegene Poly-Cystein-Region. Alle weiteren RGS-Protein-Subfamilien weisen entweder mehrere verschiedene Protein-Interaktionsdomänen oder im Falle von D-AKAP2 oder RGS22, die keiner RGS-Protein-Subfamilie zuzuordnen sind, multiple RGS-Domänen auf (nähere Erläuterungen zu den einzelnen RGS-Protein-Subfamilien, siehe oben) (modifiziert nach Siderovski und Willard 2005). Cys: Poly-Cystein-Region; RGS: regulators of G-protein signalling; DEP domain: Dishevelled/EGL-10/Pleckstrin homology domain; GGL domain: G-protein γ -like domain; PDZ: PSD95/Dlg/ZO-1 homology domain; PTB: phosphotyrosine-binding domain; RBD: Ras-binding domain; β Cat, GSK3 β , PP2A und DIX: Bestandteile des Wnt/Wingless Signaltransduktionsweges, β -Catenin, GSK3 β -Kinase, Phosphatase PP2A und Protein Dishevelled; DH domain: Dbl-homology domain; PH domain: Pleckstrin-homology domain; Ser/Thr-Kinase: Serin/Threonin- Kinase; TM: transmembrane region; PX domain: phosphatidylinositol-binding domain; PXA: PX-associated domain.

1.4 Genregulation

Die Kontrolle der Genexpression ist ein wichtiges Thema in der molekularen Genetik. Sie trägt zum Verständnis bei, warum trotz gleicher genetischer Information aller somatischer Zellen innerhalb eines Organismus Zellen verschiedener Gewebe ein unterschiedliches Genexpressionsmuster aufweisen und somit unterschiedliche Aufgaben in einem Organismus übernehmen können. Genregulation ist für die differentielle Genexpression, d. h. Expression von Genen innerhalb eines bestimmten Gewebes, eines bestimmten Entwicklungsstadiums oder physiologischen Zustandes der Zelle aber auch für konstitutiv exprimierte Gene wichtig. Während die Kontrolle der Genexpression bei *Prokaryonten* im Wesentlichen bestimmt wird durch die Regulation der Rate der Transkriptionsinitiation, ist die Genregulation bei *Eukaryonten* weitaus komplexer. Sie beinhaltet nicht nur die Regulation der Transkription, sondern auch alle weiteren Prozesse im Anschluß an die DNA-Transkription wie Transkript-Prozessierung und Modifikation, RNA-Transport, Transkriptstabilität, Translationsinitiation, posttranslationale Proteinmodifikationen, Proteintransport und Proteinstabilität (Knippers, Molekulare Genetik, 1997).

1.4.1 Transkriptionsregulation

Transkriptionsregulation ist ein zentraler Mechanismus der Genregulation. Neben der Zugänglichkeit der DNA für den Transkriptionsapparat, die bestimmt wird durch die Struktur und den Kompaktheitsgrad des Chromatins, einem Komplex aus Proteinen und DNA in Form von Nucleosomen, sind vor allem bestimmte auf den DNA-Molekülen gelegene Sequenzmotive (*cis*-Elemente) und deren Interaktion mit *in trans* wirkenden Faktoren (Transkriptionsfaktoren) von entscheidender Bedeutung für die Transkription. Die Erforschung der Transkriptionsregulation, was die Interaktion von Transkriptionsfaktoren mit *cis*-Elementen und die Interaktion der Transkriptionsfaktoren untereinander betrifft, steht bei *eukaryontischen* Organismen noch am Anfang und ist deshalb Ausgangspunkt intensiver Forschung. *Cis*-Elemente sind nicht willkürlich auf der DNA verteilt, sondern auf einem bestimmten den Genen vorgeschalteten DNA-Abschnitt, dem Promotor, lokalisiert.

1.4.1.1 Promotor, Definition

Als Promotor werden diejenigen Sequenzelemente bezeichnet, die sich in unmittelbarer Nähe (5'-aufwärts für proteinkodierende Gene, die von der RNA-Polymerase II transkribiert werden) des Transkriptionsstartpunktes befinden und deren Reihenfolge und Abstände zueinander relativ fixiert sind. Sequenzelemente, deren Position und Polarität in bezug auf den Transkriptionsstartpunkt nicht festgelegt sind und die ihre Wirkung aus der Ferne entfalten können, werden unter der Bezeichnung Enhancer zusammengefaßt. Enhancer können sich auch im transkribierten Bereich bzw. hinter der kodierenden Region befinden. Im Einzelfall kann die begriffliche Unterscheidung zwischen Promotor und Enhancer schwierig sein, deshalb wird die Bezeichnung Promotor häufig für die gesamte Transkriptionskontrollregion verwendet (Westhoff, Molekulare Entwicklungsbiologie, 1996).

1.4.1.2 Promotoraufbau

Promotoren *eukaryontischer* Organismen sind sehr komplex und variabel aufgebaut. Grundsätzlich muß zwischen Promotoren von regulierten Genen und konstitutiv exprimierten Genen unterschieden werden. Regulierte Gene können eine Vielzahl von speziellen *cis*-Elementen aufweisen, über die eine Induktion des jeweiligen Gens möglich ist. Einige Sequenzmotive lassen sich in den meisten Promotoren proteinkodierender Gene *eukaryontischer* Organismen auffinden, hierbei handelt es sich um Promotorgrundelemente:

- A. Innerhalb einer Pyrimidin-reichen Sequenz liegt das Startnukleotid für den Transkriptionsstart (häufig ein Adenin). Das Startnukleotid für den Transkriptionsstart wird als Inr-Element (Initiator) bezeichnet. Das Inr-Element am Transkriptionsstart ist in vielen, aber nicht allen Promotoren vorhanden.
- B. Die TATA-Box, ein Sequenzabschnitt, der mehr oder weniger große Ähnlichkeit mit der Nukleotidfolge 5'-TATAAT-3' (Konsensus-Sequenz) aufweist, liegt in einer Position um das Nukleotid -30 stromaufwärts vom Transkriptionsstart (wird mit +1 bezeichnet) in den Promotoren von regulierten Genen. Sie fehlt häufig, jedoch nicht immer, in den Promotoren von konstitutiv exprimierten Genen. Da die TATA-Box den Beginn der Transkription festlegt, findet man in konstitutiv exprimierten Genen oft keinen einheitlichen Transkriptionsstartpunkt, sondern mehrere, eng beieinanderliegende Startpunkte für die Transkription.

C. CCAAT-Boxen und GC-Boxen kommen in wechselnder Zahl, Orientierung und Lage (relativ zum Transkriptionsstart) in vielen, jedoch nicht allen Promotoren vor. (Knippers, Molekulare Genetik, 1997).

Neben den oben angeführten Grundelementen enthalten Promotoren *eukaryontischer* Organismen im allgemeinen noch weitere verschiedene *in cis*-wirkende Elemente, die eine bestimmte Anordnung und einen bestimmten Abstand haben müssen, um ihre Wirkung ausüben zu können. Diese *in cis*-wirkenden Elemente regulieren die Transkription in kombinatorischer Weise. Veränderungen, wie z. B. Austausch einzelner Nukleotide innerhalb hoch konservierter Sequenzmotive (GC-Boxen, CCAAT-Boxen, TATA-Box und spezielle regulatorische Elemente wie z. B. cAMP Response Element), haben Auswirkungen auf die Promotoraktivität und führen häufig zu deren Senkung.

Die Struktur eines Promotors *eukaryontischer* Organismen soll am *c-fos* Promotor erläutert werden. Dieser Promotor ist eines der am besten untersuchten Systeme im Hinblick auf Transkriptionsregulation in *eukaryontischen* Organismen. Das *c-fos* Gen gehört zu den „immediate early genes“, einer Gruppe von Genen, die nach Induktion schon sehr früh, vor anderen Genen exprimiert werden und die Informationen zur Herstellung von Transkriptionsfaktoren tragen. Die Gene *c-fos* und *c-jun* kodieren für je eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors „Activator protein 1“ (AP-1) (Knippers, Molekulare Genetik, 1997). *C-fos* wird in einer Vielzahl von Zelltypen auf einem verhältnismäßig geringem Niveau exprimiert, kann jedoch schnell und drastisch durch eine weite Bandbreite von Stimulatoren unter anderem durch Serumbestandteile wie Wachstumsfaktoren, Erhöhung der intrazellulären Konzentration an Kalzium-Ionen oder der cAMP-Konzentration induziert werden (Robertson et al. 1995; Knippers, Molekulare Genetik, 1997). Der *c-fos* Promotor weist neben den typischen regulatorischen Elementen eines Promotors *eukaryontischer* Organismen (TATA-Box, CCAAT-Box, GC-Boxen), Bindestellen für spezielle Transkriptionsfaktoren, welche die Induktion der Promotoraktivität durch diverse Stimulantien vermitteln, auf. Abbildung 4 zeigt die Sequenz des *c-fos* Promotors sowie Bindestellen für verschiedene Transkriptionsfaktoren.

TCGCTCGCCT	TCTCTGCCTT	TCCCGCCTCC	CCTCCCCCGC	CGCGGCGGGC	CTTCCCCCCC	-376	
TGCGCTGCAC	CCTCAGAGTG	CTGCAGCCGG	CGAGCTGTTC	CCGTCAATCC	CTCCCTCCTT	-316	
TACACAGGAT	GTCCATATTA	GGACATCTGC	GTCAAGCAGGT	TTCCACGGCG	GGTCCCTGTT	-256	
GTTCTGGGGG	GGGGACCATC	TCCGAAATCC	TACACGCGGA	AGGTCTAGGA	GACCCCTTAA	-196	
GATC	CCAATA	GTGAACACTC	ATAGGTGAAA	GATGTATGCC	AAGACGGGGG	TTGAAAGCCT	-136
GGGGCGTAGA	GTTGACGACA	GAGCGCCCGC	AGAGGGCCTT	GGGGCGCGCT	TCCCCCCCCT	- 76	
TCCAGTTCCG	CCCA	GTGACG	TAGGAAGTCC	ATCCATTAC	AGCGCTTCTA	TAAACGGCCA	- 16
GCTGAGGCGC	CTACTACTCC	AACCGCGACT	GCA			18	

Abbildung 4: *c-fos* Promotor

Abbildung 4 zeigt die Sequenz des *c-fos* Promotors in der Region von - 435 bis + 18. Dieser Sequenzbereich beinhaltet typische regulatorische Elemente eines *eukaryontischen* Promotors. Sie sind grau markiert und nummeriert: # 1: TATA-Box, # 2: GC-Boxen, # 3: CCAAT-Box sowie den Transkriptionsstart, der mit + 1 gekennzeichnet ist. Bindestellen für spezielle Transkriptionsfaktoren sind folgendermaßen markiert: ■ : *Sis*-inducible Element (SIE), Bindestelle für Transkriptionsfaktoren, die der Gruppe der „Signal Transducers and Activators of Transcription“ (STAT) angehören (Hassler M., 2001); ■ : Serum Response Element (SRE), Bindestelle für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, zu denen unter anderem der Serum Response Factor (SRF) und Yin Yang 1 (YY1) gehören (Robertson et al. 1995); ■ : AP-1 Binding Element (FAB), Bindestelle für das Activator Protein 1 (AP-1) und AP-1 verwandete Transkriptionskomplexe (Robertson et al. 1995; Knippers, Molekulare Genetik, 1997); ■ : Kalzium und cAMP Response Element (Ca/CRE-Sequenz), Bindestelle für das CRE-Protein. (Robertson et al. 1995; Knippers, Molekulare Genetik, 1997). Sequenz modifiziert dargestellt nach Hassler M. 2001 und Knippers, Molekulare Genetik, 1997. Um die Übersichtlichkeit zu gewährleisten, sind nur einige ausgewählte Bindestellen für spezielle Transkriptionsfaktoren dargestellt.

1.4.1.3 Transkriptionsfaktoren

Im Rahmen dieser Dissertation wird ein kurzer und grundsätzlicher Überblick über Transkriptionsfaktoren gegeben. Transkriptionsfaktoren besitzen drei essentielle Domänen, um ihre Funktion, d. h. Interaktion mit im Promotor gelegenen *cis*-Elementen und Regulation der Transkription, zu gewährleisten (Knippers, Molekulare Genetik, 1997):

1. DNA-Bindedomäne: ermöglicht die Bindung an *cis*-Elemente.
2. Transaktivierungsdomäne: ist für die Aktivierung der Transkription verantwortlich, ermöglicht die Interaktion mit dem basalen Transkriptionsapparat und Interaktionen der Transkriptionsfaktoren.
3. Dimerisierungsdomäne

Grundsätzlich lassen sich Transkriptionsfaktoren in allgemeine (basale) Transkriptionsfaktoren und spezielle Transkriptionsfaktoren einteilen.

allgemeine Transkriptionsfaktoren

Hierzu gehören die Transkriptionsfaktoren TFII-D, TFII-A, TFII-B, TFII-E, TFII-F, TFII-H und TFII-I. Alle allgemeinen Transkriptionsfaktoren bestehen aus mehreren Untereinheiten. Sie werden von der RNA-Polymerase II benötigt, damit diese sich am Promotor anlagern und die DNA-Transkription beginnen kann (Knippers, Molekulare Genetik, 1997; Conaway und Conaway 1993; Maldonado und Reinberg 1995).

spezielle Transkriptionsfaktoren

Viele Promotoren weisen zusätzlich Bindestellen für spezielle Transkriptionsfaktoren auf, mit deren Hilfe die Promotoraktivität nach bestimmten Signalen, wie beispielsweise nach Zusatz von Serum oder Erhöhung der intrazellulären Kalzium oder cAMP Konzentration, induziert wird (siehe oben, *c-fos* Promotor) oder durch Anlagerung von Repressoren reprimiert wird (Knippers, Molekulare Genetik, 1997).

Anhand eines weiteren Klassifizierungssystems können Transkriptionsfaktoren aufgrund der Struktur ihrer DNA-Bindedomäne in fünf größere Gruppierungen unterteilt werden, welche wiederum verschiedene Klassen von Transkriptionsfaktoren beinhalten (Knippers, Molekulare Genetik, 1997; Biobase 2002):

1. Transkriptionsfaktoren mit basischer DNA-Bindedomäne

Diese Gruppe kann aufgrund der Struktur ihrer Dimerisierungsdomäne in sechs Klassen unterteilt werden. Hierzu zählen basische Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren (bZIP), basische Helix-Loop-Helix Transkriptionsfaktoren (bHLH), basische Helix-Loop-Helix / Leucin-Zipper Transkriptionsfaktoren (bHLH-ZIP), Nuclear Factor 1 (NF-1), RF-X und bHSH Transkriptionsfaktoren.

2. Transkriptionsfaktoren mit Zink-Finger als DNA-Bindedomäne

Transkriptionsfaktoren dieser Gruppe weisen häufig zwei Zink-Finger-Motive auf, wobei in diesem Fall nur ein Zink-Finger zur Bindung an die DNA dient. Teile des anderen Zink-Fingers dienen der Dimerisierung. Aufgrund der Koordination des Zink-Atoms innerhalb des Zink-Fingers bzw. der Zink-Finger kann diese Gruppe in fünf Klassen unterteilt werden: Cys4 (Cystein4) Zink-Finger Transkriptionsfaktoren des nuklearer Rezeptortyps, Cys4 Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, Cys2 (Cystein2) His2 (Histidin2) Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, Cys6 Cluster Zink-Finger Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsfaktoren mit Zink-Fingern unterschiedlicher Zusammensetzung. Zur Gruppe der Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren gehört unter anderem Yin Yang 1 (YY1), für welchen eine Bindestelle im RGS16-Promotor detektiert werden konnte. YY1 ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der im unterschiedlichen Kontext entweder als Aktivator oder als Repressor der Transkription wirkt (Robertson et al. 1995; Natesan et al. 1995; Hyde-DeRuyscher et al. 1995).

3. Transkriptionsfaktoren mit Helix-Turn-Helix DNA-Bindedomäne

Zu dieser Gruppe von Transkriptionsfaktoren zählen sechs Klassen: Transkriptionsfaktoren mit Homöobox, Paired Box, Fork Head / Winged Helix Transkriptionsfaktoren, Hitzeschock-Faktoren, Transkriptionsfaktoren mit Tryptophan-Cluster und Transkriptionsfaktoren mit TEA-Domäne.

4. Beta-Scaffold Transkriptionsfaktoren mit DNA-Bindekapazität zur kleinen Furche

Diese Gruppe beinhaltet elf Klassen: Transkriptionsfaktoren mit Rel-Homologie-Region (RHR), Signal Transducers and Activators of Transcription (STAT), p53, MADS-Box Transkriptionsfaktoren, Beta-Barrel Alpha-Helix Transkriptionsfaktoren, TATA-Box-Binde-Proteine, High-Mobility Group (HMG) Protein-like Factors, heterotrimere CCAAT Faktoren, Grainyhead Transkriptionsfaktoren, Kälteschock-Domäne Faktoren und Runt Transkriptionsfaktoren.

5. andere Transkriptionsfaktoren

Hierzu zählen: Copper Fist Transkriptionsfaktoren, HMGI(Y) Transkriptionsfaktoren, Pocket Domain Transkriptionsfaktoren, E1A-like Factors und EP2/EREBP-related Factors.

1.5 Fragestellung der Arbeit

Die Induktion von RGS-Proteinen (regulators of G protein signalling) scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese sowohl der chronischen als auch der akut entzündlichen Herzinsuffizienz zu spielen (Mittmann et al. 2002; Patten et al. 2002; Patten et al. 2003). Aufgrund ihrer GTPase-aktivierenden Funktion gegenüber verschiedenen G α -Untereinheiten, insbesondere gegenüber G α_i - und G α_q -Untereinheiten, sind RGS-Proteine an der Regulation G-Protein-vermittelter Signaltransduktionsprozesse wie an der Regulation der Kontraktilität von Herzmuskelzellen, des Zellwachstums von Kardiomyozyten und der Myokardhypertrophie beteiligt (Mittmann et al. 2002; Wieland und Chen 1999; Wieland und Mittmann 2003; Michalek 2003; Rogers et al. 1999).

Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation waren Ergebnisse aus *in vivo* Experimenten, die gezeigt haben, daß zwei RGS Proteine (regulators of G protein signalling), RGS4 und RGS16, nach Behandlung mit bakteriellem Endotoxin (LPS) vermehrt im Herzen adulter Ratten exprimiert werden (Patten et al. 2002). Auch in neonatalen Rattenkardiomyozyten in Zellkultur konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, daß die RGS16-Proteinexpression durch LPS sowie durch die LPS-induzierten Zytokine Tumornekrosisfaktor α (TNF α) und Interleukin-1 β (IL-1 β) aktiviert wird, jedoch nicht durch IL-6 und IFN γ (Patten et al. 2003). In Zellkulturexperimenten an neonatalen Rattenkardiomyozyten sollen deshalb folgende Fragestellungen untersucht werden:

1. Induziert LPS direkt oder durch Aktivierung von TNF α und IL-1 β die RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten?
2. Aktiviert LPS die Expression und Sekretion von TNF α und IL-1 β in Kardiomyozyten?

Erst kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe der RGS16-Promotor kloniert. Da bisher nur sehr wenig über die transkriptionelle Regulation der RGS-Proteine im Herzen bekannt ist, soll der RGS16-Promotor exemplarisch näher untersucht und hierdurch ermittelt werden:

1. Welche regulatorischen Promotorelemente sind essentiell für die RGS16-Promotoraktivität und welche Minimalsequenz reguliert die RGS16-Promotoraktivität?
2. Wird der RGS16-Promotor in Kardiomyozyten transkriptionell durch LPS sowie durch die beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α reguliert?

3. Wird die RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten durch Serum induziert und wenn ja durch welche Serumkomponenten?
4. Welche Signaltransduktionswege spielen hierbei möglicherweise eine Rolle?

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Zellkultur

Für Zellkulturexperimente eingesetzte Kardiomyozyten wurden aus 1 – 3 Tage alten männlichen und weiblichen Ratten der Rasse Wistar aus der Tierhaltung UKE, Hamburg, gewonnen.

2.1.2 Bakterienstämme

Der folgende Bakterienstamm wurde als Rezipient für rekombinante DNA sowie zur Plasmidamplifikation und -isolierung eingesetzt:

E. coli TOP10: *F_{mcrA} Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araΔ139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG*,
Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.3 Vektoren

Für die Klonierung von PCR-Produkten (a) und zur Expression des *Firefly*-Luciferase-Reportergens (b) für RGS16-Promotoranalysen wurden folgende Vektoren eingesetzt:

<u>Vektor</u>	<u>Größe</u>	<u>Resistenz</u>	<u>Hersteller</u>
pCR ^R 2.1-TOPO (a)	3,9 kb	Ampicillin, Kanamycin	Invitrogen (Karlsruhe)
pGL ₃ -Basic (b)	4,8 kb	Ampicillin	Promega (Mannheim)

2.1.4 Synthetische Oligonukleotide und Längenstandards

Nukleotide

10 mM dNTP Mix, MBI Fermentas (St. Leon-Rot)

Primer

1. Primer für die Generierung des RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,4 kb-Sac I

5' Primer:

sa 4: GTA GCA ATC TCG AAG GGA G 19-mer, Tm = 56,7 °C

3' Primer:

sa 6: CAT GGT CTT CGA AGG TGA C 19-mer, Tm = 56,7 °C

2. Sequenzierungsprimer:

5' Primer:

M13 Reverse: CAG GAA ACA GCT ATG AC 17-mer, Tm = 50,4 °C

RVprimer3: CTA GCA AAA TAG GCT GTC C 19-mer, Tm = 54,5 °C

sa 1: CAG TGT GGT ATG GTC TCT 18-mer, Tm = 53,7 °C

sa 2: GTC CAG CTC TCC AAA AAG 18-mer, Tm = 53,7 °C

sa 3: GGG TTA CAG AGC TGT TGT 18-mer, Tm = 53,7 °C

sa 7: CCC ATG CCT GCT GAT CTT 18-mer, Tm = 56,0 °C

sa 8: ACA CGT CTC TGC TCA GC 17-mer, Tm = 55,2 °C

sa 9: CTT CAT AGG GTC TGG CTC 18-mer, Tm = 56,0 °C

sa 10: CCA GGC ATT TTG ATC TCT TC 20-mer, Tm = 55,3 °C

sa 11: CCA TAC AGC ATA GAT TTC CAG T 22-mer, Tm = 56,5 °C

sa 12: AGG TCT ACA CAA CTC TAG AAC 21-mer, Tm = 55,9 °C

sa 13: GAT GTC TAA ACC CCA GAC A 19-mer, Tm = 54,5 °C

sa 14 : ATG CGC CTG TCC TCC GTG AA 20-mer, Tm = 61,4 °C

3' Primer:

M13 Forward: GTA AAA CGA CGG CCA G 16-mer, Tm = 51,7 °C

GLprimer2: CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC C 22-mer, Tm = 56,5 °C

Soweit nicht anders vermerkt, wurden die verwendeten Primer von der Firma MWG Biotech synthetisiert.

Längenstandards

Prestained Precision Protein Standard

SMART DNA Marker

1 kb DNA Ladder

100 bp DNA Ladder

Bio-Rad (München)

Eurogentec (Köln)

New England Biolabs (Bad Schwalbach)

New England Biolabs (Bad Schwalbach)

2.1.5 Chemikalien

Acrylamid / Bis, 40 %, Solution, 29 : 1 (3,3 % C)	Bio-Rad (München)
Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Agarose	Gibco BRL (Eggenstein)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma (Taufkirchen)
Ampicillin	Calbiochem (Darmstadt)
Apo-Transferrin	Sigma (Taufkirchen)
Bio Safe Coomasie Reagenz	Bio-Rad (München)
Borsäure	Sigma (Taufkirchen)
Bradford-Reagenz	Bio-Rad (München)
5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU)	Sigma (Taufkirchen)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-β-Galactosid (X-Gal)	Diagnostics Chemicals (USA)
Bromphenolblau	Sigma (Taufkirchen)
BSA (Zellkultur)	Sigma (Taufkirchen)
BSA	Sigma (Taufkirchen)
BSA-Standard	Bio-Rad (München)
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Chelerythrin Chlorid	Calbiochem (Darmstadt)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Dextrose	Merck (Darmstadt)
Dimethylformamid (DMF)	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
DNA-Ladefarbe	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma (Taufkirchen)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
FCS, aktiv (Zellkultur)	Gibco BRL (Eggenstein)
Glycerol, 87 %, reinst	Merck (Darmstadt)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefe-Extrakt	Becton Dickinson (Heidelberg)
HEPES	Sigma (Taufkirchen)
Igepal CA-630	Sigma (Taufkirchen)
Insulin (Zellkultur)	Sigma (Taufkirchen)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydrogencarbonat	Merck (Darmstadt)
LPA	Sigma (Taufkirchen)
LPS from E. coli, Serotype: 026: B6	Sigma (Taufkirchen)
Magnesiumsulfat-Heptahydrat	Merck (Darmstadt)
2-Mercaptoethanol	Sigma (Taufkirchen)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen	Gibco BRL (Eggenstein)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumazid	Sigma (Taufkirchen)
Natriumchlorid, reinst	Merck (Darmstadt)
Natriumdesoxycholat	Merck (Darmstadt)

Natriumhydroxid	Merck (Darmstadt)
N,N-DMS	Cayman Chemical (USA)
PBS Dulbecco`s (w/o Calcium and Magnesium)	Gibco BRL (Eggenstein)
Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
Pertussis Toxin (PTX) from Bordetella pertussis	Sigma (Taufkirchen)
Ponceau S-Reagenz	Serva (Heidelberg)
Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche (Mannheim)
Salzsäure, rauchend, 37 %	Merck (Darmstadt)
SOC Medium	Invitrogen (Karlsruhe)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Taufkirchen)
Sphingosin-1-Phosphat (S1-P)	Sigma (Taufkirchen)
TEMED	Sigma (Taufkirchen)
Tris	Sigma (Taufkirchen)
Trockenmilch	Bio-Rad (München)
Trypsin 250	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Trypton	Becton Dickinson (Heidelberg)
Tween 20	Sigma (Taufkirchen)

2.1.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase, shrimp 1000 U	Roche (Mannheim)
Desoxyribonuclease II	Sigma (Taufkirchen)
Restriktionsenzyme: <i>EcoR I</i> , 10 U/µl	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
<i>Hind III</i> , 10 U/µl	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
<i>Kpn I</i> , 10 U/µl	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
<i>Sac I</i> , 10 U/µl	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
<i>Xho I</i> , 10 U/µl	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
T4 DNA Ligase, 1 U/µl	(USB Corporation, USA)
<i>Taq</i> DNA Polymerase, 5 U/µl	Invitrogen (Karlsruhe)

Alle verwendeten Enzyme wurden mit den entsprechenden Puffern, gegebenenfalls anderen benötigten Zusätzen, geliefert und nach Herstellerangaben eingesetzt.

2.1.7 Reaktionskits

ABI PRISM TM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Perkin Elmer (Rodgau-Jügesheim)
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad (München)
DNA Ligation Kit	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
ECL Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham Biosciences (Freiburg)
Dual-Luciferase ^R Reporter 1000 Assay System	Promega (Mannheim)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Rapid DNA Ligation Kit	Roche (Mannheim)
Rapid PCR Purification System	Marligen Biosciences (Heidelberg)
rat IL-1β, Quantikine M Colorimetric Sandwich ELISA	R & D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
rat TNFα, Quantikine P Colorimetric Sandwich ELISA	R & D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)

2.1.8 Antikörper und rekombinante Proteine

Antikörper

Anti-Mouse IgG-HRP (Peroxidase-konjugiert)	Dianova (Hamburg)
Anti-Rabbit IgG-HRP (Peroxidase-konjugiert)	Dianova (Hamburg)
Anti- β -Tubulin, Monoclonal	Sigma (Taufkirchen)
RGS16, CT 266	zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wieland (Universität Mannheim)

rekombinante Proteine

recombinant murine IL-1 β	R & D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
recombinant murine TNF α	R & D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
recombinant mouse IL-1ra	R & D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
recombinant mouse sTNF RI	R & D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)

2.1.9 Medien, Puffer und Lösungen

Medien

- LB-Medium:	1 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefe-Extrakt (w/v), 0,5 % NaCl (w/v), pH 7,5, autoklaviert
- LB-Agar:	LB-Medium, 1,5 % Agar (w/v), autoklaviert
- LB-Amp-Agar:	LB-Agar, 100 μ g/ml Ampicillin
- Medium für Kardiomyozyten:	Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen, 10 % FCS inaktiv (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ml) (v/v), 0,1 mM BrdU
- Medium für die Zellkultur während der Präparation der neonatalen Rattenkardiomyozyten („Nichtkardiomyozytenmedium“):	Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen, 10 % FCS inaktiv (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ml) (v/v)
- Medium während der Transfektion:	Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen, 30 mM HEPES, 5 % FCS inaktiv (v/v), 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ml) (v/v)
- Medium zum Waschen während der Transfektion:	Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen, 1 % Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ml) (v/v)
- TIBSA:	Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen, 1,0 % Apo-Transferrin-Stammlösung (1 mg/ml) (v/v), 1,0 % BSA-Stammlösung (100 mg/ml) (v/v), 0,1 % Insulin-Stammlösung (10 mg/ml) (v/v), 0,1 mM BrdU, 1,0 % Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ml) (v/v)

Puffer und Lösungen

- Agarose für DNA-Gele: 1 – 1,5 % Agarose (w/v) in 1 x TBE-Puffer
- Ampicillin-Stocklösung, 20 mg/ml: 1 g Ampicillin ad 50 ml mit H₂O, sterilfiltriert (0,2 µm Membran)
- Apo-Transferrin, Stammlösung 1 mg/ml: 50 mg Apo-Transferrin ad 50 ml mit H₂O, sterilfiltriert (0,2 µm Membran)
- APS, 10 %: 1 g APS ad 10 ml mit H₂O
- Blocking-Puffer, 3 %: 1,5 g fettarme Trockenmilch ad 50 ml mit Waschpuffer A
- Blocking-Puffer, 5 %: 2,5 g fettarme Trockenmilch ad 50 ml mit Waschpuffer A
- 10 x Blotting-Lösung: 12,1 g Tris (MW: 121,1 g), 56,25 g Glycin (MW: 75,07 g) ad 1 l mit H₂O
- Blotting-Puffer: 100 ml Blotting-Lösung, 200 ml Methanol, 700 ml H₂O
- BrdU-Stammlösung, 10 mM: 1 g BrdU ad 325,7 ml mit Aqua ad injectabilia
- BSA-Stammlösung, 100 mg/ml: 10 g BSA ad 100 ml mit H₂O, sterilfiltriert (0,45 µm Membran)
- Calciumchlorid-Dihydrat, 2,5 M: 183,78 g CaCl₂ x 2H₂O ad 500 ml mit H₂O, sterilfiltriert (0,45 µm Membran)
- Calcium und Bicarbonat freier Hanks Puffer mit HEPES = CBFHH, pH 7,4 (Zellpräparation)
 - 40 ml NaCl (3,42 M), autoklaviert
 - 100 ml HEPES (0,2 M, pH 7,4), sterilfiltriert (0,2 µm Membran)
 - 10 ml Dextrose (0,555 M), sterilfiltriert (0,2 µm Membran)
 - 10 ml KCl (0,536 M), autoklaviert
 - 10 ml mM MgSO₄ x 7 H₂O (81,14 mM), autoklaviert
 - 10 ml KH₂PO₄ (44 mM), autoklaviert
 - 10 ml Na₂HPO₄ x 2 H₂O (33,57 mM), autoklaviertad 1000 ml mit Aqua ad injectabilia
- Chelerythrin Chlorid, 500 µM: 5 mg Chelerythrin Chlorid ad 26,04 ml mit DMSO
- Dextrose-Monohydrate, 0,555 M: 54,99 g Dextrose-Monohydrate ad 500 ml mit H₂O, sterilfiltriert (0,2 µm Membran)
- DNase II-Stammlösung, 2 mg/ml: 310 mg DNase II ad 155 ml mit Aqua ad injectabilia
- DNase II-Lösung (Zellpräparation): 1,3 ml FCS (aktiv), 0,5 ml DNase II-Stammlösung (2 mg/ml), 0,5 ml Penicillin-Streptomycin (10.000 IE/ml), ad 50 ml mit CBFHH
- 2 x HBS-Puffer:
 - 8,2 g NaCl
 - 5,95 g HEPES
 - 0,134 g Na₂HPO₄ x 2 H₂Oad 500 ml mit H₂O, pH 6,95 – 7,10 sterilfiltriert (0,2 µm Membran)

- HEPES, 0,2 M: 23,83 g HEPES ad 500 ml mit H₂O, pH 7,4, sterilfiltriert (0,2 µm Membran)
- HEPES, 1 M: 119,15 g HEPES ad 500 ml mit H₂O, pH 7,5, sterilfiltriert (0,2 µm Membran)
- Kaliumchlorid, 0,536 M: 19,98 g KCl ad 500 ml mit H₂O, autoklaviert
- Kaliumhydrogencarbonat, 1 mM: 0,1 g KHCO₃ ad 1 l mit H₂O, autoklaviert
- Kaliumdihydrogenphosphat, 44 mM: 3 g KH₂PO₄ ad 500 ml mit H₂O, autoklaviert
- 1 x Laemmli-Puffer: 6,25 ml Tris (0,5 M, pH 6,8),
5 ml Glycerol,
5 ml SDS (20 %),
2,5 ml β-Mercaptoethanol,
1 mg Bromphenolblau
ad 50 ml mit H₂O
- Laufgelpuffer für PAA-Gele: 1,5 M Tris, pH 8,8
- 10 x Laufpuffer für PAA-Gele: 30 g Tris (MW: 121,1 g),
144 g Glycin,
10 g SDS
ad 1 l mit H₂O, pH 8,3
- LPA-Stammlösung, 50 µM: 1 mg LPA ad 45,45 ml mit NaCl (0,9 %, steril)
- LPS-Stammlösung, 2 mg/ml: 100 mg LPS ad 50 ml mit NaCl (0,9 %, steril)
- Lysis-Puffer: 500 mg Natriumdesoxycholat
1 g Igepal CA-630
0,5 ml SDS (20 %)
ad 100 ml mit 1 x PBS, pH 7,2
- Magnesiumsulfat-Heptahydrat, 81 mM: 9,99 g Mg SO₄ (H₂O)₇ ad 500 ml mit H₂O, autoklaviert
- Natriumchlorid, 3,42 M: 99,93 g NaCl ad 500 ml mit H₂O, autoklaviert
- di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, 34 mM: 2,99 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O ad 500 ml mit H₂O, autoklaviert
- Natronlauge, 10 M: 40 g NaOH ad 100 ml mit H₂O
- Natriumacetat, 3 M: 24,61 g ad 100 ml mit H₂O, pH 5,4
- PAA-Sammelgele (4 %): 1,26 ml Sammelgelpuffer,
0,5 ml Acrylamid (40 %),
50 µl SDS (10 %),
25 µl APS (10 %),
5 µl TEMED,
3,2 ml H₂O

- PAA-Trenngele (15 %): 3,75 ml Laufgelpuffer,
5,4 ml Acrylamid (40 %),
150 µl SDS (10 %),
75 µl APS (10 %),
7,5 µl TEMED,
5,63 ml H₂O
- 25 x Protease-Inhibitor-Cocktail: 1 Tablette in 2 ml H₂O
- recombinant murine IL-1β,
Stocklösung 5 µg/ml: 5 µg recombinant murine IL-1β,
1 % BSA (w/v) (steril)
ad 1 ml mit PBS (steril)
- recombinant mouse IL-1ra,
Stocklösung 0,1 µg/1 µl: 50 µg recombinant mouse IL-1ra,
1 % BSA (w/v) (steril)
ad 500 µl mit PBS (steril)
- recombinant murine TNFα,
Stocklösung 5 µg/ml: 10 µg recombinant murine TNFα,
1 % BSA (w/v) (steril)
ad 2 ml mit PBS (steril)
- recombinant mouse sTNF RI,
Stocklösung 50 µg/ml: 50 µg recombinant mouse sTNF RI,
1 % BSA (w/v) (steril)
ad 1 ml mit PBS (steril)
- Sammelgelpuffer für PAA-Gele: 0,5 M Tris, pH 6,8
- Sphingosin-1-Phosphat (S1-P),
500 µM: 1 mg S1-P ad 5,26 ml mit NaCl (0,9 %, steril)
- 10 x TBE-Puffer: 108 g Tris-Base,
55 g Borsäure,
20 mM EDTA, pH 8,0
ad 1 l mit H₂O, autoklaviert
- Trypsin-Stammlösung: 1 g Trypsin / 10 ml CBFHH, sterilfiltriert
- Trypsin-Lösung
(Zellpräparation): 1,5 ml Trypsin-Stammlösung, sterilfiltriert,
0,5 ml Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ml),
0,5 ml DNase II-Stammlösung (2 mg/ml)
ad 50 ml mit CBFHH
- 1 x Waschpuffer A: 10 mM Tris-HCl,
0,5 % NaCl (w/v),
0,1 % Tween 20 (v/v), pH 7,4
- 1 x Waschpuffer B: 0,25 % Natriumdesoxycholat (w/v),
0,1 % SDS (w/v),
ad 1 l mit Waschpuffer A

Alle oben erwähnten Medien, Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders vermerkt, mit entionisiertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (20 min./121 °C/1 bar).

Thermolabile Komponenten wurden durch einen 0,2 bzw. 0,45 µm Filter sterilfiltriert und nach dem Autoklavieren sowie Abkühlen auf 50 °C zugegeben. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde, wenn nicht anders vermerkt, 1 M HCl oder 1 M NaOH verwendet.

2.1.10 Verbrauchsmaterial

Aqua ad injectabilia	Baxter (Unterschleißheim)
Autoklavierband	Eppendorf (Hamburg)
Bakterienschalen	Eppendorf (Hamburg)
Centricon-Röhrchen, YM-10	Millipore (Schwalbach)
Deckgläser	Marienfeld (Lauda-Königshofen)
Digital-Timer	Merck (Darmstadt)
Drehtisch	Schütt Labortechnik (Göttingen)
Drigalski Spatel	Merck (Darmstadt)
Einwegpipetten : 1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml und 25 ml, steril	Becton Dickinson (Heidelberg)
Einwegpipetten: 10 ml (Wide Tip Serological Pipet),steril	Becton Dickinson (Heidelberg)
Erlenmeyer-Kolben, 1000 ml	Duran (Mainz)
Faltenfilter	Schleicher & Schuell (Dassel)
Filterpapier	Whatman (Maidstone, UK)
Glaszubehör	Schott (Mainz)
Handschuhe	Kimberly-Clark (Koblenz-Rheinhafen)
Impfösen	Greiner (Frickenhausen)
Kodak Bio Max MR Filme	Sigma (Taufkirchen)
Microcon-Röhrchen, YM-10	Millipore (Schwalbach)
Neubauer Zählkammer	Merck (Darmstadt)
Nitrocellulosemembran (Protean ^R , 0,45 µm)	Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger Super Frost Plus	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Parafilm	Merck (Darmstadt)
Pasteurpipetten	Eppendorf (Hamburg)
PCR Reaktionsgefäße: 0,2 ml	Hybaid (Karlsruhe)
Pinzetten	Sigma (Taufkirchen)
Pipetten: 0,5 – 1 µl, 1 – 10 µl, 10 – 100 µl	
100 – 200 µl und 200 – 1000 µl	
Pipettenspitzen	Gilson (Bad Camberg)
Pipettierhilfe – Pipettus	Eppendorf (Hamburg)
Plastik Messküvetten	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Quarz Messküvette	Rudolf Franke (Hamburg)
Reaktionsgefäße: 0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml	Bio-Rad (München)
Reaktionsgefäße: 15 ml (Falcon), 50 ml (Falcon)	Eppendorf (Hamburg)
Reaktionsgefäße: 250 ml und 500 ml	Becton Dickinson (Heidelberg)
Röhrchen TC, steril, 14 ml	Beckmann (Palo Alto, CA, USA)
Sarstedt Röhrchen	Greiner (Frickenhausen)
Scheren für Mikromanipulation	Sarstedt (Nümbrecht)
Skalpel und –klingen	Sigma (Taufkirchen)
Spatel	Bayha (Tuttlingen)
Sterilfilter: 0,2 µm und 0,45 µm	Merck (Darmstadt)
Wägebapier	Millipore (Schwalbach)
	Machery Nagel (St. Louis, USA)

Wägeschälchen	Machery Nagel (St. Louis, USA)
Zellkulturflaschen (80 cm ² , 260 ml)	Nunclon (Roskilde, DK)
Zellkulturschalen (Durchmesser: 6 cm, 10 cm)	Greiner (Frickenhausen)
Zellschaber	Greiner (Frickenhausen)
Zellsieb	Sigma (Taufkirchen)
Zentrifugenröhrchen: 250 ml	Beckmann (Palo Alto, CA, USA)
16 ml	Nalgene (Tuntenhausen)

2.1.11 Laborgeräte, Apparaturen und sonstiges Zubehör

Analysewaagen:

- Sartorius Analytic A 200 S	Sartorius GmbH (Göttingen)
- Kern 572	Gottl. Kern & Sohn GmbH (Albstadt)

Autoklav:

- Tuttnauer Systec 2540 ELV	Systec GmbH Labor-Systemtechnik (Wettenberg)
-----------------------------	---

Brutschränke:

- B 5060 EK/CO ₂ Begasungsbrutschrank	Heraeus Instruments (Hanau)
- Sanyo CO ₂ Inkubator, MCO – 17 AIC	Sanyo Electric Co., Ltd. (Japan)

DNA-Sequenzierer und Zubehör:

- Abi Prism 3100 Genetic Analyser	Applied Biosystems (Darmstadt)
-----------------------------------	--------------------------------

Elektroblotting-Apparaturen und Zubehör:

- Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Power Pack 300	Bio-Rad (München)
--	-------------------

ELISA-Plate Reader:

- SLT Spectra II, ESLT Lap Instruments	Deutschland GmbH
--	------------------

Filmentwickler:

-

Folienschweißgerät:

- Polystar-Tischschweißgerät 243	Rische + Herfurth GmbH (Hamburg)
----------------------------------	----------------------------------

Gelelektrophorese-Apparaturen und Zubehör:

- Agagel Mini und Maxi, Standard Power Pack Biometra (Göttingen)

Kühltruhen:

- Liebherr Premium, + 4 °C, - 20 °C Liebherr-Hausgeräte GmbH
(Ochsenhausen)
- Kryotec, - 80 °C Hans-S. Schröder GmbH (Hamburg)

Luciferase Assay:

- Lumat LB 9507 Berthold Technologies (Bad Wildbach)

Magnetrührer mit Heizplatte:

- IKA RH basic IKA Labortechnik (Staufen)

Mikroskope:

- Olympus BH2 OM System (Japan)
- Binokular – Olympus CK 2 OM System (Japan)

Mikrowelle:

- Gourmet 2210 Bosch (Hamburg)

PCR-Thermocycler:

- Tpersonal-Profi-Cycler Biometra (Göttingen)

pH-Meter:

- Mikroprozessor pH-Meter, pH 537 Wissenschaftlich-Technische
Werkstätten GmbH (Wilheim)

Photodokumentationssystem:

- Photo-Print Video-Geldokumentationssystem PeqLab Biotechnologie GmbH
Modell P 115-SD Vilber Lourmat (Hamburg)

Photometer:

- Smart Spec 3000 Spectrophotometer Bio-Rad (München)

Polytron:

- PCU Kinematika
- Polytron Ultra Turrax, T 25 basic

Luzern, Schweiz
IKA Labortechnik (Staufen)

Proteingel-Apparaturen und Zubehör:

- Mini-Protean 3 Cell

Bio-Rad (München)

Saugpumpe mit Zubehör:

- Vacuumbrand BVC 21

Vacuubrand GmbH + Co. (Wertheim)

Scanner:

- Epson Stylus Perfection 1240 U

Epson (Düsseldorf)

Schüttler:

- KS-15 Edmund Bühler
- Coulter Mixer
- Heidolph Polymax 2040

Johanna Otto GmbH (Hechingen)
Coulter Electronics Limited
Heidolph Elektro GmbH & Co KG
(Kelheim)

Sterilbänke:

- Hera safe
- Holten Lamin Air HVR 2448

Heraeus Instruments (Hanau)
Heraeus Instruments (Hanau)

Thermomixer:

- Thermomixer Comfort Eppendorf

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH
(Hamburg)

Trockenschrank:

- Function line

Heraeus Instruments (Hanau)

Vortexer:

- IKA-Werk VF2
- Genie 2 Vortex

IKA Labortechnik (Staufen)
Scientific Industries (Bohemia, USA)

Wasserbad:

- GFL 1083

Burgwedel

Wasserdeionisierungsanlage:

- SG Reinstwasser-System clear

SG Wasseraufbereitung (Barsbüttel)

Zentrifugen:

- Eppendorfszentrifuge

Eppendorf (Hamburg)

- Rotina 35 R,

Hettich (Tuttlingen)

Rotoren: 1714 (Max. 15.000 rpm)

1724 (Max. 5.000 rpm)

- Beckmann J2-HC Centrifuge,

Beckman Instruments GmbH

Rotoren: JA-20 (Max. 20.000 rpm)

(München)

JA-14 (Max. 14.000 rpm)

JS-4.3 (Max. 4.300 rpm)

- Biofuge pico, Heraeus 3325 B,

Kendro Laboratory Products

Rotor: Max. 1.300 rpm

(Osterode)

- Function Line Laborfuge 400 R,

Heraeus Instruments (Hanau)

Rotor: Max. 5.000 rpm

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht von *Escherichia coli* Bakterien (*E. coli* Bakterien) und Herstellung von Stammkulturen (Glycerolstocks)

E. coli Bakterien (TOP10) wurden zunächst auf Agarplatten (1,5 % Agar, w/v) kultiviert und über Nacht (ÜN) bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die weitere Anzucht der Bakterien erfolgte in 10 ml LB-Flüssigmedium. Hierzu wurde entweder eine Einzelkolonie von einer Agarplatte mit einer sterilen Pipettenspitze gepickt oder mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze geringe Mengen an Bakteriensuspension aus einem Glycerolstock entnommen, im Kulturmedium resuspendiert und über Nacht (ÜN) bei 37 °C unter ständigem Schütteln (250 rpm) inkubiert. Sowohl das LB-Flüssigmedium als auch die Agarplatten enthielten zur Anzucht von rekombinanten *E. coli* Bakterien als Selektionsmarker Ampicillin (0,1 mg/ml). Zur kurzzeitigen Lagerung von Bakterienklonen (bis zu 2 Wochen) wurden Agarplatten mit Ampicillin (0,1 mg/ml) präpariert und nach ausreichendem Bakterienwachstum im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt. *E. coli*-Stammkulturen (Glycerolstocks) wurden durch Mischen von 800 µl einer stationären ÜN-Kultur mit 200 µl sterilem 80 % igen Glycerol hergestellt und bei – 80 °C gelagert.

2.2.2 Transformation von TOP10 *E. coli* Bakterien

Bakterien sind unter bestimmten Wachstumsbedingungen in der Lage, freie DNA wie z. B. Plasmid-DNA aus einem sie umgebenden Kulturmedium aufzunehmen. Diese Fähigkeit wird als Kompetenz bezeichnet und kann mittels diverser Techniken (chemisch z. B. durch die Calciumchlorid-Methode, elektrochemisch: durch Elektroporation von Bakterienzellen) induziert werden. Die freie DNA, in der Molekularbiologie Vektoren z. B. Plasmid-DNA, enthält Selektionsmarker z. B. Gene für die Vermittlung von Antibiotikaresistenz zur Unterscheidung von Bakterien, die Fremd-DNA aufgenommen haben (rekombinante Bakterien) von Bakterien, die keine Fremd-DNA aufgenommen haben. Die Aufnahme von freier DNA durch Bakterien wird als Transformation bezeichnet.

Die von Invitrogen bezogenen chemisch kompetenten TOP10 *E. coli* Bakterien wurden laut Hersteller-Protokoll transformiert. Dazu wurden jeweils 50 µl kompetenter Bakterienzellen mit 2 µl Klonierungsansatz (Plasmid-DNA) (siehe 2.2.7.3) vorsichtig gemischt und 30 min. auf Eis inkubiert.

Zur DNA-Aufnahme wurden die Transformationsansätze anschließend 30 sec. bei 42 °C (Hitzeschock) inkubiert und unmittelbar danach für 2 min. auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium wurden die Bakterien 1 h bei 37 °C und 250 rpm herangezogen und anschließend 50 µl bzw. 100 µl dieser Bakteriensuspension auf Agarplatten, die als Selektionsmarker Ampicillin (0,1 mg/ml) enthielten, ÜN bei 37 °C kultiviert. Als Kontaminationskontrolle dienten TOP10 *E. coli* Bakterien, die wie oben beschrieben behandelt wurden, jedoch nicht mit Fremd-DNA transformiert wurden und ebenfalls auf LB-Amp.-Agarplatten bei 37 °C im Brutschrank kultiviert wurden. Bei Transformation von TOP10 *E. coli* Bakterien mit PCR-Fragmenten im pCR^R2.1-TOPO Vektor (Invitrogen), der das lacZ α -Gen für die Blau/Weiß Selektion „positiver“ *E. coli* Klone in seiner Multiple Cloning Site enthält, wurden die Agarplatten mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) als zusätzlichem Selektionsmarker beschichtet. Das lacZ-Gen kodiert für die β -Galactosidase. Bakterienkolonien, in denen das lacZ-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragmentes (PCR-Fragmentes) unterbrochen wurde, sind nicht in der Lage X-Gal umzusetzen, sie sind weiß („positive“ *E. coli* Klone). Bakterienkolonien, welche ein intaktes lacZ-Gens aufweisen, können X-Gal mit Hilfe der β -Galactosidase umsetzen, es entstehen blaue Reaktionsprodukte. Diese Bakterienkolonien weisen eine blaue Färbung auf.

2.2.3 Isolierung von Plasmid – DNA aus *E. coli* Bakterien

2.2.3.1 Minipräparation von Plasmid-DNA

Zur Analyse einer größeren Anzahl von Transformanden wurde das Kit der Firma Qiagen zur Minipräparation von Plasmid-DNA eingesetzt. Die Präparation erfolgte laut Hersteller-Protokoll. Diese Methode basiert auf einer modifizierten alkalische Lyse von Bakterien, gefolgt von einer selektiven, reversiblen Bindung von Plasmid-DNA an eine Säulenmatrix aus Harz, die nach dem Anionenaustauschprinzip arbeitet. Bei niedrigen Salzkonzentrationen bindet die Plasmid-DNA an die Säulenmatrix. RNA, Proteine und andere niedermolekulare Verunreinigungen werden durch Waschen der Säulenmatrix mit einer Pufferlösung, die eine mittlere Salzkonzentration aufweist, entfernt. Die Plasmid-DNA wird durch einen Puffer mit hoher Salzkonzentration eluiert und durch Isopropanol-Präzipitation entsalzt.

Für die Präparation von Plasmid-DNA wurden einzelne Bakterienkolonien in 10 ml LB-Amp.-Flüssigmedium ÜN bei 37 °C herangezogen (bis zu 16 h) und am folgenden Tag für 10 min. bei 5.000 x g und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in 0,3 ml P1-Puffer vollständig resuspendiert. Der P1-Puffer enthält zur Hydrolyse von RNA RNase A. Durch Zugabe und vorsichtiges Mischen mit 0,3 ml P2-Puffer erfolgte die alkalische Hydrolyse der bakteriellen Zellmembran. Dieser Reaktionsansatz wurde 5 min. bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat mit 0,3 ml eiskaltem P3-Puffer versetzt, erneut vorsichtig gemischt und für 5 min. auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von genomischer DNA, Proteinen sowie Zelltrümmern wurde der Ansatz für 10 min. bei 14.000 – 18.000 x g und 4 °C pelletiert. In der Zwischenzeit wurde jeweils eine Qiagen-tip 20 Säule mit 1 ml QBT-Puffer equilibriert. Der nach der Zentrifugation gewonnene, plasmidhaltige Überstand wurde auf die Säule geladen. Der Durchfluß der Säule wurde verworfen und die an die Matrix gebundene DNA viermal mit 1 ml QC-Puffer gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde dann mit 0,8 ml QF-Puffer eluiert, mit 0,56 ml Isopropanol und mittels Zentrifugation für 30 min. bei 14.000 – 18.000 x g gefällt. Nach Entfernen des Isopropanols wurde die Plasmid-DNA mit 1 ml 70 % igen Ethanol gewaschen, erneut kurz zentrifugiert und das Ethanol dekantiert. Die Plasmid-DNA wurde dann für ca. 10 min. getrocknet, anschließend in ddH₂O (je nach Größe des DNA-Pellets, meist jedoch in 40 µl ddH₂O) gelöst und bis zum weiteren Einsatz bei – 20 °C gelagert.

2.2.3.2 Maxipräparation von Plasmid-DNA

Zur Gewinnung größerer Mengen Plasmid-DNA (z. B. für Transfektionen von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit diesen Konstrukten) wurde ebenfalls ein Kit der Firma Qiagen eingesetzt. Die Präparation der Plasmid-DNA erfolgte laut beiliegendem Protokoll des QIAGEN Plasmid Maxi Kits. Hierbei liegt die für die Minipräparationen von Plasmid-DNA unter 2.2.3.1 beschriebene Methodik zugrunde. Die Puffer P1, P2, P3, QBT, QC, QF kommen hier ebenfalls zum Einsatz. Die Plasmid-DNA-Präparation erfolgte hierbei aus jeweils 2 x 500 ml Bakterienhauptkultur pro Klon. Für die Herstellung der Hauptkultur wurde eine 10 ml LB-Amp.-Vorkultur mit einer Bakterieneinzelkolonie von einer LB-Amp.-Agarplatte angeimpft und unter ständigem Schütteln bis zu 8 h bei 37 °C herangezogen. Die 10 ml LB-Amp.-Vorkultur wurde auf 2 x 500 ml LB-Amp.-Flüssigmedium hälftig verteilt und ÜN bei 37 °C und 250 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch 20-minütige Zentrifugation bei 6000 x g und 4 °C geerntet.

Der Überstand wurde verworfen und die beiden Bakterienpellets des gleichen Klons in 10 ml P1-Puffer vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml P2-Puffer wurde der Ansatz durch Invertieren vorsichtig gemischt und 5 min. bei RT inkubiert. Das Lysat wurde mit 10 ml eiskaltem P3-Puffer versetzt, erneut vorsichtig gemischt und für 20 min. auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung von genomischer DNA, Proteinen sowie Zelltrümmern wurde der Ansatz für 30 min. bei 4 °C und 20.000 x g pelletiert. In der Zwischenzeit wurde jeweils eine Qiagen-tip 500 Säule mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert. Der nach der Zentrifugation gewonnene, plasmidhaltige Überstand wurde auf die Säule geladen, der Durchfluß verworfen und die an die Matrix gebundene DNA zweimal mit jeweils 30 ml QC-Puffer gewaschen. Im Anschluß daran wurde die Plasmid-DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert, mit 10,5 ml Isopropanol und mittels Zentrifugation für 1 h bei 5.000 x g und 4 °C gefällt, mit 5 ml 70 % igem Ethanol gewaschen und erneut 1 h bei 5.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde das Ethanol dekantiert und die DNA für ca. 10 min. getrocknet. Die auf diese Weise präparierte Plasmid-DNA wurde in ddH₂O gelöst (je nach Größe des DNA-Pellets, meist jedoch 150 – 200 µl ddH₂O) und bis zum weiteren Einsatz bei – 20 °C gelagert.

2.2.4 Fällung und Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Fällung von DNA wurde je nach Menge mit Ethanol oder Isopropanol durchgeführt. Zur Anreicherung von DNA aus stark verdünnten Lösungen wurde die Methode der Ethanolfällung gewählt. Dazu wurden die Ansätze mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 5,4) und 2,5 Volumen absolutem Ethanol gemischt, 20 min. bei RT inkubiert und anschließend 45 min. bei 4 °C und 13.000 x g zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde dann mit 1 Volumen 70 % igem Ethanol gewaschen und erneut abzentrifugiert (15 min. bei 4 °C und 13.000 x g). Das Pellet wurde bei RT getrocknet und in einem für die weitere Verwendung adäquaten Volumen ddH₂O aufgenommen. Zur Fällung von größeren DNA-Volumina wurde Isopropanol verwendet. Dazu wurden die Proben mit 0,7 Volumen Isopropanol versetzt, 10 min. bei RT inkubiert und anschließend 30 min. bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die sedimentierte DNA wurde, wie bereits beschrieben, mit 70 % igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in ddH₂O gelöst.

Die daran anschließende Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von DNA-Lösungen erfolgte mittels spektralphotometrischer Messungen sowie analytischer Agarose-Gelelektrophoresen. Spektralphotometrisch wurde die Konzentration von DNA im UV-Bereich bei Wellenlängen von 260 und 280 nm bestimmt. Die $OD_{260\text{ nm}}$ ist dabei ein Maß für die Konzentration an Nukleotiden, während die Absorptionsmessung bei 280 nm einen Aufschluß über die Verunreinigung der Proben mit Proteinen liefert. Beim Erreichen eines Quotienten $A_{260/280}$ von 1,8 für ds DNA entspricht eine Absorptionsänderung von 1 bei $A_{260\text{ nm}}$ einer Konzentration von ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ für ds DNA. Zur Ermittlung der DNA-Konzentration wurden die Proben im Verhältnis von 1 : 100 bzw. 1 : 50 mit ddH_2O verdünnt, in Quarzküvetten überführt und anschließend im Spektralphotometer gemessen.

Bei der Bestimmung der DNA-Konzentration mittels Auftrennung in ethidiumbromidhaltigen 1 – 1,5 % igen Agarosegelen wurde zunächst die Fluoreszenzintensität der Probenbanden mit den Banden eines DNA-Längenstandards bekannter Konzentration (SMART DNA Marker) verglichen und die Konzentration der DNA-Proben auf diese Weise abgeschätzt. Anschließend wurde die abgeschätzte DNA-Menge auf das eingesetzte Probenvolumen bezogen und die Konzentration der Nukleinsäure in $\mu\text{g/ml}$ bzw. $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ errechnet.

2.2.5 Auftrennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel

Die Agarose-Gelelektrophorese basiert darauf, daß Nukleinsäuren bei einem neutralen pH-Wert polyanionisch sind, deshalb wandern die Moleküle im elektrischen Feld auf die positive Elektrode (Anode) zu. Im Agarosegel ist die Migrationsgeschwindigkeit von einer Reihe von Faktoren wie Agarose-Konzentration, Spannung, Ionenstärke, Molekulargewicht und Konformation der DNA abhängig. Kleine, kompakte Moleküle können die Matrix schneller passieren als große.

Für die gelelektrophoretische Auftrennung von DNA wurden 1 – 1,5 % ige TBE-Agarosegele in Horizontalelektrophoresekammern der Firma Biometra verwendet. Die analytische Agarose-Gelelektrophorese wurde, wie bereits oben erwähnt, zur Konzentrationsbestimmung von DNA-Proben sowie zur Überprüfung der Größe von DNA-Fragmenten nach PCR-Reaktionen und DNA-Restriktionen durchgeführt. Dazu wurde die Agarose zunächst in 1 x TBE-Puffer in einer Mikrowelle kurz aufgeköcht und dann unter fließendem Wasser auf ca. 60 °C abgekühlt.

Anschließend wurde die noch flüssige Agarose in den dafür vorgesehenen Gelträger einer Elektrophoresekammer gegossen und der Gelkamm eingesetzt. Nach dem Erstarren des Gels wurde der Kamm vorsichtig entfernt und das Agarosegel mit dem als Laufpuffer dienenden 1 x TBE-Puffer überschichtet. Für analytische Zwecke wurden in der Regel kleine Probenvolumina (5 – 20 µl) verwendet. Die DNA-Proben wurde mit DNA-Ladepuffer (MBI Fermentas) im Verhältnis 1 : 6 (Puffer/DNA) versetzt und nach kurzem Durchmischen in die Geltaschen aufgetragen. Die Auftrennung der DNA erfolgte in der Regel bei einer konstanten Spannung von 100 V innerhalb von 1 – 2 h. Danach wurde das Gel für 10 min. im Ethidiumbromidbad (5 µg/ml Ethidiumbromid in H₂O) unter leichtem Schwenken gefärbt. Die DNA-Banden wurden anschließend mit Hilfe eines UV-Transluminators analysiert und nach Bedarf mit dem Photodokumentationssystem der Firma PeqLab dokumentiert.

Die präparative Agarose-Gelelektrophorese wurde angewandt, um einzelne DNA-Fragmente nach einer Restriktion möglichst rein aus dem jeweiligen Reaktionsansatz zu isolieren und anschließend für weitere Experimente (Ligationen) einsetzen zu können. Zu diesem Zweck wurden die Probetaschen mittels breiterer Kämmen angefertigt und für die DNA-Auftrennung Probenvolumina von 20 µl eingesetzt. Die Elektrophorese erfolgte unter den bereits beschriebenen Bedingungen, Änderungen ergaben sich lediglich bei der Dauer der Auftrennung der DNA und der Spannung während des Gellaufs. Für präparative Zwecke wurde zur Schonung der DNA eine konstante Spannung von 40 – 60 V gewählt und die Auftrennungszeit auf 4 h verlängert. Die ausgewählten DNA-Banden wurden anschließend unter UV-Licht mit einem Skalpel aus dem Agarosegel herauspräpariert, in ein Eppendorfgefäß überführt und direkt weiterverarbeitet (siehe 2.2.6) oder kurzzeitig (bis zu 2 h) bei 4 °C gelagert.

2.2.6 Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde mit dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Der angewandten Methode liegt die selektive und reversible Bindung von DNA an eine Silica-Gel-Membran in Anwesenheit hoher Konzentrationen chaotropher Salze bei neutralem pH-Wert zugrunde. Verunreinigungen werden unter diesen Bedingungen entfernt. Anschließend wird die DNA bei niedrigen Salzkonzentrationen und einem pH-Wert zwischen 7,0 – 8,5 mit ddH₂O oder dem mitgeliefertem EB-Puffer eluiert.

Die aus dem Agarosegel herausgeschnittenen DNA-Fragmente (siehe 2.2.5) wurden zunächst in Eppendorfgefäßen gewogen. Nachdem die Gelvolumina ermittelt worden waren (100 mg = 100 µl), erfolgte die Solubilisierung und Bindung der DNA an eine in einer Säule befindlichen Silica-Gel-Membran. Zur Solubilisierung wurden die herauspräparierten Gelstücke mit dem dreifachen Volumen von QG-Puffer überschichtet und unter ständigem Schütteln für 10 min. bei 50 °C inkubiert. Nach der vollständigen Auflösung der Agarose wurden die DNA-haltigen Proben zur Erhöhung der Ausbeute mit 1 Volumen Isopropanol versetzt, gemischt und zur Bindung der DNA an die Silica-Gel-Membran anschließend auf eine QIAquick Säule geladen und 1 min. bei 13.000 x g und RT zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Um restliche Agarose zu entfernen, wurde die an die Silica-Gel-Membran gebundene DNA mit 0,5 ml QG-Puffer gewaschen, 1 min. bei 13.000 x g und RT zentrifugiert, anschließend wurde der oben beschriebene Waschvorgang mit 0,75 ml PE-Puffer wiederholt. Nach jedem Waschvorgang wurde der Durchfluß verworfen. Die an die Säulenmatrix gebundene DNA wurde durch nochmalige Zentrifugation für 1 min. bei 13.000 x g getrocknet. Um die gebundene DNA von der Säulenmatrix zu eluieren, wurden die Säulen mit 30 µl ddH₂O versetzt, 1 min. bei 13.000 x g zentrifugiert und bei RT getrocknet. Die eluierte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei – 20 °C gelagert.

2.2.7 DNA-Klonierungstechniken

2.2.7.1 Restriktion von DNA mit spezifischen Restriktionsenzymen

Zur DNA-Fragmentanalyse oder zur Isolation spezifischer DNA-Teilabschnitte aus einem DNA-Abschnitt bekannter Sequenz nach einer DNA-Restriktion und gelelektrophoretischer Auftrennung wurden die spezifischen Restriktionsenzyme *EcoR I*, *Hind III*, *Kpn I*, *Sac I* und *Xho I* eingesetzt. Alle erwähnten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Amersham Pharmacia Biotech bezogen. Restriktionen wurden nach Angaben des Enzymherstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer sowie Einhaltung der für das jeweilige Enzym vorgegebenen Inkubationszeiten und Temperaturoptima durchgeführt. Im Fall einer Restriktion mit zwei Enzymen wurde auf kompatible Puffer- und Temperaturbedingungen geachtet.

Die DNA-Restriktionen wurden in der Regel in einem Volumen von 20 µl und bei einer Temperatur von 37 °C durchgeführt. Die Restriktionsdauer betrug zwischen 4 – 12 Stunden. Für die Restriktion von 1 µg DNA wurden 5 U Restriktionsenzym und maximal 5 µg DNA pro Restriktionsansatz eingesetzt. Wurden größere Mengen DNA benötigt, wurde der jeweilige Restriktionsverdau mehrfach angesetzt. Für die Restriktionen wurde meist jeweils nur ein Restriktionsenzym verwendet. Ein Doppelverdau wurde lediglich mit den Restriktionsenzymen *Hind III* und *Xho I* durchgeführt. Beide Restriktionsenzyme besitzen ein Restriktionstemperaturoptimum von 37 °C. Als Puffer für diese Doppelrestriktion fand der One-Phor-All-Puffer Verwendung.

2.2.7.2 Dephosphorylierung von Vektor-DNA

Beim Schneiden eines Vektors mit nur einem Restriktionsenzym entstehen zwei kompatible Enden, die erneut miteinander ligieren können. Die alkalische Phosphatase hydrolysiert im alkalischen Milieu (pH 9,5 – 10,5) Phosphodiesterbindungen am 5'-Ende einer Nukleinsäure, sie entfernt somit Phosphatgruppen von den 5'-Enden und schafft damit freie 5'-OH-Gruppen. Während einer Ligationsreaktion (2.2.7.3) zum Einbau von Fremd-DNA in einen Vektor benötigt die für solche Experimente eingesetzte DNA-Ligase jedoch endständige 5'-Phosphat-Reste. Sowohl die spontane als auch die durch die DNA-Ligase katalysierte Religation des Vektors wird somit durch die Dephosphorylierung des Vektors durch die alkalische Phosphatase verhindert. Das DNA-Fragment, welches mit dem Vektor ligiert werden soll, besitzt noch beide Phosphatreste, so daß die Ligation durchgeführt werden kann.

Die Dephosphorylierung wurde wie folgt durchgeführt: Zu 1 µg Vektor-DNA wurden 2 µl shrimp alkaline phosphatase (SAP)-Puffer (10 x) und 1 µl (1000 U) shrimp alkaline phosphatase hinzugegeben, auf 20 µl mit Aqua ad injectabilia aufgefüllt, durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und für 30 min. bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym für 15 min. bei 68 °C inaktiviert. Die DNA wurde mit Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert, durch 30 minütige Inkubation mit 500 µl absolutem Ethanol bei - 80 °C gefällt und mittels Zentrifugation (1 h, 4 °C, 13 000 x g) pelletiert. Dieses Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes mit 75 % Ethanol gewaschen und erneut mittels Zentrifugation (1 h, 4 °C, 13 000 x g) pelletiert. Nach kurzem Trocknen wurde das Pellet in 10 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen.

2.2.7.3 DNA-Ligationsmethoden

Für die Ligation von DNA in Vektoren wurden zwei verschiedene Methoden eingesetzt. Die erste Klonierungsmethode ist speziell für die Klonierung von PCR-Produkten in einen für PCR-Produkte konstruierten Plasmid-Vektor geeignet. Diese auch als TA-Klonierung bezeichnete Methode macht sich die Tatsache zunutze, daß der pCR^R 2.1-TOPO Vektor einen 3'-Thymidin-Überhang für die Klonierung von PCR-Produkten aufweist und die *Taq*-Polymerase eine Template unabhängige terminale Transferaseaktivität besitzt, die es ihr ermöglicht, Desoxyadenosin an die 3'-Enden der PCR-Produkte zu heften. Bei dem von Invitrogen bezogenen TOPO TA Cloning Kit wird statt einer Ligase, ein mit *Vaccinia* Topoisomerase I aktivierter TA-Vektor (pCR^R 2.1-TOPO Vektor) eingesetzt. Die Topoisomerase I ist dabei kovalent an den pCR^R 2.1-TOPO Vektor gebunden und ermöglicht die Ligation der PCR-Produkte durch Anheftung des terminalen Desoxyadenosins am 3'-Ende der PCR-Produkte an den 3'-Thymidin-Überhang des Vektors. Der Ligationsvorgang dauert nur 5 Minuten. Die gesamte Klonierung und Transformation kann innerhalb von 2 h durchgeführt werden. Für Klonierungen in den pCR^R 2.1-TOPO Vektor wurden jeweils 2 µl eines frischen PCR-Produktes, 1 µl Vektor mit 2 µl sterilem H₂O auf ein Gesamtvolumen von 5 µl aufgefüllt, vorsichtig gemischt und 5 min. bei RT inkubiert, anschließend wurden 2 µl dieser Klonierungsreaktion in chemisch kompetente TOP10 *E. coli* Bakterien transformiert (siehe 2.2.2).

Die zweite Klonierungsmethode umfaßt den Einsatz von restringierten DNA-Fragmenten und deren Ligation in einen Vektor mit Hilfe der T4 DNA-Ligase. Die T4 DNA-Ligase ist ein ATP-abhängiges Enzym, es katalysiert die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxylenden von zwei doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Obwohl die T4 DNA-Ligase am effektivsten Brüche in Fragmenten schließt, die von klebrigen Enden (kohäsiven Enden = sticky ends) zusammengehalten werden, verknüpft sie unter bestimmten Bedingungen auch glatte DNA-Enden (blunt ends). Das Enzym arbeitet am ergiebigsten bei 37 °C. Es wird jedoch in der Regel bei 4 °C – 16 °C eingesetzt, um die kurzen Bereiche der doppelsträngigen DNA, welche die einzelnen Fragmente kohäsiv zusammenhalten, thermisch nicht zu denaturieren. Mit Hilfe dieser Methode wurden restringierte DNA-Fragmente in den für Reportergermanalysen eingesetzten *Firefly*-Luciferase-Reportervektor (pGL₃ b-Vektor) kloniert. Ligationen mit Hilfe der T4 DNA-Ligase wurden mit jeweils 30 – 60 ng restringierter Vektor-DNA und einem drei- bis siebenfachen molaren Überschuß an Insert-DNA unter Verwendung von 10 U T4 DNA-Ligase im mitgelieferten Ligasepuffer durchgeführt. Das Gesamtvolumen des Ligationsansatzes betrug in der Regel 20 µl. Zur Kontrolle wurde stets eine Ligationsprobe ohne Insert eingesetzt. Die Ligationsreaktionen wurden für 18 h bei 16 °C durchgeführt.

2.2.8 Polymerase-Kettenverlängerung (PCR)

2.2.8.1 Amplifikation von DNA durch die Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion (PCR)

Bei der Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion (PCR) (Saiki et al., 1985) handelt es sich um ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation von Nukleinsäure-Bereichen aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen. Der zu amplifizierende DNA-Bereich wird durch zwei Primer-Oligonukleotide festgelegt, die zu Sequenzen einer Template-DNA komplementär sind und diese beidseitig flankieren. Mit Hilfe einer DNA-Polymerase und in Anwesenheit von dNTP's können die Primer-Oligomere verlängert und ein definiertes DNA-Fragment im Verlauf von drei sich ständig wiederholenden Reaktionszyklen (DNA-Denaturierung, Primer-Annealing, Kettenverlängerung (Polymerisation)) exponentiell vermehrt werden. Es gibt verschiedene DNA-Polymerasen wie z. B. die hitzestabile Polymerase aus *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA Polymerase) oder die Platinum *Pfx* DNA Polymerase, die eine *proofreading*-Funktion besitzt und dadurch geringere Fehlerraten garantiert. In der vorliegenden Arbeit wurde die *Taq* DNA Polymerase eingesetzt. Die PCR-Reaktionen wurden in 0,2 ml Eppendorfgefäßen nach dem folgenden Grundschemata angesetzt:

50 µl Standard-Ansatz

DNA:	5,0 µl (1 ng/1µl) Plasmid-DNA mit zu amplifizierenden Insert
10 x PCR-Puffer:	5,0 µl
MgCl ₂ (50 mM):	1,5 µl
dNTP's (2 mmol):	4,0 µl
Primer 1 (10 µM):	1,5 µl
Primer 2 (10 µM):	1,5 µl
<i>Taq</i> DNA-Polymerase:	0,5 µl (2,5 Units)
destilliertes H ₂ O:	auffüllen auf 50 µl

Jede Reaktion wurde mittels einer Negativkontrolle auf eventuelle Kontaminationen überprüft. Dazu wurde die Template-DNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt und zusammen mit den zu untersuchenden Proben in einem PCR-Thermocycler amplifiziert.

Die PCR-Reaktionen zur Generierung des RGS16-Promotorkonstruktes 0,4 kb-*Sac* I wurden mit den Primer sa 4 und sa 6 (siehe 2.1.4) unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

- | | | |
|---|------------------------|-------------|
| 1) initiale DNA-Denaturierung: | 94 °C, 3 min. | |
| 2) DNA-Denaturierung: | 94 °C, 30 sec. | } 30 Zyklen |
| 3) Primer-Annealing: | 57 °C, 30 sec. | |
| 4) Kettenverlängerung (Polymerisation): | 72 °C, 3 min. | |
| 5) Auffüllen von DNA: | 72 °C, 10 min. | |
| 6) Abstoppen der Reaktion: | 4 °C, bis zur Entnahme | |

Variationen der PCR-Bedingungen können sich bei der Annealing Temperatur (3) je nach Basenpaarzusammensetzung der Primer, Dauer der Polymerisation während der einzelnen Zyklen (4) je nach erwarteter Größe des Amplifikationsproduktes (ca. 1 Minute pro 1 kb, in diesem Fall wurden 3 Minuten gewählt) und Anzahl der Zyklenzahl ergeben. Bei Einsatz von genomischer DNA sollte eine höhere Zyklenzahl (ca. 36) gewählt werden als bei Einsatz von Plasmid-DNA.

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden 5 – 10 µl des Reaktionsansatzes in einem 1,5 % igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Gelang die Amplifikation des gewünschten PCR-Fragmentes, so wurde dieses wie unter 2.2.9 beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere Arbeiten zur Verfügung.

2.2.8.2 PCR-basierte Analyse rekombinanter Bakterienklone

Um eine große Anzahl von Transformanten auf das Vorhandensein eines gewünschten Inserts in einem eingesetzten Vektor (in der Regel pCR^R 2.1-TOPO Vektor) zu testen, wurde in der vorliegenden Dissertation eine nach Jesnowski et al. (1995) modifizierte Kolonie-PCR Methode angewandt. Dazu wurden die nach einer Transformation auf LB-Amp.-Agarplatten (zusätzlich mit 40 µl X-Gal (40 mg/ml) beschichteten Agarplatten bei Einsatz des pCR^R 2.1-TOPO Vektors) ÜN gewachsenen Bakterienklone mit sterilen Pipettenspitzen vorsichtig gepickt. Ein Teil des so gewonnenen Zellmaterials wurde in vorbereiteten PCR-Ansätzen resuspendiert und anschließend eine DNA-Amplifikation mit sequenzspezifischen Primern nach dem bereits unter 2.2.8.1 beschriebenen Standard-PCR Protokoll durchgeführt.

Zur Identifizierung rekombinanter Bakterienklone wurde nach Beendigung der PCR-Reaktion jeweils 10 µl des PCR-Ansatzes in einem 1,5 % igen Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Parallel dazu wurden 10 ml LB-Amp.-Flüssigkulturen von jedem „gepickten“ Bakterienklon mit den verbliebenen Bakterienzellen angeimpft und bei 37 °C und 250 rpm für mindestens 8 h kultiviert. Von den positiven Transformanten wurde von der jeweiligen LB-Amp.-Flüssigkultur zunächst ein Glycerolstock (siehe 2.2.1) angelegt und bis zu späteren Verwendung bei – 80 °C gelagert.

2.2.8.3 Primer-Design

Die Polymerase-Kettenverlängerungsreaktion (PCR) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Amplifikation von DNA und zur DNA-Sequenzierung (2.2.10) eingesetzt. Für beide Anwendungen mußten zunächst sequenzspezifische Primer konstruiert werden. Zu diesem Zweck wurde mittels des „Blast Search“ Computerprogramms die vorliegende DNA-Sequenz analysiert und daraufhin die geeigneten Primer ausgewählt. Bei der Konstruktion der Primer wurden folgende Regeln beachtet:

- Länge der Primer = 17 – 48 Nukleotide
- ausgeglichener G/C- zu A/T-Gehalt
- möglichst gleicher Schmelzpunkt (T_m-Temperatur) für beide Primer
- Schmelztemperatur (T_m-Temperatur) zwischen 50 °C und 80 °C
- keine Haarnadelstruktur (besonders am 3´-Ende)
- keine Dimer-Bildung (weder mit sich selbst noch mit dem zweiten Primer)
- keine ungewöhnlichen Basenabfolgen wie poly-A- oder lange G/C-Abschnitte
(verändert nach Lottspeich und Zorbas, 1998)

Die Berechnung der Schmelztemperatur (T_m-Temperatur) der Primer erfolgte nach Lottspeich und Zorbas (1998) nach der Formel:

$$2\text{ °C} \times (\text{Anzahl der Nukleotide A und T}) + 4\text{ °C} \times (\text{Anzahl der Nukleotide G und C})$$

Von dem so errechneten Wert wurden anschließend 5 °C subtrahiert und somit die Annealing Temperatur der Primer abgeschätzt. Die in dieser Arbeit eingesetzten Primer wurden von der Firma MWG bezogen (siehe 2.1.4).

2.2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

Für die Aufreinigung von PCR-Produkten wurde das Rapid PCR Purification System von Marligen Biosciences verwendet. Der hierbei angewandten Methode liegt die reversible und selektive Bindung von doppelsträngiger DNA an eine Silica-Membran zugrunde. Die Absorption der DNA an die Silica-Membran ist von der Pufferzusammensetzung, mit der der PCR-Ansatz verdünnt wird, und von der Temperatur abhängig. DNA Polymerasen, Puffer, Primer und dNTP's werden mit Hilfe eines alkoholehaltenden Waschpuffers entfernt. Die DNA wird anschließend mit mitgelieferten, hochkonzentrierten TE-Puffer eluiert. Die gesamte Aufreinigungsprozedur der PCR-Produkte kann in weniger als 10 min. durchgeführt werden.

Dem jeweiligen PCR-Reaktionsansatz (50 µl) wurden 400 µl H1-Puffer (Binding Solution) hinzugefügt und gut gemischt. Zur Bindung der DNA wurde der so verdünnte PCR-Reaktionsansatz anschließend auf ein Säulchen mit der oben beschriebenen Silica-Membran geladen und bei 13 000 x g und RT für 1 min. zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen. Zur Entfernung von DNA Polymerasen, Puffer, Primer und dNTP's wurde die an die Silica-Membran gebundene DNA mit 700 µl H2-Puffer (Waschpuffer) gewaschen, erneut bei 13 000 x g und RT für 1 min. zentrifugiert. Der Durchfluß wurde verworfen und der oben beschriebene Zentrifugationsvorgang zur Entfernung des restlichen H2-Puffers wiederholt. Abschließend wurde die DNA mit 50 µl 70 °C warmen TE-Puffer mittels 1-minütiger Inkubation bei RT und Zentrifugation (13 000 x g, RT, 2 min.) eluiert.

2.2.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen wurden nach der von Sanger et al. (1977) beschriebenen nicht-radioaktiven Methode mit Hilfe eines automatischen DNA-Sequenzierers im Servicelabor der „DNA/Peptid-Analytik“ Gruppe unter der Leitung von Dr. Friedrich Buck am Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Bei diesem Kettenabbruch-Verfahren werden zusätzlich zu den normalen Desoxy-Nukleosid-Trisphosphaten (dNTP's) 2'3'-Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate (ddNTP's) verwendet. Durch den Einbau der Dideoxynukleotide fehlt die 3'-Hydroxylgruppe für die weitere DNA-Strangsynthese. Es kommt zum Kettenabbruch. Das Konzentrationsverhältnis von normalen Desoxynukleotiden zu Dideoxynukleotiden wird so gewählt, daß die Dideoxynukleotide an verschiedenen Positionen eingebaut werden können.

Dadurch werden unterschiedlich lange Fragmente erzeugt. Mit Hilfe von markierten Primern bzw. Didesoxynukleotiden kann die Sequenz durch gelelektrophoretische Auftrennung in hochauflösenden Polyacrylamid-Sequenzgelen aus diesen direkt abgelesen werden.

Für die Sequenzreaktionen wurden mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte Didesoxynukleotide (ddATP, ddTTP, ddGTP und ddCTP) eingesetzt, es handelt sich also um Sequenzreaktionen mit Dye-Terminatoren. Die Sequenzreaktionen mit den Dye-Terminatoren wurden mit dem ABI PRISM DYE Terminator Reaction Kit durchgeführt. Die für die Sequenzreaktionen benötigten Reagenzien liegen in Form eines bereits kompletten Reaktionsgemisches (Big-Dye) vor. Hinzugegeben werden muß nur noch der Puffer (Half-Therm-Puffer), Primer und Template DNA.

Für die DNA-Sequenzierungsreaktionen wurde grundsätzlich Plasmid-DNA eingesetzt. Sequenzierungen fanden in einem PCR-Gerät unter folgenden Bedingungen statt:

<u>PCR-Ansätze</u>		<u>Sequenzierungsbedingungen</u>
Half-Therm-Puffer:	6,0 µl	1) Denaturierung: 96 °C, 30 sek.
Primer (10 µM):	1,5 µl	2) Primer-Annealing: 50 °C, 30 sek.
Template-DNA:	0,5 µg – 0,7 µg Plasmid-DNA	3) Polymerisation: 60 °C, 4 min.
Big-Dye:	2,0 µl	
H ₂ O:	auffüllen auf 20 µl	

Nach Beendigung der PCR-Reaktion wurden die Ansätze auf 4 °C abgekühlt, mit destilliertem Wasser auf 100 µl aufgefüllt, mit Ethanol (wie unter 2.2.4 beschrieben) gefällt und für die Sequenzanalyse an das bereits erwähnte Servicelabor weitergeleitet. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden anschließend mit dem „Blast Search“ Computerprogramm ausgewertet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten

Die *in vitro* Kultur von Zellen, Geweben und Organen, die direkt aus einem Organismus entnommen werden, wird als Primärkultur bezeichnet. Die für die primäre Zellkultur verwendeten Kardiomyozyten wurden aus den Herzen neonataler Ratten der Rasse Wistar gewonnen. Sie wurden von der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bezogen. Die Muttertiere wurden bei handelsüblichem Laborfutter und Leitungswasser ad libitum gehalten. Die neonatalen Wistar-Ratten waren null (Tag der Geburt) bis drei Tage alt und beiderlei Geschlechts. Die Isolation der Kardiomyozyten erfolgte in Anlehnung an ein von Zimmermann et al. (2000) beschriebenen Protokoll.

Für die Gewinnung von Zellen für die Zellkultur ist eine vollständige Dissoziation des Gewebes bzw. des Organs notwendig. Das Gewebe kann durch mechanische oder enzymatische Dissoziation in Einzelzellen zerlegt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Primärkulturen durch enzymatische Dissoziation des Herzgewebes neonataler Ratten gewonnen. Das Gewebe wurde vor der enzymatischen Behandlung mit einer Schere möglichst fein zerschnitten. Für die enzymatische Dissoziation des Herzgewebes in Einzelzellen wurde Trypsin verwendet. DNase II wird bei der Trypsinierung von Geweben eingesetzt, um freigesetzte DNA, die die Aggregation von Einzelzellen fördert, zu hydrolysieren. Das zerkleinerte Herzgewebe wurde abwechselnd mit Trypsin-Arbeitslösung (siehe 2.1.9 Trypsin-Lösung, Zellpräparation) und DNase II-Arbeitslösung (siehe 2.1.9 DNase II-Lösung, Zellpräparation) behandelt, wobei stets 1 ml weniger DNase II-Arbeitslösung im Vergleich zur Trypsin-Arbeitslösung eingesetzt wurde. Die in der folgenden Beschreibung erwähnten Mengenangaben beziehen sich auf eine Präparation mit ca. 30 – 50 Tieren.

Alle Arbeitsschritte wurden an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt, die Hilfsgeräte autoklaviert oder kommerziell steril verpackt verwendet. Lösungen wurden autoklaviert oder sterilfiltriert.

Die neonatalen Ratten wurden durch Dekapitation getötet, die Herzen nach Öffnung des ventralen Thorax vorsichtig entnommen und in eine Zellkulturschale (10 cm) mit 10 ml sterilem 1x PBS (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung, speziell für die Zellkultur) gegeben. Nach Entfernung der Vörhöfe und der Gefäßreste mit einer Schere, wurden die Herzen in eine weitere Zellkulturschale (10 cm) mit sterilem CBFHH (Calcium- und Bicarbonatfreiem Hanks Puffer mit HEPES) überführt. Nach dem Absaugen des CBFHH wurden die Herzen 2 x mit CBFHH gespült, anschließend, nach vorsichtiger Entfernung der CBFHH-Lösung wurden nochmals ca. 1,5 ml CBFHH hinzupipettiert und das Gewebe mit einer gebogenen Schere fein zerschnitten (ca. 12 min.). Die so gewonnene Gewebelösung wurde mittels einer Pipette mit einer weiten Öffnung (Durchmesser: 3 mm) in ein steriles 50 ml-Falcon Röhrchen überführt, der Überstand nach dem Absetzen des Gewebepellets verworfen und das Pellet in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung für 20 min. bei 4 °C auf einem Coulter Mixer geschwenkt. Der Überstand (enthält vorwiegend Erythrozyten) wurde verworfen. Das Gewebepellet wurde in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung resuspendiert und für 12 min. bei RT auf dem Coulter Mixer geschwenkt. Der Überstand wurde in ein mit 2,5 ml aktivem FCS (4 °C) (aktives FCS führt zur Inaktivierung des Trypsins) gefülltes, steriles Sammelgefäß pipettiert und das Pellet in 9 ml DNase II-Arbeitslösung gelöst. Durch Triturieren der Gewebelösung (27 x) wurde eine gleichmäßige Verteilung der Enzymlösung gewährleistet, außerdem wurde ein Verkleben der zu verdauenden Zellkonglomerate aufgrund der aus den lysierten Zellen ausgetretenen DNA verhindert. Nach Absetzen der Zellen wurde der Überstand in das Sammelgefäß überführt. Der kombinierte Trypsin-DNase II-Verdau wurde unter Volumenverringerung der Trypsin-/DNase-Arbeitslösung, der Trypsin-Expositionszeit und der Überführung der Überstände in das jeweilige Sammelgefäß solange wiederholt, bis das Gewebe fast gänzlich verdaut war und es zu keiner weiteren Trübung des Überstandes (als Ausdruck der aus dem Gewebeverband gelösten Zellen) kam. Die Anzahl der Zyklen und damit die Dauer des Verdaus ließen sich nicht eindeutig festlegen, da diese multifaktoriell beeinflusst wurden (Tieranzahl, Zerkleinerungsgrad des Herzgewebes, Wirksamkeit des Trypsins). Es konnten in der Regel 3 Sammelröhrchen á 50 ml gefüllt werden. Die Sammelröhrchen wurden stets auf Eis gekühlt.

Sie wurden dann in der auf 4 °C vorgekühlten Function Line Laborfuge 400 R bei 600 rpm für 15 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellpellets in jeweils 2 ml Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen (MEM), welches 10 % inaktives FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin enthielt (siehe 2.1.9, Nichtkardiomyozytenmedium), resuspendiert und die Inhalte aller Sammelröhrchen anschließend vereinigt. Die Sammelröhrchen wurden mit jeweils 2 ml Minimum Essential Medium mit Earle´s Salzen (MEM), welches 10 % inaktives FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin enthielt, nachgespült und die Inhalte aller Sammelröhrchen vereinigt. Abschließend wurde dieser Zellsuspension 1/100 DNase II-Stammlösung (siehe 2.1.9) hinzugegeben, die Zellsuspension wurde mit einer weitlumigen Pipette mehrmals trituriert und nochmals in der auf 4 °C vorgekühlten Function Line Laborfuge 400 R bei 600 rpm für 15 Min. zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 24 ml MEM mit Earle´s Salzen und mit 10 % inaktivem FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin aufgenommen. Die Zellsuspension wurde über ein vorher mit MEM befeuchtetes, steriles Zellsieb (60 mesh, Porengröße 230 µm der Firma Sigma) gegeben und zu gleichen Teilen auf drei Zellkulturschalen (10 cm) verteilt. Um die Kardiomyozyten von den Nichtkardiomyozyten (kardiale Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen) zu trennen, wurden die Zellkulturschalen für 1,5 h im Brutschrank bei 37 °C (5 % CO₂, 95 % O₂) inkubiert (Preplating). Diese Zeit war ausreichend, um aufgrund unterschiedlicher Anheftungseigenschaften am Boden der Zellkulturschale eine weitgehende Trennung der Nichtkardiomyozyten von den Kardiomyozyten zu erreichen. Die Nichtkardiomyozyten wuchsen am Schalenboden fest, während die Kardiomyozyten überwiegend frei im Nährmedium schwammen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kardiomyozyten von den Zellkulturschalen durch Abpipettieren des Überstandes und Überführen in eine Zellkulturflasche (80 cm², 260 ml) gewonnen.

Die Bestimmung der absoluten Zellzahl der Kardiomyozyten wurde in einer Neubauer Zählkammer durchgeführt. Die mittlere Ausbeute betrug in der Regel 1,5 – 1,7 x 10⁶ Zellen pro Herz.

2.3.2 Aussäen und Kultivierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten

Die Kardiomyozyten wurden in einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Zellkulturschale (6 cm Durchmesser, für Reporteranalysen mittels Luciferase Assay) und 3×10^6 Zellen pro Zellkulturschale (6 cm Durchmesser, für Western-Blot-Analysen und ELISA) ausgesät. Ihre Kultivierung erfolgte in Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM) mit 10 % inaktivem FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,1 mM 5-Bromo-2-desoxyuridine (BrdU). BrdU ist ein Antimetabolit, ein Thymidinanalog, welches anstelle von Thymidin in die DNA eingebaut wird, zur Blockade der DNA-Synthese und so zur Hemmung der Zellteilung führt. Es wird somit ein Überwachsen der Kardiomyozyten (nicht-proliferierend) durch proliferierende Zellen z. B. noch enthaltende Fibroblasten verhindert. Die Kardiomyozyten waren in der Regel nach einem Tag in Kultur am Boden der Kulturschale festgewachsen und bildeten einen gleichmäßigen Zellrasen. Nach ca. zwei Tagen waren Spontankontraktionen einzelner Kardiomyozyten zu beobachten, die schnell in gleichmäßige Kontraktionen des gesamten Zellrasens übergingen. Der Tag der Präparation wurde als Tag 1 bezeichnet. Medienwechsel wurde alle zwei Tage durchgeführt.

2.3.3 Transfektion der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit RGS16-Promotorkonstrukten

Unter Transfektion versteht man die Übertragung von Fremd-DNA in höhere Zellen. Es gibt verschiedene Transfektionsverfahren (z. B. Mikroinjektion von Fremd-DNA in den Zellkern höherer Zellen (sehr aufwendig), Lipofectamin-Transfektion, Calciumphosphat-Präzipitation). Für die Transfektion der neonatalen Rattenkardiomyozyten mit RGS16-Promotorkonstrukten wurde als Transfektionsmethode die Calciumphosphat-Präzipitation gewählt. Dieser Methode liegt zugrunde, daß unlösliches Calciumphosphat an die aufzunehmende Fremd-DNA bindet. Diese Suspension wird dann zu den Zellkulturen gegeben. Die Calciumphosphat-Kristalle mit gebundener DNA setzen sich auf der Zelloberfläche der höheren Zellen ab und werden durch Endocytose in die Zellen aufgenommen (Knippers, Molekulare Genetik, 1997).

Die Transfektion wurde fünf Tage nach der Präparation der neonatalen Rattenkardiomyozyten (siehe 2.3.1) durchgeführt. Es wurden Primärkulturen neonataler Rattenkardiomyozyten einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Zellkulturschale (Durchmesser: 6 cm) eingesetzt.

Zunächst wurden die Zellkulturschalen 2 x mit Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM) und 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen, anschließend in Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM) mit 5 % inaktivem FCS und 30 mM HEPES überführt und 1 h inkubiert. Es wurden jeweils zwei Zellkulturschalen pro Konstrukt mittels Calciumphosphat-Präzipitation transient transfiziert (Patten et al. 1996).

Für die Transfektion wurden pro zu transfizierendem Konstrukt jeweils zwei Polystyren-Röhrchen vorbereitet:

Das 1. Röhrchen enthielt 275 µl 2 x HBS-Puffer (pH 6,95 – 7,10 !!!) pro Zellkulturschale.

In das 2. Röhrchen wurden :

- equimolare Mengen (4,8 µg – 6,6 µg) des leeren pGL₃b-Reportervektors (*Firefly*-Luciferase-Reportervektor) bzw. der verschiedenen pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukte
- 1 µg pRLTK-Vektor pro Zellkulturschale (zur Überprüfung der Transfektionseffizienz)
- variable Mengen an Lachssperma-DNA um eine Gesamtmenge von 20 µg zu transfizierender DNA pro Zellkulturschale zu erreichen
- 1/10 Volumen CaCl₂ (2,5 M)
- H₂O um ein Endvolumen von 275 µl pro Zellkulturschale zu erreichen

pipettiert. Die einzelnen Komponenten wurden in der folgenden Reihenfolge in das 2. Röhrchen pipettiert: H₂O, DNA (Vektor-DNA, Lachssperma-DNA), CaCl₂.

Der Inhalt des 2. Röhrchens wurde 10 Sekunden gemischt. Unter „Bubbeln“ des 2 x HBS-Puffers wurde der DNA-CaCl₂-Mix (Inhalt des 2. Röhrchens) tropfenweise dem 2 x HBS-Puffer zugesetzt. Das so erhaltene Calciumphosphat-DNA-Präzipitat wurde 10 Sekunden gemischt und für 10 – 15 min. bei RT inkubiert. Jede Zellkulturschale wurde mit jeweils 500 µl des Calciumphosphat-DNA-Präzipitats beschickt. Anschließend wurden die Zellkulturschalen für 2 h im Brutschrank bei 37 °C (5 % CO₂, 95 % O₂) inkubiert. Nach 2 h wurden sie 2 x mit Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM) und 1 % Penicillin/Streptomycin gewaschen, erneut in Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM) mit 5 % inaktivem FCS und 30 mM HEPES überführt. Nach einer 15 – 20 minütigen Inkubation wurde das Medium gegen serumfreies Medium (TIBSA, siehe 2.1.9) mit den Supplementstoffen Insulin, apo-Transferrin und Serumalbumin ausgetauscht (fötales Kälberserum enthält möglicherweise Proteine, die zur Erhöhung der Transkriptionsrate des RGS16-Promotors führen) und die Zellen erneut im Brutschrank inkubiert.

2.3.4 Stimulation der neonatalen Rattenkardiomyozyten

Die Stimulation der neonatalen Rattenkardiomyozyten erfolgte entweder vier Tage nach der Isolation (2.3.1) (Western-Blot-Analysen und ELISA) oder sechs Tage nach der Isolation im Anschluß an die Transfektion (2.3.3) (Reporteranalysen mittels Luciferase Assay). Für Western-Blot-Analysen und ELISA wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten stets in Minimum Essential Medium mit Earle's Salzen (MEM) mit 10 % inaktivem FCS, 1 % Penicillin/Streptomycin und 0,1 mM BrdU kultiviert. Für Reporteranalysen mittels Luciferase Assay wurden die Kardiomyozyten nach der Transfektion in serumfreies Medium (TIBSA, siehe 2.1.9) überführt (vorherige Kultivierung wie unter 2.3.2 beschrieben).

Für Western-Blot-Analysen (2.4.4) wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Induktion der RGS16-Proteinexpression 24 h mit LPS (4 µg/ml Zellkulturmedium) bzw. 72 h mit den Zytokinen, Interleukin-1β (IL-1β; 2 ng/ml Zellkulturmedium) oder rekombinanten Tumornekrosisfaktor α (TNFα; 10 ng/ml Zellkulturmedium), oder als Kontrolle 24 h bzw. 72 h mit NaCl (0,9 %) behandelt. Zur Antagonisierung der Zytokineffekte bzw. der durch LPS vermittelten Effekte wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten 1 h vor der Behandlung mit LPS oder den beiden oben erwähnten Zytokinen mit den spezifischen Antagonisten „Interleukin 1-receptor antagonist“ (IL-1ra; 200 ng/ml Zellkulturmedium) oder „soluble TNF receptor“ (sTNFr; 500 ng/ml Zellkulturmedium) bzw. mit beiden Antagonisten in Kombination oder als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) präinkubiert.

Für ELISA-Analysen (2.4.9) zur Quantifizierung der Zytokine TNFα und IL-1β wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten für 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h mit LPS (4 µg/ml Zellkulturmedium), IL-1β (2 ng/ml Zellkulturmedium) bzw. TNFα (10 ng/ml Zellkulturmedium) oder als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) behandelt.

Für Reporteranalysen zur Ermittlung der RGS16-Promotoraktivität mittels Luciferase Assay wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten für 24 h bzw. 48 h mit LPS (4 µg/ml Zellkulturmedium), IL-1β (10 ng/ml Zellkulturmedium), TNF α (10 ng/ml Zellkulturmedium) oder für 24 h mit fötalem Kälberserum (FCS; 10 % im Kulturmedium, siehe 2.3.2), Sphingosin 1-Phosphat (S1-P; 100 nM; 1 µM; 10 µM; 100 µM) bzw. 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphat (LPA; 100 nM; 1 µM; 10 µM), Triiodthyronin (T₃; 10 ng; 20 ng; 50 ng / ml Zellkulturmedium),

Insulin-like Growth Factor (IGF; 30 ng; 300 ng / ml Zellkulturmedium), Leukaemia Inhibitory Factor (LIF; 10 ng; 100 ng / ml Zellkulturmedium) oder als Kontrolle für 24 h bzw. 48 h mit NaCl (0,9 %) behandelt. Zur Inhibierung der S1-P-Effekte wurden die Kardiomyozyten 1 h vor der Behandlung mit S1-P (24 h; 10 µM) mit Chelethyrin (1 µM) oder Pertussis Toxin (PTX; 3 µg/ml Zellkulturmedium) präinkubiert bzw. als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) behandelt.

2.3.5 Gewinnung von Zelllysaten aus neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Messung der RGS16-Promotoraktivität mittels Luciferase Assay

Die Gewinnung von Zelllysaten aus neonatalen Rattenkardiomyozyten für den Luciferase Assay wurde mit Hilfe des Dual-Luciferase^R Reporter 1000 Assay Systems von Promega durchgeführt. Die Kardiomyozyten wurden im Anschluß an die unter 2.3.4 beschriebene Behandlung (Stimulation der neonatalen Rattenkardiomyozyten) 1 x mit 4 ml kaltem 1 x PBS (speziell für die Zellkultur) gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellkulturschalen zur Lyse der Kardiomyozyten mit jeweils 250 µl kaltem 1 x PLB-Puffer (Passive Lysis Buffer) versetzt. Die Kardiomyozyten wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale entfernt, in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt und gemischt (bis die Suspension homogen war). Zur Verbesserung der Zellyse wurde die so gewonnene Suspension in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Wasserbad bei 37 °C wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde 2 x wiederholt. Die Suspension wurde entweder kurzzeitig bei – 80 °C (bis zu einem Tag) gelagert oder sofort im Luciferase Assay (2.3.6) eingesetzt.

2.3.6 Luciferase Assay

Reportergenanalysen zur Messung von Promotoraktivitäten finden in der Molekularbiologie eine weit verbreitete Anwendung. In der vorliegenden Dissertation wurde die Aktivität des Reporterenzym Luciferase als Maß für die RGS16-Promotoraktivität gemessen. Zur Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurde das Dual Luciferase^R Reporter 1000 Assay System von Promega verwendet. Mit Hilfe dieses Systems können, zur Verbesserung der Meßgenauigkeit, die Aktivitäten von zwei verschiedenen Luciferase-Enzymen innerhalb ein- und derselben Probe durch Biolumineszenzreaktion gemessen werden.

Mittels des pGL₃b-Reportervektors kann nach der Klonierung eines funktionsfähigen Promotors (RGS16-Promotorkonstrukte) in die Multiple Cloning Site des Vektors (siehe 2.2.7.3 DNA-Ligationsmethoden) und anschließende Transfektion in neonatale Rattenkardiomyozyten (siehe 2.3.3) oder andere Zellen das Reporter-gen *Firefly*-Luciferase exprimiert werden. Durch Co-Transfektion eines weiteren Vektors, pRLTK, wird ein zweites Luciferase-Enzym, die *Renilla*-Luciferase konstitutiv exprimiert. Transfektion mit dem pRLTK-Vektor und anschließende Messung der Aktivität der *Renilla*-Luciferase dient der internen Kontrolle der Transfektionseffizienz. Zunächst wird die Aktivität der *Firefly*-Luciferase durch Umsetzung des Luciferase Assay Reagent II (LAR II) gemessen, das Signal wird gequencht und im Anschluß daran wird die Aktivität der *Renilla*-Luciferase durch Umsetzung des Stop & Glo^R Reagent gemessen.

Für den Luciferase Assay wurden die Zellysate aus den neonatalen Rattenkardiomyozyten (siehe 2.3.5) im Verhältnis 1:10 mit ddH₂O verdünnt und 20 µl dieser Verdünnung im Assay eingesetzt. Zur Messung der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase-Aktivität wurde der Lumat LB 9507 (Berthold Technologies) eingesetzt. Dieses Gerät besitzt für die Proben einen Rotor und zwei Kanäle über die die Luciferase Reagenzien, Luciferase Assay Reagent II (LAR II) und Stop & Glo^R Reagent, den Proben automatisch zugeführt werden. Über den ersten Kanal wurde der Probe automatisch ein definiertes Volumen LAR II (100 µl) zugeführt und die *Firefly*-Luciferase-Aktivität als Maß der RGS16-Promotoraktivität gemessen. Anschließend wurde das Signal gequencht und über den zweiten Kanal derselben Probe ein definiertes Volumen Stop & Glo^R Reagent (100 µl) zugeführt und die *Renilla*-Luciferase-Aktivität als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz gemessen. Die Luciferase-Aktivität der einzelnen Proben wird berechnet als Quotient aus *Firefly*-Luciferase-Aktivität / *Renilla*-Luciferase-Aktivität.

2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.4.1 Proteinbestimmung nach Bradford

Proteine können mittels verschiedener Techniken quantifiziert werden. Die heute meist verwendeten Techniken beruhen auf colorimetrischen Messungen. In der vorliegenden Dissertation erfolgte die Proteinbestimmung nach Bradford (1976).

Diese Methode beruht auf einer Komplexbildung zwischen dem blauen Säurefarbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250 mit Proteinen. Bei der Bindung von Coomassie-Brilliantblau G-250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Farbe von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm stellt hierbei ein Maß für die Proteinkonzentration in einer Probenlösung dar (Rehm, 2000). Das Verfahren eignet sich am besten, um Proteinmengen im Bereich von 1 – 10 µg zu bestimmen. Als Eichprotein zur Erstellung einer Standardreihe wurde Rinderserum-Albumin (BSA) eingesetzt. Die Proteinbestimmung wurde mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assays der Firma Bio-Rad durchgeführt.

Vor Beginn der Proteinbestimmung wurde das Bradford-Reagenz zunächst mit ddH₂O im Verhältnis von 1 : 5 verdünnt. Zur Quantifizierung des Proteingehaltes in den zu untersuchenden Proben wurde zunächst eine Standardreihe mit Rinderserum-Albumin (BSA) in den Konzentrationen: Leerwert (reine 0,9% ige NaCl-Lösung), 0,09 mg/ml, 0,18 mg/ml, 0,36 mg/ml, 0,72 mg/ml und 1,44 mg/ml durch Verdünnung mit 0,9% iger NaCl-Lösung hergestellt. Jeweils 100 µl dieser für die Standardreihe angesetzten BSA-Proteinlösungen wurden dann in Reagenzröhrchen mit 1 ml verdünnten Bradford-Reagenz pipettiert, sorgfältig gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Die zu untersuchenden Proteinproben wurden für die Konzentrationbestimmung zunächst mit 0,9% iger NaCl-Lösung im Verhältnis von 1 : 25 bzw. 1 : 40 (Proteinproben nach der Ultrafiltration mittels Centricon-Röhrchen, siehe 2.4.8) und 1 : 10 (Membranproteinlösungen, siehe 2.4.2) verdünnt. Jeweils 100 µl dieser so verdünnten Proteinproben wurden dann in Reagenzröhrchen mit 1 ml verdünnten Bradford-Reagenz versetzt, gut gemischt und für 10 min. bei RT inkubiert. Als Leerwert diente hierbei die zur Verdünnung der Proben verwendete, proteinfreie NaCl-Lösung, welche zuvor im Verhältnis von 1 : 10, 1 : 25 bzw. 1 : 40 mit dem entsprechenden Probenpuffer (1 mM KHCO₃, Lysis-Puffer) verdünnt wurde und dann, wie oben beschrieben, mit 1 ml verdünnten Bradford-Reagenz versetzt und inkubiert wurde. Anschließend wurde die Extinktion der Proteinproben mit dem Smart Spec 3000 Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

Um die Genauigkeit der Konzentrationsbestimmung zu erhöhen, wurde für jede Proteinbestimmung ein doppelter Reaktionsansatz vorbereitet und die Extinktion gemessen (Standardreihe und Proteinproben).

2.4.2 Gewinnung von Membranproteinen für Western-Blot-Analysen

Die Gewinnung von Membranproteinen zur Analyse der RGS16-Proteinexpression beinhaltet die Zellernte der neonatalen Rattenkardiomyozyten, deren Aufschluß mit Hilfe eines Polytrons und die anschließende Zentrifugation zur Gewinnung der Membranproteine. Die Kardiomyozyten wurden im Anschluß an die unter 2.3.4 beschriebene Behandlung (Stimulation der neonatalen Rattenkardiomyozyten) zunächst 2 x mit 4 ml kaltem 1 x PBS (speziell für die Zellkultur) gewaschen und jeweils 5 min. bei RT stehengelassen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellkulturschalen mit jeweils 1 ml 1 mM KHCO₃ (kalt) mit 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail (Protease-Inhibitor-Cocktail, siehe 2.1.9, ist zunächst 25 x, wird in KHCO₃ auf 1 x verdünnt) versetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Zellkulturschale entfernt und in ein Falcon-Tube (15 ml) überführt. Zur Entfernung restlicher Kardiomyozyten wurden die Zellkulturschalen mit jeweils 500 µl 1 mM KHCO₃ (kalt) mit 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail nachgespült und die restlichen Kardiomyozyten ebenfalls in das entsprechende Falcon-Tube überführt. Um eine genügende Menge an Membranproteinen zu isolieren, wurden die Proben von jeweils drei Zellkulturschalen gleicher Behandlung vereinigt. Die so gewonnenen neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend entweder bis zur weiteren Verwendung bei – 80 °C gelagert oder sofort weiterverarbeitet. Zur Weiterverarbeitung wurde die Suspension der Kardiomyozyten auf Eis aufgetaut und in jeweils 1 Nalgene-Zentrifugenröhrchen (16 ml) überführt. Die Membranproteine wurden mit Hilfe eines Polytrons (Polytron Ultra Turrax, T 25 basic, Stufe 5, 2 x 15 Sekunden) gewonnen. Während des Einsatzes des Polytrons wurden die Proben auf Eis gekühlt (sonst starke Erwärmung). Im Anschluß an die Polytronisierung der Proben, wurden diese für 10 min. bei 14 000 x g und 4 °C in der Rotina 35 R zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet (Membranproteine) wurde in 200 µl 1 mM KHCO₃ (kalt) mit 1x Protease-Inhibitor-Cocktail resuspendiert. Nach der Proteinbestimmung (2.4.1) wurden die Proben à 50 µg Protein portioniert.

2.4.3 SDS-PAA-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurde mit Hilfe einer denaturierenden und diskontinuierlichen SDS-PAA-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) durchgeführt. Dieser Methode liegt die Bindung von Proteinen an das Detergens SDS in einem konstanten Ladungs zu Masse-Verhältnis zugrunde. Durch Bindung von SDS, einem anionischen Detergens, an die Proteine liegen die Proteine negativ geladen vor, ihre Tertiär- sowie Sekundärstrukturen werden aufgehoben (Denaturierung der Proteine). In einem elektrischen Feld wandern die negativ geladenen SDS-Protein-Komplexe zur positiven Elektrode (Anode) und werden dabei durch den Siebeffekt der porösen Polyacrylamidgelmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Mittels Längenstandards (Prestained Precision Protein Standard), die zusammen mit den zu untersuchenden Proben die Polyacrylamidgelmatrix durchwandern, können im Anschluß an die Gelelektrophorese die Molekulargewichte der aufgetrennten Proteine ermittelt werden. Das diskontinuierliche Gelsystem setzt sich aus einem Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite (4 %) und einem Trenngel, welches eine geringere Polyacrylamid-Porenweite aufweist, zusammen. Die Proteinproben passieren zunächst das Sammelgel, welches den gleichzeitigen Eintritt aller Proteinproben in das Trenngel ermöglicht. Im Trenngel, welches eine höhere Salzkonzentration und einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel aufweist, werden die Proteine aufgrund ihres Molekulargewichtes aufgetrennt.

Für die SDS-PAA-Gelelektrophorese wurden 4 % ige Sammelgele und 15 % ige Trenngele (siehe 2.1.9) in einem Mini-Protean 3 Cell Proteingel-System (Bio-Rad) hergestellt. Hierzu wurden zunächst seitlich zwischen zwei gereinigten Glasplatten zwei Abstandshalter (Tiefe: 1 mm) positioniert. Diese Vorrichtung wurde dann in einem Gelträger fixiert und zum Gießen des Gels in eine dafür vorgesehene Gießhalterung eingespannt. Das Trenngel wurde bis zu $\frac{3}{4}$ der Höhe der Glasplatten eingefüllt. Das frisch gegossene Trenngel wurde zum Glätten sowie zum Ausschluß von Luftblasen mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Erstarren des Trenngels (ca. 30 min.) wurde die Isopropanolschicht vorsichtig abgegossen, die Gelkante mit ddH₂O ausgespült und mit Filterpapierstreifen getrocknet.

Auf das Trenngel wurde bis zur Oberkante der Glasplatten das Sammelgel gegossen, in welches anschließend ein Kamm zur Generierung von 10 Taschen eingesetzt wurde. Nach der Polymerisation des Sammelgels (ca. 15 min.) wurde der Kamm vorsichtig entfernt.

Die Gelkassetten (2 pro Gellauf) wurden dann in eine Elektrophoresehalterung eingespannt. Der Raum zwischen den beiden Gelkassetten wurde mit PAA-Laufpuffer gefüllt und die gesamte Vorrichtung anschließend in die SDS-Gelelektrophoresekammer eingesetzt. Nachdem die Elektrophoresekammer ebenfalls mit Laufpuffer gefüllt worden war (ca. 1/3 der Kammer), konnten die zu untersuchenden Proben sowie der Längenstandard (Prestained Precision Protein Standard) in die Taschen des Gels aufgetragen werden. Zur Verringerung des Probenvolumens wurden die in 1 mM KHCO₃-Puffer gelösten und à 50 µg portionierten Membranproteinproben vor dem Gelauftrag zunächst 30 min. bei 14 000 x g und 4 °C zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und die Membranproteine (50 µg) in jeweils 10 µl 1 mM KHCO₃ resuspendiert. Die Membranproteinproben wurden dann im Verhältnis 1 : 2 mit 1 x Laemmli-Puffer (siehe 2.1.9) versetzt und zusammen mit dem Längenstandard für 5 min. bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proteinproben und der Längenstandard (Prestained Precision Protein Standard) in die Taschen des Polyacrylamidgels aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 Volt gestartet. Nachdem die Lauffront der Proben das Trenngel erreicht hatte (ca. 30 min.) wurde die Spannung auf 150 Volt erhöht. Nach vollständiger Auftrennung der Proteine wurde das Gel von den Glasplatten gelöst und für Western-Blot-Analysen (2.4.4) eingesetzt.

2.4.4 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blot Verfahrens können gelelektrophoretisch aufgetrennte Proteine (siehe 2.4.3 SDS-PAA-Gelelektrophorese) unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes auf einen geeigneten Trägerfilter z. B. Nitrocellulose oder Nylon übertragen werden. Dabei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei die Proteine auf den Filtern immobilisiert werden. Unter geeigneten Bedingungen bleibt beim Transfer sowohl die Immunreaktivität als auch die funktionelle Aktivität der Proteine erhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden für den Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen Nitrocellulose-Membranen eingesetzt.

Für den Proteintransfer wurde die Mini Trans-Blot-Apparatur der Firma Bio-Rad eingesetzt. Zunächst wurden zwei Filterpapierstücke sowie eine Nitrocellulose-Membran in der Größe des zu analysierenden PAA-Gels zugeschnitten und zusammen mit zwei bereits befeuchteten Blotting-Schwämmen für 5 min. im Blotting-Puffer (siehe 2.1.9) eingeweicht.

Das zu untersuchende Gel wurde unmittelbar nach der Elektrophorese (siehe 2.4.3) von den Glasplatten gelöst und ebenfalls kurzzeitig in den Blotting-Puffer überführt. Im Anschluß hieran wurde die Blotting-Kassette nach dem „Sandwich-Prinzip“ mit einem Schwamm, einem Filterpapier, dem PAA-Gel, der Nitrocellulose-Membran, dem zweiten Filterpapier und dem zweiten Schwamm luftblasenfrei bestückt und nach kräftigem Zusammenpressen senkrecht in eine Blotting-Apparatur eingehängt. Eine Blotting-Apparatur kann zwei Blotting-Kassetten aufnehmen, d. h. es können zwei PAA-Gele pro Elektrotransfer eingesetzt werden. Da die im PAA-Gel aufgetrennten Proteine durch Bindung von SDS negativ geladen sind, mußte die Blotting-Kassette für einen erfolgreichen Proteintransfer mit der Gelseite zur Kathode und mit der Membranseite zur Anode ausgerichtet werden. Die Blotting-Apparatur wurde dann zusammen mit einem Kühlaggregat in eine Blotting-Kammer überführt und diese bis zum Rand mit Blotting-Puffer gefüllt. Der Proteintransfer erfolgte für 1 h und 15 min. bei 110 Volt. Anschließend wurden PAA-Gel und Nitrocellulose-Membran der Blotting-Apparatur entnommen. Das PAA-Gel wurde verworfen und die Nitrocellulose-Membran für die Detektion von Proteinen weiterverwendet (siehe 2.4.5 und 2.4.6).

2.4.5 Ponceaurotfärbung von Proteinen auf Western Blots

Zur Verifizierung des Proteintransfers auf die Nitrocellulose-Membran wurde diese unmittelbar nach dem Western Blot mit dem wasserlöslichen Farbstoffreagenz Ponceau S (siehe 2.1.5), welches Proteine unspezifisch anfärbt, versetzt. Diese als Ponceaurotfärbung bezeichnete Färbemethode erreicht eine Nachweisgrenze von 50 – 150 ng Protein/Bande.

Zum Anfärben der transferierten Proteine wurde die Nitrocellulose-Membran in eine Schale mit ca. 50 ml Ponceau S-Lösung überführt und unter leichtem Schwenken für 5 min. bei RT inkubiert. Nach dem Abgießen und Auffangen des Farbstoffes (Farbstoff kann erneut verwendet werden) wurde die Membran zur Beseitigung der Hintergrundfärbung (Membranabschnitte ohne transferierte Proteine) 3 x kurz mit ddH₂O gewaschen und anschließend für die Dokumentation photokopiert.

Die dokumentierte Ponceaurotfärbung wurde durch Waschen mit ddH₂O und Waschpuffer A (siehe 2.1.9) vollständig entfernt und die Membran für die darauf folgende Immundetektion weiterverwendet.

2.4.6 Immundetektion

Durch Immundetektion können auf einen Trägerfilter (Nitrocellulose-Membran) transferierte Proteine mit Hilfe von enzymgekoppelten Antikörpern und einem ECL-Detektionssystem (siehe 2.1.7, Reaktionskits) sensitiv und spezifisch auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Dieses Nachweisverfahren basiert auf einer Oxidationsreaktion, die von Peroxidase-gekoppelten Antikörpern katalysiert wird. Hierbei wird durch die Oxidation des im ECL-Reagenz befindlichen Luminols in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid mittels der Peroxidase eine Chemilumineszenz ausgelöst, die mit Hilfe von Autoradiographie in Form von Proteinbanden auf einem Röntgenfilm festgehalten werden kann. Grundsätzlich kann entweder bereits der 1. Antikörper enzymgekoppelt (z. B. mit Peroxidase) sein (direkter Nachweis der Proteine auf dem Trägerfilter) oder es wird ein spezifischer 1. Antikörper durch einen enzymgekoppelten Sekundärantikörper (indirekte Nachweismethode) nachgewiesen. Im Rahmen der Dissertation wurden Peroxidase-gekoppelte Sekundärantikörper (Anti-Mouse IgG-HRP und Anti-Rabbit IgG-HRP, siehe 2.1.8 Antikörper und rekombinante Proteine) eingesetzt. Vor der Antikörperbehandlung muß die Nitrocellulose-Membran jedoch mit Blockierungsreagenzien behandelt werden, um unspezifische Bindungen der Antikörper auf der Membran zu verhindern. Es wurden grundsätzlich 50 µg Membranproteine pro Spur für den Immunoblot eingesetzt.

Nach der Entfernung der Ponceaurotfärbung (siehe 2.4.5) wurde der Proteinblot in 5 % igen Blocking-Puffer (siehe 2.1.9) überführt und unter leichtem Schwenken ÜN bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde der Blot zunächst 2 x für 5 min. mit Waschpuffer A (siehe 2.1.9) gewaschen und anschließend durchtrennt. Der jeweils untere Teil des Blots wurde mit einem für RGS16 spezifischen Antikörper (CT 266, siehe 2.1.8 Antikörper und rekombinante Proteine), der das RGS16-Protein bei 32 kDa erkennt, behandelt. Der Antikörper wurde in einem Verhältnis von 1 : 1000 in 1,5 ml Waschpuffer A mit 0,1 % BSA und 0,01 % Natriumazid (verhindert Bakterienwachstum) angesetzt. Der untere Teil des Proteinblots wurde zusammen mit der Antikörperlösung in einer Folie eingeschweißt und unter leichtem Schwenken ÜN bei 4 °C inkubiert.

Zur Normalisierung wurde im jeweils oberen Teil des Immunoblots gleichzeitig, das stets in gleicher Menge unabhängig von der Behandlung (siehe 2.3.4 Stimulation der neonatalen Rattenkardiomyozyten) exprimierte β -Tubulin quantifiziert. Zum Nachweis wurde der für β -Tubulin spezifische monoklonale Antikörper (Anti- β -Tubulin, Monoclonal, siehe 2.1.8 Antikörper und rekombinante Proteine), der eine Bande bei 55 kDa detektiert, eingesetzt. Hierzu wurde der Antikörper in einem Verhältnis von 1 : 750 in 10 ml 5 % igen Blocking-Puffer angesetzt, anschließend wurde der obere Teil des Proteinblots in diese Antikörperlösung transferiert und unter leichtem Schwenken 3 h bei RT inkubiert. Nach der Behandlung mit dem 1. Antikörper (Der für RGS16 spezifische Antikörper (CT 266) wurde zur erneuten Verwendung aufgefangen.) wurde sowohl der obere als auch der untere Teil des Proteinblots zur Entfernung von ungebundenem Antikörper 1 x für 10 min. mit Waschpuffer A, 2 x für 10 min. mit Waschpuffer B und 1 x für 10 min. mit Waschpuffer A gewaschen. Im Anschluß daran erfolgte die Inkubation mit dem 2. Antikörper (Peroxidasegekoppelt). Die Detektion des Anti- β -Tubulin Antikörpers erfolgte mittels Anti-Mouse IgG-HRP und die Detektion des für RGS16 spezifischen Antikörper mittels Anti-Rabbit IgG-HRP. Beide Sekundärantikörper wurden in einem Verhältnis von 1 : 10 000 in 10 ml Waschpuffer A angesetzt. Die einzelnen Proteinblotabschnitte wurden für 2 h bei RT in der jeweiligen Sekundärantikörperlösung inkubiert. Zur Entfernung von ungebundenem Sekundärantikörper wurden die Proteinblotabschnitte, wie oben beschrieben, erneut gewaschen und zur Visualisierung der antikörpermarkierten Proteinbanden für 1 min. mit 3 ml ECL-Lösung (1 Vol. Reagenz 1 + 1 Vol. Reagenz 2) inkubiert und nach Entfernen der ECL-Lösung auf einem Röntgenfilm (1 sek. bis 15 min.) exponiert. Der Film wurde anschließend entwickelt und für die weitere Auswertung (densitometrische Auswertung des Immunoblots mit dem Software-Programm ZeroDScan) im Computer eingescannt.

2.4.7 Gewinnung von Zellkulturüberständen und Proteinhomogenaten aus neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Quantifizierung der Zytokine IL-1 β und TNF α

Für ELISA-Analysen (siehe 2.4.9) zur Quantifizierung der Zytokine TNF α und IL-1 β (in Zellkulturüberständen und zellassoziiert) wurden im Anschluß an die unter 2.3.4 beschriebene Behandlung (Stimulation der neonatalen Rattenkardiomyozyten) jeweils gleiche Mengen (2 ml) Zellkulturüberstand (Zellkulturmedium) entnommen und in jeweils ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (2,0 ml) überführt. Die Zellkulturüberstände wurden nach Konzentrierung der Proteine durch Ultrafiltration (siehe 2.4.8) für ELISA-Analysen eingesetzt. Zur Quantifizierung von zellassoziiertem TNF α oder IL-1 β wurden die Zellkulturschalen nach der Entfernung der Zellkulturüberstände 2 x mit 4 ml kaltem 1x PBS gewaschen. Nach dem Absaugen des PBS wurden die Zellkulturschalen zur Lyse der Kardiomyozyten mit jeweils 300 μ l kaltem Lysis-Puffer mit 1 x Protease-Inhibitor-Cocktail versetzt. Die Kardiomyozyten wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale entfernt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (1,5 ml) überführt. Die so gewonnenen Proteinhomogenate wurden nach Konzentrierung der Proteine durch Ultrafiltration (siehe 2.4.8) und nach der Proteinbestimmung (siehe 2.4.1) für ELISA-Analysen (siehe 2.4.9) eingesetzt.

2.4.8 Konzentrierung von Proteinen durch Ultrafiltration

Die Konzentrierung der beiden Zytokine TNF α und IL-1 β aus Zellkulturüberständen und in Proteinhomogenaten von neonatalen Rattenkardiomyozyten (siehe 2.4.7) erfolgte durch Ultrafiltration mit Hilfe der Centricon- bzw. Microcon-Zentrifugalkonzentratoren der Firma Millipore. Der hierbei eingesetzten Methodik liegt zugrunde, daß die verschiedenen Centricon bzw. Microcon YM-Zentrifugalkonzentratoren (YM-3, YM-10, YM-30, YM-50, YM-100) unterschiedliche molekulare Ausschlußgrenzen aufweisen (3 kDa, 10 kDa, 30 kDa, 50 kDa und 100 kDa). Die Aufkonzentrierung von Proteinen wird erreicht durch Ultrafiltration der Proteine durch eine Membran mittels Zentrifugation, wobei Proteine oberhalb der molekularen Ausschlußgrenze durch die Membran zurückgehalten werden, während niedrigmolekulare Proteine die Membran während der Zentrifugation passieren.

Sowohl TNF α als auch IL-1 β besitzen ein Molekulargewicht von 17 kDa, deshalb wurden zur Konzentrierung dieser beiden Zytokine die Centricon bzw. Microcon YM-10-Zentrifugalkonzentratoren eingesetzt. Für die Konzentrierung von TNF α und IL-1 β in Zellkulturüberständen wurden jeweils 2 ml Zellkulturüberstand eingesetzt, in ein Centricon-Röhrchen pipettiert und für 1 h in einem Festwinkel-Rotor (JA-20, Beckmann-Zentrifuge) bei 5 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Zur Konzentrierung der beiden Zytokine TNF α und IL-1 β in Proteinhomogenaten wurde das gesamte Zelllysate ca. 300 μ l (siehe 2.4.7) eingesetzt, in ein Microcon-Röhrchen pipettiert und für 10 min. bei 5 000 x g und 4 °C in der Rotina 35 R zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation erhaltene Proteinkonzentratmenge betrug jeweils ca. 50 μ l (sowohl aus Zellkulturüberständen als auch aus Proteinhomogenaten). Die Proteinkonzentrate wurden im Anschluß an die Ultrafiltration und nach der Proteinbestimmung (siehe 2.4.1) für ELISA-Analysen (siehe 2.4.9) eingesetzt.

2.4.9 Quantifizierung von TNF α und IL-1 β in Zellkulturüberständen und Proteinhomogenaten mittels enzymgekoppelten Immunoassays (ELISA)

Sowohl für die Quantifizierung von TNF α als auch für IL-1 β in Zellkulturüberständen und Proteinhomogenaten von neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden Reaktionskits der Firma R & D Systems eingesetzt (rat IL-1 β , Quantikine M Colorimetric Sandwich ELISA und rat TNF α , Quantikine P Colorimetric Sandwich ELISA). Beiden Assays liegt die gleiche Methodik zugrunde, sie nutzen eine Sandwich Enzym-Immunoassay Technik zur Quantifizierung der beiden oben erwähnten Zytokine. Standardproteinlösungen, Kontrollen und Proben werden auf eine mit einem immobilisierten Antikörper, der spezifisch ist für Ratten IL-1 β (polyklonaler Antikörper) oder für Ratten TNF α (monoklonaler Antikörper), versehene ELISA-Mikrotiterplatte pipettiert. Durch Waschen der ELISA-Mikrotiterplatte mit einem Waschpuffer werden ungebundene Substanzen entfernt. Im Anschluß daran wird ein mit einem enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper gegen Ratten IL-1 β bzw. Ratten TNF α auf die ELISA-Mikrotiterplatte pipettiert. Durch erneutes Waschen wird ungebundener Antikörper entfernt. Nach diesem Waschschrift wird die ELISA-Mikrotiterplatte mit einer Substratlösung versetzt. Das Substrat kann mit Hilfe des an den polyklonalen Antikörper gekoppelten Enzyms umgesetzt werden. Diese Enzymreaktion liefert ein blaues Reaktionsprodukt, welches nach Zusatz einer Stopplösung gelb wird.

Die Extinktion der gelben Farblösung wird mittels eines ELISA-Plate Readers bei 450 nm gemessen, wobei die Intensität der gemessenen gelben Farbe ein Maß für die Menge des in der Probenlösung befindlichen IL-1 β bzw. TNF α dargestellt.

Vor Beginn des enzymgekoppelten Immunoassays müssen die mit dem jeweiligen Kit mitgelieferten Kontrollen (Ratten IL-1 β -Kontrolle, Ratten TNF α -Kontrolle), der 2. Antikörper (Ratten IL-1 β -Antikörperkonjugat, Ratten TNF α -Antikörperkonjugat), der jeweilige Waschpuffer, die Standardproteinlösungen zur Erstellung einer Eichreihe und die Proben vorbereitet werden.

Die lyophilisiert vorliegenden Kontrollen wurden durch Zusatz von 1 ml ddH₂O rekonstituiert und weisen nach der Rekonstitution eine definierte Konzentration auf (Ratten IL-1 β -Kontrolle: 178 – 298 pg/ml, Ratten TNF α -Kontrolle: 122 – 204 pg/ml). Das Antikörperkonjugat (Ratten IL-1 β -Antikörperkonjugat, Ratten TNF α -Antikörperkonjugat) wurde durch Zusatz von 0,5 ml Konjugat-Konzentrat zu 11 ml Konjugatdiluent vorbereitet. Der jeweilige Waschpuffer wurde als Konzentrat im Kit mitgeliefert und durch Zusatz von 25 ml Waschpufferkonzentrat zu 625 ml ddH₂O vorbereitet. Die Standardproteinlösungen (Ratten IL-1 β -Standardproteinlösung, Ratten TNF α -Standardproteinlösung) wurden durch Rekonstitution des mitgelieferten Standards mit dem jeweiligen Kalibratordiluent und anschließende Verdünnung mit dem Kalibratordiluent vorbereitet und wiesen folgende Konzentrationen auf: Ratten IL-1 β -Standardproteinlösungen: Leerwert (Kalibratordiluent), 31,2 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml, 1000 pg/ml und 2000 pg/ml und Ratten TNF α -Standardproteinlösungen: Leerwert (Kalibratordiluent), 12,5 pg/ml, 25 pg/ml, 50 pg/ml, 100 pg/ml, 200 pg/ml, 400 pg/ml und 800 pg/ml. Die zu untersuchenden Proben wurden mit dem jeweiligen Kalibratordiluent im Verhältnis von 1 : 3; 1 : 5; 1 : 10; 1 : 25 und 1 : 50 verdünnt. Als Leerwert diente der jeweilige proteinfreie Probenpuffer (Lysis-Puffer für Proteinhomogenate) oder Zellkulturmedium (für Zellkulturüberstände). Der Probenpuffer und das Zellkulturmedium wurden im oben angegebenen Verhältnis mit dem jeweiligen Kalibratordiluent verdünnt.

Die ELISA-Mikrotiterplatten wurden durch Zusatz von 50 µl des jeweiligen Assaydiluent pro „Well“ vorbereitet. Im Anschluß daran wurden 50 µl Standardproteinlösung, Kontrolle und verdünnte bzw. unverdünnte Proben in jeweils ein „Well“ pipettiert und 2 h bei RT inkubiert. Nach 2 h wurden die ELISA-Mikrotiterplatten mit jeweils 400 µl Waschpuffer pro „Well“ gewaschen. Der Waschvorgang wurde 4 x wiederholt. Nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers wurden die ELISA-Mikrotiterplatten mit jeweils 100 µl des 2. Antikörpers, des Antikörperkonjugates (Ratten IL-1 β -Antikörperkonjugat, Ratten TNF α -Antikörperkonjugat), pro „Well“ versetzt und erneut 2 h bei RT inkubiert. Dann wurden die ELISA-Mikrotiterplatten, wie bereits oben beschrieben, gewaschen, mit 100 µl Substratlösung pro „Well“ versetzt und unter Lichtausschluß 30 Min. bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden jeweils 100 µl Stopplösung pro „Well“ hinzupipettiert und vorsichtig gemischt. Die Quantifizierung von IL-1 β und TNF α aus den neonatalen Rattenkardiomyozyten erfolgte durch Extinktionsmessung mittels eines ELISA-Plate Readers bei 450 nm. Zur Verbesserung der Meßgenauigkeit wurden alle Quantifizierungen als Doppelbestimmungen durchgeführt.

2.5 Statistik

Alle dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte (MW) \pm Standardabweichung der Mittelwerte (SEM) und wurden mit dem Microsoft-Office-Programm MS-Excel berechnet. Die Anzahl der unabhängigen Experimente wurde mit n bezeichnet. Die statistischen Signifikanzen wurden mit dem ANOVA-Test und dem Student's t-Test für unverbundene oder verbundene Stichproben ermittelt. Ein p -Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant bezeichnet.

3. Ergebnisse

3.0 Überblick

Der Ergebnisteil gliedert sich inhaltlich in drei Abschnitte.

Im ersten Abschnitt (3.1) wird der Einfluß von LPS, TNF α und IL-1 β auf die RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten durch Immunoblotting nachgewiesen und quantifiziert. Mit Hilfe von ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) Experimenten wird die LPS-induzierte Expression und Sekretion von TNF α und IL-1 β in Zellkulturüberständen und Proteinhomogenaten von neonatalen Rattenkardiomyozyten sowie die Regulation der IL-1 β Expression durch TNF α untersucht.

Erst kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe der RGS16-Promotor kloniert. Um die für die RGS16-Promotoraktivität essentiellen Promotorelemente zu ermitteln, wurden im zweiten Abschnitt dieser Arbeit (3.2) verschiedene überlappende, putative RGS16-Promotordeletionskonstrukte hergestellt und zur funktionellen Analyse in einen Luciferase-Reportervektor (pGL₃b) kloniert.

Im dritten Abschnitt (3.3) werden die verschiedenen überlappenden, putativen pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukte nach transienter Transfektion in neonatale Rattenkardiomyozyten mit Hilfe von Reporteranalysen (Luciferase-Assay) auf ihre Promotoraktivität untersucht, um die für die RGS16-Promotoraktivität essentiellen Promotorelemente und die Minimalsequenz, die die RGS16-Promotoraktivität reguliert, zu ermitteln. Anschließend wird die transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors durch LPS, IL-1 β , TNF α , Serum und verschiedene Serumkomponenten wie Triiodthyronin (T₃), Insulin-like Growth Factor (IGF), Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) sowie durch die EDG-Rezeptor (endothelial differentiation gene-encoded receptors) Agonisten, Sphingosin 1-Phosphat (S1-P) und 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphat (LPA), in neonatalen Rattenkardiomyozyten im Luciferase-Assay untersucht. Im Anschluß hieran wird der Signaltransduktionsweg von Sphingosin 1-Phosphat (S1-P), welches die Transkription des RGS16-Promotors in neonatalen Rattenkardiomyozyten reguliert, durch Inhibitionsversuche mit Pertussis Toxin (PTX) und Chelerythrin analysiert.

3.1.1 Einfluß von LPS, TNF α und IL-1 β auf die RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten

In vivo Experimente an adulten Ratten haben gezeigt, daß mehrere Zytokine wie IL-1 β , TNF α , IL-6 und IFN γ sowie die RGS-Proteine, RGS4 und RGS16, nach LPS-Gabe vermehrt im Herzen adulter Ratten exprimiert werden (Patten et al. 2001; Patten et al. 2002). Durch Zellkulturexperimente an neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte nachgewiesen werden, daß die RGS16-Proteinexpression durch LPS sowie durch die Zytokine IL-1 β und TNF α induziert wird, jedoch nicht durch IL-6 und IFN γ (Patten et al. 2003).

Zur Untersuchung, ob LPS direkt oder durch Induktion der beiden Zytokine IL-1 β und TNF α zur Steigerung der RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten führt, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur mit LPS (24 h; 4 μ g/ml) oder mit den beiden Zytokinen, mit rekombinanten TNF α (72 h; 10 ng/ml) und IL-1 β (72 h; 2 ng/ml), oder als Kontrolle mit NaCl (24 h bzw. 72 h; 0,9 %) behandelt. 24-stündige Inkubation mit den beiden oben angeführten Zytokinen zeigte keine Wirkung auf die RGS16-Proteinexpression. Durch Präinkubation mit den spezifischen Antagonisten, „soluble TNF receptor“ (sTNFr; 500 ng/ml) oder „Interleukin 1-receptor antagonist“ (IL-1ra; 200 ng/ml), 1 h vor der Stimulation mit LPS oder den Zytokinen sollten die von LPS, TNF α oder IL-1 β induzierten Effekte inhibiert werden. Im Anschluß an diese Behandlung wurde mit Hilfe von Western-Blot-Analysen die RGS16-Proteinexpression quantifiziert.

Zunächst sollte die TNF α - und IL-1 β -induzierte RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten durch den für TNF α spezifischen Antagonisten, sTNFr, und den für IL-1 β spezifischen Rezeptor-Antagonisten, IL-1ra, inhibiert werden. Abbildung 5 zeigt, übereinstimmend mit bereits in unserer Arbeitsgruppe vorliegenden Daten, die Induktion der RGS16-Proteinexpression durch IL-1 β (1,75 fach \pm 0,12, *p < 0,05 versus NaCl) und TNF α (1,62 fach \pm 0,08, *p < 0,05 versus NaCl) (Patten et al. 2003). Präinkubation mit den jeweils spezifischen Antagonisten IL-1ra (1,22 fach \pm 0,05, #p < 0,05 versus IL-1 β) oder sTNFr (1,21 fach \pm 0,08, +p < 0,05 versus TNF α) führt zur Inhibition der RGS16-Proteinexpression. Dies deutet auf eine rezeptorvermittelte Wirkungsweise der beiden Zytokine TNF α und IL-1 β hin.

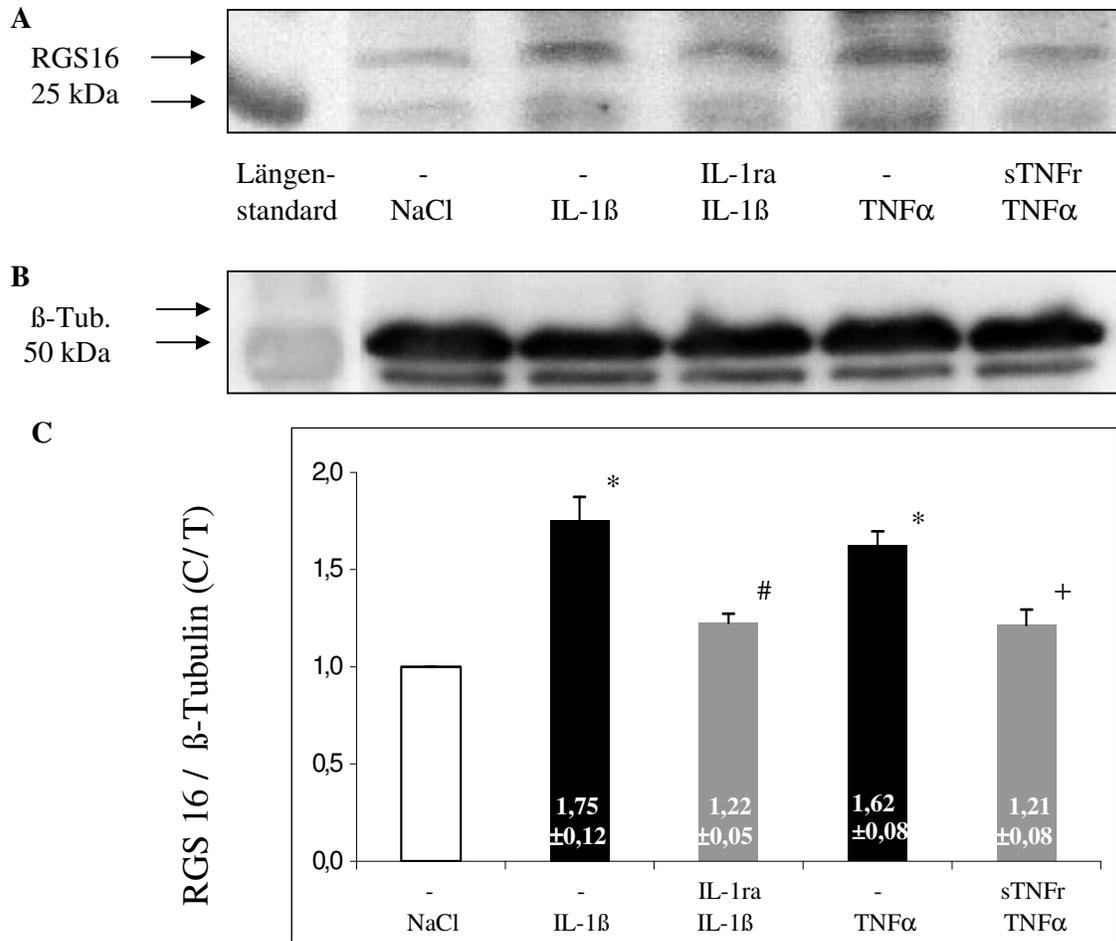


Abbildung 5: Die TNF α - und IL-1 β -induzierte RGS16-Proteinexpression wird durch den jeweils spezifischen Antagonisten, sTNFr oder IL-1ra, inhibiert

Abbildung 5: Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden vier Tage nach der Isolation 72 h mit rekombinanten Tumornekrosistfaktor α (TNF α ; 10 ng/ml) bzw. Interleukin-1 β (IL-1 β ; 2 ng/ml) oder als Kontrolle 72 h mit NaCl (0,9 %) behandelt. Zur Antagonisierung der TNF α - und IL-1 β -Effekte wurden die Kardiomyozyten 1 h vor der Behandlung mit TNF α oder IL-1 β mit ihren spezifischen Antagonisten entweder mit „soluble TNF receptor“ (sTNFr; 500 ng/ml) oder mit „Interleukin 1-receptor antagonist“ (IL-1ra; 200 ng/ml) präinkubiert. Anschließend wurden Membranproteine isoliert. Im Immunoblot wurden 50 μ g Membranproteine pro Spur eingesetzt. Abbildung A zeigt den unteren Teil eines Immunoblots von isolierten Membranproteinen behandelt mit einem spezifischen Antikörper (CT 266, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wieland, Universität Mannheim) für das Membranprotein RGS16, Molekulargewicht: 32 kDa. Abbildung B zeigt den oberen Teil des gleichen Immunoblots, der zur Normalisierung mit einem für β -Tubulin (β -Tub.), Molekulargewicht: 55 kDa, spezifischen Antikörper (Monoclonal Anti- β -Tubulin, Sigma) behandelt wurde. Abbildung C zeigt die densitometrische Auswertung von $n = 5 - 14$ unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Angegeben sind Mittelwerte der mit Zytokinen bzw. mit sTNFr oder IL-1ra und Zytokinen behandelten neonatalen Kardiomyozyten, als Kontrolle dienten mit NaCl (= 1) behandelte neonatale Rattenkardiomyozyten, \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM), * $p < 0,05$ versus NaCl, # $p < 0,05$ versus IL-1 β , + $p < 0,05$ versus TNF α .

Im Anschluß an diese Experimente wurde untersucht, ob die LPS-vermittelte Induktion der RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten ebenfalls durch IL-1ra und sTNFr inhibiert werden kann, ob die stimulatorischen Effekte von LPS also durch Aktivierung von IL-1 β und / oder TNF α vermittelt werden oder ob LPS die RGS16-Proteinexpression direkt induziert.

Abbildung 6 zeigt, in Übereinstimmung mit bereits in unserer Arbeitsgruppe vorliegenden Daten, die Induktion der RGS16-Proteinexpression durch LPS (1,57 fach \pm 0,04, *p < 0,05 versus NaCl) in neonatalen Rattenkardiomyozyten in Zellkultur (Patten et al. 2003). Präinkubation mit dem IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten, IL-1ra (1,17 fach \pm 0,04, #p < 0,05 versus LPS), führt zur Inhibition der LPS-induzierten RGS16-Proteinexpression, wohingegen Präinkubation mit dem TNF α -Antagonisten, sTNFr (1,94 fach \pm 0,16, *p < 0,05 versus NaCl), 1 h vor der Behandlung mit LPS zu einer weiteren Verstärkung der RGS16-Proteinexpression im Vergleich zu alleinig mit LPS behandelten Kardiomyozyten führt. Gleichzeitige Präinkubation mit IL-1ra und sTNFr (1,24 fach \pm 0,07, #p < 0,05 versus LPS) inhibiert die LPS-induzierte RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß LPS durch Aktivierung von IL-1 β die RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten induziert.

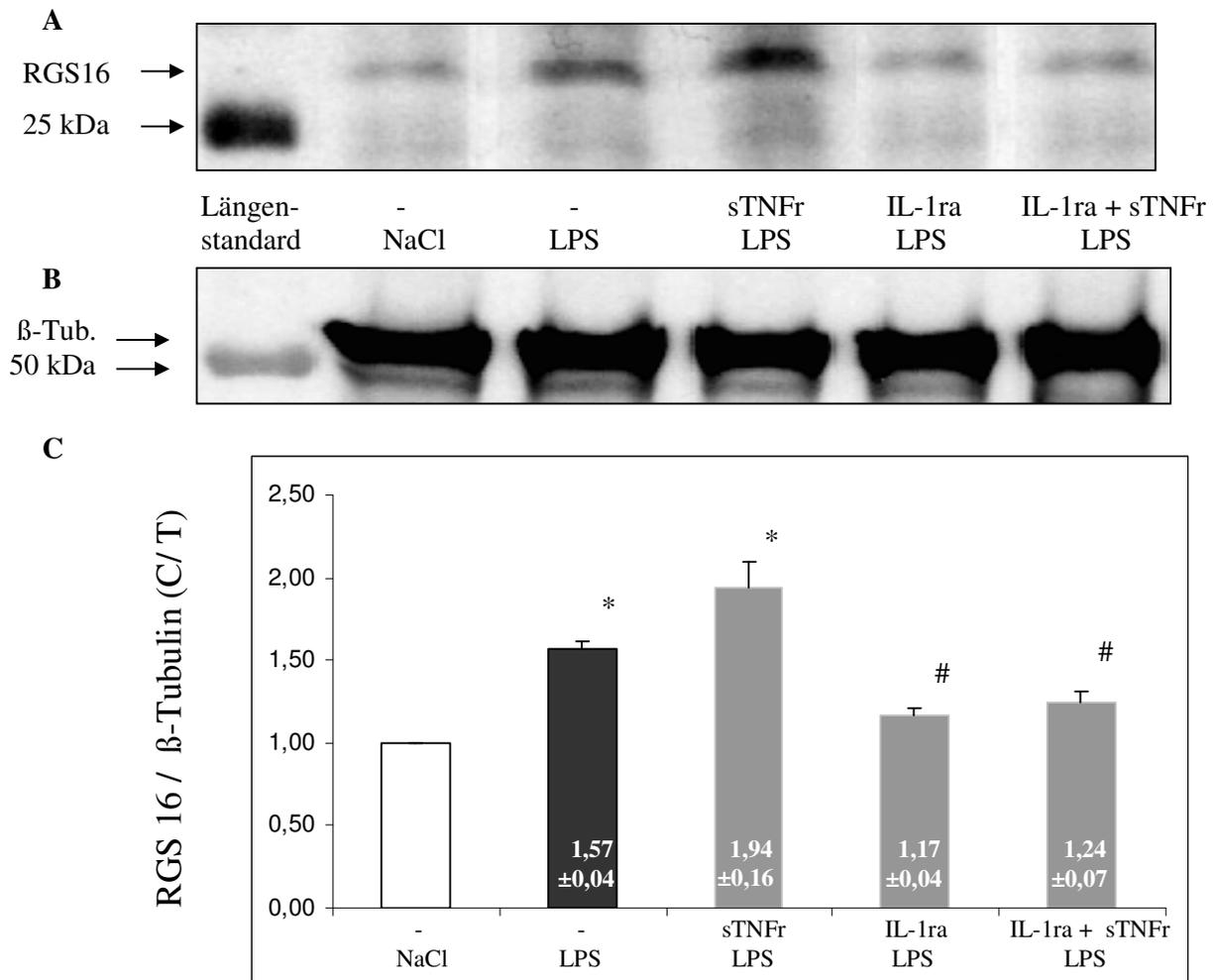


Abbildung 6: Die LPS-induzierte RGS16-Proteinexpression wird durch IL-1ra, jedoch nicht durch sTNFr inhibiert

Abbildung 6: Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden 1 h vor der 24 h-Behandlung mit LPS (4 µg/ml) oder als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) mit den spezifischen Antagonisten entweder mit „soluble TNF receptor“ (sTNFr; 500 ng/ml) oder mit „Interleukin 1-receptor antagonist“ (IL-1ra; 200 ng / ml) allein oder mit „Interleukin 1-receptor antagonist“ (IL-1ra; 200 ng/ml) und „soluble TNF receptor“ (sTNFr; 500 ng/ml) gleichzeitig präinkubiert. Anschließend wurden Membranproteine isoliert. Im Immunoblot wurden 50 µg Membranproteine pro Spur eingesetzt. Abbildung A zeigt den unteren Teil eines Immunoblots von isolierten Membranproteinen behandelt mit einem spezifischen Antikörper (CT 266, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wieland, Universität Mannheim) für das Membranprotein RGS16, Molekulargewicht: 32 kDa. Abbildung B zeigt den oberen Teil des gleichen Immunoblots, der zur Normalisierung mit einem für β-Tubulin (β-Tub.), Molekulargewicht: 55 kDa, spezifischen Antikörper (Monoclonal Anti-β-Tubulin, Sigma) behandelt wurde. Abbildung C zeigt die densitometrische Auswertung von n = 6 – 13 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Angegeben sind Mittelwerte der mit LPS bzw. mit sTNFr oder IL-1ra und LPS oder sTNFr, IL-1ra und LPS behandelten neonatalen Kardiomyozyten, als Kontrolle dienten mit NaCl (=1) behandelte neonatale Rattenkardiomyozyten, ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM), *p < 0,05 versus NaCl, #p < 0,05 versus LPS.

Abschließend für diesen Versuchsteil wurde untersucht, ob die IL-1 β -induzierte RGS16-Proteinexpression durch den TNF α -Antagonisten, sTNFr, und die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression durch den IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten, IL-1ra, inhibiert werden kann. Als Kontrolle für die inhibitorischen Effekte von IL-1ra und sTNFr dienten die Inhibitionen der IL-1 β -Effekte durch IL-1ra und der TNF α -Effekte durch sTNFr.

Abbildung 7 zeigt, wie bereits Abbildung 5, die Induktion der RGS16-Proteinexpression durch IL-1 β und TNF α in neonatalen Rattenkardiomyozyten sowie die Inhibition der IL-1 β - und TNF α -Effekte auf die RGS16-Proteinexpression durch ihren jeweils spezifischen Antagonisten IL-1ra und sTNFr. Interessanterweise läßt sich die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression durch den IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten, IL-1ra (1,15 fach \pm 0,08, +p < 0,05 versus TNF α), inhibieren, während die durch IL-1 β aktivierte RGS16-Proteinexpression nicht durch den TNF α -Antagonisten, sTNFr (1,59 fach \pm 0,003, *p < 0,05 versus NaCl), inhibiert werden kann. Diese Ergebnisse implizieren, daß sowohl die LPS- (Abbildung 6) wie auch die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression über die Aktivierung von IL-1 β vermittelt wird.

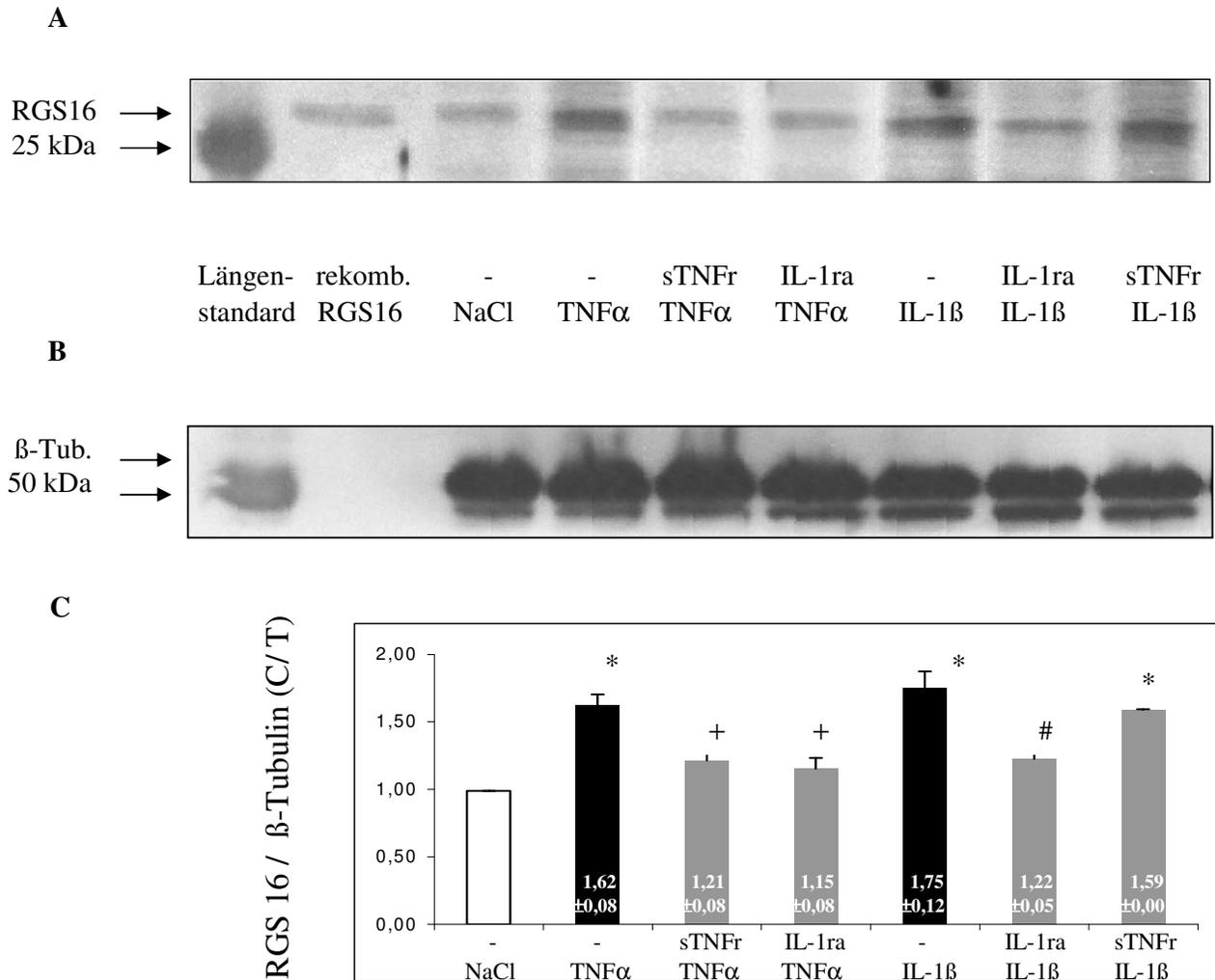


Abbildung 7: Die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression wird durch IL-1ra inhibiert, die IL-1 β -induzierte RGS16-Proteinexpression jedoch nicht durch sTNFr

Abbildung 7: Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden 1 h vor der 72h-Behandlung mit rekombinanten Tumornekrosissfaktor α (TNF α ; 10 ng/ml), Interleukin-1 β (IL-1 β ; 2 ng/ml) bzw. als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) mit den spezifischen Antagonisten entweder mit „soluble TNF receptor“ (sTNFr; 500 ng/ml) oder mit „Interleukin 1-receptor antagonist“ (IL-1ra; 200 ng/ml) präinkubiert. Anschließend wurden Membranproteine isoliert. Im Immunoblot wurden 50 μ g Membranproteine pro Spur eingesetzt. Abbildung A zeigt den unteren Teil eines Immunoblots von isolierten Membranproteinen behandelt mit einem spezifischen Antikörper (CT 266, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Wieland, Universität Mannheim) für das Membranprotein RGS16, Molekulargewicht: 32 kDa. Als Positivkontrolle diente aufgereinigtes, rekombinantes RGS16 (50 ng). Abbildung B zeigt den oberen Teil des gleichen Immunoblots, der zur Normalisierung mit einem für β -Tubulin (β -Tub.), Molekulargewicht: 55 kDa, spezifischen Antikörper (Monoclonal Anti- β -Tubulin, Sigma) behandelt wurde. Abbildung C zeigt die densitometrische Auswertung von n = 5 – 14 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Angegeben sind Mittelwerte der mit Zytokinen bzw. mit IL-1ra oder sTNFr und Zytokinen behandelten neonatalen Kardiomyozyten, als Kontrolle dienten mit NaCl (=1) behandelte neonatale Rattenkardiomyozyten, \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM), *p < 0,05 versus NaCl, #p < 0,05 versus IL-1 β , +p < 0,05 versus TNF α .

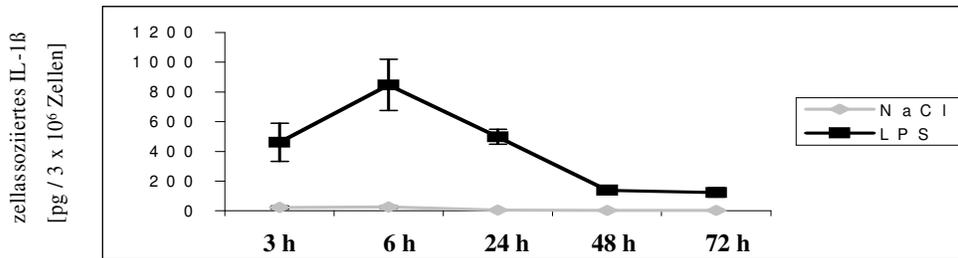
3.1.2 ELISA-Experimente zum Nachweis der Expression und Sekretion von IL-1 β und TNF α in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Mit Hilfe von ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay) Immunoblotting Experimenten sollten die Proteine IL-1 β und TNF α in Zellkulturüberständen und Proteinhomogenaten von neonatalen Rattenkardiomyozyten quantifiziert werden und so untersucht werden, ob LPS die Expression und Sekretion von TNF α und IL-1 β in neonatalen Rattenkardiomyozyten aktiviert und inwieweit TNF α die Expression von IL-1 β reguliert.

Hierzu wurden neonatale Rattenkardiomyozyten vier Tage nach der Isolation zur Induktion der IL-1 β - und TNF α -Proteinexpression und -sekretion 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h mit LPS (4 μ g/ml) bzw. zur Induktion der IL-1 β -Proteinexpression und -sekretion 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h mit TNF α (10 ng/ml) oder als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) behandelt. Anschließend wurden zur Quantifizierung von sezerniertem IL-1 β und TNF α Zellkulturüberstände entnommen und zur Analyse von zellassoziertem IL-1 β und TNF α Proteinhomogenate gewonnen. Der Nachweis von IL-1 β und TNF α in Zellkulturüberständen und Proteinhomogenaten von neonatalen Rattenkardiomyozyten erfolgte mit Hilfe von ELISA-Immunoblotting.

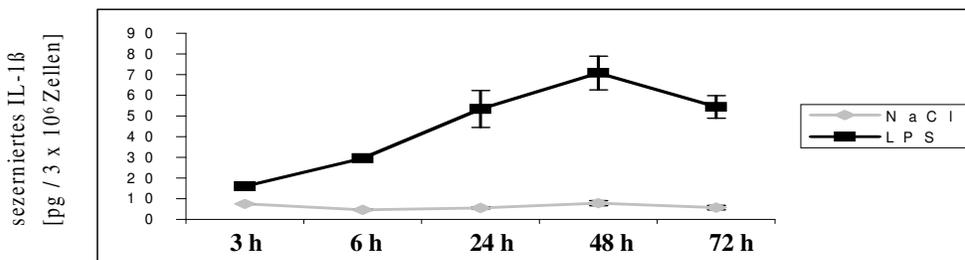
Abbildung 8 zeigt die Induktion der IL-1 β -Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Kardiomyozyten durch LPS. IL-1 β konnte sowohl intrazellulär als auch extrazellulär in geringer Konzentration in mit NaCl behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten nachgewiesen werden. LPS induziert die IL-1 β -Proteinexpression mit einem Maximum von $847,1 \pm 173,1$ pg / 3×10^6 Zellen nach 6 h, gefolgt von einer zeitlich verzögerten IL-1 β -Sekretion mit einem Maximum von $70,8 \pm 8,1$ pg / 3×10^6 Zellen nach 48 h.

A



Inkubation	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
NaCl	23,1 ± 10,8	25,9 ± 7,9	4,8 ± 0,4	3,5 ± 1,3	2,3 ± 0,6
LPS	461,5 ± 128,8	847,1 ± 173,1	498,6 ± 50,6	138,5 ± 18,8	123,8 ± 31,5

B



Inkubation	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
NaCl	7,4 ± 0,2	4,5 ± 0,3	5,5 ± 0,5	7,8 ± 1,2	5,6 ± 1,1
LPS	15,9 ± 0,5	29,5 ± 0,5	53,3 ± 8,9	70,8 ± 8,1	54,4 ± 5,5

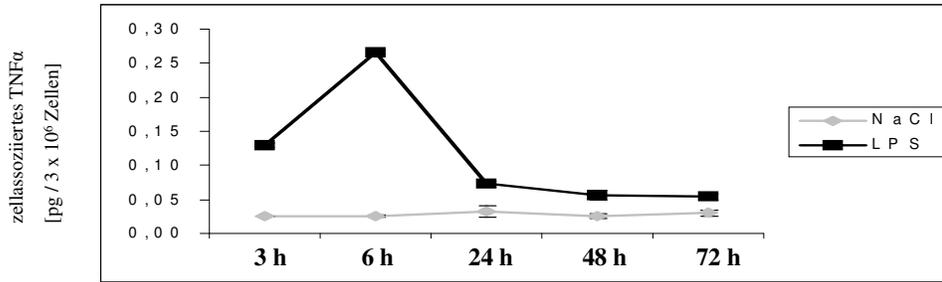
Abbildung 8: LPS stimuliert zeitabhängig die IL-1β-Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Abbildung 8: Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden vier Tage nach der Isolation 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h mit LPS (4µg/ml) oder als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) behandelt. Zur Untersuchung der IL-1β-Proteinsekretion wurden jeweils gleiche Mengen an Zellkulturmedium pro Zellkulturschale entnommen. Zur Analyse von zellassoziertem IL-1β wurden Proteinhomogenate gewonnen. Sowohl die intrazellulären IL-1β-Proteinkonzentrationen als auch die extrazellulären IL-1β-Proteinkonzentrationen wurden mit ELISA-Immunoblotting bestimmt. Abbildung 8 A zeigt die intrazellulären IL-1β-Proteinkonzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte dargestellt als [pg] Protein / Gesamtprotein / Zellkulturschale (3 x 10⁶ Zellen) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 2 – 4 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Abbildung 8 B zeigt die extrazellulären IL-1β-Proteinkonzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte dargestellt als [pg] Protein / Zellkulturschale (3 x 10⁶ Zellen) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 2 – 4 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

In Abbildung 9 wird die durch LPS aktivierte TNF α -Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten gezeigt. Im Gegensatz zur LPS-induzierten IL-1 β -Proteinexpression ist intrazelluläres TNF α sowohl in mit LPS als auch in mit NaCl behandelten neonatalen Kardiomyozyten kaum nachweisbar. Es konnte jedoch eine durch LPS induzierte TNF α -Proteinsekretion mit einem Maximum von $653,9 \pm 36,3$ pg / Zellkulturschale nach 6 h nachgewiesen werden.

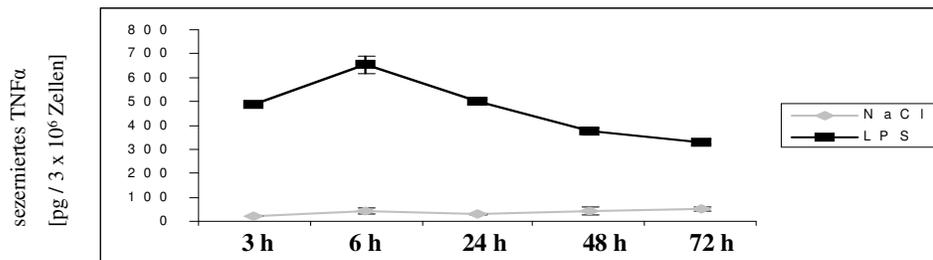
Die Inhibition der von TNF α aktivierten RGS16-Proteinexpression durch den IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten, IL-1ra (Abbildung 7), deutet darauf hin, daß IL-1 β zu den von TNF α induzierten Effekten in neonatalen Rattenkardiomyozyten beiträgt. Deshalb wurde untersucht, ob TNF α die IL-1 β -Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten induziert. Abbildung 10 zeigt die von TNF α aktivierte IL-1 β -Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Sowohl die Induktion der IL-1 β -Proteinexpression durch TNF α , Maximum $365,9 \pm 16,5$ pg / Zellkulturschale nach 6 h, als auch die IL-1 β -Proteinsekretion liegen deutlich unter der von LPS aktivierten IL-1 β -Proteinexpression und -sekretion (Abbildung 8), sind jedoch zu allen Meßzeitpunkten nachweisbar.

A



Inkubation	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
NaCl	0,03 ± 0,001	0,03 ± 0,001	0,03 ± 0,009	0,03 ± 0,004	0,03 ± 0,004
LPS	0,13 ± 0,003	0,27 ± 0,003	0,07 ± 0,005	0,06 ± 0,007	0,05 ± 0,005

B

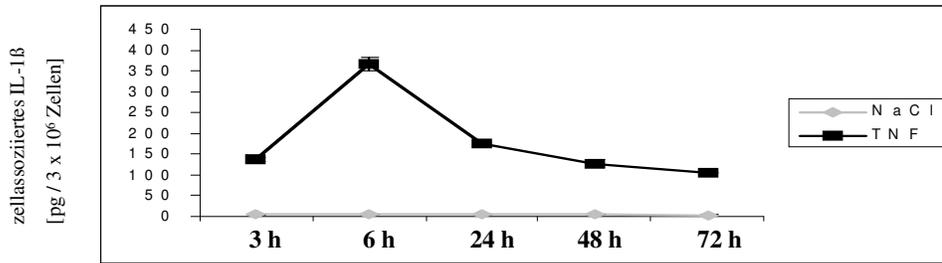


Inkubation	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
NaCl	21,7 ± 1,2	44,1 ± 13,3	29,4 ± 2,3	43,1 ± 15,6	49,6 ± 8,9
LPS	488,2 ± 6,6	653,9 ± 36,3	498,8 ± 8,5	374,4 ± 13,6	331,5 ± 11,1

Abbildung 9: LPS stimuliert zeitabhängig die TNFα-Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten

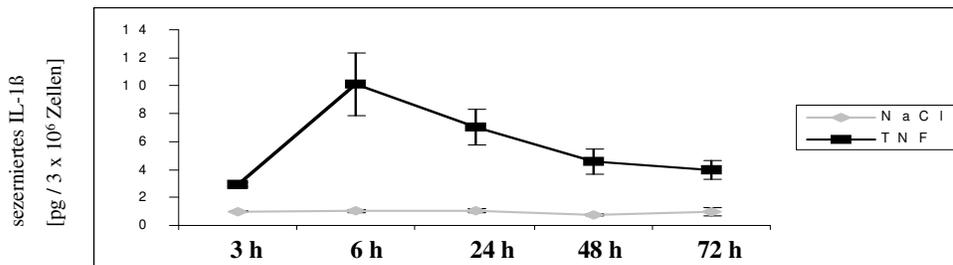
Abbildung 9: Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden vier Tage nach der Isolation 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h mit LPS (4µg/ml) oder als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) behandelt. Zur Untersuchung der TNFα-Proteinsekretion wurden jeweils gleiche Mengen an Zellkulturmedium pro Zellkulturschale entnommen. Zur Analyse von zellassoziiertem TNFα wurden Proteinhomogenate gewonnen. Sowohl die intrazellulären TNFα-Proteinkonzentrationen als auch die extrazellulären TNFα-Proteinkonzentrationen wurden mit ELISA-Immunoblotting bestimmt. Abbildung 9 A zeigt die intrazellulären TNFα-Proteinkonzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte dargestellt als [pg] Protein / Gesamtprotein / Zellkulturschale (3 x 10⁶ Zellen) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 2 – 4 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Abbildung 9 B zeigt die extrazellulären TNFα-Proteinkonzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte dargestellt als [pg] Protein / Zellkulturschale (3 x 10⁶ Zellen) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 2 – 4 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

A



Inkubation	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
NaCl	4,1 ± 0,4	4,9 ± 0,4	5,6 ± 0,2	4,9 ± 0,4	4,0 ± 0,2
TNFα	137,7 ± 6,2	365,9 ± 16,5	174,3 ± 4,2	127,8 ± 9,8	104,8 ± 0,13

B



Inkubation	3 h	6 h	24 h	48 h	72 h
NaCl	1,0 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,3
TNFα	2,9 ± 0,2	10,1 ± 2,2	7,1 ± 1,3	4,6 ± 0,9	3,9 ± 0,7

Abbildung 10: TNFα aktiviert die IL-1β-Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Abbildung 10: Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden vier Tage nach der Isolation 3 h, 6 h, 24 h, 48 h und 72 h mit TNFα (10 ng/ml) oder als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) behandelt. Zur Untersuchung der IL-1β-Proteinsekretion wurden jeweils gleiche Mengen an Zellkulturmedium pro Zellkulturschale entnommen. Zur Analyse von zellassoziertem IL-1β wurden Proteinhomogenate gewonnen. Sowohl die intrazellulären IL-1β-Proteinkonzentrationen als auch die extrazellulären IL-1β-Proteinkonzentrationen wurden mit ELISA-Immunoblotting bestimmt. Abbildung 10 A zeigt die intrazellulären IL-1β-Proteinkonzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte dargestellt als [pg] Protein / Gesamtprotein / Zellkulturschale (3 x 10⁶ Zellen) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 2 – 4 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung. Abbildung 10 B zeigt die extrazellulären IL-1β-Proteinkonzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte dargestellt als [pg] Protein / Zellkulturschale (3 x 10⁶ Zellen) ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 2 – 4 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

Ein Einfluß von IL-1 β auf die TNF α -Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.1:

1. Die durch IL-1 β und TNF α induzierte RGS16-Proteinexpression kann durch den jeweils spezifischen Antagonisten, IL-1ra oder sTNFr, inhibiert werden, womit gezeigt wurde, daß diese beiden Zytokine rezeptorvermittelt wirken.
2. Die Aktivierung der RGS16-Proteinexpression durch LPS kann durch den IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten, IL-1ra, inhibiert werden, jedoch nicht durch den TNF α -Antagonisten, sTNFr. Dies deutet darauf hin, daß die LPS-induzierte RGS16-Proteinexpression durch Aktivierung von IL-1 β vermittelt wird.
3. Die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression kann ebenfalls durch IL-1ra inhibiert werden. Daraus kann geschlossen werden, daß nicht nur die durch LPS aktivierte RGS16-Proteinexpression, sondern auch die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression durch Aktivierung von IL-1 β vermittelt wird.
4. LPS induziert die IL-1 β -Proteinexpression / -sekretion und die TNF α -Proteinexpression / -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten.
5. TNF α aktiviert die IL-1 β -Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten, während eine Induktion von TNF α durch IL-1 β nicht nachgewiesen werden konnte.

3.2 Herstellung und Klonierung überlappender, putativer RGS16-Promotordeletionskonstrukte

Die Induktion von RGS-Proteinen im Herzen scheint eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz zu spielen (Mittmann et al. 2002). Durch *in vivo* Experimente an adulten Ratten konnte gezeigt werden, daß sowohl RGS4 als auch RGS16 im Rahmen einer durch LPS vermittelten akut entzündlichen Herzinsuffizienz rasch induziert werden (Patten et al. 2002). Auch Zellkulturexperimente an neonatalen Rattenkardiomyozyten haben gezeigt, daß die RGS16-Proteinexpression durch LPS sowie durch die beiden Zytokine IL-1 β und TNF α induziert wird (Patten et al. 2003). Erst kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe der RGS16-Promotor kloniert. Da bisher nur sehr wenig über die transkriptionelle Regulation der RGS-Proteine im Herzen bekannt ist, wurde der RGS16-Promotor exemplarisch untersucht. Hierzu wurden überlappende, putative RGS16-Promotordeletionskonstrukte hergestellt (Abschnitt 3.2), um anschließend durch Bestimmung der Promotoraktivität der einzelnen Konstrukte, die für die RGS16-Promotoraktivität essentiellen Promotorelemente zu ermitteln sowie die transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors zu untersuchen (Abschnitt 3.3).

3.2.1 Klonierungsstrategie

An dieser Stelle soll zunächst ein grober Überblick über die Klonierungsstrategie gegeben werden. Die Herstellung der einzelnen putativen RGS16-Promotordeletionskonstrukte wird später genauer beschrieben.

Der RGS16-Promotor wurde aus genomischer Maus-RGS16 DNA mit Hilfe des Genome Walker™ Kits der Firma Clontech hergestellt. Mit Hilfe dieser PCR-basierten Methode wurde ausgehend von bekannten DNA-Sequenzabschnitten aus dem Exon 1 des entsprechenden Gens der RGS16-Promotor amplifiziert. Er wurde dann in einen speziell für PCR-Produkte konstruierten PCR-Vektor (pCR^R2.1-TOPO 3,9 kb-Vektor, Invitrogen) kloniert und in *E. coli* Bakterien vermehrt. Nach der Gewinnung dieses Konstruktes und Sequenzanalyse der klonierten DNA-Abschnitte, wurde der RGS16-Promotor anschließend mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem pCR^R2.1-TOPO Vektor wieder herausgeschnitten und zur näheren Untersuchung der Promotoraktivität schließlich in die Multiple Cloning Site eines Reportervektors subkloniert und in *E. coli* Bakterien vermehrt. Der RGS16-Promotor lag zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns vor.

Mit Hilfe des Sequencher DNA^R Softwareprogrammes konnten folgende potentielle regulatorische Promotorelemente ermittelt werden: drei putative TATA-Boxen, zwei putative CCAAT-Boxen sowie ein Sequenzmotiv, welches Homologie zur Konsensussequenz (CCT)AANATGGNC/G der Bindestelle des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Yin Yang 1 (YY1) aufweist (Lee et al. 1992). YY1 ist ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, der entweder als Aktivator oder als Repressor in verschiedenen Promotoren fungiert (Shrivastava et al. 1994; Natesan et al. 1995; Hyde-DeRuyscher et al. 1995). Zur Ermittlung der TATA-Box unter den drei putativen TATA-Boxen sowie zur Bestimmung weiterer für die RGS16-Promotoraktivität essentieller Promotorelemente wurden mehrere putative RGS16-Promotordeletionskonstrukte hergestellt. Sie wurden durch Eliminierung fest definierter DNA-Abschnitte mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus einem bereits vorliegenden Konstrukt oder durch PCR generiert. Die Überprüfung der einzelnen Konstrukte erfolgte durch Sequenzierung und Restriktion mit spezifischen Restriktionsenzymen. Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung des RGS16-Promotors sowie die Lage der putativen RGS16-Promotordeletionskonstrukte.

Für die Klonierung und Funktionsanalyse des RGS16-Promotors sowie der putativen RGS16-Promotordeletionskonstrukte wurde der *Firefly*-Luciferase-Reportervektor (pGL₃b^R, Promega), mit dessen Hilfe die *Firefly*-Luciferase exprimiert wird, eingesetzt. Die Auswahl dieses Reportervektors wird an späterer Stelle erläutert. In Abbildung 12 werden die für die Klonierungsexperimente eingesetzten Plasmid-Vektoren gezeigt. Abbildung 12 A zeigt den speziell für PCR-Produkte konstruierten pCR^R2.1-TOPO 3,9 kb Vektor (Invitrogen), in Abbildung 12 B ist der *Firefly*-Luciferase-Reportervektor (pGL₃b^R, Promega) dargestellt. Abbildung 13 zeigt schematisch die angewandte Klonierungsstrategie.

Die in Abbildung 11 dargestellten, mit Hilfe des Sequencher DNA^R Softwareprogrammes ermittelten, potentiellen regulatorischen Promotorelemente des RGS16-Promotors wurden zur Auswahl der Lage der Deletionskonstrukte zugrunde gelegt.

RGS16-Promotor (1,8 kb-*Kpn I*) im pGL₃b Vektor

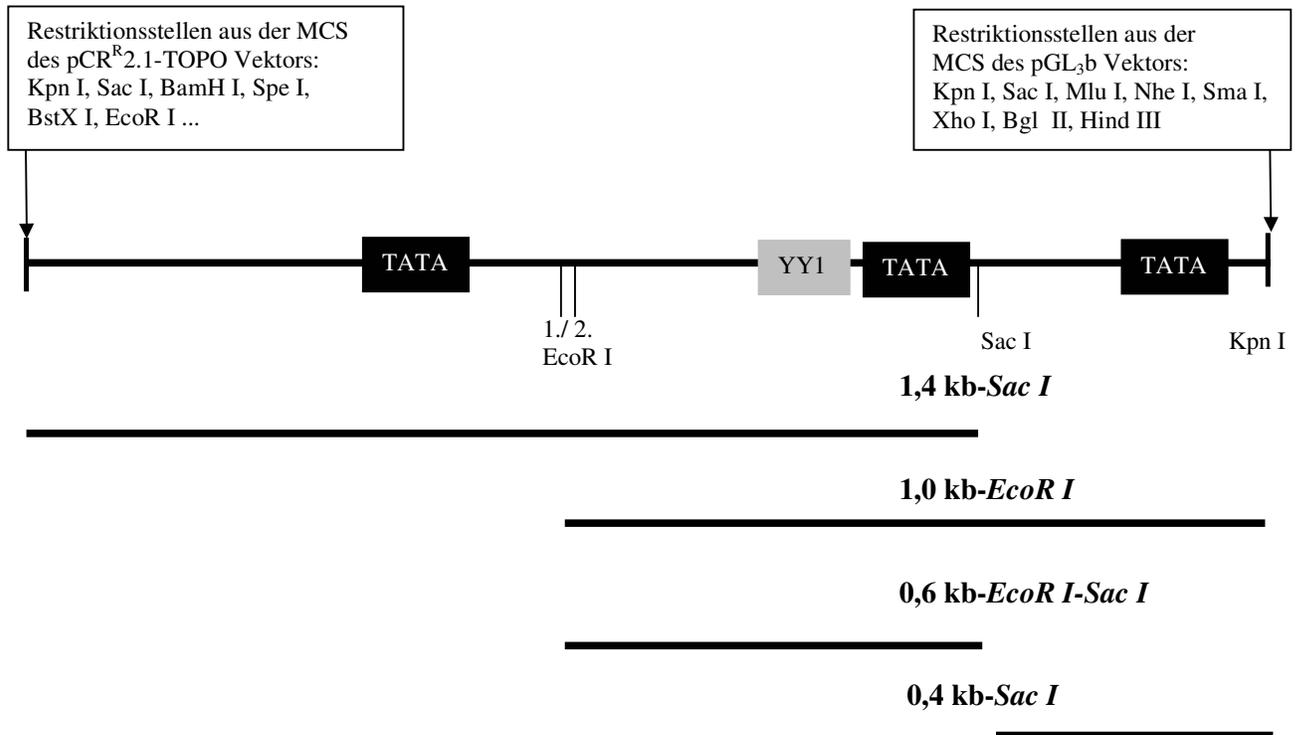


Abbildung 11: Schematische Darstellung des RGS16-Promotors und Lage der RGS16-Promotordeletionskonstrukte

Abbildung 11 zeigt eine schematische Darstellung des RGS16-Promotors, Bezeichnung: RGS16-Promotorkonstrukt 1,8 kb-*Kpn I*, mit wichtigen regulatorischen Elementen eines Promotors, putative TATA-Boxen und putative Yin Yang 1 (YY1)-Bindestelle sowie für die Generierung der RGS16-Promotordeletionskonstrukte wichtige Restriktionsstellen. Die Lage und die Länge der vier RGS16-Promotordeletionskonstrukte ist schematisch dargestellt. MCS, Multiple Cloning Site

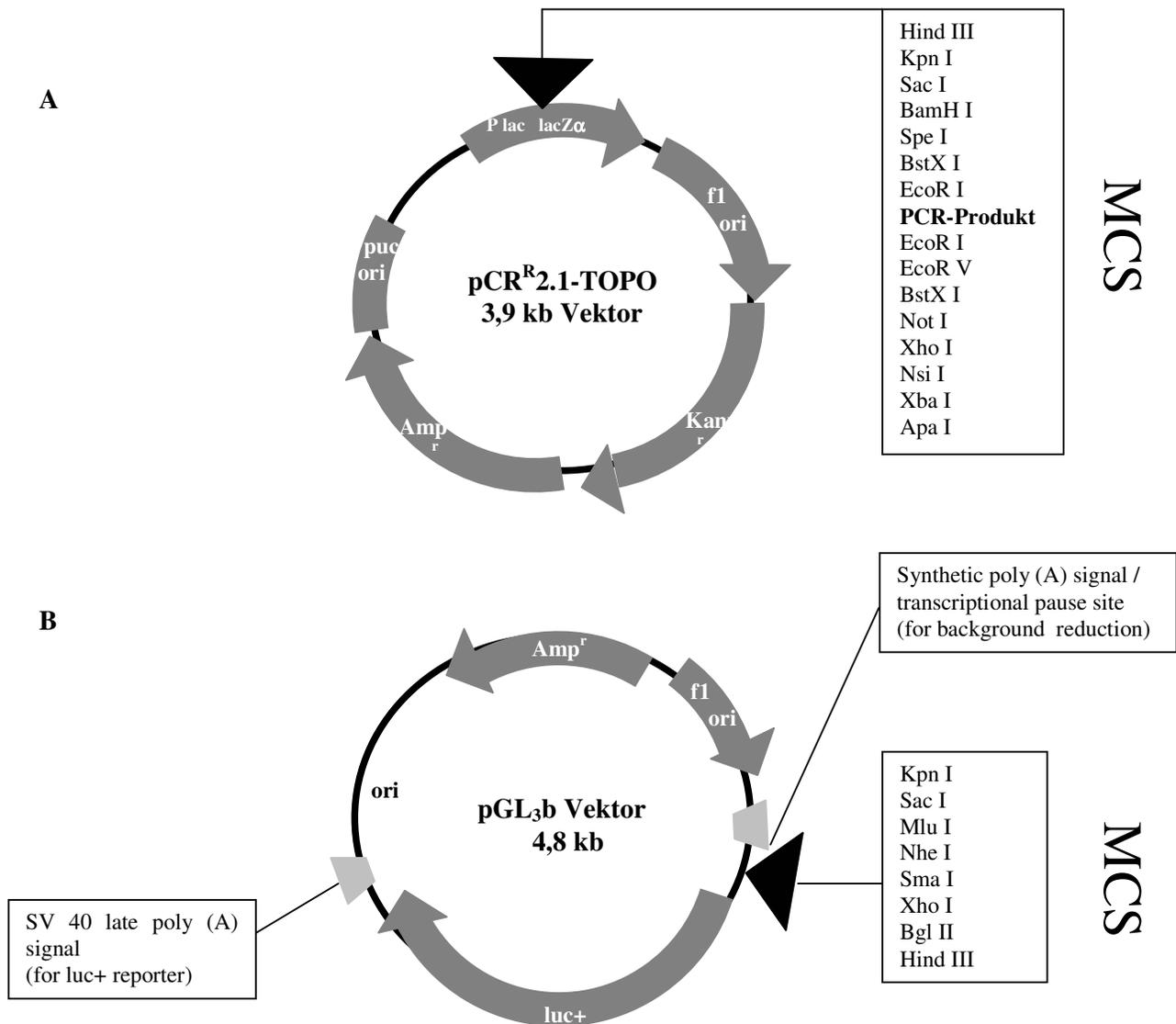


Abbildung 12: Klonierungsvektoren

Abbildung 12 zeigt die für die Klonierungsexperimente eingesetzten Plasmid-Vektoren. In Abbildung A ist der speziell für die Klonierung von PCR-Produkten geeignete PCR-Vektor, pCR^R 2.1-TOPO 3,9 kb Vektor von Invitrogen, dargestellt. Dieser Vektor enthält für die Blau / Weiß Selektion „positiver“ *E. coli* Klone das lacZ α -Gen, welches für die β -Galactosidase kodiert. Die β -Galactosidase setzt Lactose zu Galactose und Glucose um. Agarplatten enthalten für die Blau / Weiß Selektion 5-Brom-4-Chlor-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal), welches nach Hydrolyse durch die β -Galactosidase farbige (blaue) Reaktionsprodukte liefert. „Negative“ *E. coli* Bakterien, welche den PCR-Vektor ohne Insert enthalten, besitzen ein intaktes lacZ α -Gen und können X-Gal umsetzen, sie zeigen eine blaue Färbung. „Positive“ *E. coli* Bakterien, welche den PCR-Vektor mit dem gewünschten Insert enthalten, besitzen kein intaktes lacZ α -Gen und sind somit nicht in der Lage X-Gal umzusetzen, sie zeigen keine Färbung (sind weiß). Abbildung B zeigt den pGL₃b Reportervektor von Promega mit dessen Hilfe die *Firefly*-Luciferase exprimiert werden kann. Dieser Vektor wurde für die Bestimmung der Promotoraktivität putativer RGS16-Promotorkonstrukte eingesetzt. Amp^r, Ampicillinresistenzgen; Kan^r, Kanamycinresistenzgen; P lac, Locus des lacZ α -Gens; lacZ α , codiert für die β -Galactosidase; luc+, Luciferasereporter; MCS, Multiple Cloning Site; ori, Initiationspunkt für die Replikation.

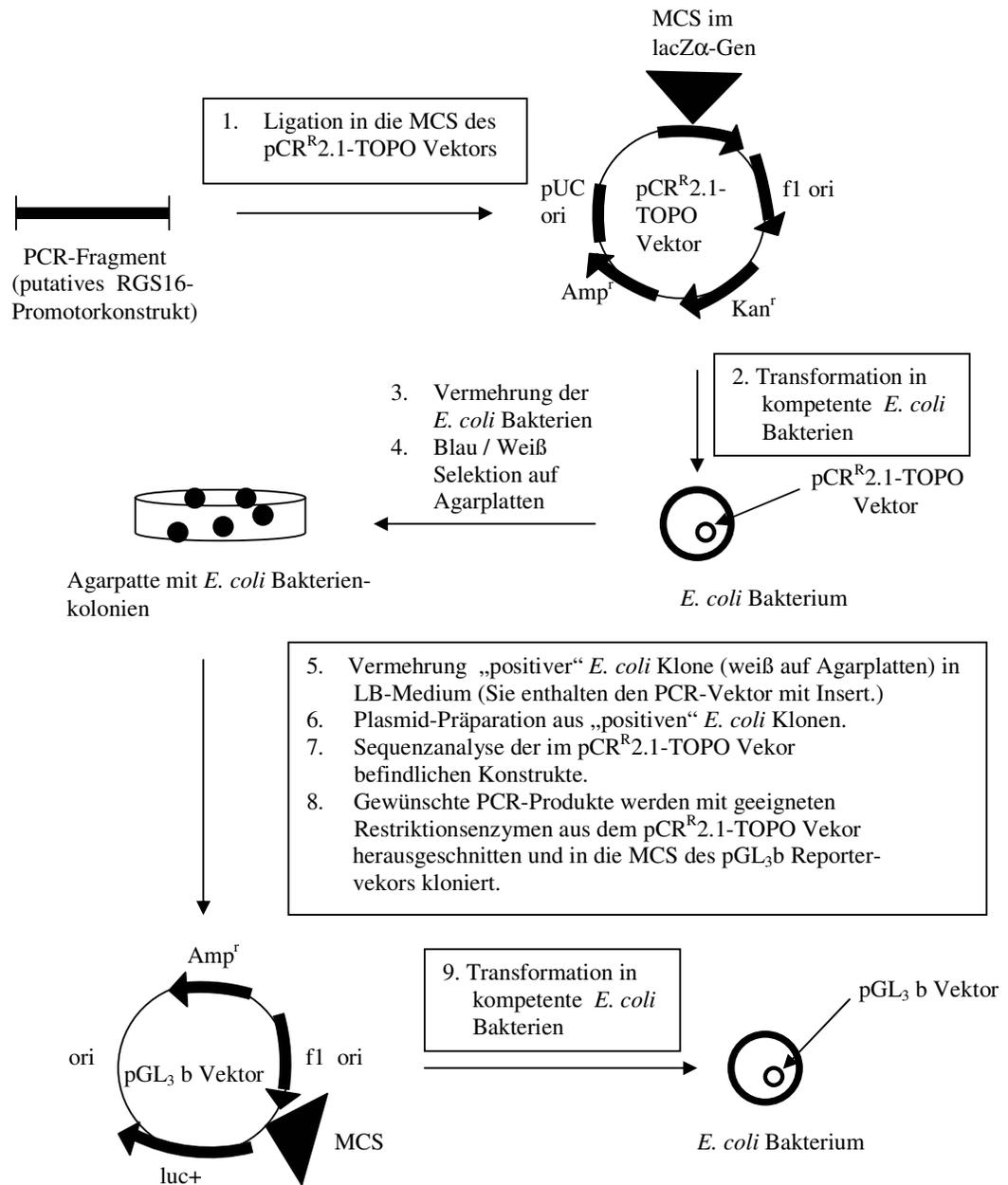


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Klonierungsstrategie

Durch PCR erhaltene putative RGS16-Promotorkonstrukte wurden in die Multiple Cloning Site des speziell für PCR-Produkte geeigneten pCR^R 2.1-TOPO Vektor kloniert. Anschließend wurden kompetente *E. coli* Bakterienzellen mit diesen Konstrukten transformiert, vermehrt und auf X-Gal enthaltende Agarplatten ausplattiert. Durch Blau / Weiß Selektion wurden „positive“ *E. coli* Bakterien (weiße Färbung) selektiert, sie enthalten den pCR^R 2.1-TOPO Vektor mit einem PCR-Produkt. Diese *E. coli* Bakterien wurden in LB-Medium vermehrt. Durch Plasmid-Präparation wurden die Konstrukte aus den Bakterien gewonnen, Sequenzanalysen durchgeführt und gewünschte PCR-Produkte mit geeigneten Restriktionsenzymen aus dem pCR^R 2.1-TOPO Vektor herausgeschnitten und in die Multiple Cloning Site des pGL₃b Reportervektor kloniert. Wiederum wurden kompetente *E. coli* Bakterien mit den so erhaltenen Konstrukten transformiert, vermehrt, Plasmid-Präparationen und anschließend Sequenzanalysen durchgeführt. Amp^r, Ampicillinresistenzgen; Kan^r, Kanamycinresistenzgen; lacZ α , codiert für die β -Galactosidase; luc+, Luciferasereportergen; MCS, Multiple Cloning Site; ori, Initiationspunkt für die Replikation.

3.2.2 Herstellung der RGS16-Promotordeletionskonstrukte

Das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,4 kb-*Sac I* (Lage, Abbildung 11) wurde durch Restriktionsverdau des pGL₃b-RGS16-Promotorkonstruktes 1,8 kb-*Kpn I* mit *Sac I* hergestellt. Abbildung 14 A zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau mit *Sac I* in einem 1 % igen Agarosegel. Neben der Vektor-DNA-Bande wurden zwei weitere Banden bei 1,4 kb und 388 bp detektiert. Die 1,4 kb lange Bande und die Vektor-DNA-Bande wurden durch Gelelution aus dem Agarosegel gewonnen. Der mit *Sac I* geöffnete Vektor wurde zur Verhinderung seiner Re-Ligation dephosphoryliert. Das 1,4 kb lange DNA-Fragment wurde anschließend wieder mit dem pGL₃b Vektor ligiert.

Zur Kontrolle des Ligationserfolges und der Orientierung des Deletionskonstruktes 1,4 kb-*Sac I* im pGL₃b Vektor wurde sowohl eine Sequenzierung mit den vektor-spezifischen Primern: RVprimer3 / GLprimer2 und genspezifischen Primern (siehe Material und Methoden, 2.1.4) als auch eine Restriktion mit *EcoR I* (Lage der Restriktionsstellen, siehe Abbildung 11) durchgeführt. Bei richtiger Orientierung des Deletionskonstruktes 1,4 kb-*Sac I* sollte nach der Restriktion mit *EcoR I* neben der Vektor-DNA-Bande eine Bande bei 718 bp im Agarosegel detektiert werden können. Falsche Orientierung sollte neben der Vektor-DNA-Bande eine Bande bei 632 bp im Agarosegel zeigen. Sequenzierung und die in Abbildung 14 B gezeigte Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente in einem 1,5 % igen Agarosegel nach der Restriktion des im pGL₃b Reportervektor befindlichen Deletionskonstruktes 1,4 kb-*Sac I* mit *EcoR I* zeigten die richtige Orientierung dieses Konstruktes im pGL₃b Vektor. Das Konstrukt wurde für weitere Experimente eingesetzt.

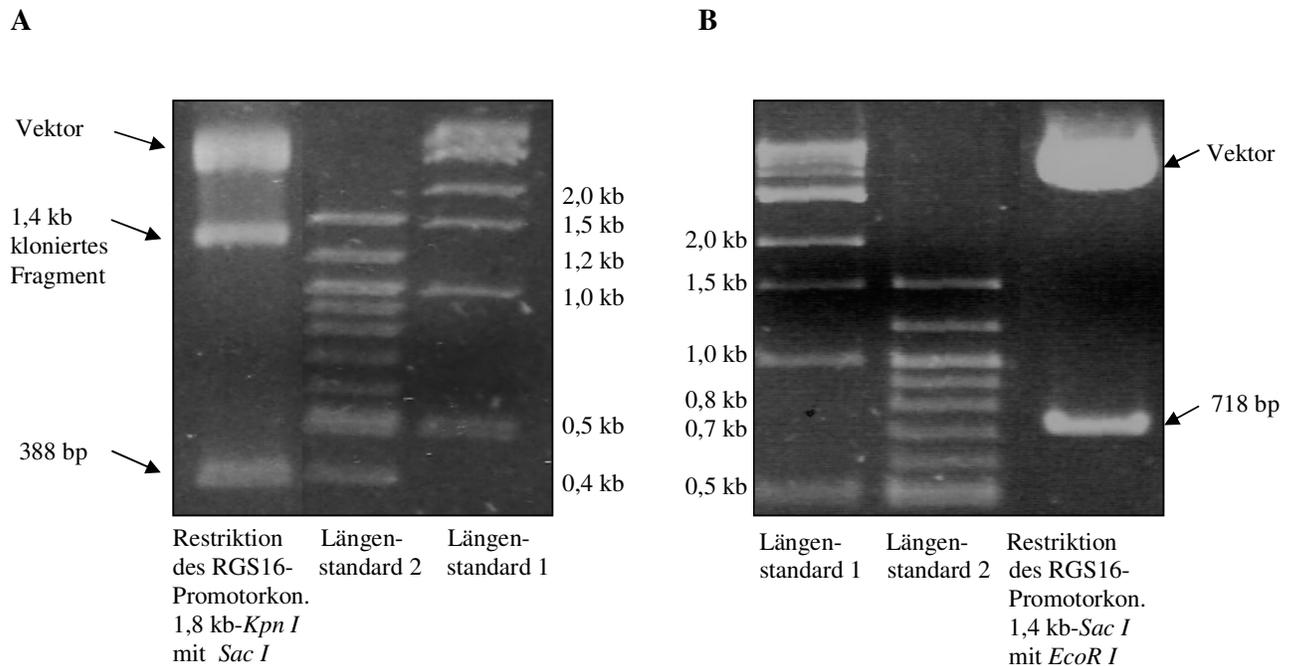


Abbildung 14: Herstellung und Kontrollverdau des RGS16-Promotordeletionskonstruktes 1,4 kb-*Sac I*

Abbildung 14 A zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente des pGL₃b-RGS16-Promotorkonstruktes 1,8 kb-*Kpn I* in einem 1 % igen Agarosegel nach Restriktionsverdau mit *Sac I*. Neben der Vektor-DNA-Bande können zwei weitere Banden bei 1,4 kb und 388 bp detektiert werden. Die Vektor-DNA-Bande und die 1,4 kb lange Bande wurden durch Gelelution aus dem Agarosegel gewonnen. Das 1,4 kb lange Fragment wurde in den pGL₃b Vektor religiert. Abbildung 14 B zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente des im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 1,4 kb-*Sac I* in einem 1,5 % igen Agarosegel nach Restriktionsverdau mit *EcoR I*. Bei richtiger Orientierung des Deletionskonstruktes im Vektor kann, wie oben gezeigt, neben der Vektor-DNA-Bande eine Bande bei 718 bp im Agarosegel detektiert werden. Als Längenstandard 1 diente der 1 kb DNA Ladder (Biolabs), Längenstandard 2 ist der 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

Das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,0 kb-*EcoR I* (Lage, Abbildung 11) wurde durch Restriktionsverdau des pGL₃b-RGS16-Promotorkonstruktes 1,8 kb-*Kpn I* mit *EcoR I* (Lage der Restriktionsstellen, siehe Abbildung 11) hergestellt. Abbildung 15 A zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau mit *EcoR I* in einem 1 % igen Agarosegel. Im Agarosegel konnten zwei Banden, eine Bande bei ~6 kb (Vektor mit gewünschtem Insert) und eine Bande bei 718 bp detektiert werden. Die ~6 kb lange Bande wurde durch Gelelution aus dem Agarosegel gewonnen und anschließend wieder religiert.

Zur Kontrolle wurde eine Restriktion mit *Kpn I* durchgeführt, bei der das gesamte Insert, 1021 bp, aus dem pGL₃b Vektor herausgeschnitten wird. In Abbildung 15 B wird die Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente in einem 1,5 % igen Agarosegel nach der Restriktion des im pGL₃b Reportervektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 1,0 kb-*EcoR I* mit *Kpn I* gezeigt. Neben der Vektor-DNA-Bande wurde eine 1021 bp lange Bande im Agarosegel detektiert. Dieses Konstrukt wurde für weitere Experimente eingesetzt.

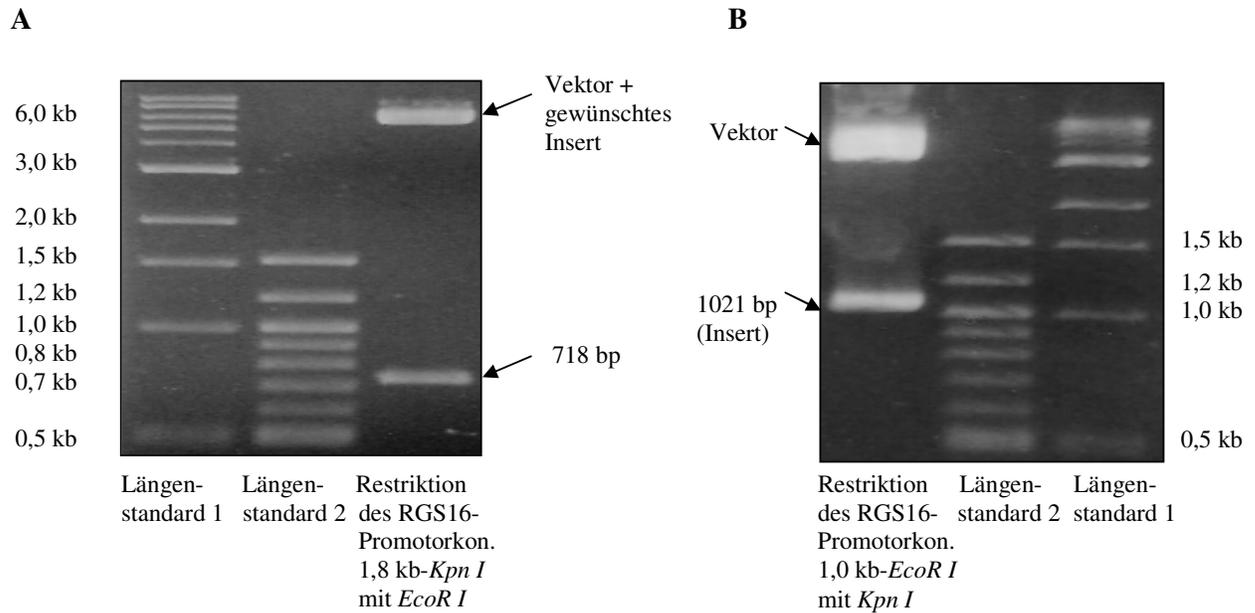


Abbildung 15: Herstellung und Kontrollverdau des RGS16-Promotordeletionskonstruktes 1,0 kb-*EcoR I*

Abbildung 15 A zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente des pGL₃b-RGS16-Promotor-konstruktes 1,8 kb-*Kpn I* in einem 1 % igen Agarosegel nach Restriktionsverdau mit *EcoR I*. Neben einer Bande bei ~6 kb (Vektor mit gewünschtem Insert) kann eine weitere Bande bei 718 bp detektiert werden. Die ~6 kb lange Bande wurde durch Gelelektion aus dem Agarosegel gewonnen und anschließend wieder religiert. Abbildung 15 B zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente des im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 1,0 kb-*EcoR I* in einem 1,5 % igen Agarosegel nach Restriktionsverdau mit *Kpn I*. Durch Restriktion mit *Kpn I* wurde das gesamte Deletionskonstrukt 1,0 kb-*EcoR I* (1021 bp) aus dem Vektor herausgeschnitten. Als Längenstandard 1 diente der 1 kb DNA Ladder (Biolabs), Längenstandard 2 ist der 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

Das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I*-*Sac I* (Lage, Abbildung 11) wurde durch Restriktionsverdau des im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 1,4 kb-*Sac I* mit *EcoR I* (Lage der Restriktionsstellen Abbildung 11) hergestellt. Abbildung 16 A zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau mit *EcoR I* in einem 1 % igen Agarosegel. Im Agarosegel konnten zwei Banden, eine Bande bei ~5,4 kb (Vektor mit gewünschten Insert) und eine Bande bei 718 bp detektiert werden. Die ~5,4 kb lange Bande wurde durch Gelelution aus dem Agarosegel gewonnen und anschließend wieder religiert.

Zur Kontrolle wurde eine Restriktion mit *Sac I* durchgeführt, bei der das gesamte Insert, 633 bp, aus dem pGL₃b Vektor herausgeschnitten wird. In Abbildung 16 B wird die Auftrennung der einzelnen DNA-Fragmente in einem 1,5 % igen Agarosegel nach der Restriktion des im pGL₃b Reportervektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,6 kb-*EcoR I*-*Sac I* mit *Sac I* gezeigt. Neben der Vektor-DNA-Bande wurde eine 633 bp lange Bande im Agarosegel detektiert. Dieses Konstrukt wurde für weitere Experimente eingesetzt.

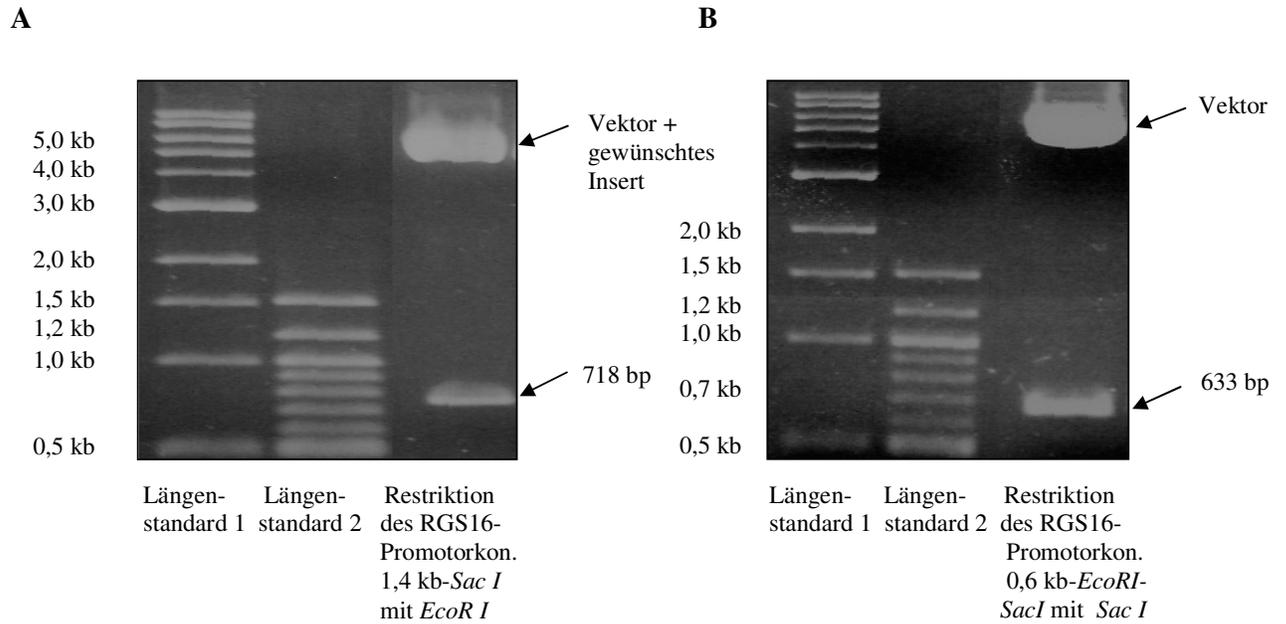


Abbildung 16: Herstellung und Kontrollverdau des RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,6 kb-*EcoR I*-*Sac I*

Abbildung 16 A zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente des im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 1,4 kb-*Sac I* in einem 1 % igen Agarosegel nach Restriktionsverdau mit *EcoR I*. Neben einer Bande bei ~5,4 kb (Vektor mit gewünschten Insert) kann eine weitere Bande bei 718 bp detektiert werden. Die ~5,4 kb lange Bande wurde durch Gelelution aus dem Agarosegel gewonnen und anschließend wieder religiert. Abbildung 16 B zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente des im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,6 kb-*EcoR I*-*Sac I* in einem 1,5 % igen Agarosegel nach Restriktionsverdau mit *Sac I*. Durch Restriktion mit *Sac I* wurde das gesamte RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I*-*Sac I* (633 bp) aus dem Vektor herausgeschnitten. Als Längenstandard 1 diente der 1 kb DNA Ladder (Biolabs), Längenstandard 2 ist der 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

Das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,4 kb-*Sac I* (liegt an der *Sac I*-Restriktionsstelle im Insert bis Sequenzende, Lage, Abbildung 11) wurde durch PCR mit den genspezifischen Primern, 5' Primer: GTA GCA ATC TCG AAG GGA G und dem 3' Primer: CAT GGT CTT CGA AGG TGA C, hergestellt. Als Template für die PCR-Reaktion diente das RGS16-Promotorkonstrukt 1,8 kb-*Kpn I* (Abbildung 11). Die Amplifikation wurde in einem Agarosegel überprüft. Abbildung 17 A zeigt die Überprüfung des Amplifikationserfolges in einem 1,5 % igen Agarosegel. Das PCR-Produkt wies eine Länge von ca. 0,4 kb auf. Es wurde in den pCR^R2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert (Abbildung 12 A) und in *E. coli* Bakterien vermehrt (Klonierungsstrategie, Abbildung 13). Sequenzüberprüfung mit den Vektor-Primern: M13 Reverse / M13 Forward und genspezifischen Primern (siehe Material und Methoden, 2.1.4) zeigte eine Länge des PCR-Produktes von 394 bp und eine „falsche“ Orientierung des Inserts im Vektor. Gezielte Wahl der Restriktionsenzyme zum Herausschneiden des RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,4 kb-*Sac I* aus dem pCR^R2.1-TOPO Vektor und für die Umklonierung in den pGL₃b Vektor erlaubt eine „gerichtete“ Klonierung in den pGL₃b Reportervektor. Auf Grund der „falschen“ Orientierung des RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,4 kb-*Sac I* im pCR^R2.1-TOPO Vektor wurden die Restriktionsenzyme *Hind III* und *Xho I* zum Herausschneiden des Konstruktes aus dem PCR-Vektor und die anschließende gerichtete Klonierung in den pGL₃b Reportervektor gewählt (Klonierungsvektoren, Abbildung 12). Dies sollte zur richtigen Orientierung des Konstruktes im pGL₃b Reportervektor führen. Der pGL₃b Reportervektor wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *Hind III* und *Xho I* geöffnet.

Abbildung 17 B zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau des im pCR^R2.1-TOPO Vektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,4 kb-*Sac I* mit *Hind III* und *Xho I* in einem 1,5 % igen Agarosegel. Neben der Vektor-DNA-Bande konnte eine Bande bei 0,5 kb im Agarosegel detektiert werden, dabei handelt es sich um das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,4 kb-*Sac I*. Die Bande ist länger als das gewünschte Insert, da Nukleotide aus der Multiple Cloning Site des pCR^R2.1-TOPO Vektor enthalten sind. Die 0,5 kb lange Bande wurde durch Gelelektion aus Agarosegel gewonnen und über *Hind III* und *Xho I* Restriktionsstellen in den ebenfalls mit *Hind III* und *Xho I* geöffneten pGL₃b Reportervektor ligiert. Die richtige Orientierung des im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,4 kb-*Sac I* wurde durch Sequenzierung mit den vektorspezifischen Primern: RVprimer3 / GLprimer2 und genspezifischen Primern (siehe Material und Methoden, 2.1.4) überprüft.

Das Konstrukt wies die gewünschte Orientierung im pGL₃b Vektor auf. Es wurde für weitere Experimente ausgewählt.

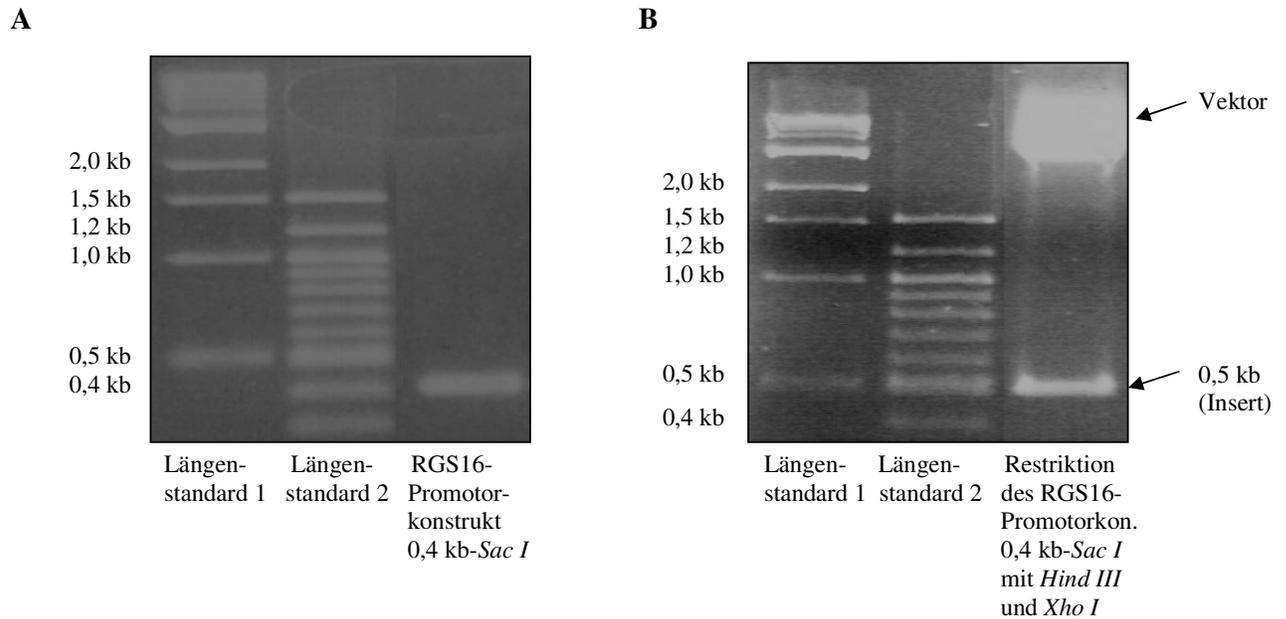


Abbildung 17: Herstellung und Kontrollverdau des RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,4 kb-*Sac I*

Abbildung 17 A zeigt das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,4 kb-*Sac I* (liegt an der *Sac I*-Restriktionsstelle im Insert bis Sequenzende, Lage, Abbildung 11) in einem 1,5 % igen Agarosegel. Es wurde durch PCR mit den genspezifischen Primern, 5'-Primer: GTA GCA ATC TCG AAG GGA G und dem 3'-Primer: CAT GGT CTT CGA AGG TGA C, hergestellt. Als Template für die PCR-Reaktion diente das RGS16-Promotor-konstrukt 1,8 kb-*Kpn I*. Das PCR-Produkt wurde in den pCR^R2.1-TOPO Vektor (Invitrogen) kloniert (Abbildung 12 A). Um eine gerichtete Klonierung in den pGL₃b Reportervektor zu ermöglichen, wurde das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen, *Hind III* und *Xho I*, aus dem pCR^R2.1-TOPO Vektor herausgeschnitten. Abbildung 17 B zeigt die Auftrennung der DNA-Fragmente in einem 1,5 % igen Agarosegel nach Restriktionsverdau des im pCR^R2.1-TOPO Vektor befindlichen RGS16-Promotordeletionskonstruktes 0,4 kb-*Sac I* mit *Hind III* und *Xho I*. Neben der Vektor-DNA-Bande wurde eine Bande bei 0,5 kb im Agarosegel detektiert, dabei handelt es sich um das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,4 kb-*Sac I*. Die Bande ist länger als das gewünschte Insert, da Nukleotide aus der Multiple Cloning Site des pCR^R2.1-TOPO Vektor enthalten sind. Die 0,5 kb lange Bande wurde durch Gelelution aus Agarosegel gewonnen und über *Hind III* und *Xho I* Restriktionsstellen in den ebenfalls mit *Hind III* und *Xho I* geöffneten pGL₃b Reportervektor ligiert. Als Längenstandard 1 diente der 1 kb DNA Ladder (Biolabs), Längenstandard 2 ist der 100 bp DNA Ladder (Biolabs).

3.3 Untersuchung der Promotoraktivität und transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors

Reporteranalysen finden in der Molekularbiologie eine weit verbreitete Anwendung, um Promotoren auf ihre Aktivität zu untersuchen. In dem für die vorliegende Dissertation gewählten Luciferase Assay wird die Aktivität des Reporterenzym Luciferase gemessen. Zur Verbesserung der Messgenauigkeit werden die Aktivitäten von zwei verschiedenen Luciferase-Enzymen gemessen. Mit Hilfe des pGL₃b Reportervektors (Abbildung 12 B) kann durch Klonierung eines funktionsfähigen Promotors (RGS16-Promotorkonstrukte) in die Multiple Cloning Site des Vektors und anschließende Transfektion in eine Zellkulturlinie das Reportergen *Firefly*-Luciferase exprimiert werden. Durch Co-Transfektion eines weiteren Vektors, pRLTK (Promega), wird ein zweites Luciferase-Enzym, die *Renilla*-Luciferase konstitutiv exprimiert. Transfektion mit dem pRLTK-Vektor und anschließende Messung der Aktivität der *Renilla*-Luciferase dient der internen Kontrolle der Transfektionseffizienz. Die Enzymaktivitäten beider Luciferase-Enzyme, *Firefly*-Luciferase und *Renilla*-Luciferase, können durch Biolumineszenzreaktion nacheinander innerhalb einer Probe bestimmt werden.

3.3.1 Untersuchung der Promotoraktivität der RGS16-Promotorkonstrukte

Um die für die RGS16-Promotoraktivität essentiellen DNA-Sequenzabschnitte zu ermitteln, wurden die unter 3.2 beschriebenen putativen RGS16-Promotorkonstrukte (siehe Abbildung 11) auf ihre Promotoraktivität untersucht. Hierzu wurden neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur fünf Tage nach ihrer Isolation mit equimolaren Mengen (4,8 µg – 6,6 µg) der pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukte bzw. mit dem leeren pGL₃b Reportervektor mittels Calciumphosphat-Präzipitation transient transfiziert (siehe 2.3.3, Material und Methoden). Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde 1 µg des pRLTK-Vektors co-transfiziert. Durch Messung der Promotoraktivitäten der verschiedenen RGS16-Promotorkonstrukte konnte die für die Promotoraktivität essentielle TATA-Box unter den drei putativen TATA-Boxen (Abbildung 11) eindeutig ermittelt werden. In Abbildung 18 wird die DNA-Sequenz des RGS16-Promotors sowie die mit Hilfe des Sequencher DNA^R Softwareprogrammes ermittelten regulatorischen Promotorelemente gezeigt.

```

AACAAAGGCAT CCACCCACCG AGTGCCACACA CGTCTCTGCT CAGCCCCAGT CTAGCCCTCG GCGGTGAGGT
AGGAAGCTCT CAAGAGCTGA GCTTGGCAAG ACGGGCATGT GGATTTGGTG TTCACTGCAC CTGAGGTAGA
AGTGTGTCCA GGAATGTGCC CTGTCCTCTC TGCCTTGTT CTGCCTTGAG AATGTGGGAG TTTGGGAACA
GTGGATCAGG TTGACTAACT GGGTCACCCT TCATAGGGTC TGGCTCAGTG AGGGGAGTCT ACCTGAACTA
TTGTTCCAGA TGTTTGGTTT CGGACTGGAC TGGACAGGCA CAAGGGACTG AGGTGCAAAT TTTTCATATC
AAAGCAGACC TGGCCTCTAG GTTCTCCCAG CATCCCTCAG TCTCACCTGG CATACCCTGC CCCTAACCTT
GAACTTTCAG CCCAGGGGCT GGGCTGCCCT TCC1CCAAT1 GCCTCTTCTC TATATAATCC AGGCATTTTG
ATCTCTTCTT CTTCCTCTTC TTCCTCTTCC TCCTCTCTCT TCTCTCTCTG TGCATGCACA TTCTCAAGTG
CCCTTTCTCT AGACAAGACC ACTGAGCTGC ATCTCCAGCC TCCTTCCTCG CCTCCCTTC CTTTCTCCT
TCCCCTCCCT TCCCATCTTC CTTTCCCGAC CTTTACTTTC ACAGAGCATA GAGCAGTCT TACTGCTGGA
GAAGCCCCCT AGGAGATGGA ATTCTGTATC CTGAAAGTGA CAAAACATTG TTTTCCTTAC TGCATAGAAT
TCCATACAGC ATAGATTTC AGTCTATCTG TTTG1CCAAT1 CTGTTTGATT GTGTGCCAAG TCTTGTTC
AGGCCTTGT ATATAGATGC GGGTCCTTTG GCATGCCACC CAGATCCCCT ATCCTGGCCA CCACCAGTGT
GGTATGGTCT CTGTTATAGG CTCTGGAGTT GCTCTTGACA GAGACATCAC CTGGAGCCAG GTCAGGCATC
TCAGCACAGC AGAGTCCAAT AAATGGGTAA TGCTAAGGCC TGCTCAGCTC CAGAAGTAGA CACTTGCAAA
GGTCTACACA ACTCTAGAAC ATCCTTGAAG ACCCTCTGGG CGTGGGGTGG GGTCTCTGTG TGCAGCATAA
CTGCTCTGCT CTTCTCTCAG TTCGTTTCTG AGAATTATCC CTAGCATGCC TGCTACCCCT ACAGAATGCT
CCCTGGGGAA GTCAGCTCT CAAAAGGTC TTCAGTCCC ACCACACCTT ATGAAATAAG TATGGTGATG
TCTAAACCC AGACACAAAG AAATGGAAGATGGAG2TCTC TAAGTCTCT CA3TAATTATA3CAGCAGAAAC
ATGATTTGAA ACTCCATAAC TATCTACCCT TAACCTTACC TGCTGCTTCT TAGTAGCAAT CTCGAAGGGA
GCTCCCGAGG GCCAGCCGGG AAGACAATGG CACCTTAAAG GCAGGATGCG GAGCGGAACT AAGCAGTTGC
TTAGCCTCAG GATCACTTAC GGGTTACAGA GCTGTTGTTA CTGTTGCTTT CCAGCAGGAG CAACATGGTA
AATTCAAAGC TGGATTGAGG CACCAAGACT TACCCTATAA CTATAGAGCA TTAGAGCAAT TAAGCACGGT
TGCAGAGATT TCTGCTATAA TTGTGTTAAG TAAATGTTTC CGCCCATGCC TGCTGATCTT GGCCAAATCG
CTAGTTTTCT GATCTTCTGA TCCTTCATCT CAAAGTGGAG GTAATGACCG TGGGGGCGAA TAGCTCACTT
GGCTCCCCTC ACCTTGAAG ACCATGGGAT GGTACCTGTT CTGACCTGAG AGAGAGTGCA GTATAGTGGT
GATGTACTTT TTCTTGAAT GCACCCCATG CGCCTGCTCT CCGTGAACTC TCCACCCCT ACCAAACCTC
TCCTGTCACT TTTGAATTGT TTTCTGCTT TACTAGAGG TCGGCGTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC
TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC GCGGATGTC TGGTCTTCAA GCCTTCCTCT
TCTCTGGCA CCCAAGTCT CCGACCTTG GGTGGGGAC AGCCCCGTG GCTTGAGATG AGGCCCTGGG
GGCTACCAGT CGTGCCAC CCGTTCAGAC TCCCCTGCT CCGTCTCTCC TCCCAACGCC CAGCCCCT
CTCTTATTGG TCGGCGACGT TCGTCCCCG CCGCCCCAC GGGGATAAAA GCCTTAGTAG CCACCGCCCC
GGCGCGTGCC GCTCTCCAGA CCTCTTCTGC GCAGCCTGGT ACTTGCTACT CGCTTTTCCC TCTTCGCCCT
CCGGTCCGCC ACCATCTCT CCACGACGTG CTGTCTGCG TCCGCAACCATG TGCCGCACC CTAGCCACCT
TCCCAACAC CTGCCTGGAG A

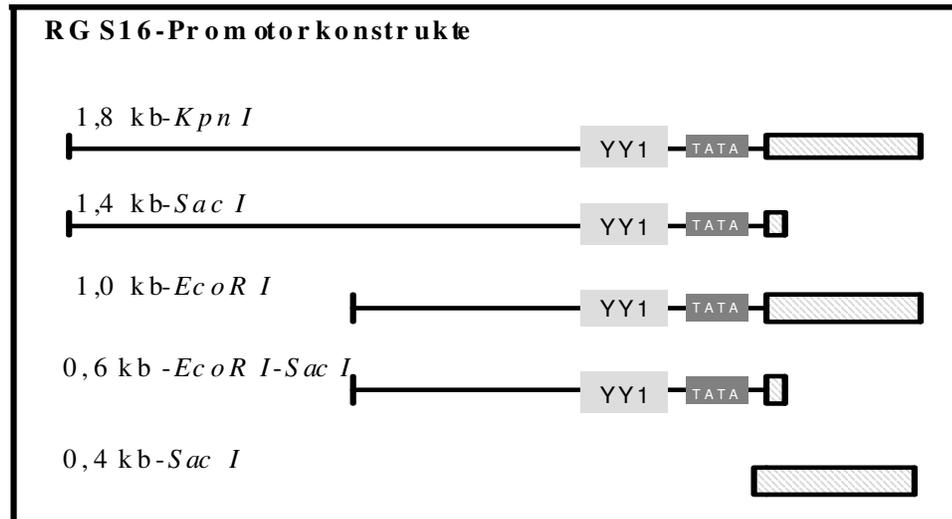
```

Abbildung 18: DNA-Sequenz des RGS16-Promotors

Abbildung 18 zeigt die DNA-Sequenz des RGS16-Promotors des entsprechenden murinen Gens. Mit Hilfe des Sequencher DNA^R Softwareprogrammes konnten folgende in Boxen hervorgehobene regulatorische Promotorelemente identifiziert werden: ¹ CCAAT-Boxen, ² YY1-Bindestelle, ³ TATA-Box, oberer grau hervorgehobener DNA-Sequenzabschnitt: Minimalsequenz, die die RGS16-Promotoraktivität reguliert (0,6 kb-*EcoRI-SacI*-Promotorkonstrukt), unterer grau hervorgehobener DNA-Sequenzabschnitt: Exon 1 mit Translationsstart (Box).

Abbildung 19 A zeigt schematisch die Lage und Struktur der verschiedenen RGS16-Promotorkonstrukte sowie ihre Bezeichnung und Abbildung 19 B die Promotoraktivitäten der einzelnen RGS16-Promotorkonstrukte im Vergleich zum leeren pGL₃b Reportervektor. Die für das längste RGS16-Promotorkonstrukt 1,8 kb-*Kpn I* gemessene *Firefly*-Luciferase Aktivität war 10,3 fach ($\pm 1,1$) höher im Vergleich zum leeren pGL₃b Vektor. Drei der vier RGS16-Promotordeletionskonstrukte (Lage, Abbildung 11) zeigten wie das längste RGS16-Promotorkonstrukt 1,8 kb-*Kpn I* ebenfalls Promotoraktivität. Im Vergleich zum leeren pGL₃b Vektor zeigten die einzelnen Deletionskonstrukte folgende Promotoraktivitäten: RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,4 kb-*Sac I* (18,4 fach $\pm 1,9$), RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,0 kb-*EcoR I* (12,9 fach $\pm 1,3$) und RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* (18,7 fach $\pm 2,3$). Im Gegensatz dazu zeigte das Deletionskonstrukt 0,4 kb-*Sac I* (Lage, Abbildung 11) keinerlei Promotoraktivität ($0,5 \pm 0,04$).

A



B

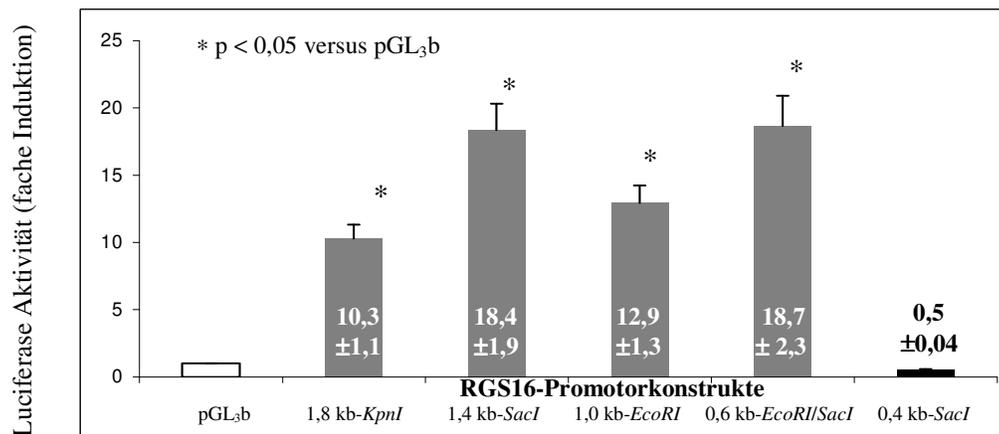


Abbildung 19: Promotoraktivität der RGS16-Promotorkonstrukte

Abbildung A zeigt schematisch die Lage, Struktur und Bezeichnung der RGS16-Promotorkonstrukte. Abbildung B zeigt die *Firefly*-Luciferase-Aktivität der im pGL₃b Reportervektor befindlichen RGS16-Promotorkonstrukte als Maß für ihre Promotoraktivität. Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden fünf Tage nach ihrer Isolation mit equimolaren Mengen des leeren pGL₃b Vektor bzw. der pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukte (4,8 µg – 6,6 µg) mittels Calciumphosphat-Präzipitation transient transfiziert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde 1 µg des pRLTK-Vektors, mit dessen Hilfe die *Renilla*-Luciferase konstitutiv exprimiert wird, co-transfiziert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten lysiert und die verdünnten Lysate im Luciferase Assay eingesetzt. In diesem Assay wurden die Aktivitäten der *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte der *Firefly*-Luciferase-Aktivität der im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotorkonstrukte im Vergleich zum leeren pGL₃b Reportervektor (Aktivität = 1), ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 3 - 8 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung, * p < 0,05 versus pGL₃b.

3.3.2 Untersuchung der transkriptionellen Regulation des RGS16-Promotors

LPS und die beiden Zytokine, IL-1 β und TNF α , induzieren sowohl in den Herzen adulter Ratten als auch in neonatalen Rattenkardiomyozyten in Zellkultur die RGS16-Proteinexpression (Patten et al. 2002 und Patten et al. 2003). Deshalb sollte zunächst untersucht werden, ob der RGS16-Promotor der transkriptionellen Regulation durch LPS, IL-1 β und TNF α unterliegt. Für diese Untersuchungen wurden drei der vier funktionsfähigen RGS16-Promotorkonstrukte eingesetzt (Abbildung 19). Das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* lag zum Versuchszeitpunkt noch nicht vor. In Abbildung 20 A werden die Promotoraktivitäten der in neonatalen Rattenkardiomyozyten befindlichen pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukte nach 24 h-Behandlung mit LPS (4 μ g/ml) oder als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) gezeigt. Keines der drei RGS16-Promotorkonstrukte zeigte nach Behandlung der transfizierten neonatalen Kardiomyozyten mit LPS eine erhöhte Promotoraktivität, RGS16-Promotorkonstrukt 1,8 kb-*Kpn I* (0,86 fach \pm 0,08 versus NaCl), RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,4 kb-*Sac I* (0,97 fach \pm 0,12 versus NaCl) und RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,0 kb-*EcoR I* (0,93 fach \pm 0,06 versus NaCl).

Da die Promotoraktivität der drei oben genannten RGS16-Promotorkonstrukte nicht durch LPS induziert wurde, wurden Untersuchungen zur transkriptionellen Regulation des RGS16-Promotors durch die beiden Zytokine, IL-1 β und TNF α , exemplarisch nur mit Hilfe des RGS16-Promotorkonstruktes 1,8 kb-*Kpn I* durchgeführt. Wie in Abbildung 20 B gezeigt, führte eine 24 h-Behandlung der mit dem pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukt 1,8 kb-*Kpn I* transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten weder mit IL-1 β (10 ng/ml) (0,95 fach \pm 0,10, versus NaCl) noch mit TNF α (10 ng/ml) (1,19 fach \pm 0,33 versus NaCl) zu einer signifikant erhöhten Promotoraktivität.

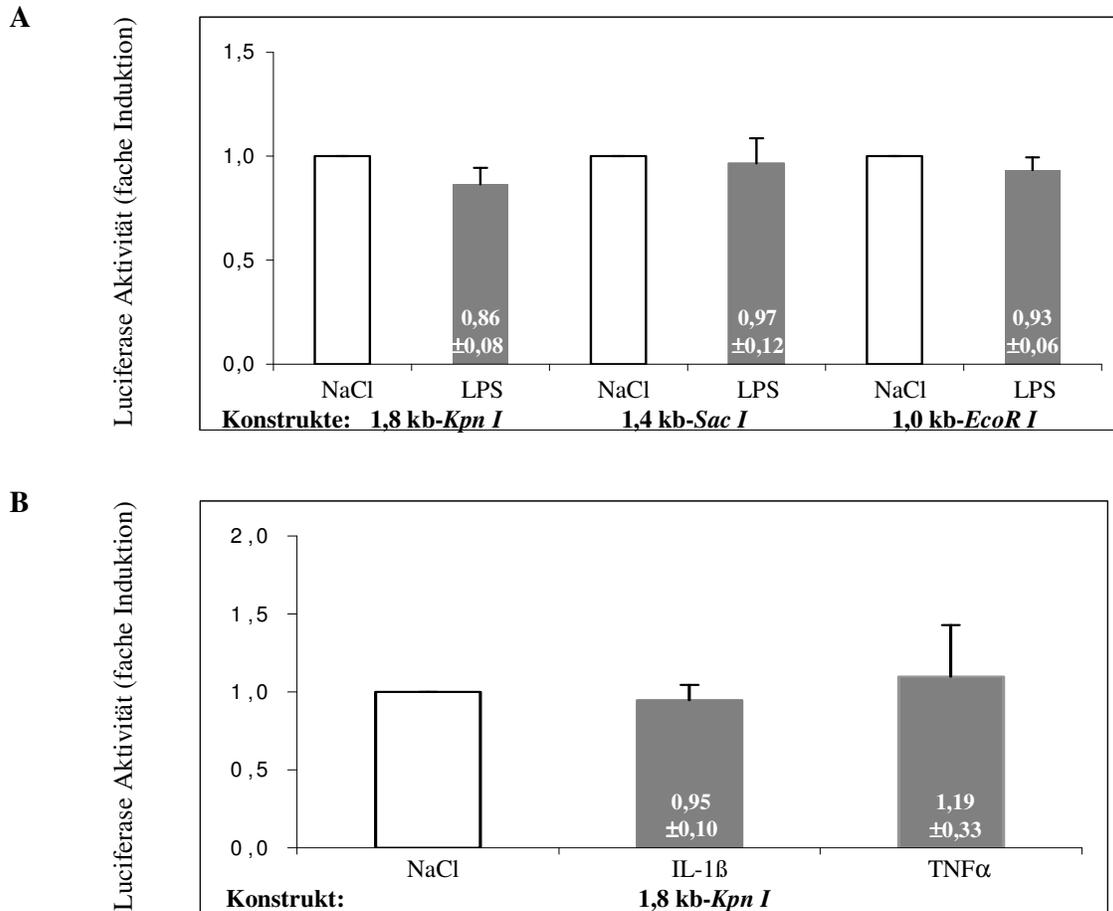


Abbildung 20: Der RGS16-Promotor unterliegt nicht der transkriptionellen Regulation durch LPS, IL-1 β oder TNF α

Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden mit equimolaren Mengen der im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotorkonstrukte (4,8 μ g – 6,6 μ g) mittels Calciumphosphat-Präzipitation transient transfiziert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde 1 μ g des pRLTK-Vektors co-transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten 24 h mit LPS (4 μ g/ml), IL-1 β (10 ng/ml), TNF α (10 ng/ml) oder NaCl (0,9 %) behandelt. Im Anschluß an diese Behandlung wurden die Kardiomyozyten lysiert, die *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase Aktivität in den verdünnten Lysaten im Luciferase-Assay bestimmt. Abbildung A zeigt die *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten (als Maß für die Promotoraktivitäten) von drei RGS16-Promotorkonstrukten nach 24 h-Behandlung der mit diesen Konstrukten transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten mit LPS bzw. NaCl. Abbildung B zeigt die *Firefly*-Luciferase-Aktivität (als Maß für die Promotoraktivität) des RGS16-Promotorkonstruktes 1,8 kb-*Kpn I* nach 24 h-Behandlung der mit diesem Konstrukt transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten mit IL-1 β , TNF α bzw. NaCl. Angegeben sind Mittelwerte der *Firefly*-Luciferase-Aktivität der mit den pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukten transfizierten und mit LPS bzw. IL-1 β oder TNF α behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten im Vergleich zu mit diesen Konstrukten transfizierten und mit NaCl behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten (Aktivität = 1), \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 3 - 8 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung.

Auch eine 48 h-Behandlung der mit den pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukten transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten mit LPS, IL-1 β oder TNF α führte zu keiner erhöhten Promotoraktivität der RGS16-Promotorkonstrukte (Daten nicht gezeigt).

Serum (fötale Kälberserum, FCS) enthält eine Vielzahl von Proteinen, Wachstumsfaktoren, Hormonen, Nährstoffen und Metaboliten, die Auswirkung auf die transkriptionelle Regulation von diversen Genen unter anderem auch kardialen Genen haben könnten. Deshalb wurde untersucht, ob Serum (fötale Kälberserum, FCS) die RGS16-Promotoraktivität induziert.

Abbildung 21 zeigt, daß FCS-Behandlung der mit den pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukten transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten die Promotoraktivität der RGS16-Promotorkonstrukte induziert. So zeigte das RGS16-Promotorkonstrukt 1,8 kb-*Kpn I* eine Induktion der Promotoraktivität um das 1,8 fache ($\pm 0,1$, * $p < 0,05$ versus NaCl), RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,4 kb-*Sac I* (1,9 fache $\pm 0,2$, * $p < 0,05$ versus NaCl), RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,0 kb-*EcoR I* (1,5 fache $\pm 0,1$, * $p < 0,05$ versus NaCl) und RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* (1,8 fache $\pm 0,2$, * $p < 0,05$ versus NaCl) (Bezeichnung und Struktur der RGS16-Promotorkonstrukte, Abbildung 19 A).

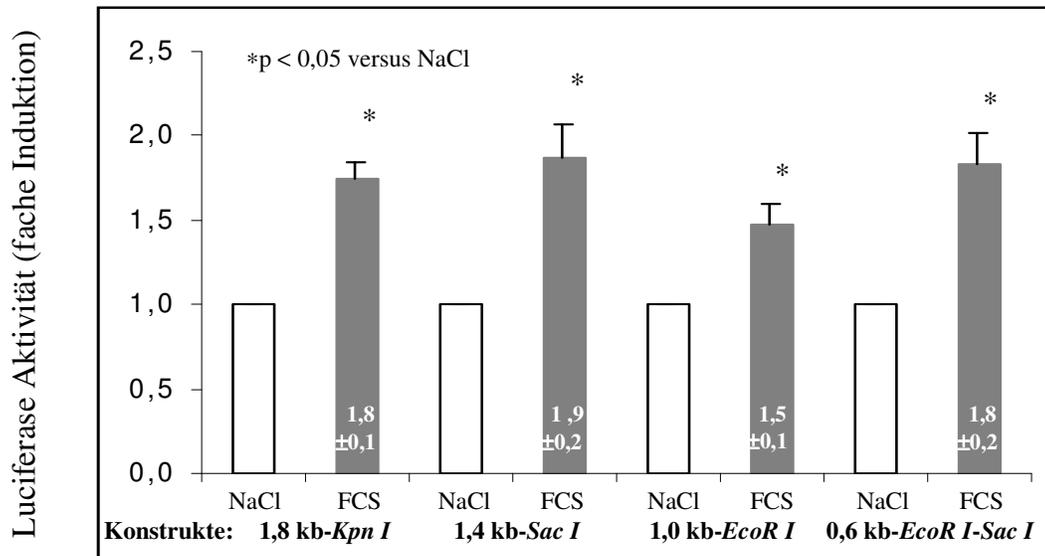


Abbildung 21: Die Promotoraktivität des RGS16-Promotors wird induziert durch fötales Kälberserum

Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden fünf Tage nach ihrer Isolation mit equimolaren Mengen der im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotorkonstrukte (4,8 µg – 6,6 µg) mittels Calciumphosphat-Präzipitation transient transfiziert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde 1 µg des pRLTK-Vektors co-transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten 24 h mit fötalem Kälberserum (FCS; 10 %) bzw. mit NaCl (0,9 %) behandelt. Im Anschluß an diese Behandlung wurden die Kardiomyozyten lysiert und die *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase Aktivität in den verdünnten Lysaten im Luciferase-Assay bestimmt. Die Abbildung zeigt die *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten (als Maß der Promotoraktivität) der RGS16-Promotorkonstrukte: RGS16-Promotorkonstrukt 1,8 kb-*Kpn I*, RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,4 kb-*Sac I*, RGS16-Promotordeletionskonstrukt 1,0 kb-*EcoR I* und RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* (Struktur und Lage, Abbildung 19 A). Angegeben sind Mittelwerte der *Firefly*-Luciferase-Aktivität der mit den pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukten transfizierten und mit FCS behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten im Vergleich zu mit diesen Konstrukten transfizierten und mit NaCl behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten (Aktivität = 1), ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 3 - 6 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung, * p < 0,05 versus NaCl.

Die durchgeführten Experimente haben ergeben, daß das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* (Lage und Struktur schematisch in Abbildung 19 A) als kleinstes funktionsfähiges Deletionskonstrukt alle essentiellen regulatorischen Promotorelemente enthält, die eine volle Promotoraktivität (Abbildung 19 B) gewährleisten. Darüber hinaus wurde die Promotoraktivität dieses Konstruktes durch fötales Kälberserum induziert (Abbildung 21), es wurde deshalb für alle weiteren Versuche eingesetzt.

Verschiedene Serumkomponenten, wie Triiodthyronin (Schilddrüsenhormon, T₃), Insulin-like Growth Factor (IGF), Leukaemia Inhibitory Factor (LIF) sowie die beiden zu den Lysophospholipiden gehörenden EDG-Rezeptor (endothelial differentiation gene-encoded receptors) Agonisten, Sphingosin 1-Phosphat (S1-P) und 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphat (LPA), regulieren sowohl unter physiologischen wie auch pathophysiologischen Bedingungen transkriptionell eine Reihe von kardialen Genen (Danzi et al. 2005; Duerr et al. 1995; Eiken et al. 2001; Karliner 2002; Karliner et al. 2001), deshalb wurde untersucht, ob sie die RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten induzieren. Jede Serumkomponente wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt (siehe Material und Methoden 2.3.4) und die Auswirkung auf die RGS16-Promotoraktivität untersucht. Abbildung 22 zeigt, daß eine 24 h-Behandlung der mit dem pGL₃b-RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten weder mit Triiodthyronin (T₃; maximal eingesetzte Konzentration: 50 ng / ml, 0,96 fach ± 0,01 versus NaCl) noch mit Insulin-like Growth Factor (IGF; maximal eingesetzte Konzentration: 300 ng / ml, 1,11 ± 0,05 versus NaCl) oder Leukaemia Inhibitory Factor (LIF; maximal eingesetzte Konzentration: 100 ng / ml, 0,94 fach ± 0,11 versus NaCl) zu einer Induktion der RGS16-Promotoraktivität führt. Im Gegensatz dazu induzierte der EDG-Rezeptor Agonist Sphingosin-1-Phosphat (S1-P) dosisabhängig die RGS16-Promotoraktivität mit einem Maximum bei einer 10 µM Konzentration (1,9 fach ± 0,10 * p < 0,05 versus NaCl), während 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphate (LPA), ein EDG-Rezeptor Agonist für eine andere EDG-Rezeptor Subfamilie, keinerlei Einfluß auf die RGS16-Promotoraktivität zeigte (maximale Konzentration: 1 µM, 0,81 fach ± 0,13 versus NaCl). Höhere LPA-Konzentrationen (10 µM) konnten nicht berücksichtigt werden, da sie zur Zelllyse führten (Daten nicht gezeigt).

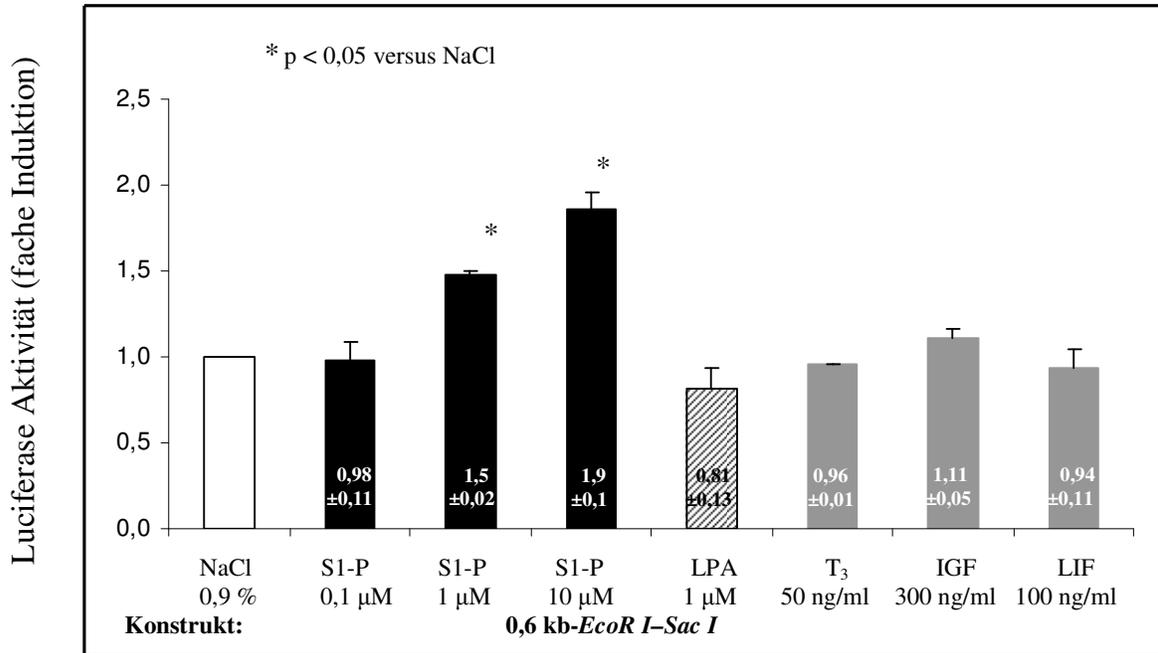


Abbildung 22: Die RGS16-Promotoraktivität wird stimuliert durch den EDG-Rezeptor Agonisten, Sphingosin 1-Phosphat (S1-P)

Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden fünf Tage nach ihrer Isolation mit dem im pGL₃b Vektor befindlichen RGS16-Promotorkonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* (3,21 µg) (Lage und Struktur, Abbildung 19 A) mittels Calciumphosphat-Präzipitation transient transfiziert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde 1 µg des pRLTK-Vektors co-transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten 24 h mit Sphingosin 1-Phosphat (S1-P; 0,1 µM; 1 µM; 10 µM), 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphate (LPA; 1µM), Triiodthyronin (T₃; 50 ng/ml), Insulin-like Growth Factor (IGF; 300 ng/ml), Leukaemia Inhibitory Factor (LIF; 100 ng/ml) oder NaCl (0,9 %) behandelt. Im Anschluß an diese Behandlung wurden die Kardiomyozyten lysiert und die *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase Aktivität in den verdünnten Lysaten im Luciferase-Assay bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte der *Firefly*-Luciferase-Aktivität (als Maß der Promotoraktivität) der mit dem pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* transfizierten und mit S1-P, LPA, T₃, IGF oder LIF behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten im Vergleich zu mit diesem Konstrukt transfizierten und mit NaCl behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten (Aktivität = 1), ± Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 3 - 6 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung, * p < 0,05 versus NaCl.

S1-P entfaltet seine weitreichende biologische Wirkung, die unter anderem einen Einfluß auf Zellwachstum, Zellüberleben, Migration sowie Zelldifferenzierung und Regulation der Genexpression beinhaltet, in einer Vielzahl von Zelltypen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (Karliner Joel S. 2002; Karliner Joel S. et al. 2001; Meacci E. et al. 2003). Aus diesem Grund wurde untersucht, ob S1-P rezeptorvermittelt über die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionskaskade die RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten induziert. Für diese Experimente wurden zwei verschiedene Inhibitoren, welche die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktion an unterschiedlicher Stelle hemmen, eingesetzt.

Pertussis Toxin (PTX) modifiziert $G\alpha_i$ -Untereinheiten durch ADP-Ribosylierung, blockiert dadurch die Interaktion der $G\alpha_i$ -Untereinheit mit ihrem Rezeptor, verhindert hierdurch die Aktivierung heterotrimerer G-Proteine der $G\alpha_i$ -Familie und inhibiert somit die Signaltransduktion bereits auf Rezeptor / G-Protein Ebene. Chelerythrin hingegen hemmt die Proteinkinase C und inhibiert die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion somit später in der Signaltransduktionskaskade auf Effektormolekül-Ebene.

Zunächst wurde als Kontrolle die Wirkung der Inhibitoren auf die RGS16-Promotoraktivität untersucht. Hierzu wurden die mit dem pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-SacI* transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten einen Tag nach der Transfektion 24 h mit Chelerythrin (1 μ M) oder PTX (3 μ g/ml) behandelt. Es konnte weder mit Chelerythrin (0,8 fach \pm 0,05 versus NaCl) noch mit PTX (0,9 fach \pm 0,02 versus NaCl) eine Induktion der RGS16-Promotoraktivität festgestellt werden (Daten nicht graphisch dargestellt). Um zu untersuchen, ob S1-P rezeptorvermittelt über die G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionskaskade die RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten induziert, wurden die mit dem pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukt 0,6kb-*EcoR I-Sac I* transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten 1 h vor Behandlung mit S1-P (24 h; 10 μ M) mit Chelerythrin (1 μ M) oder PTX (3 μ g/ml) präinkubiert bzw. als Kontrolle mit NaCl (0,9 %) behandelt.

Wie in Abbildung 23 gezeigt, konnte die von S1-P induzierte RGS16-Promotoraktivität (1,9 fach \pm 0,10, * $p < 0,05$ versus NaCl) sowohl durch Präinkubation mit PTX (1,0 fach \pm 0,05, # $p < 0,05$ versus S1-P) als auch durch Präinkubation mit Chelerythrin (1,1 fach \pm 0,14, # $p < 0,05$ versus S1-P) inhibiert werden. Diese Ergebnisse implizieren, daß S1-P rezeptorvermittelt Gi- und Proteinkinase C-abhängig die RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten induziert.

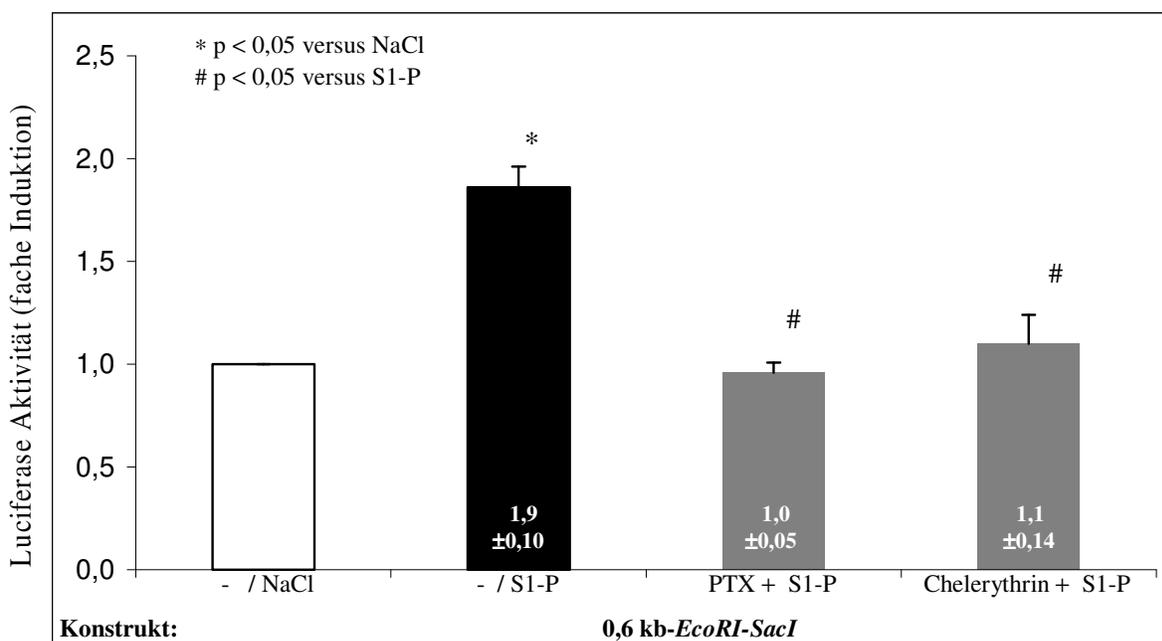


Abbildung 23: Die von Sphingosin 1-Phosphat (S1-P) induzierte RGS16-Promotoraktivität wird inhibiert durch Pertussis Toxin (PTX) und Chelerythrin

Neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur wurden fünf Tage nach ihrer Isolation mit dem pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* (3,21 μ g) (Lage und Struktur, Abbildung 19 A) mittels Calciumphosphat-Präzipitation transient transfiziert. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienz wurde 1 μ g des pRLTK-Vektors co-transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten 1 h vor der 24 h-Behandlung mit Sphingosin 1-Phosphat (S1-P; 10 μ M) entweder mit Pertussis Toxin (PTX; 3 μ g/ml) oder Chelerythrin (1 μ M) präinkubiert bzw. als Kontrolle 24 h mit NaCl (0,9 %) behandelt. Im Anschluß an diese Behandlung wurden die Kardiomyozyten lysiert und die *Firefly*- und *Renilla*-Luciferase Aktivität in den verdünnten Lysaten im Luciferase-Assay bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte der *Firefly*-Luciferase-Aktivität (als Maß der Promotoraktivität) der mit dem pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* transfizierten und mit S1-P bzw. mit PTX oder Chelerythrin und S1-P behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten bzw. als Kontrolle mit NaCl (Aktivität = 1) behandelten neonatalen Rattenkardiomyozyten, \pm Standardfehler des Mittelwerts (SEM) aus n = 3 - 6 unabhängigen Experimenten in Doppelbestimmung, * $p < 0,05$ versus NaCl, # $p < 0,05$ versus S1-P.

Zusammenfassung der Ergebnisse aus 3.3:

1. Vier der fünf RGS16-Promotorkonstrukte (Abbildung 19) haben eine signifikante Promotoraktivität gezeigt. Lediglich das Deletionskonstrukt 0,4 kb-*Sac I* zeigte keinerlei Promotoraktivität, ist somit kein RGS16-Promotorkonstrukt. Auf Grund dieser Ergebnisse war eine genaue Bestimmung der TATA-Box unter den drei putativen TATA-Boxen möglich (Abbildung 11). Die zweite der in Abbildung 11 hervorgehobenen putativen TATA-Boxen erwies sich als die für die Promotoraktivität essentielle TATA-Box.
2. Das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* (Abbildung 19) zeigte als kleinstes RGS16-Promotorkonstrukt volle Promotoraktivität und wurde deshalb als Minimalsequenz des RGS16-Promotors identifiziert.
3. Trotz der Induktion der RGS16-Proteinexpression durch LPS und durch die beiden Zytokine, IL-1 β und TNF α , in den Herzen adulter Ratten und in neonatalen Rattenkardiomyozyten in Zellkultur (Patten et al. 2002 und Patten et al. 2003) konnte keine signifikante Erhöhung der RGS16-Promotoraktivität nach Behandlung der mit den pGL₃b-RGS16-Promotorkonstrukten transfizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten mit LPS oder IL-1 β bzw. TNF α nachgewiesen werden.
4. Die RGS16-Promotoraktivität wird induziert durch fötales Kälberserum und durch den EDG-Rezeptor Agonisten, Sphingosin-1-Phosphat (S1-P).
5. Inhibitionsversuche mit Pertussis Toxin (PTX), welches mit G α_i -Untereinheiten heterotrimerer G-Proteine interagiert und ihre Aktivierung blockiert sowie mit Chelerythrin, einem Proteinkinase C Inhibitor, deuten darauf hin, daß die von S1-P induzierte RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten Gi- und Proteinkinase C-abhängig vermittelt wird.

4. Diskussion

Es ist bereits vielfach in der Literatur beschrieben worden, daß bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS), ein Bestandteil der äußeren Zellmembran gram-negativer Bakterien, eine Zytokinkaskade induziert, welche die im Rahmen einer Sepsis beobachteten Effekte vermittelt (Alexander et al. 2001; Mathiak et al. 2002; Blackwell et al. 1996; Wheeler et al. 1999; Beutler et al. 1985 a). Bei septischen Patienten wurden erhöhte Serumlevel der pro-inflammatorischen Zytokine TNF α , IL-1 β , IL-6 und IFN γ , anti-inflammatorischer Zytokine sowie löslicher Zytokin-Rezeptoren wie „soluble TNF receptor“ (sTNFr) und Zytokin-Rezeptor-Antagonisten wie „IL-1 β -receptor antagonist“ (IL-1ra) nachgewiesen (Gogos et al. 2000; Blackwell et al. 1996). In den letzten Jahren mehren sich die Hinweise, daß LPS sowie LPS-induzierte Zytokine nicht nur in der Pathogenese der akut entzündlichen Herzinsuffizienz bei Patienten mit gram-negativer Sepsis (Müller-Werdan et al. 1996; Wheeler et al. 1999; Court et al. 2002), sondern auch im Rahmen der chronischen Herzinsuffizienz pathophysiologische Relevanz besitzen (Rauchhaus et al. 2000; Rauchhaus et al. 2001; Beitz und Niebauer 2000). Hierbei kommt es durch Translokation intestinaler Bakterien zur LPS-Freisetzung (Anker et al. 1997; Niebauer et al. 1999). Sowohl unsere wie auch andere Arbeitsgruppen konnten in *in vivo* Experimenten an adulten Ratten und Mäusen eine rasche Induktion von IL-1 β , TNF α , IL-6 und IFN γ im Herzgewebe der Tiere nach LPS-Gabe nachweisen (Baumgarten et al. 2001; Patten et al. 2001). Diesen pro-inflammatorischen Zytokinen werden ebenso wie LPS kardiodepressive Effekte zugeschrieben (Cain et al. 1999; Finkel et al. 1992; Kinugawa et al. 1994; Stein et al. 1996; Sun et al. 1998).

Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation waren Ergebnisse aus *in vivo* Experimenten an adulten Ratten. Diese zeigten nach LPS-Gabe im Herzgewebe charakteristische molekulare Veränderungen innerhalb der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, wie Induktion der inhibitorischen G α_i -Untereinheit und der RGS-Proteine RGS4 und RGS16 sowie Inhibition der G α_q -vermittelten Endothelin-1-induzierten Phospholipase C Aktivität (Patten et al. 2002). Auch in Zellkulturexperimenten an neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte unsere Arbeitsgruppe nachweisen, daß die RGS16-Proteinexpression durch LPS sowie durch die LPS-induzierten Zytokine TNF α und IL-1 β , jedoch nicht durch IL-6 und IFN γ , aktiviert wird (Patten et al. 2003). Die Induktion von RGS-Proteinen scheint eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Herzinsuffizienz zu spielen (Mittmann et al. 2002).

Durch ihre GTPase-aktivierende Funktion gegenüber verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten, insbesondere gegenüber $G\alpha_i$ - und $G\alpha_q$ -Untereinheiten, sind RGS-Proteine in der Lage G-Protein-vermittelte Signaltransduktionsprozesse zu modulieren und spielen eine Rolle bei der Regulation der Kontraktilität von Herzmuskelzellen und der Myokardhypertrophie (Mittmann et al. 2002; Wieland und Chen 1999; Wieland und Mittmann 2003). So führt beispielsweise die Überexpression von RGS4 zur Inhibition der $G\alpha_q$ -vermittelten, Endothelin-1-induzierten Erhöhung der myokardialen Kontraktilität und zur Inhibition der Endothelin-1-induzierten Hypertrophie von Herzmuskelzellen (Tamirisa et al. 1999; Michalek C. 2003).

4.1.1 Einfluß von LPS, TNF α und IL-1 β auf die RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten

TNF α , ein Zytokin, welches hauptsächlich von Makrophagen / Monozyten synthetisiert wird (Voronov et al. 1999), gilt als einer der Vermittler der bei inflammatorischen Erkrankungen beobachteten Effekte und wird in Verbindung gebracht mit einer Vielzahl infektiöser sowie nicht-infektiöser inflammatorischer Erkrankungen (Strieter et al. 1993; Blackwell et al. 1996). Es entfaltet seine Wirkung autokrin (lösliches TNF α , 17 kDa bzw. Homotrimer 51 kDa) oder juxtakrin (Transmembranprotein, 25 kDa) über die beiden ubiquitär exprimierten Rezeptoren TNF-R55 (TNF-Rezeptor 1; TNFR-1) und TNF-R75 (TNF-Rezeptor 2; TNFR-2) (Ibelgauf, Cope with cytokines and cells; Beitz und Niebauer, 2000). Bereits Ende des 19. Jahrhunderts wurde die Beobachtung gemacht, daß in einigen Fällen inoperable Sarkome nekrotisch wurden, wenn bei jenen Patienten gleichzeitig schwere bakterielle Infektionen auftraten. Dies führte erstmals zur Verknüpfung von Infektion, Entzündung und antitumoralen Effekten (Coley, 1893). 1975 wurde ein Molekül entdeckt, das in LPS behandelten Mäusen Tumornekrose induzierte und daraufhin den Namen Tumornekrosisfaktor erhielt (Carswell, 1975). Zehn Jahre später gelang es, TNF zu klonieren und in *E. coli* zu exprimieren (Aggarwal, 1985). Weitere Untersuchungen zeigten, daß TNF dem bereits beschriebenen Kachektin entspricht, einem Protein, das von Makrophagen sezerniert und für Auszehrungserscheinungen bei Patienten, die an malignen Neoplasien oder chronischen Entzündungen erkrankt sind verantwortlich ist (Beutler, 1985 b).

IL-1 ist die Bezeichnung für zwei funktionell eng verwandte Proteine, IL-1 α und IL-1 β , wobei IL-1 β die vorherrschende Form ist. Beide Proteine aktivieren autokrin die gleichen IL-1-Rezeptoren (IL-1-Rezeptor Typ I und IL-1-Rezeptor Typ II) und zeigen deshalb häufig die gleiche biologische Aktivität (Ibelgaufts, Cope with cytokines and cells). IL-1 wird synthetisiert von Monozyten / Makrophagen sowie von anderen Zelltypen, wie z. B. B-Zellen, Fibroblasten, Epithelzellen sowie Endothelzellen und entfaltet seine Wirkung in einer Vielzahl von Geweben (Dinarello, 1991; Court et al. 2002; Voronov et al. 1999).

Den beiden oben erwähnten LPS-induzierten pro-inflammatorischen Zytokinen, TNF α und IL-1 β , wird in der Literatur eine zentrale Rolle für die im Rahmen einer gram-negativen bakteriellen Sepsis beobachteten Effekte zugeschrieben (Blackwell et al. 1996; Court et al. 2002). Patienten mit bakterieller Sepsis zeigen erhöhte TNF α - und IL-1 β -Serumlevel, die mit dem Schweregrad der Sepsis korrelieren (Martin et al. 1994; Blackwell et al. 1996). Infusionen von TNF α und IL-1 β führten sowohl bei gesunden Voluntären als auch im Tierversuch zu einem sepsisähnlichen Zustand (Blackwell et al. 1996; Court et al. 2002; van der Poll et al. 1991) und kardiovaskulären Veränderungen, wie Hypotension, Erhöhung der CO-Konzentration im Blut und Verringerung der myokardialen Kontraktilität, die auch während eines septischen Schocks beobachtet werden können (Eichenholz et al. 1992; Court et al. 2002; Gu et al. 1998; Kumar et al. 1996; Finkel et al. 1992; Weisensee et al. 1993; Gulick et al. 1989; Hosenpud et al. 1989). Sowohl TNF α als auch IL-1 β induzieren weitere inflammatorische Mediatoren, unter anderem distale Zytokine, wie beispielsweise IL-6 und IL-8, sowie reaktive Sauerstoffspezies wie Stickstoffmonoxid (Blackwell et al. 1996; Finkel et al. 1992).

Ausgehend von ihrer zentralen Rolle für die während einer gram-negativen bakteriellen Sepsis und bei akut entzündlicher Herzinsuffizienz beobachteten Effekte, wurde in der vorliegenden Dissertation untersucht, ob LPS direkt oder durch Induktion von TNF α und / oder IL-1 β zur Erhöhung der RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten führt. In Zellkulturexperimenten wurde die bereits bekannte stimulatorische Wirkung von LPS, IL-1 β und TNF α auf die RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht (Patten et al. 2003). Zur Inhibition der stimulatorischen Wirkung von LPS und den beiden oben erwähnten pro-inflammatorischen Zytokinen wurden die beiden Inhibitoren „soluble TNF receptor“ (sTNFr) und „Interleukin-1-receptor antagonist“ (IL-1ra) eingesetzt und die RGS16-Proteinexpression nach dieser Behandlung im Immunoblot quantifiziert.

Sowohl lösliche TNF-Rezeptoren (sTNFRs) als auch Interleukin-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) liegen bei septischen Patienten in erhöhter Konzentration vor. Die Funktion und Bedeutung der Induktion von löslichen Rezeptoren und Rezeptor-Antagonisten, wie sTNFr und IL-1ra, ist im Einzelnen noch unbekannt, sie scheinen jedoch die Aktivität von pro-inflammatorischen Zytokinen zu regulieren (Blackwell et al. 1996; Gogos et al. 2000; Beitz und Niebauer 2000).

Die bereits vielfach in der Literatur beschriebene inhibitorische Wirkung von sTNFr und IL-1ra auf TNF α - und IL-1 β -vermittelte Effekte, wie beispielsweise Inhibition der TNF α - bzw. IL-1 β -induzierten Expression von IL-6, IL-8 und IFN γ sowie Inhibition der durch TNF α vermittelten Gewebeschädigung (Blackwell et al. 1996; Abraham et al. 1994; He et al. 2006; Chan et al. 2002), konnte auch in dieser Dissertation nachgewiesen werden. So führte Präinkubation mit dem jeweils spezifischen Inhibitor sTNFr bzw. IL-1ra zur Inhibition der TNF α - bzw. IL-1 β -induzierten RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten (Abbildung 5). Dies verdeutlicht die rezeptorvermittelte Wirkungsweise dieser beiden pro-inflammatorischen Zytokine. Von weitaus größerer Bedeutung ist jedoch die im Immunoblot beobachtete Inhibition der LPS-induzierten RGS16-Proteinexpression durch den IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten IL-1ra (Abbildung 6), wohingegen Präinkubation mit dem TNF α -Inhibitor sTNFr keinerlei inhibitorische Wirkung auf die LPS-induzierte RGS16-Proteinexpression zeigt (Abbildung 6). Einsatz beider Inhibitoren, sTNFr und IL-1ra, führt zur Inhibition der LPS-induzierten RGS16-Proteinexpression, die mit der inhibitorischen Wirkung von IL-1ra größenordnungsmäßig vergleichbar ist (Abbildung 6) und deshalb wohl auf die Wirkung von IL-1ra zurückzuführen ist. Diese Ergebnisse deuten daraufhin, daß LPS durch Induktion von IL-1 β zu einer verstärkten RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten führt. Interessanterweise läßt sich die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression ebenfalls durch den IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten IL-1ra inhibieren, während die IL-1 β -induzierte RGS16-Proteinexpression nicht durch den TNF α -Inhibitor sTNFr inhibiert wird (Abbildung 7). Daraus läßt sich schließen, daß sowohl die LPS- (Abbildung 6) wie auch die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression (Abbildung 7) durch Aktivierung von IL-1 β vermittelt wird und IL-1 β somit eine Schlüsselrolle in der Regulation der kardialen RGS16-Proteinexpression einnimmt.

Ausgehend von der zentralen Bedeutung der Induktion der RGS16-Proteinexpression im Herzen in der Entwicklung einer Herzinsuffizienz, befinden sich diese Ergebnisse im Einklang mit anderen Studien, die IL-1 β ebenfalls eine entscheidende Rolle für die im Rahmen einer bakteriellen Sepsis beobachteten Effekte zuschreiben. So reduziert Präinkubation mit IL-1ra die Mortalitätsrate von Kaninchen, die mit Endotoxin behandelt wurden (Ohlsson et al. 1990). Fischer et al. (1992) berichteten, daß Behandlung mit IL-1ra die Expression von IL-1, IL-6 und IL-8 reduziert und die Überlebensrate von Pavianen nach Infusion mit *E. coli* Bakterien steigert. Wakabayashi et al. (1991) zeigten im Tiermodell an Kaninchen, daß Behandlung mit IL-1ra während eines septischen Schocks Hypotension sowie Gewebeschädigung verhindert.

4.1.2 ELISA-Experimente zum Nachweis der Expression und Sekretion von IL-1 β und TNF α in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Obwohl im Rahmen von verschiedenen Herzerkrankungen, wie beispielsweise koronaren Herzerkrankungen, chronischer Herzinsuffizienz und akut entzündlicher Herzinsuffizienz, erhöhte Zytokinkonzentrationen im Serum dieser Patienten festgestellt wurden (Zeuke et al. 2002; Court et al. 2002; Rauchhaus et al. 2001; Baumgarten et al. 2004) und darüber hinaus die kardiodepressive Wirkung insbesondere der LPS-induzierten Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 vielfach in der Literatur beschrieben worden ist (Müller-Werdan et al. 1998; Kumar et al. 1996; Stein et al. 1996; Finkel et al. 1992), ist bisher nur wenig darüber bekannt, ob Kardiomyozyten lediglich Zielzellen für oben erwähnte Zytokine darstellen oder ob sie selbst Zytokine exprimieren und sezernieren. Da TNF α und IL-1 β jedoch nicht IL-6 die RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten induzieren (Patten et al. 2003), wurde in der vorliegenden Dissertation mit Hilfe von ELISA Immunoblotting Experimenten untersucht, ob LPS die Expression und Sekretion von TNF α und IL-1 β in neonatalen Rattenkardiomyozyten in Zellkultur induziert.

Zellassoziertes IL-1 β wurde bereits innerhalb von 3 h durch LPS in neonatalen Rattenkardiomyozyten induziert und erreichte sein Expressionsmaximum nach 6 h (Abbildung 8 A), gefolgt von einer verzögerten IL-1 β -Sekretion mit einem Maximum nach 48 h (Abbildung 8 B). Im Vergleich zur IL-1 β -Sekretion (Abbildung 8 B) lag die LPS-induzierte TNF α -Sekretion der Kardiomyozyten ca. 10fach höher und erreichte ihr Maximum bereits nach 6 h (Abbildung 9 B).

Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Induktionsabfolge und quantitative Relation von IL-1 β zu TNF α erbrachten Versuchsreihen an septischen Patienten und Voluntären, in denen die Konzentrationen von IL-1 β und TNF α nach LPS-Infusion im Blutplasma bestimmt wurden. Diese Patienten zeigten maximale IL-1 β -Plasmakonzentrationen 3 h nach LPS-Infusion, während TNF α -Plasmalevel im Vergleich zu IL-1 β um das 15fache erhöht waren und ihr Maximum bereits nach 90 Min. erreichten (Cannon et al. 1990; Blackwell et al. 1996; Hesse et al. 1988; Suffredini et al. 1994).

Zellassoziertes TNF α konnte zu jedem Versuchszeitpunkt sowohl nach NaCl- als auch nach LPS-Gabe nur in geringer Konzentration detektiert werden (Abbildung 9 A). Dies könnte entweder auf eine sehr schnelle und quantitative Sekretion von TNF α , so daß intrazellulär nur wenig TNF α verbleibt, oder auf technische Probleme bei der Versuchsdurchführung zurückzuführen sein. ELISA Kits sind laut Herstellerangaben (R & D Systems) optimal geeignet zum spezifischen Proteinnachweis in Zellkulturüberständen und Serum, grundsätzlich können sie jedoch ebenfalls zum spezifischen Proteinnachweis in Zelllysaten eingesetzt werden. Hierbei können jedoch verschiedene Probleme, die größtenteils experimentell durch entsprechende Vorversuche auszuschließen sind, auftreten. Anzuführen wären an dieser Stelle mögliche Interaktionen mit Bestandteilen des Lysis-Puffers, Zerstörung des jeweiligen Proteins oder der nativen Struktur eines Proteins durch Bestandteile des Lysis-Puffers (enthalten häufig Detergentien mit denaturierender Wirkung) oder der ausschließliche Nachweis eines Proteins in einer bestimmten, biologisch aktiven Form. In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist, daß sowohl IL-1 β als auch TNF α als sogenannte „Precursor“-Proteine mit einem Molekulargewicht von 31 kDa (IL-1 β) bzw. 25 kDa (TNF α) synthetisiert werden, welche nach proteolytischer Spaltung als biologisch aktive Proteine mit einem Molekulargewicht von 17 kDa vorliegen (Hazuda et al. 1988; Voronov et al. 1999).

IL-1 β liegt intrazellulär ausschließlich als biologisch inaktives „Precursor“-Protein vor (Voronov et al. 1999; Singer et al. 1995), extrazellulär als Gemisch aus „Precursor“-Protein (31 kDa) und biologisch aktivem Protein mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, wobei eine Prozessierung des „Precursor“-Proteins für die Sekretion nicht notwendig zu sein scheint (Hazuda et al. 1988).

Als Prozessierungsmechanismen werden in der Literatur sowohl extrazelluläre Prozessierung durch eine LPS-induzierbare Protease (Ibelgaufits, Cope with cytokines and cells) als auch Prozessierung nach Assoziation des IL-1 β -„Precursor“-Proteins (31 kDa) an die Zellmembran mit Hilfe des in der Zellmembran lokalisierten IL-1 β Converting Enzyms im Verlaufe der Sekretion beschrieben (Singer et al. 1995). Sowohl das intrazellulär lokalisierte IL-1 β -„Precursor“-Protein (31 kDa) als auch das sezernierte, biologisch aktive IL-1 β (17 kDa) sind laut Herstellerangaben mit Hilfe des ELISA Kits von R & D Systems detektierbar.

TNF α liegt intrazellulär als biologisch aktives Transmembranprotein („Precursor“-Protein, 25 kDa) vor. Der Prozessierungsmechanismus dieses Transmembranproteins ist im Zusammenhang mit dem Nachweis von intrazellulärem TNF α interessant. Um näher auf den Prozessierungsmechanismus einzugehen, muß zunächst die Orientierung des Transmembranproteins innerhalb der Membran näher erläutert werden. Das aminoternale Ende des membranassoziierten TNF α ist intrazellulär lokalisiert, das Transmembran-Segment liegt in der Nähe des aminoternalen Endes, das carboxyterminale Ende ist extrazellulär gelegen. Dieses Transmembranprotein wird proteolytisch in Form eines löslichen, biologisch aktiven Proteins mit einem Molekulargewicht von 17 kDa, welches das carboxyterminale Ende beinhaltet, aus der Plasmamembran abgespalten. Nach der Sekretion bildet es stabile Homotrimeren (Voronov et al. 1999). Intrazellulär liegt es somit zu keinem Zeitpunkt in seiner sezernierten monomeren (17 kDa) bzw. trimeren Form (51 kDa) vor. Es liegen keine Herstellerangaben vor, ob mit Hilfe des ELISA Kits (rat TNF α , Quantikine P Colorimetric Sandwich ELISA, R & D Systems) neben der sezernierten Form (17 kDa) bzw. als Trimer (51 kDa), welche in Zellkulturüberständen und Serum vorhanden ist, auch membranassoziiertes, intrazelluläres TNF α detektierbar ist. Die schnelle und quantitative Sekretion von TNF α oder das Vorliegen von intrazellulärem TNF α in einer mit dem oben erwähnten Kit nicht nachweisbaren Form sind mit hoher Wahrscheinlichkeit der Grund für das intrazellulär kaum detektierbare TNF α . Interaktionen mit Bestandteilen des Lysis-Puffers oder die Zerstörung von TNF α bzw. für den Nachweis von TNF α relevante denaturierende Wirkung des Lysis-Puffers wurden experimentell ausgeschlossen.

Die durch oben angeführte ELISA Immunoblotting Experimente nachgewiesene LPS-induzierte Expression der beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α und die schnelle Sekretion von TNF α ist bereits für andere Zelltypen des kardiovaskulären Systems, wie z. B. für glatte Gefäßmuskelzellen (Detmer et al. 2001) und für humane Endothelzellen der Herzkranzgefäße (Zeuke et al. 2002), beschrieben worden. Da es sich jedoch auf Grund der Präparationsweise (siehe Material und Methoden 2.3.1) und des Einsatzes eines Proliferationshemmers (BrdU) zu mehr als 95 % um Kardiomyozyten in unserer Präparation handelt, spricht der massive Anstieg des IL-1 β -Gehaltes in Zellhomogenaten bzw. Zellkulturüberständen (Abbildung 8 A bzw. 8 B) und des TNF α -Gehaltes in Zellkulturüberständen (Abbildung 9 B) dafür, daß LPS in den Kardiomyozyten selbst die beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α induziert. In diesem Zusammenhang erwähnenswert ist, daß Kardiomyozyten den zur Erkennung von LPS benötigten Transmembranrezeptor „Toll-like receptor 4“ (TLR4) exprimieren (Frantz et al. 1999). Während bereits in einigen wenigen Arbeiten gezeigt werden konnte, daß Kardiomyozyten zumindest einen bestimmten Anteil an der LPS-induzierten TNF α -Sekretion im Herzen haben und hierzu neben TLR4 der Co-Faktor CD14 benötigt wird (Comstock et al. 1998), konnte in dieser Dissertation erstmalig gezeigt werden, daß LPS in Kardiomyozyten ebenfalls die IL-1 β -Expression sowie die Sekretion induziert (Abbildung 8 A und 8 B).

Die Inhibition der von LPS bzw. TNF α aktivierten RGS16-Proteinexpression durch den IL-1 β -Rezeptor-Antagonisten IL-1ra (Abbildung 6 bzw. 7) deuten darauf hin, daß nicht nur die LPS-induzierte RGS16-Proteinexpression, sondern auch die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression durch Aktivierung der IL-1 β -Proteinexpression vermittelt wird. Deshalb wurde nicht nur, wie bereits oben diskutiert, untersucht, ob LPS die Expression und Sekretion von IL-1 β und TNF α in Kardiomyozyten induziert, sondern darüber hinaus, inwieweit TNF α die IL-1 β -Proteinexpression und -sekretion in neonatalen Rattenkardiomyozyten reguliert. Berücksichtigung der Induktionsabfolge von TNF α und IL-1 β nach LPS-Infusion in *in vivo* Versuchsreihen (Cannon et al. 1990; Blackwell et al. 1990; Hesse et al. 1988; Suffredini et al. 1989) bzw. nach LPS-Gabe im Zellkulturmodell (Abbildung 8 und 9), welche eine rasche Sekretion von TNF α gefolgt von einer zeitlich verzögerten IL-1 β Sekretion zeigten, legen eine mögliche Regulation der IL-1 β -Proteinexpression durch TNF α nahe.

Die durch TNF α intrazellulär induzierte IL-1 β -Proteinmenge beträgt mit einem Maximum nach 6 h (Abbildung 10 A) ca. die Hälfte im Vergleich zur durch LPS intrazellulär induzierten IL-1 β -Proteinmenge nach 6 h (Abbildung 8 A). Auch die TNF α -induzierte IL-1 β -Proteinsekretion (Abbildung 10 B) liegt unter der von LPS aktivierten IL-1 β -Proteinsekretion (Abbildung 8 B), ist jedoch zu jedem Versuchszeitpunkt nachweisbar. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß TNF α neben LPS einen erheblichen Anteil an der Regulation der IL-1 β -Proteinexpression und –sekretion in Kardiomyozyten hat.

Abbildung 24 zeigt zusammenfassend die biochemischen Prozesse, die zur Induktion der RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten unter LPS-Einwirkung führen. Grundlage für dieses Diagramm sind unter 3.1 erzielte Ergebnisse sowie in der Legende angeführte Literatur.

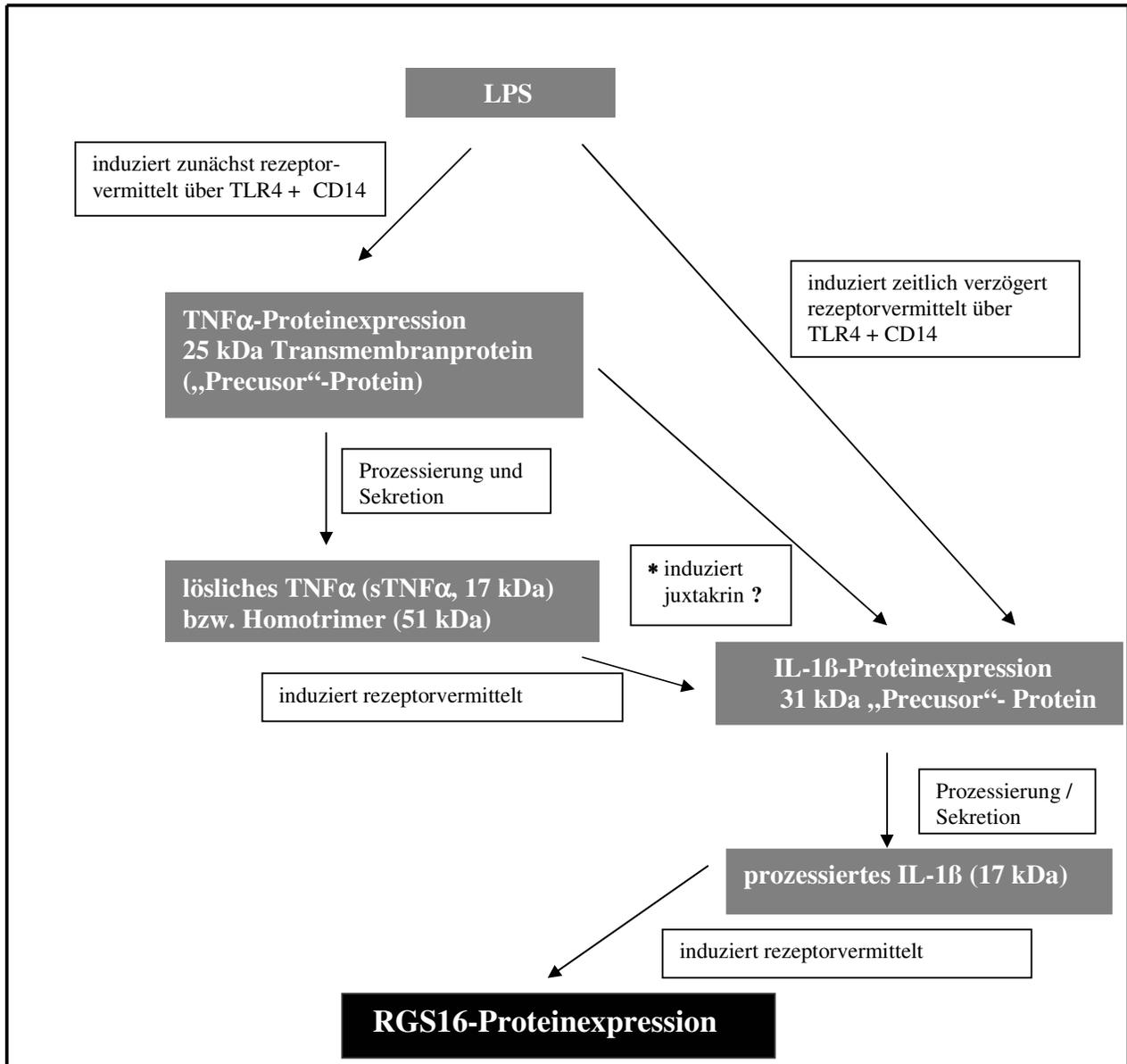


Abbildung 24: Induktion der RGS16-Proteinexpression in neonatalen Rattenkardiomyozyten unter LPS-Einwirkung

LPS induziert zunächst rezeptorvermittelt über den Transmembranrezeptor „Toll-like receptor 4“ (TLR4) sowie den Co-Faktor CD14 (Frantz et al. 1999; Comstock et al. 1998) die TNF α -Proteinexpression. TNF α wird zunächst als Transmembranprotein („Precursor“-Protein, 25 kDa) synthetisiert, anschließend prozessiert und als lösliches TNF α (sTNF α , 17 kDa) sezerniert. Es bildet nach der Sekretion stabile Homotrimer (Voronov et al. 1999). Neben LPS aktiviert lösliches TNF α als Homotrimer (sTNF α , 51 kDa) rezeptorvermittelt in autokriner Wirkungsweise die Expression des IL-1 β -„Precursor“-Proteins (31 kDa). Das IL-1 β -„Precursor“- Protein (31 kDa) wird prozessiert und sezerniert (Voronov et al. 1999). In seiner sezernierten Form (17 kDa) induziert IL-1 β in autokriner Wirkungsweise die RGS16-Proteinexpression. * Anmerkung: Nicht auszuschließen ist darüber hinaus eine Induktion des IL-1 β -„Precursor“- Proteins (31 kDa) durch membranassoziiertes TNF α (25 kDa) in juxtakriner Wirkungsweise. In dieser Dissertation wurde jedoch ausschließlich die Wirkungsweise von löslichem TNF α (17 kDa) bzw. als Trimer (51 kDa) unter definierten Bedingungen untersucht, so daß lediglich Aussagen über die Aktivität von TNF α in dieser Form gemacht werden können.

4.2 RGS16-Promotoranalyse

Im Laufe der letzten Jahre wurde viel über die Funktionsweise der RGS-Proteine im Herzen veröffentlicht (Riddle et al. 2005; Wieland et al. 2003; Patten et al. 2002; Panetta et al. 1999; Rogers et al. 1999). Bisher ist jedoch nur wenig über die transkriptionelle Regulation der RGS-Proteine bekannt. Lediglich der Promotor des RGS2-Gens, welches für eines der ersten im Säugetier beschriebenen RGS-Proteine kodiert, wurde bisher identifiziert und funktionell charakterisiert (Thirunavukkarasu et al. 2002). Die schnelle Induktion der RGS16-mRNA und Proteinexpression in Kardiomyozyten im Rahmen einer akut entzündlichen Herzinsuffizienz deutet auf eine wichtige Rolle im Rahmen der Pathophysiologie dieser Herzerkrankung hin (Patten et al. 2002). Aus diesem Grunde wurde der RGS16-Promotor kloniert. Es wurden überlappende, putative RGS16-Promotordeletionskonstrukte erstellt, um die minimale Promotorsequenz zu ermitteln, die für die RGS16-Expression erforderlich ist. Durch die Untersuchung der Promotoraktivität verschiedener putativer Promotordeletionskonstrukte können funktionell wichtige Abschnitte innerhalb eines Promotors sowie die Minimalsequenz, die die Promotoraktivität des jeweiligen Gens reguliert, ermittelt werden.

Das Ausgangskonstrukt 1,8 kb-*Kpn I*, der RGS16-Promotor, wurde aus genomischer Maus RGS16-DNA mit Hilfe des Genome WalkerTM Kits mittels PCR hergestellt. Dieses Konstrukt lag zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns vor. Die putativen RGS16-Promotordeletionskonstrukte wurden entweder durch Restriktion aus einem bereits vorliegenden Konstrukt oder durch PCR generiert. Für die Klonierung und funktionelle Analyse der RGS16-Promotorkonstrukte wurden Plasmid-Vektoren, für PCR-Produkte der pCR^R2.1-TOPO 3,9 kb Vektor und für durch Restriktion hergestellte RGS16-Promotordeletionskonstrukte sowie für die funktionelle Analyse dieser Konstrukte der pGL₃b Vektor 4,8 kb (Abbildung 12), eingesetzt. Als Transfektionsmethode in neonatale Rattenkardiomyozyten wurde die Calciumphosphat-Präzipitation und als Reporteragen-Assay der Dual-Luciferase Reporteragen-Assay von Promega gewählt. Im Folgenden werden die Gründe für die Wahl von Plasmid-Vektoren, die Calciumphosphat-Präzipitation und den Dual-Luciferase Reporteragen-Assay näher erläutert.

4.2.1 Klonierung von DNA und Gentransfer

Für die Klonierung von zu untersuchenden DNA-Abschnitten (Promotoren, kodierende Bereiche eines Gens) oder für den Gentransfer im Rahmen einer Gentherapie (*in vivo* oder *ex vivo*) stehen verschiedene modifizierte virale sowie nicht-virale Vektoren zur Verfügung. Bei der Auswahl des passenden Klonierungsvektors müssen verschiedene Aspekte wie Länge des zu klonierenden DNA-Abschnitts (siehe Tabelle 1), Anwendungsbereich (*in vivo* oder *in vitro*), Gentransfereffizienz, Sicherheit und Herstellungsaufwand berücksichtigt werden.

1. Gentransfer mittels modifizierter viraler Vektoren (Retroviren oder Adenoviren):

Modifizierte virale Vektoren werden vorwiegend im Rahmen einer Gentherapie eingesetzt (Adenoviren, 25 %; Retroviren, 23 %) (Wiley 2007). Gründe hierfür beinhalten eine höhere Gentransfereffizienz im Vergleich zu nicht-viralen Vektoren sowie das Fehlen zytotoxischer Eigenschaften aufgrund des rezeptorvermittelten DNA-Transfers. Insbesondere bei der *in vivo* Applikation im Rahmen einer Gentherapie sind mögliche immunogene (insbesondere Adenoviren) sowie carcinogene (insbesondere Retroviren) Eigenschaften dieser Vektoren zu berücksichtigen (Thomas et al. 2003; Lehmann S. 1999; Orkin und Motulsky 1995). Der Herstellungsaufwand rekombinanter Viren ist hoch. In der Regel werden durch Modifikation replikationsinkompetente Viren eingesetzt, die sich in der Zielzelle nicht mehr replizieren und somit nicht unkontrolliert vermehren können. Die für die Vermehrung fehlenden Funktionen werden bei der Synthese dieser Viren durch Helferviren oder durch sogenannte „Packaging Cells“ (KB-, Hela-, HEK- oder 293-Zellen), die den viralen Vektor komplementieren und zur Vermehrung dienen, zur Verfügung gestellt (Michalek 2003). Verschiedene virale Vektoren ermöglichen entweder einen stabilen Einbau der rekombinanten viralen DNA in die Zielzellen (Retroviren und die ebenfalls zu den Retroviren gehörenden Lentivirinae) oder transiente Expression (Adenoviren). Manche virale Vektoren erfassen nur proliferierende Zellen (Retroviren), während die Subfamilie der Lentivirinae ebenfalls nicht-proliferierende Zellen erfaßt. Adenoviren erfassen ein weites Spektrum an replizierenden sowie nicht-replizierenden Zellen (Michalek 2003; Schmid 2006).

2. Nicht-viraler Gentransfer

In der nicht-therapeutischen Anwendung des Gentransfers zu Forschungszwecken werden zum Gentransfer in *eukaryontische* Zellen meist nicht-virale Gentransfermethoden verwendet. Zur Transfektion mit nicht-viralen Vektoren (eine Übersicht über in der Gentechnologie häufig eingesetzte Vektoren gibt Tabelle 1) stehen verschiedene physikalische, chemische oder

biologische Methoden zur Verfügung (Lehmann C. 2003; Knippers, Molekulare Genetik 1997; Ibelgauf, Gentechnologie von A bis Z 1993; Schmid 2006). Diese variieren in ihrer Gentransfereffizienz, Transfektionsaufwand und Eignung.

physikalische Methoden:

A. Mikroinjektion: Die DNA wird mit Hilfe einer Mikrokapillare direkt in die Zelle injiziert. Vorteil: nicht zytotoxisch, Transfektionseffizienz von nahezu 100 %, Nachteil: Das Verfahren ist sowohl apparativ sehr aufwendig als auch manipulativ höchst anspruchsvoll, darüber hinaus müssen die Zellen einzeln injiziert werden.

B. Particle Gun: Die DNA wird auf Mikroprojekteile z. B. Wolframpartikel, Gold aufgebracht, die mit Druck auf die Zellen geschossen werden. Interessante Einsatzgebiete sind: Transfektion von Pflanzenzellen, einzige Methode zur Transfektion von Organellen wie Mitochondrien oder Chloroplasten. Nachteil: Verfahren ist apparativ sehr aufwendig.

C. Elektroporation: Durch elektrische Pulse hoher Feldstärke wird die Zellmembran durchlässig gemacht für Makromoleküle wie DNA. Dieses Verfahren eignet sich für eine Vielzahl von Zellarten und Spezies, unter anderem Bakterienzellen, Hefe und andere *eukaryontische* Zellen in Suspension, und ist in vielen Fällen auch dann anwendbar, wenn andere Methoden versagen. Diese Methode eignet sich darüber hinaus auch für die *in vivo* Applikation im Rahmen einer Genthherapie. Hier müssen die Zellen nicht in Suspension vorliegen. Es werden mit einer Elektrode bestückte Nadeln eingesetzt und die DNA direkt in die Zielzelle injiziert.

chemische Verfahren:

Chemische Verfahren beruhen auf der Komplexierung der polyanionischen DNA mit Kationen, hierdurch wird der Membrantransfer ermöglicht. Chemische Verfahren zur Transfektion sind häufig zytotoxisch und deshalb nicht für *in vivo*-Studien geeignet, jedoch teilweise sehr effektiv (DEAE-Dextran, Calciumphosphat). Eingesetzt werden können z. B. Diethylaminoether (DEAE)-Dextran, Calciumphosphat, Polyethylenimin, Polybren, kationische Lipidgemische (Lipofektion) z. B. Lipofectamine oder kationische Dendrimere. Dendrimere sind kationische hochverzweigte sphärische Polymere, bei denen sich Polymerstrukturen mit endständig geladenen Aminogruppen um ein zentrales Molekül anordnen. Sowohl kationische Lipide z. B. Lipofectamine als auch Dendrimere z. B. Superfect (Qiagen) zeigen hohe Transfektionseffizienzen, erreichen ein weites Spektrum *eukaryontischer* Zellen und zeigen zum Teil eine geringere Zytotoxizität (Superfect von Qiagen).

biologische Methoden:

Kopplung der zu transfizierenden DNA an einen Liganden (z. B. Asialoglykoprotein, Transferrin, Integrin, Epidermal Growth Factor), welcher an Oberflächenrezeptoren der Zielzelle bindet und so eine Internalisierung ermöglicht.

Obwohl der *in vitro* Einsatz rekombinanter Adenoviren zum Gentransfer in neonatale Rattenkardiomyozyten in einigen Dissertationen beschrieben wird (Michalek 2003; Fahimi-Vahid 2003) und gute Gentransfereffizienzen erreicht wurden, wurden in dieser Dissertation keine Adenoviren eingesetzt. Als Grund hierfür ist der hohe Herstellungsaufwand rekombinanter Adenoviren anzuführen. Es werden zwei *eukaryontische* Zelllinien benötigt, die zur Vermehrung dienenden „Packaging Cells“ und Kardiomyozyten. Darüber hinaus ist die Virusaufreinigung aufwendig. Physikalische Methoden waren entweder nicht geeignet (Elektroporation) oder zu aufwendig und hierdurch keine ausreichende Menge an rekombinanter DNA zu isolieren (Mikroinjektion). Als Transfektionsmethoden in neonatale Rattenkardiomyozyten wurden verschiedene chemische Verfahren wie Lipofektion, Transfektion mit Dendrimeren sowie die Calciumphosphat-Präzipitation gewählt. Sowohl Lipofektion als auch Transfektion mit Dendrimeren zeigten keine besseren Transfektionseffizienzen als die Calciumphosphat-Präzipitation (Daten nicht gezeigt). Für Versuchszwecke zeigte die Calciumphosphat-Präzipitation (Standardmethode) eine ausreichende Transfektionseffizienz und wurde deshalb als Transfektionsmethode gewählt.

Tabelle 1 gibt Aufschluß über häufig in der Gentechnologie eingesetzte Vektoren.

Tabelle 1: Übersicht über in der Gentechnik häufig eingesetzte Vektoren

Vektor	Maximale Aufnahmekapazität
Plasmide	10 – 15 kb (Knippers, Molekulare Genetik)
Cosmide	30 – 50 kb (Ibelgaufits, Gentechnologie von A bis Z, 1993)
BAC (bacterial artificial chromosome)	75 – 125 kb (Ibelgaufits, Gentechnologie von A bis Z, 1993)
YAC (yeast artificial chromosome)	100 – 1.000 kb (Ibelgaufits, Gentechnologie von A bis Z, 1993)
Modifizierte Viren	
a. Bakteriophagen	10 – 20 kb (Lambda), 90 kb (P1) (Knippers, Molekulare Genetik, 1997)
b. DNA-/RNA-Viren	30 kb (Adenoviren) (Benihoud et al. 1999)
c. Retroviren	8 kb (Brand und Strauß 1997)

In der Gentechnologie werden zur Klonierung von kleinen DNA-Abschnitten (maximal 10 – 15 kb) und anschließender *in vitro* Applikation meist Plasmide eingesetzt (Ibelgauf, Gentechnologie von A bis Z, 1993). Sie weisen eine Reihe von Vorteilen auf, die sie optimal geeignet machen zur Klonierung von kleinen DNA-Abschnitten.

4.2.2 Plasmide in der Gentechnologie

Die heute in der Gentechnologie eingesetzten Plasmid-Vektoren sind Derivate des natürlich in Bakterien vorkommenden R-Plasmids. Sie besitzen neben spezifischen Genen als reguläre Mindestbestandteile ihres Genoms, genau wie das R-Plasmid, einen „origin of replication“ (ori) und DNA-Abschnitte, die Antibiotikaresistenz vermitteln. Synthetische Plasmid-Vektoren weisen neben diesen regulären Mindestbestandteilen und spezifischen Genen eine „Multiple Cloning Site“ (MCS) auf, in die über entsprechende Restriktionsstellen die zu untersuchenden DNA-Abschnitte in den Plasmid-Vektor kloniert werden (Knippers, Molekulare Genetik, 1997).

Verschiedene Vorteile machen Plasmid-Vektoren zu geeigneten DNA-Transfervehikeln in der Gentechnologie:

- Geringe bzw. keine Sicherheitsrisiken beim Umgang mit Plasmid-Vektoren.
- Schnelle, leichte Vermehrung in Bakterien für den späteren DNA-Transfer in *eukaryontische* Zellen.
- Gute Selektionierbarkeit aufgrund der vermittelten Antibiotikaresistenz. Häufig weitere Selektionsmarker, die Aufschluß über den Klonierungserfolg ermöglichen (lacZ-Gen, Blau / Weiß Selektion, Abbildung 12, Klonierungsvektoren).
- Kommerzielle Erhältlichkeit für unterschiedlichste Anwendungsbereiche (z. B. für die Klonierung von PCR-Produkten, spezielle Vektoren für unterschiedlichste Reporteranalysen).
- Effiziente, zum Teil auch schnelle Klonierung (pCR^R 2.1-TOPO 3,9 kb Vektor, Ligation von Fremd-DNA in den Plasmid-Vektor innerhalb von 5 Minuten, gesamte Klonierung und Transformation der Bakterien innerhalb von 2 h).

4.2.3 Reporter-Gen-Assays

Durch Kopplung von Reporter-Genen an regulatorische Sequenzen (Promotoren) kann die Aktivität dieser Sequenzen nachgewiesen werden.

Reportergene müssen Genprodukte erzeugen, die sich leicht mit Hilfe biochemischer oder histochemischer Methoden nachweisen lassen und die für den Organismus oder die Zellen, in denen sie exprimiert werden, nicht toxisch sind. Im Idealfall sollten die Genprodukte nicht in endogener Form vorkommen. Häufig eingesetzte Reporter-Gen-Assays sind (Knippers, Molekulare Genetik 1997; Ibelgaufits, Gentechnologie von A bis Z, 1993, Sherf et al. 1996):

- Luciferase Reporter-Gen-Assay bzw. Dual-Luciferase Reporter-Gen-Assay
- Chloramphenicol Acetyltransferase Assay (CAT-Assay, Nachteil: endogene Deacetylase-Aktivität kann diesen Assay stören)
- β -Galactosidase Assay (β -Gal-Assay, Nachteil: β -Galactosidase wird in vielen Zelltypen exprimiert z. B. in Säugerzellen in der Leber),
- β -Glucuronidase Assay (β -GUS-Assay, Nachteil: β -Glucuronidase wird exprimiert in vielen Zelltypen)
- Green Fluorescent Protein Assay (GFP-Assay)

Der in der vorliegenden Dissertation zur Untersuchung der RGS16-Promotoraktivität eingesetzte Dual-Luciferase Reporter-Gen-Assay bietet im Vergleich zu oben angeführten anderen Reporter-Gen-Assays folgende Vorteile (Sherf et al. 1996, McNabb et al. 2005):

- höhere Sensitivität (Detektionsgrenze: 5 fg / ml)
- Schnellere, effizientere Durchführbarkeit durch die optimal aufeinander abgestimmte Kombination der beiden Reporter-Gen-Systeme. Der „experimentelle“ Vektor (pGL₃b) exprimiert die *Firefly*-Luciferase (aus *Photinus pyralis*) bei Klonierung eines funktionsfähigen Promotors, der Kontrollvektor (pRLTK) hingegen exprimiert konstitutiv die *Renilla*-Luciferase (aus *Renilla reniformis*) (Kontrolle der Transfektionseffizienz, Normalisierung: *Firefly*-Luciferase Aktivität / *Renilla*-Luciferase Aktivität). Beide Luciferase-Enzyme zeigen nach Umsetzung ihres jeweiligen Substrates Biolumineszenzreaktionen, die nacheinander in kürzester Zeit innerhalb einer Probe gemessen werden können (für die Messung einer Probe wird ca. 1 Minute benötigt). Kein anderes System ist derartig gut aufeinander abgestimmt. So kombinieren z. B. andere Reporter-Gen-Assays Reportergene, die sich wesentlich in der chemischen Umsetzung ihrer Substrate und Reaktionszeit unterscheiden z. B. *Firefly*-Luciferase (Messung innerhalb von Sekunden) mit CAT, β -Gal oder β -GUS als Kontrollvektor (wesentlich längere Inkubationszeiten) oder nutzen nur einen einzigen Reporter z. B. β -Gal, die Normalisierung erfolgt durch aufwendige kolorimetrische Messung des Gesamtproteingehaltes im Zelllysat.

4.2.4 Identifikation essentieller RGS16-Promotorelemente

Durch Sequenzanalysen mit Hilfe des Sequencher DNA^R Softwareprogrammes sowie durch Messung der Promotoraktivität verschiedener RGS16-Promotorkonstrukte (Abbildungen 11 und 19) konnten, neben mehreren CCAAT-Boxen, insbesondere zwei für die RGS16-Promotoraktivität essentielle *cis*-Elemente sowie die Minimalsequenz, die die RGS16-Promotoraktivität reguliert, detektiert werden (Abbildung 18):

1. TATA-Box: Sie ist ein Grundelement innerhalb von Promotoren sowohl *prokaryontischer* als auch *eukaryontischer* Organismen und zur eindeutigen Festlegung des Transkriptionsstartes absolut unerlässlich (Knippers, Molekulare Genetik, 1997). Sequenzanalysen zeigten zunächst drei putative TATA-Boxen innerhalb des RGS16-Promotors (Abbildung 11). Erst durch die Messung der Promotoraktivität verschiedener putativer RGS16-Promotordeletionskonstrukte (Abbildungen 11 und 19) konnte die TATA-Box eindeutig ermittelt werden. Die zweite der in Abbildung 11 hervorgehobenen putativen TATA-Boxen erwies sich als die für die RGS16-Promotoraktivität essentielle TATA-Box.
2. Ein in unmittelbarer Nähe zur TATA-Box gelegenes Sequenzmotiv, welches Homologie zur Konsensussequenz (CCT)AANATGGNC/G der Bindestelle des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Yin Yang 1 (YY1) (Lee et al. 1992) aufweist (Abbildung 18). Dieses Sequenzelement ist aus verschiedenen Gründen interessant. YY1, ein multifunktionaler Transkriptionsfaktor, reguliert entweder als Aktivator oder Repressor die Transkriptionsrate vieler Gene (Shrivastava et al. 1994; Natesan et al. 1995; Hyde-DeRuyscher et al. 1995). Auch im Rahmen der kardialen Genregulation, als Repressor der Transkription kardialer Gene wie z. B. skeletal α -Aktin, spielt YY1 eine wichtige Rolle (Patten et al. 1996; Patten et al. 2000). Grundsätzlich jedoch sind alle in unmittelbarer Nähe der TATA-Box gelegenen *cis*-Elemente besonders interessant, da Transkriptionsfaktoren, welche mit diesen Elemente interagieren, zusätzlich Interaktionen mit allgemeinen Transkriptionsfaktoren, welche sich in der Region um die TATA-Box anlagern, zeigen könnten. So wird für YY1 in der Literatur Interaktion mit den allgemeinen Transkriptionsfaktoren TFIIB (allgemeiner Transkriptionsfaktor IIB) und TBP (TATA-Bindeprotein) beschrieben (Usheva et al. 1994).

In *in vitro* Analysen an dem Adenovirus-assoziierten P5 Promotor konnte gezeigt werden, daß das Vorhandensein der Transkriptionsfaktoren YY1, TFIIB und der RNA-Polymerase II ausreichen, um die Transkription zu initiieren (Usheva et al. 1994). Darüber hinaus werden für YY1 in der Literatur auch Interaktionen mit weiteren Transkriptionsfaktoren wie z. B. mit dem SRF (Serum Response Factor), c-Myc oder Sp1 beschrieben (Natesan et al. 1995; Shrivastava et al. 1994).

3. Messungen der Promotoraktivität verschiedener putativer RGS16-Promotordeletionskonstrukte (Abbildung 19) zeigten, daß ein „upstream“ des kodierenden Genbereiches gelegener 0,6 kb langer DNA-Abschnitt (RGS16-Promotordeletionskonstrukt: 0,6 kb *EcoRI-SacI*) alle für die RGS16-Promotoraktivität essentiellen Promotorelemente enthält und somit als Minimalsequenz des RGS16-Promotors identifiziert wurde (Abbildung 18).

4.2 Transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors

4.3.1 Der RGS16-Promotor wird nicht transkriptionell reguliert durch LPS, IL-1 β oder TNF α

Obwohl die RGS16-mRNA und Proteinexpression transient sowohl in den Herzen adulter Ratten als auch in Zellkulturexperimenten an neonatalen Rattenkardiomyozyten (RGS16-Proteinexpression) durch LPS sowie durch die beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α induziert wird (Patten et al. 2002 und Patten et al. 2003), konnte im Gegensatz zu diesen Ergebnissen die RGS16-Promotoraktivität weder durch LPS noch durch IL-1 β oder TNF α in neonatalen Rattenkardiomyozyten in Zellkultur induziert werden (Abbildung 20). Hierbei muß berücksichtigt werden, daß die RGS16-Promotoraktivität in einem artifiziellen System untersucht wurde. In diesem System könnten Ko-Faktoren fehlen, welche zur transkriptionellen Regulation des RGS16-Promotors durch LPS, IL-1 β und TNF α benötigt werden, die jedoch möglicherweise *in vivo* vorhanden sind.

Eine weitere mögliche Erklärung wäre eine posttranskriptionelle Regulation der RGS16-Expression durch LPS sowie durch die beiden oben erwähnten LPS-induzierten pro-inflammatorischen Zytokine durch Regulation der mRNA-Stabilität, translationale bzw. posttranslationale Regulation oder eine Kombination dieser drei Regulationsmechanismen.

Die erhöhte RGS16-mRNA-Expression in den Herzen adulter Ratten nach LPS-Gabe (Patten et al. 2002) spricht jedoch für eine Regulation der RGS16-Expression durch LPS, IL-1 β und TNF α bereits auf mRNA-Ebene durch Beeinflussung der mRNA-Stabilität möglicherweise kombiniert mit einer translationalen bzw. posttranslationalen Regulation durch oben erwähnte Stimulantien. Für einen möglichen Regulationsmechanismus durch Modulation der RGS16-mRNA-Stabilität nach LPS-Gabe sind Hinweise in der Literatur zu finden (Frevel et al. 2003).

Für viele insbesondere transient verstärkt exprimierte Gene, zu denen im Rahmen der Pathogenese verschiedener bakteriell verursachter Erkrankungen des Darmtraktes, der Niere, des zentralen Nervensystems sowie Sepsis (hier jedoch nicht transient) auch die pro-inflammatorischen Zytokine TNF α und IL-1 β gehören, wird in der Literatur sowohl transkriptionelle, posttranskriptionelle als auch posttranslationale Expressionsregulation beschrieben (Harrison et al. 2004).

Ein wichtiger erst in den letzten Jahren näher erforschter Regulationsmechanismus betrifft die Stabilität der mRNA, hierbei scheinen insbesondere sogenannte Destabilisierungssequenzen, AU-reiche (Adenin, Uracil-reiche) Sequenzabschnitte im 3'-untranslatierten mRNA-Bereich einen zentralen Stellenwert zu haben (Frevel et al. 2003; Harrison et al. 2004). Modulation der Genexpression über AU-reiche Sequenzabschnitte im 3'-untranslatierten mRNA-Bereich spielt bei vielen zellulären Prozessen z. B. innerhalb des kardiovaskulären und hämatopoetischen Systems, der zellulären Wachstumsregulation sowie bei der angeborenen als auch bei der spezifischen Immunregulation als Antwort auf Infektion durch Mikroorganismen eine wichtige Rolle. Mehr als 900 humane Gensequenzen, welche AU-reiche Sequenzabschnitte im 3'-untranslatierten mRNA-Bereich enthalten (häufig mehrere Kopien der Sequenzabfolge AUUUA), sind in der ARE-mRNA (Adenylate uridylate rich element mRNA) Datenbank ARED unter <http://rc.kfshrc.edu.sa/ared> abgelegt (Frevel et al. 2003; Bakheet et al. 2001; Bakheet et al. 2006). Neben verschiedenen Zytokinen sowie weiteren für entzündungsrelevante Proteine kodierenden Genen sind in dieser Datenbank auch die Sequenzen von humanen TNF α (Accession Nr. 000594), humanen IL-1 β (Accession Nr. 000576) und humanen RGS16 (Accession Nr. 002928) abgelegt.

Für IL-1 β und TNF α sowie für verschiedene andere Zytokine, welche bei inflammatorischen Prozessen eine Rolle spielen, konnte nach LPS- bzw. Shiga Toxin 1- (Stx-)Behandlung in einem Zellkulturmodell an humanen Monozyten (THP-1) sowohl eine transkriptionelle als auch eine posttranskriptionelle Regulation durch Modulation der mRNA-Stabilität nachgewiesen werden (Frevel et al. 2003; Harrison et al. 2004). Eine transkriptionelle Regulation von IL-1 β und TNF α erfolgt durch Bindung von *in trans* wirkenden Faktoren wie Nuclear Factor KappaB (NF- κ B) und Activator Protein-1 (AP-1) an die entsprechenden Bindestellen in den Promotoren von IL-1 β und TNF α (Harrison et al. 2004; Sakiri et al. 1998). Regulation der mRNA-Stabilität über AU-reiche Sequenzabschnitte erfolgt ähnlich wie die Transkriptionsregulation über *in trans* wirkende Faktoren. Hierbei handelt es sich um spezifische an die RNA bindende Proteine. Es konnten bereits *in trans* wirkende Faktoren aus verschiedenen Proteinfamilien identifiziert werden, die an AU-reiche Sequenzabschnitte in der mRNA binden und hierdurch Einfluß auf die mRNA-Degradierung nehmen (Keene 1999; Keene 2001; Frevel et al. 2003). So scheint Tristetraprolin, ein Protein der CCCH Tandem-Zinkfinger Familie, die mRNA-Stabilität von TNF α , Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor und Interleukin-3 zu regulieren (Carballo et al. 1998; Carballo et al. 2000; Lai et al. 1999; Stoecklin et al. 2000; Frevel et al. 2003). Stabilisierung der IL-1 β mRNA ist p38 abhängig, hierbei könnte die Phosphorylierung von ARE (Adenylate uridylate rich element)-stabilisierenden Proteinen durch p38 involviert sein (Frevel et al. 2003).

Induktion der RGS16-mRNA-Expression *in vivo* oder *in vitro* konnte sowohl nach LPS- als auch nach TNF α -Gabe von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Patten et al. 2002; Fong et al. 2000; Panetta et al. 1999; Frevel et al. 2003). Es konnte jedoch anhand dieser Studien keine Aussage darüber getroffen werden, ob die RGS16-Expression transkriptionell oder posttranskriptionell über eine Modulation der mRNA-Stabilität durch LPS bzw. TNF α reguliert wird. Die oben erwähnten und die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse (Abbildung 20) deuten auf eine mögliche posttranskriptionelle Regulation der RGS16-Expression durch LPS, TNF α und IL-1 β über Modulation der mRNA-Stabilität hin.

Weiterführende Studien wie mRNA-Gelshift-Assays sowie Konkurrenzexperimente könnten Aufschluß über Interaktionen bestimmter RGS16-mRNA-Abschnitte mit *in trans* wirkenden Faktoren und deren Sequenzspezifität geben.

Einbau von RGS16-cDNA, welche für putative mRNA-Destabilisierungssequenzen kodiert, in einen geeigneten Reportervektor und anschließende Aktivitätsbestimmung des Reportergens könnte Hinweise über den Einfluß dieser RGS16-mRNA-Sequenzen auf die mRNA-Stabilität liefern. Mit Hilfe dieser Methode konnten z. B. Destabilisierungssequenzen in der mRNA der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase, eines regulatorischen Enzyms der Gluconeogenese detektiert werden. Hierbei wurde das pLUC / Zeo Plasmid zur Klonierung der zu untersuchenden cDNA-Abschnitte eingesetzt. Dieses Plasmid enthält den Cytomegalovirus (CMV-)Promotor, die volle kodierende Region des *Firefly*-Luciferase Reportergens, die 3'-untranslatierte Region und das Polyadenylat-Signal der besonders stabilen Rinderwachstumshormon mRNA sowie eine Multiple Cloning Site (MCS) in der oben erwähnten 3'-untranslatierten Region des Rinderwachstumshormons. Die Insertion von kurzen cDNA-Sequenzen in die MCS, welche für putative Destabilisierungssequenzen in der mRNA kodieren, haben weder Einfluß auf die Transkription ausgehend vom CMV-Promotor noch auf die Translation chimärer mRNA, können jedoch die Stabilität des resultierenden Transkripts verringern. Vergleich der *Firefly*-Luciferase Aktivität in Proben, welche das pLUC / Zeo Plasmid ohne Insert bzw. Insertion von sehr stabiler β -Globin cDNA enthalten, mit Proben, welche das pLUC / Zeo Plasmid mit zu untersuchenden cDNA-Sequenzen enthalten, können Aufschluß über Destabilisierungssequenzen in der mRNA liefern (Laterza et al. 2000).

4.3.2 Der RGS16-Promotor unterliegt der transkriptionellen Regulation durch Serum

Analyse der RGS16-Promotoraktivität verschiedener RGS16-Promotordeletionskonstrukte nach Zugabe von fötalem Kälberserum zu neonatalen Rattenkardiomyozyten in Zellkultur zeigt, daß der RGS16-Promotor wie viele Promotoren anderer Gene der transkriptionellen Regulation durch Serum unterliegt (Abbildung 21). Bereits seit vielen Jahrzehnten ist bekannt, daß Serum mit seiner Vielzahl der darin enthaltenen Proteine, Wachstumsfaktoren, Hormone, Nährstoffe und Metabolite diverse Gene transkriptionell reguliert. Mehrere Forschergruppen haben die Expression von Genen nach Serumaktivierung von ruhenden Fibroblasten und anderen Zellen bestimmt und dabei festgestellt, daß über hundert verschiedene Gene, die unterschiedlichste physiologische Prozesse steuern, sequentiell induziert werden (Knippers, Molekulare Genetik, 1997; Iyer et al. 1999; Selvaraj et al. 2004).

So wird, um nur einige Beispiele zu nennen, in der Literatur sequentielle transkriptionelle Regulation von Genen beschrieben, die für:

- an der Signaltransduktion beteiligte Proteine (z. B. „mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-1“ (MKP1))
- „immediate-early“ Transkriptionsfaktoren (z. B. *c-Fos*, *c-Myc*, *Jun B*)
- andere Transkriptionsfaktoren (z. B. NERF2)
- muskelspezifische Proteine (z. B. α -Aktin glatter Muskelzellen, Tropomyosin I)
- Proteine des Zytoskeletts (z. B. „cytoskeletal actin“)
- Proteine, welche im Rahmen der folgenden physiologischen Prozesse eine Rolle spielen
 - der Zellzyklusregulation und Zellproliferation
 - Entzündungsprozesse
 - der Angiogenese
 - des „Tissue Remodeling“
 - der Reorganisation des Zytoskeletts
 - der Wundheilung
 - der Cholesterol-Biosynthese

kodieren (Iyer et al. 1999; Selvaraj et al. 2004).

Ein für die Induzierbarkeit durch Serum wichtiges regulatorisches Promotorelement ist das Serum Response Element (SRE). Von einer Reihe der Promotoren von Genen, die für oben erwähnte Proteine kodieren, insbesondere von den Promotoren der „immediate-early“ Gene wie *c-fos*, *c-myc*, *jun B* (kodieren für Transkriptionsfaktoren), aber auch von anderen Promotoren z. B. Aktin-Promotoren, unter anderem vom Promotor des kardialen skeletal α -Aktins, ist bekannt, daß sie transkriptionell durch SREs reguliert werden (Selvaraj et al. 2004; Schratt et al. 2001; Robertson et al. 1995). Der RGS16-Promotor weist kein SRE auf, jedoch ein in unmittelbarer Nähe zur TATA-Box gelegenes Sequenzmotiv, welches Homologie zur Konsensussequenz (CCT)AANATGGNC/G der Bindestelle des Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Yin Yang 1 (YY1) (Lee et al. 1992) hat (Abbildung 18 und Diskussion 4.2.4 Identifikation essentieller RGS16-Promotorelemente).

Bindestellen für YY1 konnten neben dem SRE ebenfalls in den Promotoren einiger „immediate-early“ Gene wie *c-fos* und *c-myc* sowie im Promotor des kardialen skeletal α -Aktins identifiziert werden, die in einigen Promotoren (*c-fos*, kardiales skeletal α -Aktin) überlappen oder angrenzend lokalisiert sind (Shrivastava et al. 1994; Patten et al. 2000). Für diese Promotoren wird kompetitive transkriptionelle Regulation (Shrivastava et al. 1994; Patten et al. 2000) aber auch co-operative transkriptionelle Regulation durch YY1 und den Serum Response Factor (SRF) (Natesan et al. 1995) beschrieben. In der Literatur sind jedoch darüber hinaus Beispiele für eine SRE-unabhängige transkriptionelle Regulation von Genen durch YY1 zu finden (Shrivastava et al. 1994; Natesan et al. 1995), wie dies für den RGS16-Promotor zutreffen könnte.

4.3.3 Transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors durch Sphingosin 1-Phosphat (S1-P)

Von verschiedenen untersuchten Serumkomponenten (Abbildung 22), welche sowohl unter physiologischen wie auch pathophysiologischen Bedingungen transkriptionell eine Reihe von kardialen Genen regulieren (Danzi et al. 2005; Duerr et al. 1995; Eiken et al. 2001; Karliner 2002; Karliner et al. 2001), induzierte lediglich der EDG-Rezeptor Agonist Sphingosin 1-Phosphat (S1-P) dosisabhängig die RGS16-Promotoraktivität, während 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphate (LPA), ein EDG-Rezeptor Agonist für eine andere EDG-Rezeptor Subfamilie, keinerlei Einfluß auf die RGS16-Promotoraktivität zeigte (Abbildung 22).

Sowohl S1-P als auch LPA gehören zu den Lysophospholipiden, einer Gruppe von phosphorhaltigen, amphiphilen Membranlipiden, die in Phosphoglyceride mit Glycerin als Grundgerüst (LPA) und Sphingomyeline, die vom Sphingosin (einfach ungesättigter Aminoalkohol) abgeleitet sind (S1-P), unterteilt werden können. Während S1-P durch enzymatische Spaltung aus Sphingomyelin, einem membranassoziierten Sphingolipid, freigesetzt wird, wird LPA durch enzymatische Spaltung aus membranassoziierten Phosphoglycerid-Vorläufern generiert (Goetzl et al. 1998). S1-P und LPA erreichen mit mikromolaren Konzentrationen hohe Serumkonzentrationen und vermitteln als Hauptkomponenten des Blutplasmas viele Serumeffekte wie beispielsweise Zellproliferation und Zelldifferenzierung (Lee et al. 2000; Alewijnse et al. 2004).

Darüber hinaus haben beide Lysophospholipide sowohl im Rahmen der Morphogenese des kardiovaskulären System (Angiogenese, Vaskulogenese), der Regulation verschiedener kardiovaskulärer Parameter (Regulation des Blutdrucks und der Herzfrequenz, Vasokonstriktion, Vasodilatation) als auch in der Pathogenese verschiedener Herzerkrankungen wie Arteriosklerose und in der Hypertrophie von Herzmuskelzellen eine zentrale Funktion (Karliner 2002). Sowohl S1-P als auch LPA wird bei entzündlichen Erkrankungen und in der Immunologie eine wichtige Rolle zugeschrieben (Barekzi et al. 2006; Graler et al. 2002; Goetzl et al. 1998; Goetzl et al. 2004). So vermittelt S1-P offensichtlich die negativ inotrope Wirkung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF α auf Kardiomyozyten (Oral et al. 1997) (Bedeutung von TNF α bei inflammatorischen Erkrankungen und diversen Herzerkrankungen, siehe Diskussion 4.1.1 und 4.1.2). TNF α induziert wie S1-P die RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten (Abbildung 5 (TNF α); Stübe et al. 2007 (S1-P)). Sowohl TNF α als auch S1-P können somit zur Inhibition der über G-Proteine regulierten myokardialen Kontraktilität führen. Neben ihrer Bedeutung in der Pathophysiologie von Herzerkrankungen haben S1-P und LPA jedoch auch kardioprotektive Effekte unter hypoxischen Bedingungen (Karliner et al. 2001; Karliner 2002).

S1-P und LPA entfalten ihre weitreichenden biologischen Wirkungen, die unter anderem Regulation des Zellwachstums, Zellüberlebens, Migration sowie Zelldifferenzierung beinhalten, in einer Vielzahl von Zelltypen über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren der EDG (endothelial differentiation gene)-Rezeptor-Familie (Goetzl et al. 1998; Karliner 2002; Karliner et al. 2001; Meacci et al. 2003). EDG-Rezeptoren koppeln an G-Proteine der G-Protein-Familien G α_i , G $_{q/11}$ sowie G $_{12/13}$ und zeigen Interaktionen mit MAP-Signaltransduktionskaskaden. Sie ermöglichen somit Signaltransduktion über diverse Pfadwege, die als Effektor- und signalweiterleitende Moleküle unter anderem cAMP, Phospholipase C sowie die monomeren G-Proteine Ras (weitere Signaltransduktion über MAP-Signaltransduktionskaskade), Rac und Rho, beinhalten (Goetzl et al. 1998).

Sowohl für S1-P als auch für LPA konnten mehrere EDG-Rezeptoren detektiert werden. Ihre Verteilung ist zelltypspezifisch, darüber hinaus zeigen sie Ligandenspezifität. Während S1-P an die EDG-Rezeptoren 1, 3, 5, 6 und 8 bindet, bindet LPA an die EDG-Rezeptoren 2, 4 und 7 (Fukushima et al. 2001).

Für beide Lysophospholipide, S1-P und LPA, konnten EDG-Rezeptoren in Kardiomyozyten detektiert werden (Karliner et al. 2001). Ein erhöhtes Expressionsniveau konnte jedoch für den S1-P-Rezeptor EDG1 in Kardiomyozyten nachgewiesen werden (Robert et al. 2001; Mazurais et al. 2002). Die S1-P-Rezeptoren EDG3 und 5 zeigen zwar im Herzen ein hohes Expressionsniveau, liegen jedoch im Vergleich zu EDG1 in geringerer Konzentration in Kardiomyozyten vor (Mazurais et al. 2002). Die verschiedenen EDG-Rezeptoren zeigen offensichtlich Spezifität gegenüber einer distinkten G-Protein-Familie. Obwohl sich die durch S1-P und LPA hervorgerufenen rezeptorvermittelten Effekte, wie Stimulation der Phospholipase C, Ca^{2+} Mobilisierung, Inhibition der Adenylatzyklase und Aktivierung der MAP-Signaltransduktionskaskade ähneln, kann nicht jeder EDG-Rezeptortyp alle Effekte vermitteln (Zondag et al. 1998). Zur Verdeutlichung sei an dieser Stelle ein Zellkultursystem bestehend aus Sf9 Zellen, welche entweder EDG1 oder EDG2 exprimieren angeführt (Zondag et al. 1998). In diesem System konnte nach S1-P Behandlung von EDG1 exprimierenden Sf9 Zellen eine Pertussis Toxin-sensitive, $G\alpha_i$ -vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase und Aktivierung der MAP-Signaltransduktionskaskade, jedoch keine Ca^{2+} Mobilisierung nachgewiesen werden. Für die S1-P-induzierte Ca^{2+} Mobilisierung ist offensichtlich ein anderer S1-P-Rezeptor der EDG-Rezeptor-Familie verantwortlich. EDG2 exprimierende Zellen zeigten keine S1-P-vermittelte Inhibition der Adenylatzyklase. Darüber hinaus konnte der EDG2 Rezeptor-Agonist LPA die Adenylatzyklase weder in EDG1 noch in EDG2 exprimierenden Sf9 Zellen inhibieren (Zondag et al. 1998).

Zelltypspezifische Verteilung, Ligandenspezifität und Spezifität der einzelnen EDG-Rezeptoren gegenüber einer distinkten G-Protein-Familie / Signaltransduktionskaskade begründen letztendlich trotz der Ähnlichkeit der von S1-P und LPA vermittelten Effekte höchstwahrscheinlich ihr unterschiedliches Verhalten in Bezug auf die Induktion der RGS16-Promotoraktivität (Abbildung 22).

Experimente zur Charakterisierung der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, in deren Rahmen S1-P die RGS16-Promotoraktivität induziert, zeigten, daß die durch S1-P aktivierte RGS16-Promotoraktivität durch Pertussis Toxin (PTX) und den Proteinkinase C Inhibitor Chelerythrin gehemmt wird (Abbildung 23). Diese Ergebnisse deuten auf eine rezeptorvermittelte G_i - und Proteinkinase C-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten hin.

Für eine durch S1-P vermittelte Signaltransduktion über Aktivierung von Gi, darauf folgender Freisetzung der $\beta\gamma$ -Unterheit heterotrimer G-Proteine, $\beta\gamma$ -abhängige Induktion der Phospholipase C mit anschließender Aktivierung der Proteinkinase C sind Hinweise in der Literatur zu finden (Goetzl et al. 1998; Krauss 2003).

4.3.4 Weiterführende Experimente unserer Arbeitsgruppe

Weiterführende Experimente zur S1-P-vermittelten Signaltransduktion in neonatalen Rattenkardiomyozyten deuten darauf hin, daß der eine Herzmuskelhypertrophie induzierende, stark in Kardiomyozyten exprimierte und an Gi-koppelnde EDG1-Rezeptor (Robert et al. 2001; Mazurais et al. 2002; Rogers et al. 1999; Zondag et al. 1998) an der Induktion der RGS16-Promotoraktivität beteiligt ist (Stübe et al. 2007).

Endothelin-1 (ET-1), ein vasoaktives Peptid, welches eine wichtige Rolle bei der Regulation kardiovaskulärer Funktionen wie Regulation des Blutdrucks, der Inotropie und Chronotropie (positiv inotrop und chronotrop) sowie verschiedener kardialer Gene spielt und im Rahmen von diversen kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzmuskelhypertrophie, Hypertonie und chronische Herzinsuffizienz pathophysiologische Relevanz besitzt (Agapitov et al. 2002; Rogers et al. 1999; King et al. 1998; Ikeda et al. 1999), konnte als weiterer Stimulator der RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten identifiziert werden (Stübe et al. 2007). Derzeit sind zwei Endothelin-Rezeptorsubtypen, ET_A und ET_B , die auch im Herzen detektiert werden konnten, bekannt (Bax et al. 1993; Agapitov et al. 2002). Endothelin-Rezeptoren koppeln an verschiedene G-Proteine der G-Protein-Familien $G\alpha_i$, $G_{q/11}$ sowie $G_{12/13}$, aktivieren MAP-Signaltransduktionskaskaden sowie monomere G-Proteine (Arai et al. 2002; Clerk et al. 2001). Der Pertussis Toxin-insensitive $G_{q/11}$ -vermittelte, Phospholipase C-abhängige Signaltransduktionspfad stellt einen Hauptsignaltransduktionsweg dar, über den ET-1 seine Effekte vermittelt (Agapitov et al. 2002; Pfannenschmidt 2000; Rothfischer 2002). Unsere Arbeitsgruppe konnte eine ET_B -vermittelte, Pertussis Toxin-insensitive Induktion der RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten feststellen (Stübe et al. 2007). Diese Ergebnisse deuten auf eine Beteiligung von Pertussis Toxin-insensitiven G-Proteinen wie $G_{q/11}$ - oder $G_{12/13}$ -Proteinen bei der Aktivierung des RGS16-Promotors hin.

Der multifunktionale Transkriptionsfaktor YY1 erwies sich in unserem System als negativer Regulator der RGS16-Promotoraktivität. Koexpression von YY1 führte zur Inhibition der durch FCS, S1-P und ET-1 induzierten RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten. YY1 reduzierte darüber hinaus die basale RGS16-Promotoraktivität. Mutationen innerhalb des YY1-Bindemotivs im RGS16-Promotor hoben den negativen regulatorischen Effekt durch YY1 komplett auf und ermöglichten eine Induktion der RGS16-Promotoraktivität sowohl durch S1-P als auch durch ET-1 (Stübe et al. 2007).

Weiterführende Experimente sollten näheren Aufschluß über den Aufbau der Signaltransduktionskaskaden, in deren Rahmen S1-P und ET-1 die RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten induzieren, geben. Hierbei zu beantwortende Fragen beinhalten unter anderem:

1. Über welche Pertussis Toxin-insensitiven G-Proteine wird die ET-1-induzierte RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten vermittelt? Sowohl für die Pertussis Toxin-insensitiven $G_{q/11}$ - als auch $G_{12/13}$ -Proteine wird eine Induktion von monomeren G-Proteinen, wie sie auch in unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden konnte (ET-1 induziert RhoA) (Stübe et al. 2007), in der Literatur beschrieben (Arai et al. 2002; Clerk et al. 2001).
2. Welche weiteren signalweiterleitenden Moleküle sind an der ET-1-vermittelten Induktion der RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten beteiligt? Bisher deuten die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe auf eine ET-1-vermittelte, RhoA-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten hin (Stübe et al. 2007).
3. Sind neben Rac1, welches in unserem System durch S1-P induziert wurde, oder RhoA (induziert durch ET-1) (Stübe et al. 2007) weitere monomere G-Proteine an der Induktion der RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten beteiligt? In der Literatur wird sowohl eine Proteinkinase C-vermittelte, Ras-abhängige Induktion von Rac in Kardiomyozyten (Sugden et al. 1998) als auch eine Phospholipase C- und Proteinkinase C-vermittelte Ras-unabhängige Induktion von Rac1 in anderen Zelltypen (Jackson et al. 2003) beschrieben.

4. Sowohl für S1-P als auch für ET-1 wird in der Literatur vielfach eine Induktion von monomeren G-Proteinen mit anschließender Aktivierung von MAP-Kinasen beschrieben (Goetzl et al. 1998; Arai et al. 2002; Clerk et al. 2001). Weitere Experimente können Aufschluß über eine mögliche Beteiligung von MAP-Kinasen an der S1-P- bzw. ET-1-induzierten RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten geben.
5. Weitere Analysen sollten näheren Einblick in die negative regulatorische Aktivität von YY1 auf die RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten geben. Die Reduktion der basalen RGS16-Promotoraktivität durch YY1 (Stübe et al. 2007) und die unmittelbare Nähe des YY1-Bindemotivs zur TATA-Box (Abbildung 18) deuten auf mögliche Interaktionen mit dem basalen Transkriptionsapparat hin.
6. Über MAP-Signaltransduktionskaskaden werden eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren aktiviert (Goetzl et al. 1998; Sudgen et al. 1998). Welche durch S1-P bzw. ET-1 induzierte Transkriptionsfaktoren aktivieren den RGS16-Promotor in Kardiomyozyten und welche *cis*-Elemente sind hierfür verantwortlich?

Abbildung 25 zeigt hypothetische biochemische Prozesse, die zur Induktion der RGS16-Promotoraktivität durch S1-P in neonatalen Rattenkardiomyozyten führen könnten. Die Abbildung basiert zum Teil auf eigenen Ergebnissen, die in dieser Dissertation erzielt wurden. So deuten die in der vorliegenden Dissertation erzielten Ergebnisse auf eine rezeptorvermittelte Gi- und Proteinkinase C-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten hin (Abbildung 23). Der andere Teil beruht auf Hypothesen basierend auf in der Literatur beschriebenen S1-P Effekten und auf Ergebnissen der Arbeitsgruppe (Rac1-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität; Stübe et al. 2007).

Durch Bindung an einen Gi-gekoppelten EDG-Rezeptor induziert S1-P die Freisetzung der $G\alpha_i$ -Untereinheit und der dimeren $\beta\gamma$ -Untereinheit. Die dimere $\beta\gamma$ -Untereinheit kann über verschiedene Pfadwege Transkriptionsfaktoren aktivieren:

1. Durch Stimulation der Phospholipase C mit anschließender Aktivierung der Proteinkinase C durch Diacylglycerol (DAG) (Krauss 2003; Goetzl et al. 1998; Hamm 1998). Die Proteinkinase C kann verschiedene monomere G-Proteine wie Ras oder Rac aktivieren. Eine S1-P-vermittelte, Rac1-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten konnte von unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden (Stübe et al. 2007). In der Literatur wird sowohl eine Proteinkinase C-vermittelte, Ras-abhängige Induktion von Rac in Kardiomyozyten (Sudgen et al. 1998) als auch eine Phospholipase C- und Proteinkinase C-vermittelte, Ras-unabhängige Induktion von Rac1 in anderen Zelltypen (Jackson et al. 2003) beschrieben. Aktivierte monomere G-Proteine können Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPK-Mitglieder) induzieren (Sudgen et al. 1998). Die verschiedenen MAP-Kinasen aktivieren diverse Transkriptionsfaktoren (Sudgen et al. 1998; Goetzl et al. 1998; Krauss 2003), die an der Transkriptionsregulation verschiedener Gene, möglicherweise auch an der Regulation von RGS16, beteiligt sind.
2. Durch direkte Interaktion mit Ras / Rac, weitere Signaltransduktion über MAP-Kinasen und letztendlich Aktivierung von Transkriptionsfaktoren (Krauss 2003; Hamm 1998)

Da die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse auf eine Beteiligung der Proteinkinase C an der S1-P-induzierten RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten hindeuten (Abbildung 23), wird der unter eins beschriebene Signaltransduktionsweg in Abbildung 25 dargestellt.

Der Zinkfinger-Transkriptionsfaktor YY1 wird in Abbildung 25 nicht dargestellt, da dieser Transkriptionsfaktor zur Inhibition der durch S1-P induzierten RGS16-Promotoraktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten führte (Stübe et al. 2007).

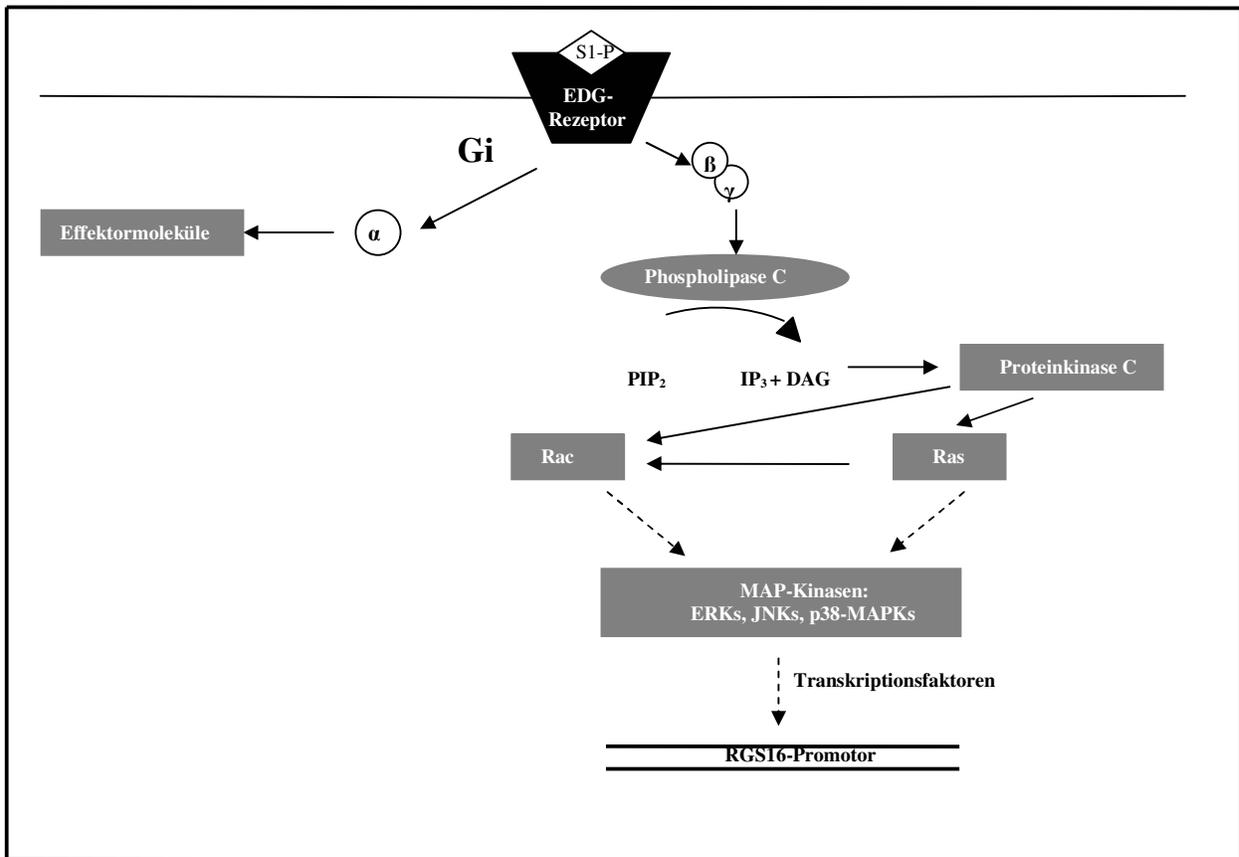


Abbildung 25: Induktion des RGS16-Promotors durch Sphingosin 1-Phosphat (S1-P) in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Abbildung 25 zeigt schematisch die Aktivierung des RGS16-Promotors durch S1-P in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die in dieser Dissertation erzielten Ergebnisse deuten auf eine rezeptorvermittelte Gi- und Proteinkinase C-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität hin (Abbildung 23). Eine S1-P-vermittelte, Rac1-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität konnte von unserer Arbeitsgruppe festgestellt werden (Stübe et al. 2007). Die weitere Beschreibung der Signaltransduktion bis zur Aktivierung des RGS16-Promotors basiert auf Hypothesen, die auf in der Literatur beschriebenen S1-P Effekten beruhen. Die S1-P-induzierte, rezeptorvermittelte Aktivierung von Gi führt zur Freisetzung von $G\alpha_i$ und der dimeren $\beta\gamma$ -Untereinheit. $\beta\gamma$ -vermittelte Stimulation des Effektormoleküls Phospholipase C führt zur Spaltung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP_2) und somit zur Freisetzung der beiden „second messenger“ Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) (Krauss 2003; Goetzl et al. 1998; Hamm 1998). Das membranassoziierte DAG aktiviert die membranständige Proteinkinase C. Diese stimuliert monomere G-Proteine wie Ras oder Rac. Die Stimulation von Rac durch Proteinkinase C kann entweder indirekt über Ras (Sudgen et al. 1998) oder Ras unabhängig erfolgen (Jackson et al. 2003). Ras und Rac können verschiedene Mitglieder einer zellinternen Phosphorylierungskaskade, die sogenannten Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK-Mitglieder) induzieren (Sudgen et al. 1998; An et al. 2000; Robert et al. 2001). MAP-Kinasen aktivieren diverse Transkriptionsfaktoren, die an der Regulation der RGS16-Promotoraktivität beteiligt sein könnten.

4.3 Bedeutung von RGS-Proteinen

Pharmakologische Regulation von pathophysiologisch relevanten RGS-Proteinen?

Die G-Protein-vermittelte Signaltransduktion stellt eine der wichtigsten Signaltransduktionskaskaden innerhalb *eukaryontischer* Organismen, von Vertebraten einschließlich des Menschen, Invertebraten z. B. Nematoden, bis hin zu einzelligen Organismen wie Hefe, dar. Darüber hinaus ist sie im Pflanzenreich und bei Pilzen vertreten (Ivey et al. 1996; Wilkie et al. 1994; Jones et al. 2004). Sie ist unter anderem an der Weiterleitung von Licht-, Geruchs- und Geschmacksreizen sowie von diversen neurohumoralen Signalen beteiligt (Ivey et al. 1996; Birnbaumer et al. 1990; Ji et al. 1998). RGS-Proteine, negative Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion, welche neben ihrer GTPase-aktivierenden Funktion gegenüber verschiedenen G α -Untereinheiten, über diverse Proteindomänen Interaktionen mit weiteren signalweiterleitenden Molekülen vermitteln, zeigen ein ebenso weites Spezies-Spektrum (Dohlman und Thorner 1997; Wieland und Chen 1999; Siderovski und Willard 2005).

In Kardiomyozyten haben insbesondere zwei G-Protein-gekoppelte Signaltransduktionskaskaden, die β -adrenerge Signaltransduktionskaskade und die G $_{q/11}$ -gekoppelte Signaltransduktionskaskade, eine wichtige Funktion. Diese beiden Signaltransduktionskaskaden spielen sowohl bei der Regulation physiologischer Prozesse wie Regulation der Inotropie und Chronotropie als auch in der Pathophysiologie von diversen kardiovaskulären Erkrankungen wie z. B. chronischer Herzinsuffizienz, akut entzündlicher Herzinsuffizienz, Hypertrophie von Herzmuskelzellen und Hypertonie eine wichtige Rolle (Lohse et al. 2003; Castellano et al. 1997; Patten et al. 2002; Patten et al. 2003; Mittmann et al. 2002). Sie unterliegen neben anderen Regulationsmechanismen der Regulation durch RGS-Proteine. Von den bis heute mehr als 30 bekannten RGS-Proteinen, sind alleine 20 RGS-Proteine im humanen Myokard detektiert worden (Riddle et al. 2005; Siderovski und Willard 2005). Dies verdeutlicht ihren Stellenwert bei der Regulation kardialer Signaltransduktionsprozesse.

Nicht nur bei vielen kardiovaskulären Erkrankungen, sondern auch bei vielen anderen Erkrankungen wie verschiedenen Krebserkrankungen (Cho et al. 2004), Schizophrenie (Zawilska 2003; Jope et al. 1998), neurodegenerativen (z. B. Alzheimer, Parkinson) (Cowburn et al. 2001; Zawilska 2003) sowie immunologischen Erkrankungen (z. B. allergisches Asthma) (Druey 2003) sind Veränderungen innerhalb der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion festgestellt worden. Hierunter fallen auch Veränderungen in der Expressionsrate von RGS-Proteinen, die pathophysiologische Relevanz besitzen (Cho et al. 2004; Tekumalla et al. 2001; Druey 2003; Emilsson et al. 2006).

Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es durch Überstimulation des sympathischen Nervensystems zu einer Desensitivierung der kardialen Signaltransduktion durch:

- „Down-Regulation“ von β -Adrenorezeptoren (Castellano et al. 1997; Lohse et al. 2003).
- Entkopplung von β -adrenergen Rezeptoren durch Rezeptor-Phosphorylierungsprozesse (Castellano et al. 1997; Lohse et al. 2003).
- Einer sowohl bei chronischer als auch bei akut entzündlicher Herzinsuffizienz nachgewiesenen Induktion der inhibitorischen $G\alpha_i$ -Untereinheit (Lohse et al. 2003; Castellano et al. 1997; Böhm et al. 1995) sowie zu einer Induktion der RGS-Proteine RGS4 und RGS16 (Mittmann et al. 2002; Wieland et al. 2003; Patten et al. 2002; Patten et al. 2003).

Aus der pathophysiologischen Relevanz der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion ergibt sich ihre therapeutische Bedeutung. Ca. 50 % aller Medikamente modulieren G-Protein-vermittelte Signaltransduktionsprozesse, insbesondere die Funktion von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (Riddle et al. 2005; Cho et al. 2004; Druey 2003). Im Rahmen der Behandlung von kardiovaskulären Erkrankungen, wie z. B. Herzinsuffizienz und Hypertonie, stellt der Einsatz von β -Rezeptor-Antagonisten (β -Blockern) neben ACE-Hemmern heute eine effektive Standardtherapie dar (Lohse et al. 2003). Der therapeutische Nutzen der β -Blocker liegt in der Aufhebung der schädlichen Auswirkungen einer β -adrenergen Überstimulation sowie in einer Resensitivierung des kardialen β -Rezeptorsystems (Lohse et al. 2003).

RGS-Proteine könnten eine ebenso große therapeutische Bedeutung erlangen wie G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, da sie durch:

- ihre gewebe- und zelltypspezifische Expression
- Regulierbarkeit ihrer GTPase-aktivierenden Funktion und subzellulären Lokalisation
- sowie durch ihre Rezeptorspezifität

in vivo häufig eine hohe Selektivität in Bezug auf ihre GTPase-aktivierende Funktion gegenüber einer spezifischen $G\alpha$ -Untereinheit sowie einer distinkten G-Protein-vermittelten Signaltransduktionskaskade aufweisen (Riddle et al. 2005). Dies bietet im Rahmen einer Therapie die Möglichkeit gezielt eine G-Protein-vermittelte Signaltransduktionskaskade in einem Organ zu modulieren, während durch ein unterschiedliches Expressionsprofil der einzelnen RGS-Proteine ein- und dieselbe Signaltransduktionskaskade in einem anderen Organ nicht beeinflusst wird. Als weitere Option zu ihrer Inhibition bieten RGS-Proteine darüber hinaus die Möglichkeit ihre Aktivität zu modulieren. Pharmakologische Regulation von RGS-Proteinen könnte z. B. die Behandlung mit G-Protein-gekoppelten Agonisten bzw. Antagonisten ergänzen, um deren Dosis zu verringern oder bei Kontraindikation des Einsatzes eines G-Protein-gekoppelten Agonisten bzw. Antagonisten als Alternativtherapie eingesetzt werden (Riddle et al. 2005).

Obwohl bereits vieles über Struktur und Expressionsprofil der RGS-Proteine sowie über ihre Funktion als negative Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion bekannt ist (Wieland et al. 1999; Riddle et al. 2005; Dohlman et al. 1997), ist im Gegensatz dazu noch vieles unbekannt in Bezug auf ihre weiteren Funktionen z. B. als Effektoren bei G-Protein-vermittelten Signaltransduktionsprozessen, als Interaktionspartner spezifischer $G\beta$ -Untereinheiten, als Gerüstproteine in Signaltransduktionskomplexen, als Interaktionspartner von G-Protein-unabhängigen, signalweiterleitenden Molekülen sowie in Bezug auf ihre Regulation, insbesondere ihre transkriptionelle Regulation.

Diese noch offenen Fragen stellen eine Herausforderung dar bei Erforschung und Entwicklung neuer Therapiestrategien, welche die Funktion bzw. Aktivität von RGS-Proteinen modulieren.

5. Zusammenfassung

In der Pathogenese der Herzinsuffizienz spielen molekulare Veränderungen der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion wie „Down-Regulation“ von β -Adrenorezeptoren, Entkopplung von β -adrenergen Rezeptoren, Induktion der inhibitorischen $G\alpha_i$ -Untereinheit sowie von RGS-Proteinen (regulators of G protein signalling), insbesondere von RGS4 und RGS16 im Herzgewebe eine wichtige Rolle. Durch ihre GTPase-aktivierende Funktion gegenüber verschiedenen $G\alpha$ -Untereinheiten, insbesondere gegenüber $G\alpha_i$ - und $G\alpha_q$ -Untereinheiten sind RGS-Proteine in der Lage kardiale G-Protein-vermittelte Signaltransduktionsprozesse zu modulieren und regulieren die Kontraktilität, das Zellwachstum von Kardiomyozyten sowie die Induktion einer Hypertrophie von Herzmuskelzellen. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, daß RGS4 und RGS16 sowohl durch bakterielles Endotoxin (Lipopolysaccharid, LPS) als auch durch proinflammatorische Zytokine in Herzmuskelzellen aktiviert werden.

Ausgangspunkt für die vorliegende Dissertation waren Ergebnisse aus Zellkulturexperimenten an neonatalen Rattenkardiomyozyten, in denen nachgewiesen werden konnte, daß die RGS16-Proteinexpression durch LPS sowie durch die LPS-induzierten Zytokine IL-1 β und TNF α , jedoch nicht durch IL-6 und IFN γ , stimuliert wird. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob LPS direkt oder durch Induktion von TNF α und IL-1 β die RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten aktiviert. Hierzu wurden Zellkulturexperimente an neonatalen Rattenkardiomyozyten durchgeführt. Neben der bereits bekannten Induktion der RGS16-Proteinexpression durch LPS, TNF α und IL-1 β , konnte gezeigt werden, daß die IL-1 β - oder TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten durch den jeweils entsprechenden Inhibitor, Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) oder „soluble“ TNF α -Rezeptor (sTNFr), gehemmt wird. Dies deutet auf eine rezeptorvermittelte Wirkungsweise der beiden oben erwähnten Zytokine hin. Von entscheidender Bedeutung ist jedoch, daß Präinkubation mit IL-1ra darüber hinaus sowohl die LPS- als auch die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten inhibiert, während sTNFr weder die LPS- noch die IL-1 β -vermittelten stimulatorischen Effekte auf die RGS16-Proteinexpression hemmen konnte. Diese Ergebnisse implizieren, daß sowohl die LPS- als auch die TNF α -induzierte RGS16-Proteinexpression in Kardiomyozyten durch Aktivierung von IL-1 β vermittelt wird und IL-1 β somit eine Schlüsselrolle in der Regulation der kardialen RGS16-Proteinexpression einnimmt.

Um zu klären, ob LPS die Expression und Sekretion von TNF α und IL-1 β in Kardiomyozyten aktiviert und inwieweit TNF α die IL-1 β -Expression reguliert, wurden die Proteinkonzentrationen von IL-1 β und TNF α aus Zellkulturüberständen sowie Proteinhomogenaten von neonatalen Rattenkardiomyozyten gemessen. Es konnte gezeigt werden, daß LPS die IL-1 β -Expression und Sekretion sowie die TNF α -Sekretion in Kardiomyozyten stimuliert. Die LPS-induzierte TNF α -Sekretion der Kardiomyozyten lag ca. 10fach höher und erfolgte schneller (Maximum bereits nach 6 h) im Vergleich zur LPS-induzierten IL-1 β -Sekretion (Maximum nach 48 h). TNF α aktiviert sowohl die IL-1 β -Expression als auch die IL-1 β -Sekretion in Kardiomyozyten. Die durch TNF α intrazellulär induzierte IL-1 β -Proteinmenge beträgt ca. die Hälfte im Vergleich zur LPS-induzierten IL-1 β -Proteinmenge bei Berücksichtigung der maximal induzierten Proteinmengen nach 6 h. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß TNF α neben LPS einen erheblichen Anteil an der Regulation der IL-1 β -Proteinexpression und –sekretion in Kardiomyozyten hat. Eine Regulation der TNF α -Proteinexpression oder –sekretion in Kardiomyozyten durch IL-1 β konnte nicht nachgewiesen werden.

Erst kürzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe der RGS16-Promotor kloniert. Da bisher nur sehr wenig über die transkriptionelle Regulation der RGS-Proteine im Herzen bekannt ist, wurde im zweiten Teil der Dissertation der RGS16-Promotor exemplarisch näher untersucht, um die für die RGS16-Promotoraktivität essentiellen regulatorischen Promotorelemente und die Minimalsequenz, welche die RGS16-Promotoraktivität reguliert, zu ermitteln sowie die transkriptionelle Regulation des RGS16-Promotors zu analysieren. Hierzu wurden verschiedene überlappende RGS16-Promotordeletionskonstrukte, 1,4 kb-*Sac I*, 1,0 kb-*EcoR I*, 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* und 0,4 kb-*Sac I*, hergestellt, zur Untersuchung ihrer Promotoraktivität in den Luciferase-Reportervektor (pGL₃b) kloniert und anschließend transient in neonatale Rattenkardiomyozyten in Zellkultur transfiziert. Neben dem Ausgangskonstrukt 1,8 kb-*Kpn I*, dem RGS16-Promotor, zeigten drei der vier oben angeführten RGS16-Promotordeletionskonstrukte Promotoraktivität. Lediglich das Konstrukt 0,4 kb-*Sac I* zeigte keine Promotoraktivität, ist somit kein RGS16-Promotorkonstrukt. Das RGS16-Promotordeletionskonstrukt 0,6 kb-*EcoR I-Sac I* zeigte als kleinstes RGS16-Promotorkonstrukt volle Promotoraktivität und wurde deshalb als Minimalsequenz des RGS16-Promotors identifiziert.

Durch Sequenzanalysen mit Hilfe des Sequencher DNA^R Softwareprogrammes konnten neben mehreren CCAAT-Boxen, insbesondere zwei für die RGS16-Promotoraktivität essentielle *cis*-Elemente, die TATA-Box und ein in unmittelbarer Nähe zur TATA-Box gelegenes Sequenzmotiv, welches Homologie zur Konsensussequenz (CCT)AANATGGNC/G der Bindestelle des multifunktionalen Zinkfinger-Transkriptionsfaktors Yin Yang 1 (YY1) aufweist, identifiziert werden.

Obwohl die RGS16-mRNA und Proteinexpression transient sowohl in den Herzen adulter Ratten als auch in Zellkulturexperimenten an neonatalen Rattenkardiomyozyten (RGS16-Proteinexpression) durch LPS sowie durch die beiden pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β und TNF α induziert wird (Patten et al. 2002 und Patten et al. 2003), konnte die RGS16-Promotoraktivität weder durch LPS noch durch IL-1 β oder TNF α in neonatalen Rattenkardiomyozyten stimuliert werden.

Auf der Suche nach weiteren den RGS16-Promotor aktivierenden Substanzen konnte gezeigt werden, daß der RGS16-Promotor wie viele Promotoren anderer Gene der transkriptionellen Regulation durch Serum unterliegt. Der EDG-Rezeptor Agonist Sphingosin 1-Phosphat (S1-P) konnte als eine Serumkomponente identifiziert werden, die für die Induktion der RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten verantwortlich ist, während 1-Oleoyl-sn-glycerol 3-phosphate (LPA), ein EDG-Rezeptor Agonist für eine andere EDG-Rezeptor Subfamilie, keinerlei Einfluß auf die RGS16-Promotoraktivität zeigte. Die S1-P-induzierte RGS16-Promotoraktivität konnte durch Pertussis Toxin (PTX) und den Proteinkinase C Inhibitor Chelerythrin gehemmt werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine rezeptorvermittelte Gi- und Proteinkinase C-abhängige Induktion der RGS16-Promotoraktivität in Kardiomyozyten hin.

6. Literatur

- Abraham E., Coulson W.F., Schwartz M.D., Allbee J. (1994) Effects of therapy with soluble tumour necrosis factor receptor fusion protein on pulmonary cytokine expression and lung injury following haemorrhage and resuscitation. *Clin Exp Immunol.* **98(1)**: 29 – 34.
- Agapitov A.V., Haynes W.G. (2002) Role of endothelin in cardiovascular disease. *Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System* **3(1)**: 1 – 15.
- Aggarwal B.B., Kohr W.J., Hass P.E., Moffat B., Spencer S.A., Henzel W.J., Bringman T.S., Nedwin G.E., Goeddel D.V., Harkins R.N. (1985) Human tumor necrosis factor. Production, purification and characterization. *J Biol. Chem.* **260**: 2345 – 2354.
- Alewijnse A.E., Peters S.L., Michel M.C. (2004) Cardiovascular effects of sphingosine-1-phosphate and other sphingomyelin metabolites. *Br J Pharmacol.* **143(6)**: 666 – 684.
- Alexander C., Rietschel E.T. (2001) Bacterial lipopolysaccharides and innate immunity. *J Endotoxin Res* **7(3)**: 167 – 202.
- Amatruda T.T., Steele D.A., Slepak V.Z., Simon M.I (1991) $G\alpha_{16}$, a G protein α subunit specifically expressed in hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **88(13)**: 5587 – 5591
- An S., Zheng Y., Bleu T. (2000) Sphingosine 1-phosphate-induced cell proliferation, survival, and related signaling events mediated by G protein-coupled receptors EDG3 and EDG5. *J Biol Chem.* **275 (1)**: 288 – 296
- Anand I.S., Fisher L.D., Chiang Y.T., Latini R., Masson S., Maggioni A.P., Glazer R.D., Tognoni G., Cohn J.N.; Val-HeFT Investigators (2003) Changes in brain natriuretic peptide and norepinephrine over time and mortality and morbidity in the Valsartan Heart Failure Trial (Val-HeFT). *Circulation* **107(9)**: 1278 – 1283.
- Anger T., Zhang W., Mende U. (2004) Differential contribution of GTPase activation and effector antagonism to the inhibitory effect of RGS proteins on Gq-mediated signaling in vivo. *J Biol Chem* **279(6)**: 3906 – 3915.
- Anker S.D., Egerer K.R., Volk H.D., Kox W.J., Poole-Wilson P.A., Coats A.J. (1997) Elevated soluble CD14 receptors and altered cytokines in chronic heart failure. *Am J Cardiol* **79**: 1426 – 1430
- Arai K., Maruyama Y., Nishida M., Tanabe S., Takagahara S., Kozasa T., Mori Y., Nagao T., Kurose H. (2002) Differential Requirement of $G\alpha_{12}$, $G\alpha_{13}$, $G\alpha_q$ and $G\beta\gamma$ for Endothelin-1-Induced c-Jun NH₂-Terminal Kinase and Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation. *Molecular Pharmacology* **63(3)**: 478 – 488.
- Asano T., Ogasawara N., Kitajima S., Sano M. (1986) Interaction of GTP-binding proteins with calmodulin. *FEBS Lett* **203**: 135 – 138
- Bakheet T., Frevel M., Williams B.R.G., Greer W., Khabar K.S.A. (2001) ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Research* **29(1)**: 246 – 254.
- Bakheet T., Williams B.R.G., Khabar K.S.A. (2006) ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Research* **34**: D111 – D114.

- Baldus S., Meinertz T. (2006) Aktuelle Konzepte der diabetischen Atherogenese. Clin Res Cardiol **95**: Suppl 1, I/1-I/6.
- Barekzi E., Roman J., Hise K., Georas S., Steinke J.W. (2006) Lysophosphatidic acid stimulates inflammatory cascade in airway epithelial cells. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. **74(6)**: 357 – 363.
- Bauer P.H., Müller S., Puzicha M., Pippig S., Obermaier B., Helmreich E.J.M., Lohse M.J. (1992) Phosducin is a protein kinase A-regulated G protein regulator. Nature **358**: 73 – 76
- Baumgarten G., Knuefermann P., Nozaki N., Sivasubramanian N., Mann D-L, Vallejo J-G (2001) In vivo expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. J Infect Dis **183**: 1617 – 1624.
- Baumgarten G., Grohe C., Hoeft A., Knuefermann P. (2004) Cytokines and heart failure. Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther. **39(4)**: 197 – 203.
- Bax W.A., Bruinvels A.T., van Suylen R.J., Saxena P.R., Hoyer D. (1993) Endothelin receptors in the human coronary artery, ventricle and atrium. A quantitative autoradiographic analysis. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. **348(4)**: 403 – 410.
- Beitz F., Niebauer J. (2000) Zytokinaktivierung in der Herzinsuffizienz. Journal für Kardiologie **7(12)**: 516 – 518.
- Benedict C.R., Johnstone D.E., Weiner D.H., Bourassa M.G., Bittner V., Kay R., Kirlin P., Greenberg B., Kohn R.M., Nicklas J.M. (1994) Relation of neurohumoral activation to clinical variables and degree of ventricular dysfunction: a report from the Registry of Studies of Left Ventricular Dysfunction. SOLVD Investigators. J Am Coll Cardiol **23(6)**: 1410-20
- Benihoud K., Yeh P., Perricaudet M. (1999) Adenovirus vectors for gene delivery. Curr Opin Biotechnol. **10(5)**: 440 – 447.
- Benovic J.L. und Gomez J. (1993) Molecular cloning and expression of GRK6. A new member of the G protein-coupled receptor kinase family. J Biol Chem **268**: 19521 – 19527.
- Berkowitz L.A., Riabowol K.T., Gilman M.Z. (1989) Multiple sequence elements of a single functional class are required for cyclic AMP responsiveness of the mouse *c-fos* promoter. Mol. Cell. Biol. **9**: 4272 – 4281.
- Beutler B., Milsark I.W., Cerami A.C. (1985 a) Passive immunization against cachectin / tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. Science **229(4716)**: 869 – 871.
- Beutler B., Greenwald D., Hulmes J.D., Chang M., Pan Y.C., Mathison J., Ulevitch R. Cerami A. (1985 b) Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. Nature **316**: 552 – 554.
- Biobase (2002) Transcription Factor Classification.
- Birnbaumer L., Abramowitz J., Brown A.M. (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. Biochim Biophys Acta **1031(2)**: 163 – 224.
- Blackwell T.S., Christman J.W. (1996) Sepsis and cytokines: current status. British Journal of Anaesthesia **77**: 110 – 117.

- Böhm M, Kirchmayr R., Gierschik P., Erdmann E. (1995) Increase of myocardial inhibitory G-proteins in catecholamine-refractory septic shock or in septic multiorgan failure. *Am J Med.* **98(2)**: 183 – 186.
- Böhm M. (1998) Catecholamine refractoriness and their mechanisms in cardiocirculatory shock and chronic heart failure. *Thorac Cardiovasc Surg.* **46** Suppl 2: 270 – 275.
- Bouvier M., Hausdorff W.P., De Blasi A., O'Dowd B.F., Kobilka B.K., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1988) Removal of phosphorylation sites from the β 2-adrenergic receptor delays the onset of agonist-promoted desensitization. *Nature (Lond)* **333**: 370 - 373
- Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248 – 254
- Brand K. und Strauß M. (1997) Molekulare Grundlagen des Gentransfers und Anwendung für die Gentherapie. In: *Handbuch der molekularen Medizin*, Band 1, Herausgeber: D. Ganten und K. Ruckpaul, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Cain B.S., Meldrum D.R., Dinarello C.A., Meng X., Joo K.S., Banerjee A., Harken A.H. (1999) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta synergistically depress human myocardial function. *Crit Care Med* **27**: 1309 – 1318.
- Cannon J.G., Tompkins R.G., Gelfand J.A., Michie H.R., Stanford G.G., van der Meer J.W., Endres S., Lonnemann G., Corsetti J., Chernow B. (1990) Circulating interleukin-1 and tumor necrosis factor in septic shock and experimental endotoxin fever. *J Infect Dis* **161(1)**: 79 – 84.
- Carballo E., Lai W.S., Blakeshear P.J. (1998) Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* **281**: 1001 – 1005.
- Carballo E., Lai W.S., Blakeshear P.J. (2000) Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* **95**: 1891 – 1899.
- Carman C.V., Parent J.L., Day P.W., Pronin A.N., Sternweis P.M., Wedegaertner P.B., Gilman A.G., Benovic J.L., Kozasa T. (1999) Selective regulation of Galpha(q11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem* **274(48)**: 34483 – 34492.
- Carswell E.A., Old L.J., Kassel R.L., Green S., Fiore N., Williamson B. (1975) An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* **72**: 3666 – 3670.
- Castellano M., Böhm M. (1997) The Cardiac beta-Adrenoceptor-Mediated Signaling Pathway and its Alterations in Hypertensive Heart Disease. *Hypertension* **29(3)**: 715 - 722
- Chan R.K., Otte C.A. (1982 a) Isolation and genetic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Mol Cell Biol* **2(1)**: 11 – 20.
- Chan R.K., Otte C.A. (1982 b) Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitive to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. *Mol Cell Biol* **2(1)**: 21- 29.
- Chan J.M., Villarreal G. Jin W.W., Stepan T. Burstein H., Wahl S.M. (2002) Intraarticular gene transfer of TNFR:Fc suppresses experimental arthritis with reduced systemic distribution of the gene product. *Mol Ther.* **6(6)**: 727 – 736.

Cho H., Harrison K., Kehrl J.H. (2004) Regulators of G Protein Signaling. Potential Drug Targets for Controlling Cardiovascular and Immune Function. *Current Drug Targets – Immune, Endocrine & Metabolic Disorders* **4**: 107 – 118.

Clerico A., Emdin M. (2004) Diagnostic Accuracy and Prognostic Relevance of the Measurement of Cardiac Natriuretic Peptides: A Review. *Clinical Chemistry* **50**: 33 – 50.

Clerk A., Pham F.H., Fuller S.J., Sahai E., Aktories K., Marais R., Marshall C., Sugden P.H. (2001) Regulation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Cardiac Myocytes through the Small G Protein Rac1. *Molecular and Cellular Biology* **21(4)**: 1173 – 1184.

Cohn J.N., Levine T.B., Olivari M.T., Garberg V., Lura D., Francis G.S., Simon A.B., Rector T. (1984) Plasma norepinephrine as a guide to prognosis in patients with chronic congestive heart failure. *N Engl J Med*. **311(13)**: 819 - 823

Cohn J.N. (1996) The management of chronic heart failure. *N Engl J Med* **335**: 490 – 498

Coley W.B. (1893) The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas. With a report of ten original cases. *Am J Med Sci* 487 –

Comstock K.L., Krown K.A., Page M.T., Martin D., Ho P., Pedraza M., Castro E.N., Nakajima N., Glembotski C.C., Quintana P.J., Sabbadini R.A. (1998) LPS-induced TNF-alpha release and apoptosis in rat cardiomyocytes: obligatory role for CD14 in mediating the LPS response. *J Mol Cell Cardiol*. **30(12)**: 2761 – 2775.

Conaway R.C., Conaway J.W. (1993) General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu Rev Biochem* **62**: 161 – 190.

Conrad N. (2004) Effekte der induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase und Superoxid auf die Aktivierung von Matrixmetalloproteinase 2, 9 und die koronare Endothelfunktion. In vivo Studie nach allogener Herztransplantation im Rattenmodell. Dissertation

Corr P.B., Yamada K.A., Witkowski F.X. (1986) Mechanism controlling cardiac autonomic function and their relation to arrhythmogenesis: In: Fozzard H.A., Haber E., Jennings R.B., Katz A.M., Morgan H.E., eds. *The heart and the cardiovascular system*, pp 1343 - 1404

Court O., Kumar A., Parrillo J.E., Kumar A. (2002) Clinical review: Myocardial depression in sepsis and septic shock. *Crit. Care* **6 (6)**: 500 – 508

Cowburn R.F., O'Neill C., Bonkale W.L., Ohm T.G., Fastbom J. (2001) Receptor-G-protein signalling in Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp*. **67**: 163 – 175.

Cushman D.W. & Ondetti M.A. (1991) History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. *Hypertension* **17**: 589 – 592

Daaka Y., Luttrell L.M., Lefkowitz R.J. (1997) Switching of the coupling of the beta2-adrenergic receptor to different G proteins by protein kinase A. *Nature* **390**: 88 – 91.

Danzi S., Dubon P., Klein I. (2005) Effect of serum triiodothyronine on regulation of cardiac gene expression: role of histone acetylation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **289**: H1506 – H1511.

De Vries L., Fischer T., Tronchere H., Brothers G.M., Strockbine B., Siderovski D.P., Farquhar M.G. (2000) Activator of G-protein signaling 3 is a guanine dissociation inhibitor for Galpha I subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 14364 – 14369.

- Detmer K., Wang Z., Warejcka D., Leeper-Woodford S.K., Newman W.H. (2001) Endotoxin stimulated cytokine production in rat vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **281(2)**: H661 – H668.
- Dettlaff-Swiercz D.A., Wettschureck N., Moers A., Huber K., Offermanns S. (2005) Characteristic defects in neural crest cell-specific $G\alpha_q$ / $G\alpha_{11}$ and $G\alpha_{12}$ / $G\alpha_{13}$ deficient mice. *Dev Biol*. **282(1)**: 174 – 182.
- Dinarello C.A. (1991) Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood* **77**: 1627 – 1652.
- Dohlman H.G., Thorner J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1991) Model systems for the study of seven-transmembrane-segment receptors. *Annu Rev Biochem* **60**: 653 – 688
- Dohlman H.G., Song J., Ma D., Courchesne W.E., Thorner J. (1996) Sst2, a negative regulator of pheromone signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: expression, localization, and genetic interaction and physical association with Gpa1 (the G-protein alpha subunit). *Mol Cell Biol* **16(9)**: 5194 – 5209.
- Dohlman H.G., Thorner J. (1997) RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *Journal of biological chemistry* **272 (7)**: 3871 – 3874.
- Downes G.B. and Gautam N. (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics* **62**: 544 – 552.
- Druey K.M., Blumer K. J., Kang V.H., Kehrl J.H. (1996) Inhibition of G-protein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* **379**: 742 – 746.
- Druey K.M. (2003) Regulators of G protein signalling: potential targets for treatment of allergic inflammatory diseases such as asthma. *Expert Opin Ther Targets* **7(4)**: 475 – 484.
- Duerr R.L., Huang S., Miraliakbar H.R., Clark R., Chien K.R., Ross J. (1995) Insulin-like Growth Factor-1 enhances ventricular hypertrophy and function during the onset of experimental cardiac failure. *J. Clin. Invest.* **95**: 619 – 627.
- Eckert R., Randall D., Augustine G. (1993) *Tierphysiologie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York
- Eichenholz P.W., Eichacker P.Q., Hoffmann W.D., Banks S.M., Parrillo J.E., Danner R.L., Natanson C. (1992) Tumor necrosis factor challenges in canines: patterns of cardiovascular dysfunction. *Am J Physiol* **263**: H668 – H675.
- Eiken H.G., Oie E., Damas J.K., Yndestad A., Bjerkeli V., Aass H., Simonsen S., Geiran O.R., Tonnessen T., Christensen G., Froland S.S., Gullestad L., Attramadal H., Aukrust P. (2001) Myocardial gene expression of leukaemia inhibitory factor, interleukin-6 and glycoprotein 130 in end-stage human heart failure. *European Journal of Clinical Investigation* **31(5)**: 389 – 397.
- Emilsson L., Saetre P., Jazin E. (2006) Low mRNA levels of RGS4 splice variants in Alzheimer's disease: association between a rare haplotype and decreased mRNA expression. *Synapse* **59(3)**: 173 – 176.
- Eschenhagen T. (1993) G proteins and the heart. *Cell Biol Int* **17**: 723 – 749.
- Eschenhagen T., Mende U., Diederich M., Hertle B., Memmesheimer C., Pohl A., Schmitz W., Scholz H., Steinfath M., Böhm M., Michel M.C., Brodde O.E., Raap A. (1996) Chronic treatment with carbachol sensitizes the myocardium to cAMP-induced arrhythmia. *Circulation* **93**: 763 – 771.

- Fahimi-Vahid M. (2003) Untersuchungen zur Beteiligung von $G\alpha_{12}$ / $G\alpha_{13}$ -Proteinen an der Aktivierung der Phospholipase D in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten. Dissertation.
- Faurobert E., Hurley J.B. (1997) The core domain of a new retina specific RGS protein stimulates the GTPase activity of transducin in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 2945 – 2950.
- Ferguson S.S.G., Barak L.S., Zhang J., Caron M.G. (1996) G-protein-coupled receptor regulation: Role of G-protein-coupled receptor kinases and arrestins. *Can J Physiol Pharmacol* **74**: 1095 – 1110.
- Ferguson S.S.G., Caron M.G. (1998) G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol* **9**: 119 – 127
- Ferguson S.S.G (2001) Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling. *Pharmacological Reviews* **53(1)**: 1 – 24
- Finkel M.S., Oddis C.V, Jacob T.D, Watkins S.C., Hattler B.G, Simmons R.L (1992) Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. *Science* **257**: 387 – 389
- Fisch T.M., Prywes R., Simon M.C., Roeder R.G. (1989) Multiple sequence elements in the *c-fos* promoter mediate induction by cAMP. *Genes Dev.* **3**: 198 – 211.
- Fischer E., Marano M.A., Van Zee K.J., Rock C.S., Hawes A.S., Thompson W.A., DeForge L., Kenney J.S., Remick D.G., Bloedow D.C., Thompson R.C., Lowry S.F., Moldawer L.L. (1992) Interleukin 1 receptor blockade improves survival and hemodynamic performance in *Escherichia coli* septic shock, but fails to alter host responses to sublethal endotoxemia. *Journal of Clinical Investigation* **89**: 1551 – 1557.
- Fong C.W., Zhang Y., Neo S.Y., Lin S.-C. (2000) Specific induction of RGS16 (regulator of G-protein signalling 16) mRNA by protein kinase C in CEM leukaemia cells is mediated via tumour necrosis factor α in a calcium-sensitive manner. *Biochem J.* **352**: 747 – 753.
- Francis G.S., Goldsmith S.R., Levine T.B., Olivari M.T., Cohn J.N. (1984) The neurohumoral axis in congestive heart failure. *Ann Intern Med.* **101(3)**: 370 – 377
- Franco M., Paris S., Chabre M. (1995) The small G-protein ARF1GDP binds to the Gt beta gamma subunit of transducin, but not to Gt alpha GDP-Gt beta gamma. *FEBS Lett* **362(3)**: 286 – 290
- Frank O. (1895) Zur Dynamik des Herzmuskels. *Z Biol* **32**: 370
- Frantz S., Kobzik L., Kim Y.D., Fukazawa R., Medzhitov R., Lee R.T., Kelly R.A. (1999) Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest.* **104(3)**: 271 – 280.
- Fredriksson R., Lagerstrom M.C., Lundin L.G. & Schiöth H.B. (2003) The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints. *Mol. Pharmacol.* **63**: 1256 – 1272.
- Frevel M.A.E., Bakheet T., Silva A.M., Hissong J.G., Khabar K.S.A., Williams B.R.G. (2003) p38 Mitogen-Activated Protein Kinase-Dependent and -Independent Signaling of mRNA Stability of AU-Rich Element-Containing Transcripts. *Molecular and Cellular Biology* **23(2)**: 425 – 436.
- Fukushima N., Ishii I., Contos J.J., Weiner J.A., Chun J. (2001) Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **41**: 507 – 534.

- Gaudet R., Bohm A., Sigler P.B. (1996) Crystal structure at 2.4 angstroms resolution of the complex of transducin $\beta\gamma$ and its regulator, phosducin. *Cell* **87**: 577 – 588.
- Gautam N., Downes G.B., Yan K. and Kisselev O. (1998) The G-protein $\beta\gamma$ complex. *Cell Signal* **10**: 447 - 455
- Geha A.S., El-Zein C., Massad M.G. (2004) Mitral valve surgery in patients with ischemic and nonischemic dilated cardiomyopathy. *Cardiology*. **101**(1 – 3): 15 – 20
- Gerhardstein B.L., Puri T.S., Chien A.J., Hosey M.M.(1999) Identification of the sites phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase on the β_2 subunit of L-type voltage-dependent calcium channels. *Biochemistry* **38**: 10361 – 10370.
- Goetzl E.J., An S. (1998) Diversity of cellular receptors and functions for the lysophospholipid growth factors lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate. *The FASEB Journal* **12**: 1589 – 1598.
- Goetzl E.J., Wang W., McGiffert C., Huang M-C. Graler M.H. (2004) Sphingosine 1-phosphate and its G protein-coupled receptors constitute a multifunctional immunoregulatory system. *J Cell Biochem*. **92**(6): 1104 – 1114.
- Gogos C.A., Drosou E., Bassaris H.P., Skoutelis A. (2000) Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis : a marker for prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* **181**(1): 176 – 180.
- Granton J.T., Goddard C.M., Allard M.F., van Eeden S., Walley K.R. (1997) Leukocytes and decreased left-ventricular contractility during endotoxemia in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* **155**: 1977 – 1983
- Graler M.H., Goetzl E.J. (2002) Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. *Biochim Biophys Acta* **1582**(1 – 3): 168 – 174.
- Griffin P.P., Schubert-Zsilavec M., Stark H. (2004) Hemmstoffe von Beta-Adrenozeptoren. *Pharmazie in unserer Zeit* **33**(6): 442 – 449.
- Gu M., Bose R., Bose D., Yang J., Li X., Light R.B., Mink S. (1998) Tumor necrosis factor-alpha but not septic plasma depresses cardiac myofilament contraction. *Can J Anesth* **45**: 280 – 286.
- Guilfoyle T.J. (1997) The structure of plant gene promoters. *Genetic Engineering* **19**: 15 – 45.
- Gulick T., Chung M.K., Pieper S.J., Lange L.G., Schreiner G.F. (1989) IL-1 and TNF inhibit cardiac myocyte adrenergic responsiveness. *Proc Natl Acad Sci* **86**: 6753 – 6757.
- Hadcock J.R. und Malbon C.C. (1988) Down regulation of β -adrenergic receptors: Agonist-induced reduction in receptor mRNA levels. *Proc Natl Acad Sci USA* **85**: 5021 – 5025
- Hamm H. E. (1998) The many faces of G protein signaling. *J. Biol. Chem.* **273**: 669 – 681
- Harhammer R., Gohla A., Schultz G. (1996) Interaction of G protein G beta gamma dimers with small GTP-binding proteins of the Rho family. *FEBS Lett.* **399**(3): 211 – 214
- Harrison L.M., van Haaften W.C.E., Tesh V.L. (2004) Regulation of Proinflammatory Cytokine Expression by Shiga Toxin 1 and / or Lipopolysaccharides in the Human Monocytic Cell Line THP-1. *Infection and Immunity* **72**(5): 2618 – 2627.

- Hart M.J., Jiang X., Kozasa T., Roscoe W., Singer W.D., Gilman A.G., Sternweis P.C., Bollag G. (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by G α_{13} . *Science* **280**: 2112 – 2114
- Hassler M. (2001) Regulation of the Human c-fos Gene: X-ray Structure of the SAP-1, SRF, DNA Ternary Complex. Dissertation
- Hausdorff W.P., Bouvier M., O'Dowd B.F., Irons G.P., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1989) Phosphorylation sites on two domains of the β_2 -adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem* **264**: 12657 – 12665.
- Hazuda D.J., Lee J.C., Young P.R. (1988) The kinetics of interleukin 1 secretion from activated monocytes. Differences between interleukin 1 alpha and interleukin 1 beta. *J Biol Chem.* **263(17)**: 8473 – 8479.
- He W., Cowan C.W., Wensel T.G. (1998) RGS9, a GTPase accelerator for phototransduction. *Neuron* **20**: 95 – 102.
- He J., Yao L.H., Chen A.J., Yu H., Jia R.Q., Cheng C.S., Huan L.F., Zhang Z.Q. (2006) Expression of sTNFR-IgGfc fusion gene in endothelial cell and its application in gene therapy for rheumatoid arthritis. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao* **22(3)**: 378 – 383.
- Hein L. (2004) Entwicklung der Beta-Blocker. *Pharmazie in unserer Zeit* **33(6)**: 434 – 437
- Hemleben V. (1990) *Molekularbiologie der Pflanzen*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Hepler J.R., Berman D.M., Gilman A.G., Kozasa T. (1997) RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for Gq alpha and block activation of phospholipase C beta by gamma-thio-GTP-Gq alpha. *Proc Natl Acad Sci USA* **94(2)**: 428 – 432.
- Hesse D.G., Tracey K.J., Fong Y., Manogue K.R., Palladino M.A. jr, Cerami A., Shires G.T., Lowry S.F. (1988) Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia. *Surgery, Gynecology and Obstetrics* **166**: 147 – 153.
- Heximer S.P., Knutsen R. H., Sun X., Kaltenbronn K.M., Rhee M-H., Peng N., Oliveira-dos-Santos A., Penninger J.M., Muslin A.J., Steinberg T.H., Wyss J.M., Mecham R.P., Blumer K.J. (2003) Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. *The Journal of Clinical Investigation* **111(4)**: 445 – 452.
- Hosenpud J.D., Campbell S.M., Mendelson D.J. (1989) Interleukin-1 induced myocardial depression in an isolated beating heart preparation. *J Heart Transplant* **8**: 460 – 464.
- Hunt T.W., Fields T.A., Casey P.J., Peralta E.G. (1996) RGS10 is a selective activator of Galpha i GTPase activity. *Nature* **383(6596)**: 172 –175.
- Hyde-DeRuyscher R.P., Jennings E., Shenk T. (1995) DNA binding sites for the transcriptional activator / repressor YY1. *Nucleic Acids Research* **23(21)**: 4457 – 4465.
- Ibelgaufts. Horst Ibelgaufts` Cope with cytokines and cells. Online Pathfinder Encyclopaedia.
- Ibelgaufts H. (1993) *Gentechnologie von A bis Z*. VHC Verlagsgesellschaft

- Ikeda T., Ohta H., Okada M., Kawai N., Nakao R., Siegl P.K.S., Kobayashi T., Maeda S., Miyauchi T., Nishikibe M. (1999) Pathophysiological Roles of Endothelin-1 in Dahl-Sensitive Hypertension. *Hypertension* **34**: 514 – 519.
- Ivey F.D., Hodge P.N., Turner G.E., Borkovich K.A. (1996) The $G\alpha_i$ Homologue *gna-1* Controls Multiple Differentiation Pathways in *Neurospora crassa*. *Molecular Biology of the Cell* **7**: 1283 – 1297
- Iyer V.R., Eisen M.B., Ross D.T., Schuler G., Moore T., Lee J.C.F., Trent J.M., Staudt L.M., Hudson J., Boguski M.S., Lashkari D., Shalon D., Botstein D., Brown P.O. (1999) The Transcriptional Program in the Response of Human Fibroblasts to Serum. *Science* **283**: 83 – 87.
- Jackson T.A., Koterwas D.M., Morgan M.A., Bradford A.P. (2003) Fibroblast Growth Factors Regulate Prolactin Transcription via an Atypical Rac-Dependent Signaling Pathway. *Mol Endocrinol* **17(10)**: 1921 – 1930.
- Jan L.Y., Jan Y.N. (1997) Receptor-regulated ion channels. *Curr Opin Cell Biol.* **9(2)**: 155 – 160.
- Jesnowski R., Naehring J., Wolf K. (1995) A rapid and reliable method for PCR-based amplification of chromosomal and mitochondrial DNA from intact yeast cells. *Curr Genet.* **27 (4)**: 318-319
- Ji T.H., Grossmann M., Ji I. (1998) G Protein-coupled receptors. I. Diversity of receptor-ligand interactions. *J Biol Chem* **273**: 17299- 17302
- Jones A.M., Assmann S.M. (2004) Plants: the latest model system for G-protein research. *EMBO reports* **5**: 572 – 578.
- Joep R.S., Song L., Grimes C.A., Pacheco M.A., Dilley G.E., Li X., Meitzer H.Y., Overholser J.C., Stockmeier C.A. (1998) Selective increases in phosphoinositide signalling activity and G protein levels in postmortem brain from subjects with schizophrenia or alcohol dependence. *J Neurochem.* **70(2)**: 763 – 771.
- Kardestuncer T., Wu H., Lim Angela L., Neer Eva J. (1998) Cardiac myocytes express mRNA for ten RGS proteins: changes in RGS mRNA expression in ventricular myocytes and cultured atria. *FEBS Letters* **438**: 285 – 288
- Karliner J.S., Honbo N., Summers K., Gray M.O., Goetzl E.J. (2001) The lysophospholipids sphingosine-1-phosphate and lysophosphatidic acid enhance survival during hypoxia in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **33**: 1713 – 1717.
- Karliner Joel S. (2002) Lysophospholipids and the cardiovascular system. *Biochimica et Biophysica Acta* **1582**: 216 – 221
- Katz A.M. (1990) Cardiomyopathy of overload. A major determinant of prognosis in congestive heart failure. *N Engl J Med* **332**: 100 – 110
- Keene J.D. (1999) Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5 – 7.
- Keene J.D. (2001) Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 7018 – 7024.
- Kikuchi A. (1999) Modulation of Wnt signaling by Axin and Axil. *Cytokine Growth Factor Rev.* **10(3 – 4)**: 255 – 265.

- Kimchi A., Ellrodt G.A., Berman D.S., Murata G.H., Riedinger M.S., Swan H.J.C., Murata G.H. (1984) Right ventricular performance in septic shock: a combined radionuclide and hemodynamic study. *J Am Coll Cardiol* **4**: 945 – 951.
- King K.L, Winer J., Phillips D.M., Quach J., Williams P.M., Mather J.P. (1998) Phenylephrine, endothelin, prostaglandin F₂alpha and leukemia inhibitory factor induce different cardiac hypertrophy phenotypes in vitro. *Endocrine* **9**(1): 45 – 55.
- Kinugawa K., Takahashi T., Kohmoto O., Yao A., Aoyagi T., Momomura S, Hirata Y., Serizawa T. (1994) Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on [Ca²⁺] and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. *Circ Res* **75**: 285 – 295.
- Knippers R. (1997) *Molekulare Genetik*. Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York
- Koelle M.R., Horvitz H.R. (1996) EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. *Cell* **84**(1): 115 – 125.
- Krauss G. (2003) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Wiley-VCH GmbH & Co. KGaA
- Krupnick J.G. und Benovic J.L. (1998) The role of receptor kinases and arrestins in G protein-coupled receptor regulation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**: 289 – 319.
- Kumar A., Thota V., Dee L., Olson J., Uretz E., Parrillo J.E. (1996) Tumor necrosis factor α and interleukin 1β are responsible for in vitro myocardial cell depression induced by human septic shock serum. *J. Exp. Med.* **183**: 946 – 958.
- Kumar A., Brar R., Wang P., Dee L., Skorupa G., Khadour F., Schulz R. Parrillo J. E. (1999) Role of nitric oxide and cGMP in human septic serum-induced depression of cardiac myocyte contractility. *Am J. Physiol.* **276**: R265 – R276.
- Kunst G., Kress K.R., Gruen M., Uttenweiler D., Gautel M., Fink R.H. (2000) Myosin binding protein C, a phosphorylation-dependent force regulator in muscle that controls the attachment of myosin heads by its interaction with myosin S2. *Circ Res.* **86**: 51 – 58
- Kuschel M., Zhou Y.Y., Cheng H., Zhang S.J., Chen Y., Lakatta E.G., Xiao R.P. (1999) G_i protein-mediated functional compartmentalization of cardiac β_2 -adrenergic signaling. *J Biol Chem.* **274**: 22048 – 22052.
- Laemmli U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680 – 685
- Lai W.S., Carballo E., Strum J.R., Kennington E.A., Phillips R.S., Blackshear P.J. (1999) Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 4311 – 4323.
- Langhans-Rajasekaran S.A., Wan Y., Huang X. (1995) Activation of Tsk and Btk Tyrosine Kinases by G Protein $\beta\gamma$ Subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**: 8601 – 8605
- Laterza O.F., Taylor L., Unnithan S., Nguyen L., Curthoys N.P. (2000) Mapping and functional analysis of an instability element in phosphoenolpyruvate carboxykinase mRNA. *Am J Physiol Renal Physiol* **279**: F866 – F873.

- Lee T.C., Shi Y., Schwartz R.J. (1992) Displacement of BrdUrd-induced YY1 by serum response factor activates skeletal α -actin transcription in embryonic myoblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 9814- 9818.
- Lee H., Goetzl E.J., An S. (2000) Lysophosphatidic acid and sphingosine 1-phosphate stimulate endothelial cell wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* **278**: C612 – C618.
- Lefkowitz R.J.(1993) G protein-coupled receptor kinases. *Cell* **74**: 409 - 412
- Lefkowitz R.J., Rockman H.A., Koch W.J.(2000) Catecholamines, Cardiac β -Adrenergic Receptors, and Heart Failure. *Circulation* **101**: 1634 – 1644
- Lehmann C. (2003) Untersuchungen zum Aufnahmemechanismus und intrazellulärem Transport von fusogenen und kationischen Liposomen-DNA-Komplexen für den Gentransfer. Dissertation
- Lehmann S. (1999) Virus treatment questioned after gene therapy death. *Nature* **6753**: 517 - 518
- Letunic I., Goodstadt L., Dickens N.J., Doerks T., Schultz J., Mott R., Ciccarelli F., Copley R.R., Ponting C.P., Bork P. (2002) Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic Acids Res* **30(1)**: 242 – 244.
- Levy D., Kenchaiah S., Larson M., et al. (2002) Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure. *N Engl J Med* **347**: 1139 – 1144
- Ling Y., West A.G., Roberts E.C., Lakey J.H., Sharrocks A.D. (1998) Interaction of Transcription Factors with Serum Response Factor. *The Journal of Biological Chemistry* **273(17)**: 10506 – 10514
- Lohse M.J., Benovic J.L., Codina J., Caron M.G., Lefkowitz R.J. (1990) β -arrestin: A protein that regulates β -adrenergic receptor function. *Science (Wash DC)* **248**: 1547 - 1550
- Lohse M.J., Engelhardt S., Eschenhagen T. (2003) What is the role of β -adrenergic signaling in heart failure? *Circulation Research* **93**: 896 – 919.
- Lottspeich & Zorbas (1998) Bioanalytik. Spektrum Verlag, Heidelberg – Berlin
- Luo D., Saltzman W.M. (2000) Enhancement of transfection by physical concentration of DNA at cell surface. *Nat Biotechnol* **18(8)**: 893 – 895.
- Maack C., Böhm M. (2004) Klinischer Einsatz von Beta-Blockern bei kardiovaskulären Indikationen. *Pharmazie in unserer Zeit* **33(6)**: 466 – 475
- Maldonado E., Reinberg D. (1995) News on initiation and elongation of transcription by RNA polymerase II. *Curr Opin Cell Biol* **7(3)**: 352 – 361.
- Maier L.S., Pieske B., Allen D.G. (1997) Influence of stimulation frequency on $[Na^+]_i$ and contractile function in Langendorff-perfused rat heart. *Am J Physiol* **273**: H1246 – H1254
- Martemyanov K.A., Lishko P.V., Calero N., Keresztes G., Sokolov M., Strissel K.J., Leskov I.B., Hopp J.A. Kolesnikov A.V., Chen C.K., Lem J., Heller S., Burns M.E., Arshavsky V.Y. (2003) The DEP domain determines subcellular targeting of the GTPase activating protein RGS9 in vivo. *J Neurosci.* **23**: 10175 – 1081.
- Martin C., Sauzx P., Mege J.L., Perrin G., Papazian L., Gouin F. (1994) Prognostic value of serum cytokines in septic shock. *Intensive Care Medicine* **20**: 272 – 277.

- Maruyama Y., Nishida M., Sugimoto Y., Tanabe S., Turner J.H., Kozasa T., Wada T., Nagao T., Kurose H. (2002) $G_{\alpha_{12/13}}$ mediates α_1 -adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circulation Research* **91**: 961 – 969.
- Marx S.O., Reiken S., Hisamatsu Y., Jayaraman T., Burkhoff D., Rosemblyt N., Marks A.R. (2000) PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell* **101**: 365 – 376.
- Mathiak G., Kabir K., Grass G., Keller H., Steinringer E., Minor T., Rangger C., Neville L.F. (2003) Lipopolysaccharides from different bacterial sources elicit disparate cytokine responses in whole blood assays. *International Journal of Molecular Medicine* **11**: 41 – 44.
- Mazurais D., Robert P., Gout B., Berrebi-Bertrand I., Laville M.P., Calmels T. (2002) Cell Type-specific Localization of Human S1P Receptors. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **50(5)**: 661 – 669.
- Mc Donald P.H. und Lefkowitz R.J. (2001) Beta-Arrestins: new roles in regulating heptahelical receptors' functions. *Cell Signal*. **13**: 683 – 689.
- McNabb D.S., Reed R., Marciniak R.A. (2005) Dual Luciferase Assay System for Rapid Assessment of Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic Cell* **4(9)**: 1539 – 1549.
- Meacci E., Donati C., Farnararo M., Bruni P. (2003) Sphingosine 1-phosphate signal transduction in muscle cells. *The Italian Journal of Biochemistry* **52 (1)**: 25 – 27
- Mende U., Kagen A., Cohen A., Aramburu J., Schoen F.J., Neer E.J. (1998) Transient cardiac expression of constitutively active G_{α_q} leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *PNAS* **95 (23)**: 13893 – 13898
- Michalek C. (2003) Untersuchungen zu Veränderungen $G_{q/11}$ -vermittelter Signalwege bei Herzinsuffizienz bzw. kardialer Hypertrophie durch RGS-Proteine. Dissertation.
- Mittmann C., Chung C-H., Höppner G., Michalek C., Nose M., Schüler C., Schuh A., Eschenhagen T., Weil J., Pieske B., Hirt S., Wieland T. (2002) Expression of ten RGS proteins in human myocardium: functional characterization of an upregulation of RGS4 in heart failure. *Cardiovasc Res* **55**: 778 – 786
- Morgan J.I., Curran T. (1991 a) Proto-oncogene transcriptions factors and epilepsy. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**: 343 – 349.
- Morgan J.I., Curran T. (1991 b) Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes *fos* and *jun*. *Annu. Rev. Neurosci.* **14**: 421 – 451.
- Morris A.J., Scarlata S. (1997) Regulation of effectors by G-protein alpha- and beta gamma-subunits. Recent insights from studies of the phospholipase c-beta isoenzymes. *Biochem Pharmacol.* **54(4)**: 429 – 435.
- Müller-Werdan U., Reithman C., Werdan K. (1996) Cytokines and the heart – Molecular mechanisms of septic cardiomyopathy. Austin, Texas: Landes Company and Heidelberg: Springer Verlag.
- Müller-Werdan U., Schumann H., Loppnow H., Fuchs R., Darmer D., Stadler J., Holtz J., Werdan K. (1998) Endotoxin and tumor necrosis factor α exert a similiar proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 1027 – 1036.

Mutschler E., Geisslinger G., Kroemer H.K. & Schäfer-Korting M. (2001) Therapie der Hypertonie. Mutschler E. (Hrsg.) Arzneimittelwirkungen. 8. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Natanson C., Eichenholz P.W., Danner R.L., Eichacker P.Q., Hoffman W.D., Kuo G.C., Banks S.M., MacVittie T.J., Parrillo E. (1989) Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J Exp Med* **169**: 823 – 832

Natesan S., Gilman M. (1995) YY1 facilitates the association of serum response factor with the *c-fos* serum response element. *Mol Cell Biol.* **15(11)**: 5975 – 5982.

Neer E.J. (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* **80(2)**: 249 – 257.

Nemec K. & Schubert-Zsilavecz M. (2003) Vom Teprotid zum Captopril – Rationales Design von ACE-Hemmern. *Pharmazie in unserer Zeit* **32**: 11 – 15.

Neves S.R., Ram P.T., Iyengar R. (2002) G Protein Pathways. *Science* **296**: 1636 – 1639

Niebauer J., Volk H-D, Kemp M., Dominguez M., Schumann R.R., Rauchhaus M., Poole-Wilson P.A., Coats A.J.S, Anker S.D. (1999) Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet* **353**: 1838 – 1842.

Nürnberg B., Gudermann T., Schultz G (1995) Receptors and G proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 2. G proteins: structure and function. *J Mol Med* **73**: 123 – 132.

Offermanns S., Laugwitz K.L., Spicher K., Schlutz G. (1994) G proteins of the G₁₂ family are activated via thromboxane A₂ and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci* **91**: 504 – 508.

Offermanns S., Hashimoto K., Wantanabe M., Sun W., Kurihara H., Thompson R.F., Inoue Y., Kano M., Simon MI (1997) Impaired motor coordination and persistent multiple climbing fiber innervation of cerebellar Purkinje cells in mice lacking G α_q . *Proc Natl Acad Sci* **94**: 14089 – 14094.

Ohlsson K., Bjork P., Bergenfeldt M., Hageman R., Thompson R.C. (1990) Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature* **348**: 550

Ono K., Tsujimoto G., Sakamoto A., Eto K., Masaki T., Ozaki Y., Satake M. (1994) Endothelin-A receptor mediates cardiac inhibition by regulating calcium and potassium currents. *Nature* **370(6487)**: 301 – 304.

Oral H., Dorn G.W., Mann D.L. (1997) Sphingosine mediates the immediate negative inotropic effects of tumor necrosis factor- α in the adult mammalian cardiac myocyte. *American Society for Biochemistry and Molecular Biology* **272(8)**: 4836 – 4842.

Orkin St.H., Motulsky A.G. (1995) Report and recommendations of the panel to assess the NIH investment in research on gene therapy. <http://www.nih.gov/news/panelrep.html>

Ortmann R.A., Cheng T., Visconti R., Frucht D.M., O'Shea J.J. (2000) Janus kinases and signal transducers and activators of transcription: their roles in cytokine signaling, development and immunoregulation. *Arthritis Res.* **2(1)**: 16 – 32.

- Pak Y., O'Dowd B.F., Wang J.B., George S.R. (1999) Agonist-induced, G protein-dependent and -independent down regulation of the mu opioid receptor. The receptor is a direct substrate for protein-tyrosine kinase. *J Biol Chem* **274**: 27610 – 27616.
- Panetta R., Guo Y., Magder S., Greenwood M.T. (1999) Regulators of G-protein signaling (RGS) 1 and 16 are induced in response to bacterial lipopolysaccharide and stimulate c-fos promoter expression. *Biochem Biophys Res Com* **259**: 550 – 556.
- Parker J.L., Adams H.R. (1985) Development of myocardial dysfunction in endotoxin shock: *Am J Physiol* **248**: H818- H826.
- Parker M.M., McCarthy K.E., Ognibene F.P., Parrillo J.E. (1990) Right ventricular dysfunction and dilatation, similar to left ventricular changes, characterize the cardiac depression in septic shock in humans. *Chest* **97**: 126 – 131.
- Parker M.M., Shelhamer J.H., Bacharach S.L., Green M.V., Natanson C., Frederick T.M., Damske B.A., Parrillo J.E. (1984) Profound but reversible myocardial depression in patients with septic shock. *Ann Intern Med* **100**: 483 – 490.
- Patten M., Hartogensis WE, Long CS. (1996) Interleukin-1 β is a negative transcriptional regulator of α 1-adrenergic induced gene expression in cultured cardiac myocytes. *J Biol Chem*. **271**(35): 21134 – 41
- Patten M., Wang W., Aminololama-Shakeri S., Burson M., Long C.S. (2000) IL-1 β Increases Abundance and Activity of the Negative Transcriptional Regulator Yin Yang-1 (YY1) in Neonatal Rat Cardiac Myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **32**: 1341 – 1352.
- Patten M., Krämer E., Bünemann J., Wenck C., Thoenes M., Wieland T., Long C. (2001) Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes in vivo. *Pflügers Arch Eur J Physiol* **442**: 920 – 927.
- Patten M., Bünemann J., Thoma B., Krämer E., Thoenes M., Stübe S., Mittmann C., Wieland T. (2002) Endotoxin induces desensitization of cardiac endothelin-1 receptor signaling by increased expression of RGS4 and RGS16. *Cardiovascular Research* **53**: 156 – 164.
- Patten M., Stübe S., Thoma B., Wieland T. (2003) Interleukin-1 β mediates endotoxin- and tumor necrosis factor α -induced RGS16 protein expression in cultured cardiac myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **368**: 360 – 365.
- Penny W.J. (1984) The deleterious effects of myocardial catecholamines on cellular electrophysiology and arrhythmias during ischemia and reperfusion. *Eur Heart J* **5**: 960 – 973.
- Perez C., Albert I., DeFay K., Zachariades N., Gooding L., Kriegler M. (1990) A nonsecretable cell surface mutant of tumor necrosis factor (TNF) kills by cell-to-cell contact. *Cell* **63**(2): 251 – 258.
- Pfannenschmidt G. (2000) Der Effekt von Antithrombin III auf die pulmonalvaskuläre Freisetzung von Big Endothelin-1, Endothelin-1 und Prostanoiden unter septischen und nichtseptischen Bedingungen sowie seine Mechanismen. Dissertation.
- Pieske B., Kretschmann B., Meyer M., Holubarsch C., Weirich J., Posival H., Minami K., Just H., Hasenfuss G. (1995) Alterations in intracellular calcium handling associated with the inverse force-frequency relation in human dilated cardiomyopathy. *Circulation* **92**: 1169 – 1178.
- Pieske B. (1998) New aspects of the pathophysiology of heart failure. *Wien Med Wochenschr.* **148**(5): 108 – 120.

- Pieske B., Hasenfuss G. (2000) Pathophysiological basis of heart failure. *Ther Umsch.* **57(5)**: 284 – 292.
- Piot C., Lemaire S., Albat B., Seguin J., Nargeot J., Richard S. (1996) High-frequency induced upregulation of human cardiac calcium currents. *Circulation* **93**: 120 – 128.
- Popov S., Yu K., Kozasa T., Wilkie T.M. (1997) The regulators of G-protein signaling (RGS) domains of RGS4, RGS10, and GAIP retain GTPase activating protein activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 7216 – 7220.
- Pumiglia K., LeVine H., Haske T., Habib T., Jove R. and Decker S. (1995) A direct interaction between G-protein subunits and the Raf-1 protein kinase. *J. Biol. Chem.* **270**: 14251 – 14254.
- Rauchhaus M., Coats A.J., Anker S.D., Niebauer J., Volk H.D., Kemp M., Dominguez M., Schumann R.R., Poole-Wilson P.A. (2000) The endotoxin-lipoprotein hypothesis – Endotoxin and immune activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. *Lancet* **356** (No. 3233): 930 – 933.
- Rauchhaus M., Müller-Werdan U. (2001) Cytokines in heart diseases. *Internist (Berl)* **42(1)**: 75 – 84.
- Rehm H. (2000) *Proteinbiochemie / Proteomics*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Reinhart K., Karzai W. (2001) Anti-tumor necrosis factor therapy in sepsis: update on clinical trials and lessons learned. *Crit Care Med* **29(7)**: S121 – S125.
- Reithmann C., Gierschik P., Werdan P., Jakobs K.H. (1991) Tumor necrosis factor α up-regulates G α i and G β proteins and adenylyl cyclase responsiveness in rat cardiomyocytes. *Europ J Pharmacol* **206**: 53 – 60.
- Remmers U. (2000) Über die Auswirkung einer Adenovirus-vermittelten Überexpression von inhibitorischen G-Proteinen und β 1-Adrenozeptoren in Herzmuskelzellen. Dissertation
- Reutemann M. (2002) ICAM-1 abhängige Akkumulation neutrophiler Granulozyten und Leukotrien-vermittelte Kardiodepression in *Staphylococcus aureus* α -Toxin-perfundierten Rattenherzen. Dissertation
- Riddle E.L., Schwartzman R.A., Bond M., Insel P.A. (2005) Multi-tasking RGS proteins in the heart. The next therapeutic target? *Circulation Research* **96**: 401 – 411.
- Robert P., Tsui P., Laville MP, Livi George P., Sarau Henry M., Bril A., Berrebi-Bertrand I. (2001) EDG1 receptor stimulation leads to cardiac hypertrophy in rat neonatal myocytes. *J Mol Cell Cardiol* **33**: 1589 – 1606
- Robertson L.M., Kerppola T.K., Vendrell M., Luk D., Smeyne R.J., Bocchiaro C., Morgan J.I., Curran T. (1995) Regulation of *c-fos* Expression in Transgenic Mice Requires Multiple Interdependent Transcription Control Elements. *Neuron* **14**: 241 – 252.
- Roger V.L., Weston S.A., Redfield M.M., et al. (2004) Trends in heart failure incidence and survival in a community-based population. *JAMA* **292**: 344 – 350
- Rogers J.H., Tamirisa P., Kovacs A., Weinheimer C., Courtois M., Blumer K.J., Kelly D.P. et al. (1999) RGS4 causes increased mortality and reduced cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *J Clin Invest* **104**: 567 – 576.
- Rothfischer Wolfram Georg (2002) Experimentelle Untersuchungen zur Wirkung von Endothelin-1 auf die Lungenstrombahn am Modell der isolierten Kaninchenlunge. Dissertation.

- Sadoshima J., Izumo S. (1993) Signal transduction pathways of angiotensin II-induced *c-fos* gene expression in cardiac myocytes *in vitro*. Roles of phospholipid-derived second messengers. *Circ Res.* **73(3)**: 424 – 438.
- Saiki RK, Scharf S., Faloona F., Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230 (4732)**: 1350 – 1354
- Saitoh O., Kubo Y., Miyatani Y., Asano T., Nakata H. (1997) RGS8 accelerates G-protein-mediated modulation of K⁺ currents. *Nature* **390**: 525 – 529.
- Sakiri R., Ramegowda B., Tesh V.L. (1998) Shiga Toxin 1 Activates Tumor Necrosis Factor- α Gene Transcription and Nuclear Translocation of Transcriptional Activators Nuclear Factor- κ B and Activator Protein-1. *Blood* **92(2)**: 558 – 566.
- Sanger F., Nicklen S., Coulson a.R. (1977) DNA Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Acad. Sci. USA* **74**: 5463 – 5467
- Sassone-Corsi P., Sisson J.C., Verma I.M. (1988) Transcriptional autoregulation of the proto-oncogene *fos*. *Nature* **334**: 310 – 314.
- Schiff M.L., Siderovski D.P., Jordan J.D., Brothers G., Snow B., De Vries L., Ortiz D.F., Diverse-Pierluissi M. (2000) Tyrosine-kinase-dependent recruitment of RGS12 to the N-type calcium channel. *Nature* **408(6813)**: 723 – 727.
- Schmid J. (2006) www.univie.ac.at/VascBio/schmid
bzw. www.univie.ac.at/VascBio/schmid/20060425SSM3.pdf
- Schneider T., Igelmund P., Heschler J. (1997) G protein interaction with K⁺ and Ca²⁺ channels. *Trend Pharmacol Sci* **18(1)**: 8 – 11
- Schneider A.J., Teule G.J.J., Groenveld A.B.J., Nauta J., Heidendal G.A.K., Thijs L.G. (1988) Biventricular performance during volume loading in patients with early septic shock, with emphasis on the right ventricle: a combined hemodynamic and radionuclide study. *Am Heart J* **116**: 103 – 112
- Scholich K., Mullenix J.B., Wittpoth C., Poppleton H.M., Pierre S.C., Lindorfer M.A., Garrison J.C., Patel T.B. (1999) Facilitation of signal onset and termination by adenylyl cyclase. *Science* **283**: 1328 – 1331
- Scholz H. (1987) Behandlung der Herzinsuffizienz – gestern, heute, morgen. *Pharmazie in unserer Zeit* **16**: 77 – 91
- Scholz J., Schaefer B., Schmitz W., Scholz H., Steinfath M., Lohse M., Schwabe U., Puurunen J. (1988) Alpha-1 adrenoceptor-mediated positive inotropic effect and inositol trisphosphate increase in mammalian heart. *J Pharmacol Exp Ther.* **245(1)**: 327 – 335
- Scholz J. (1989) Inositol trisphosphate, a new „second messenger“ for positive inotropic effects on the heart? *Klin. Wochenschr.* **16(5)**: 271 – 279
- Schratt G., Weinhold B., Lundberg A.S., Schuck S., Berger J., Schwarz H., Weinberg R.A., Rüther U., Nordheim A. (2001) Serum Response Factor is required for immediate-early gene activation yet is dispensable for proliferation of embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology* **21(8)**: 2933 – 2943.

- Scott M.J., Godshall C.J., Cheadle W.G. (2002) Jaks, STATs, Cytokines, and Sepsis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **9(6)**: 1153 – 1159.
- Selvaraj A., Prywes R. (2004) Expression profiling of serum inducible genes identifies a subset of SRF target genes that are MKL dependent. *BMC Molecular Biology* **5(13)**: 1 – 15.
- Sheng M., Dougan S.T., McFadden G., Greenberg M.E. (1988) Calcium and growth factor pathways of *c-fos* transcriptional activation require distinct upstream regulatory sequences. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 2787 – 2796.
- Sheng M., McFadden G., Greenberg M.E. (1990) Membrane depolarization and calcium induce *c-fos* transcription via phosphorylation of transcription factor CREB. *Neuron* **4**: 571 – 582.
- Sherf B.A., Navarro S.L., Hannah R.R., Wood K.V. (1996) Dual-LuciferaseTM Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating *Firefly* and *Renilla* Luciferase Assays. *Promega Notes Magazine* **57**: 2 – 8.
- Shrivastava A, Calame K. (1994) An analysis of genes regulated by the multifunctional transcriptional regulator Yin Yang-1. *Nucleic Acids Res* **22**: 5151 – 5155.
- Siderovski D.P., Hessel A., Chung S., Mak T.W., Tyers M. (1996) A new family of regulators of G-protein-coupled receptors? *Curr Biol* **6(2)**: 211 – 212.
- Siderovski D.P., Diverse-Pierluissi M., De Vries L. (1999) The GoLoco motif: a Gα i/o binding motif and potential guanine-nucleotide exchange factor. *Trends Biochem Sci* **24(9)**: 340 – 341.
- Siderovski D.P., Willard F.S. (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci* **1**: 51 – 66.
- Simmerman H.K., Jones L.R. (1998) Phospholamban: protein structure, mechanism of action, and role in cardiac function. *Physiol Rev.* **78**: 921 – 947
- Singer I.I., Scott S., Chin J., Bayne E.K., Limjuco G., Weidner J., Miller D.K., Chapman K., Kostura M.J. (1995) The interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE) is localized on the external cell surface membranes and in the cytoplasmic ground substance of human monocytes by immunoelectron microscopy. *J Exp Med* **182(5)**: 1447 – 1459.
- Smeyne R.J., Vendrell M., Hayward M., Baker S.J., Miao G.G., Schilling K., Robertson L.M., Curran T., Morgan J.I. (1993) Continuous *c-fos* expression precedes programmed cell death *in vivo*. *Nature* **363**: 166 – 169.
- Snow B.E., Krumins A.M., Brothers G.M., Lee S.F. Wall M., Chung S., Mangion J., Arya A., Gilman A.G., Siderovski (1998 a) A G-protein γ subunit-like domain shared between RGS11 and other RGS proteins specifies binding of Gβ₅ subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 13307 – 13312.
- Snow B.E., Hall R.A., Krumins A.M., Borthers G.M., Bouchard D., Brothers C.A., Chung S., Mangion J., Gilman A.G., Lefkowitz R.J., Siderovski D.P. (1998 b) GTPase activating specificity of RGS12 and binding specificity of an alternatively spliced PDZ (PDS-95/Dlg/ZO-1) domain. *J Biol Chem* **273**: 17749 – 17755.
- Snyder J.T. (2002) Structural basis for the selective activation of Rho GTPases by Dbl exchange factors. *Nat Struct Biol* **9(6)**: 468 – 475.
- Spink K.E., Polakis P., Weis W.I. (2000) Structural basis of Axin-adenomatous polyposis coli interaction. *EMBO J.* **19(10)**: 2270 – 2279.

- Starling E.H. (1918) Linacre lecture on the law of the heart. Longmans, London
- Stein B., Frank P., Schmitz W., Scholz H., Thoenes M. (1996) Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. *J Mol Cell Cardiol* **28**: 1631 – 1639
- Stoecklin G., Ming X.F., Looser R., Moroni C. (2000) Somatic mRNA turnover mutants implicate tristetraprolin in the interleukin-3 mRNA degradation pathway. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 3753 – 3763.
- Strieter R.M., Kunkel S.L., Bone R.C. (1993) Role of tumour necrosis factor-alpha in disease states and inflammation. *Critical Care Medicine* **21**: S447 – 463.
- Stübe S., Wieland T., Krämer E., v. Stritzky A., Schröder D., Seekamp S., Vogt A., Chen C.-K., Patten M. (2007) Sphingosine-1-Phosphate and Endothelin-1 induce the expression of RGS16 protein in cardiac myocytes by transcriptional activation of the *rgs16* gene. Submitted. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.*
- Suffredini A.F., Fromm R.E., Parker M.M., Brenner M., Kovacs J.A., Wesley R.A., Parrillo J.E. (1989) The cardiovascular response of normal humans to the administration of endotoxin. *New England Journal of Medicine* **321**: 280 – 287.
- Sugden P.H., Clerk A. (1998) „Stress-Responsive“ Mitogen-Activated Protein Kinases (c-Jun N-Terminal Kinases and p38 Mitogen-Activated Protein Kinases) in the Myocardium. *Circulation Research* **83**: 345 – 352
- Sulakhe P.V., Vo X.T. (1995) Regulation of phospholamban and troponin-I phosphorylation in the intact rat cardiomyocytes by adrenergic and cholinergic stimuli. *Mol Cell Biochem.* **149 – 150**: 103 – 126.
- Sun X., Delbridge M.D., Dusting G.J. (1998) Cardiodepressant effects of interferon- γ and endotoxin reversed by inhibition of NO synthase in rat myocardium. *J Mol Cell Cardiol* **30**: 989 – 997
- Sunahara R.K., Dessauer C.W., Gilman A.G. (1996) Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* **36**: 461 – 480
- Surya A., Stadel J.M. and Knox B.E. (1998) Evidence for multiple, biochemically distinguishable states in the G protein-coupled receptor, rhodopsin. *Trends Pharmacol Sci* **19**: 243 – 247
- Tang W.J., Gilman A.G. (1992) Adenylyl cyclases. *Cell* **70**: 869 – 872
- Tamirisa P., Blumer K.J., Muslin A.J. (1999) RGS4 inhibits G-protein signalling in cardiomyocytes. *Circulation* **99**: 441 – 447.
- Tang X., Downes P. (1997) Purification and characterization of $G_{\beta,\gamma}$ -responsive Phosphoinositide 3-Kinases from Platelet Cytosol. *J. Biol. Chem.* **272**: 14193 – 14199.
- Tang M.K., Wang G.R., Lu P., Karas R.H., Aronovitz M., Heximer S.P., Kaltenbronn K.M., Blumer K.J., Siderovski D.P., Zhu Y., Mendelsohn M.E. (2003) Regulator of G-protein signalling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. *Nat Med.* **9**: 1506 – 1512.
- Tekumalla P.K., Calon F., Rahman Z., Birdi S., Rajput A.H., Hornykiewicz O., Di Paolo T., Bedard P.J., Nestler E.J. (2001) Elevated levels of DeltaFosB and RGS9 in striatum in Parkinson's disease. *Biol Psychiatry.* **50(10)**: 813 – 816.

- Thirunavukkarasu K., Halladay D.L., Miles R.R., Geringer C.D., Onyia J.E. (2002) Analysis of regulator of G-protein signalling-2 (RGS2) expression and function in osteoblastic cells. *J Cell Biochem* **85**: 837 – 850.
- Thomas C.E., Ehrhardt A., Kay M.A. (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Reviews Genetics* **4**: 346 – 358.
- Timmer-Stranghöner A. (2004) Isolierung und Kultivierung von Ventrikelzellen aus Rattenherzen. Dissertation.
- Treisman R. (1990) The SRE: a growth factor responsive transcriptional regulator. *Semin Cancer Biol.* **1 (1)**: 47 – 58
- Treisman R. (1992) The serum response element. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 423 – 426.
- Ueyama T., Kawashima S., Sakoda T., Rikitake Y., Ishida T., Kawai M., Namiki M., Yokoyama M. (1999) Endothelin-1 activates p38 mitogen-activated protein kinase via endothelin-A receptor in rat myocardial cells. *Mol. Cell. Biochem.* **199**
- Usheva A., Shenk T. (1994) TATA-binding protein-independent initiation: YY1, TFIIB, and RNA polymerase II direct basal transcription on supercoiled template DNA. *Cell* **76(6)**: 1115 – 1121.
- Valiquette M., Bonin H., Hnatowich M., Caron M.G., Lefkowitz R.J., Bouvier M. (1990) Involvement of tyrosine residues located in the carboxyl tail of the human β_2 -adrenergic receptor in agonist-induced down-regulation of the receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 5089 – 5093
- van der Poll T., Romjin J.A., Endert E., Borm J.J., Buller H.R., Sauerwein H.P. (1991) Tumor necrosis factor mimics the metabolic response to acute infection in healthy humans. *Am J Physiol* **261**: E457 – E465.
- Vincent J.L., Reuse C., Frank N., Contempre B., Kahn R.J. (1989) Right ventricular dysfunction in septic shock: assessment by measurements of right ventricular ejection fraction using the thermodilution technique. *Acta Anaesthesiol Scand* **33**: 34 – 38.
- Voronov E., Apte R.N., Sofer S. (1999) The systemic inflammatory response syndrome related to the release of cytokines following severe envenomation. *J. Venom. Anim. Toxins* **1**
- Wakabayashi G., Gelfand J.A., Burke J.F., Thompson R.C., Dinarello C.A. (1991) A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents *Escherichia coli*-induced shock in rabbits. *FASEB J* **5**: 338 – 343.
- Weisensee D., Bereiter-Hahn J., Low-Friedrich I. (1993) Effects of cytokines on the contractility of cultured cardiac myocytes. *Int J Immunopharmacol* **15**: 581 -587.
- Weißelberg T.W. (2001) Die Wirkung von Stickstoffmonoxid auf Isoprenalin-induzierte positiv inotrope Effekte beim hypertrophierten Herzen der Ratte. Dissertation
- Westhoff P., Jeske H., Jürgens G., Klopstech K, Link G. (1996) Molekulare Entwicklungsbiologie, Georg Thieme Verlag Stuttgart · New York.
- Wettschureck N., Moers A., Wallenwein B., Parlow A.F., Maser-Gluth C., Offermanns S. (2005) Loss of G_{q/11} Family G Proteins in the Nervous System Causes Pituitary Somatotroph Hypoplasia and Dwarfism in Mice. *Mol Cell Biol.* **25(5)**: 1942 – 1948

- Wheeler A.P., Bernard G.R. (1999) Treating patients with severe sepsis. *The New England Journal of Medicine* **340** (3): 207 – 214.
- Wieland T., Chen C.K. (1999) Regulators of G-protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **360**: 14 – 26
- Wieland T., Mittmann C. (2003) Regulators of G protein signalling: multifunctional proteins with impact on signalling in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther* **97**: 95 – 115
- Wiley J. (2007) Gene Therapy Clinical Trials Worldwide. *The Journal of Gene Medicine*. <http://www.wiley.co.uk/genmed/clinical>
- Wilkie T.M., Yokovama S. (1994) Evolution of the G protein alpha subunit multigene family. *Soc Gen Physiol Ser* **49**: 249 – 270.
- Wu D., Katz A., Lee C.H., Simon M.I. (1992) Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family. *J Biol Chem* **267(36)**: 25798 – 25802
- Xiao R.P., Heping C., Zhou Y.Y.; Kuschel M., Lakatta E.G. (1999) Recent Advances in Cardiac β_2 -Adrenergic Signal Transduction. *Circulation Research* **85(11)**: 1092 – 1111
- Yatani A., Imoto Y., Codina J., Hamilton S.L., Brown A.M., Birnbaumer L. (1988) The stimulatory G protein of adenylyl cyclase, Gs, also stimulates dihydropyridine-sensitive Ca^{2+} channels: evidence for direct regulation independent of phosphorylation by cAMP-dependent protein kinase or stimulation by a dihydropyridine agonist. *J Biol Chem* **263**: 9887 – 9895
- Yatani A. and Brown A.M. (1989) Rapid β -adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G protein pathway. *Science* **245**: 71 – 74.
- Yu J.H., Wieser J., Adams T.H. (1996) The Aspergillus FlibA RGS domain protein antagonizes G protein signaling to block proliferation and allow development. *EMBO J.* **15(19)**: 5184 – 5190.
- Zawilska J.B. (2003) Dopamine receptors – structure, characterization and function. *Postepy Hig Med Dosw.* **57(3)**: 293 – 322.
- Zeuke S., Ulmer A.J., Kusumoto S., Katus H.A., Heine H. (2002) TLR4-mediated inflammatory activation of human coronary artery endothelial cells by LPS. *Cardiovasc Res.* **56(1)**: 126 – 134.
- Zhang M., Wang W. (2003) Organization of signaling complexes by PDZ-domain scaffold proteins. *Acc Chem Res* **36**: 530 – 538.
- Zhao X.L., Gutierrez L.M., Chang C.F., Hosey M.M. (1994) The α_1 -subunit of skeletal muscle L-type Ca channels is the key target for regulation by A-kinase and protein phosphatase-1C. *Biochem Biophys Res Commun* **198**: 166 – 173
- Zheng B., Ma Y., Ostrom R.S., Lavoie C., Gill G.N., Insel P.A., Huang X., Farquhar M.G. (2001) RGS-PX1, a GAP for $G\alpha_s$ and sorting nexin in vesicular trafficking. *Science* **294**: 1939 – 1942.
- Zimmermann WH, Fink C., Kralisch D., Remmers U., Weil J., Eschenhagen T. (2000) Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng* **68**: 106 – 114.

Zondag G.C.M., Postma F.R., van Etten I., Verlaan I., Moolenaar W.H. (1998) Sphingosine 1-phosphate signalling through the G-protein-coupled receptor Edg-1. *Biochem J.* **330**: 605 – 609.

Zolk O., Kouchi I., Schnabel P., Böhm M. (2000) Heterotrimeric G proteins in heart disease. *Can J Physiol Pharmacol.* **78**(3): 187 – 198.

Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

I. Originalarbeiten

Patten M., Bünemann J., Thoma B., Krämer E., Thoenes M., **Stübe S.**, Mittmann C., Wieland T. (2002) Endotoxin induces desensitization of cardiac endothelin-1 receptor signaling by increased expression of RGS4 and RGS16. *Cardiovasc Res.* **53(1)**: 156 – 164.

Patten M., **Stübe S.**, Thoma B., Wieland T. (2003) Interleukin-1 beta mediates endotoxin- and tumor necrosis factor alpha-induced RGS16 protein expression in cultured cardiac myocytes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* **368(5)**: 360 – 365.

Stübe S., Wieland T., Krämer E., v. Stritzky A., Schröder D., Seekamp S., Vogt A., Chen C.-K., Patten M. (2007) Sphingosine-1-phosphate and endothelin-1 induce the expression of RGS16 protein in cardiac myocytes by transcriptional activation of the *rgs16* gene. Submitted. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*

II. Poster

Patten M., **Stübe S.**, Thoma B., Wieland T. (2003) Interleukin-1 β mediates *E.coli* Endotoxin-induced RGS16 Protein Expression in Cardiac Myocytes.

Patten M., **Stübe S.**, Wieland T. (2004) Transcriptional Regulation of RGS16 – Cloning and Characterization of the RGS16 Promotor.

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

„Expression und transkriptionelle Regulation von RGS16 im Modell der Kardiomyozyten neonataler Wistar Ratten (*Rattus norvegicus*, Berkenhout 1769)“

in der Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie des universitären Herzzentrums Hamburg, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, unter der Leitung von Prof. Dr. T. Meinertz und der Betreuung von Frau Dr. M. Patten ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe an keiner in- oder ausländischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch diese oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Hamburg, den 06.10.07

Sabine Stübe

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde an der Klinik und Poliklinik für Kardiologie und Angiologie des universitären Herzzentrums Hamburg, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, unter der Leitung von Prof. Dr. T. MEINERTZ durchgeführt. Ich danke ihm herzlich für die Betreuung.

Diese Arbeit entstand unter der Betreuung von Frau Dr. M. PATTEN. Für ihre kompetente und engagierte Betreuung während dieser Zeit, die maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat sowie die kritische Durchsicht der Arbeit bin ich ihr sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. RENWRANTZ danke ich herzlich für die Übernahme der Gutachtertätigkeit. Ohne ihn wäre die Anfertigung der Dissertation nicht möglich gewesen.

Bei Herrn Prof. Dr. T. WIELAND möchte ich mich herzlich für die Einführung in die Präparation von Membranproteinen, für wissenschaftliche Anregungen sowie für die Überlassung des spezifischen Antikörpers (CT 266) für das Membranprotein RGS16 bedanken.

Frau J. BERGMANN und Frau E. KRÄMER danke ich für die technische Assistenz und praktischen Tips bei der Versuchsdurchführung.

Den MITARBEITERN der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. W. ITO danke ich für das angenehme und kollegiale Arbeitsklima während der gesamten Zeit meiner Dissertation.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Freundin ANNA bedanken, die mir stets mit praktischen Ratschlägen und Tips zur Seite gestanden hat.

Meiner FAMILIE bin ich sehr dankbar für die uneingeschränkte Unterstützung während dieser Zeit.