



Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische  
Pharmakologie und Toxikologie,  
Abteilung für Pharmakologie  
der Universität Hamburg

Direktor: Professor Dr. med. Dr. h.c. H. Scholz

**Untersuchungen zur Beteiligung von  $G_{\alpha 12}$  /  $G_{\alpha 13}$ -Proteinen an der Aktivierung  
der Phospholipase D in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereichs Chemie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Mercedeh Fahimi-Vahid

Hamburg 2003

1. Gutachter: Professor Dr. Detlef Geffken
2. Gutachter: Professor Dr. Thomas Wieland

Meiner geliebten Familie  
in Dankbarkeit



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Heterotrimere G-Proteine</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Mechanismus der Signalvermittlung über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor</b>	<b>4</b>
<b>1.4</b>	<b>Regulatorproteine der G-Protein-vermittelten Signalübertragung</b>	<b>6</b>
<b>1.5</b>	<b>G-Protein-gekoppelte Signalübertragungswege</b>	<b>9</b>
	1.5.1 Regulation von Phospholipasen durch heterotrimere und monomere GTP-bindende Proteine	9
	1.5.1.1 Metabolismus der Phosphoinositide und des Phosphatidylcholins	11
	1.5.1.2 Phospholipase D- und Phospholipase C-Aktivierung	12
	1.5.2 Die Proteinkinase-Kaskade der MAP-Kinasen	14
<b>1.6</b>	<b>Aufgabenstellung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>Methoden</b>	<b>17</b>
	<b><u>Molekularbiologische Methoden</u></b>	
<b>2.1</b>	<b>Amplifikation der cDNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion</b>	<b>17</b>
	2.1.1 Kontrolle der PCR-Produkte in der Agarosegel-Elektrophorese Größenbestimmung von DNA-Fragmenten	19
<b>2.2</b>	<b>Herstellung rekombinanter cDNA-Plasmide</b>	<b>20</b>
	2.2.1 Schneiden von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen	20
	2.2.2 Elution von cDNA aus LMP-Agarosegelen	23
	❖ Aufreinigung der DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion	23
	❖ Enzymatische Reinigung	24
	❖ Aufreinigung von DNA durch reversible Bindung an „Glasmilch“	24
	2.2.3 Dephosphorylierung der Vektor-DNA	25
	2.2.4 Ligation von DNA-Molekülen	26
	2.2.5 Einschleusen von DNA in E. coli-Bakterien	26
	2.2.6 Minipräparation von Plasmid-DNA	28
	❖ TELT-Minipräparation von Plasmid-DNA	29
	❖ Wizard-Minipräp (Promega)	29
	2.2.7 Maxipräparation von Plasmid-DNA	30
	2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen	31
<b>2.3</b>	<b>Herstellung rekombinanter Adenoviren</b>	<b>32</b>

**Proteinbiochemische Methoden**

<b>2.4</b>	<b>Genexpression in E. coli: Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine</b>	<b>35</b>
2.4.1	Expression kleinerer Mengen rekombinanten Proteins	36
2.4.2	Expression größerer Mengen rekombinanten Proteins	36
2.4.3	Reinigung des Polyhistidin-Fusionsproteins	37
2.4.4	Konzentrierung des rekombinanten Proteins	37
2.4.5	Proteinbestimmung	38
<b>2.5</b>	<b>Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese</b>	<b>39</b>
2.5.1	Herstellung des Polyacrylamidgels	39
2.5.2	Probenvorbereitung	40
2.5.3	Elektrophorese	40
2.5.4	Coomassie-Blau-Färbung	41
2.5.5	Vakuumtrocknung des Gels	41
2.5.6	Immunoblot	41

**Zellbiologische Methoden**

<b>2.6</b>	<b>HEK 293-Zellen</b>	<b>43</b>
2.6.1	Kultivieren von HEK 293-Zellen	44
2.6.2	Subkultivieren (Passagieren) von HEK 293-Zellen	44
<b>2.7</b>	<b>Amplifikation rekombinanter Adenoviren in HEK 293-Zellen</b>	<b>45</b>
2.7.1	Transfektion des Ligationsproduktes in HEK 293-Zellen	45
2.7.2	Infektion der HEK 293-Zellen mit Adenoviren (Virus-Large-Scale)	46
2.7.3	Cäsiumchlorid (CsCl) - Gradient zur Aufreinigung	47
<b>2.8</b>	<b>Bestimmung des Virustiters</b>	<b>49</b>
2.8.1	Deproteinierung der Virussuspension	49
2.8.2	Konzentrierung der DNA	50
2.8.3	Darstellung der Virus-DNA in der Agarosegel-Elektrophorese	50
<b>2.9</b>	<b>Isolierung von Kardiomyozyten neonataler Ratten</b>	<b>50</b>
2.9.1	Zellzahlbestimmung	53
2.9.2	Aussäen der Zellen	53
2.9.3	Kultivierung von Kardiomyozyten	54
<b>2.10</b>	<b>Phospholipase C- und Phospholipase D–Aktivitätsmessung in HEK 293-Zellen</b>	<b>55</b>
2.10.1	Infektion der HEK 293-Zellen	55
2.10.2	Markierung der HEK 293-Zellen	55
2.10.3	Bestimmung der PLC- und PLD-Aktivität in HEK 293-Zellen	55
<b>2.11</b>	<b>Phospholipase C- und Phospholipase D–Aktivitätsmessung in Kardiomyozyten neonataler Ratten</b>	<b>56</b>
2.11.1	Infektion der Kardiomyozyten der neonatalen Ratten	56
2.11.2	Markierung der Kardiomyozyten der neonatalen Ratten	56
2.11.3	Bestimmung der PLC- und PLD–Aktivität in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten	57
2.11.3.1	Phospholipase C-Aktivitätsmessung	58
2.11.3.1.1	Bestimmung von Gesamt-Inositol-Phosphaten	58
2.11.3.1.2	Bestimmung von Inositol-(1,4,5)-Triphosphat	59
2.11.3.2	Phospholipase D-Aktivitätsmessung	61
<b>2.12</b>	<b>Statistik</b>	<b>62</b>

<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>63</b>
<hr/>		
3.1	<b>Chemikalien</b>	63
	3.1.1 Substanzen mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen	65
3.2	<b>Reaktionssysteme</b>	65
3.3	<b>Bakterien, DNA und Vektoren</b>	66
3.4	<b>Enzyme</b>	66
3.5	<b>Zelllinien</b>	66
3.6	<b>Antikörper</b>	66
3.7	<b>Verbrauchsmaterial</b>	67
3.8	<b>Laborgeräte</b>	67
3.9	<b>Zusammensetzung der verwendeten Gele und Lösungen</b>	69
3.10	<b>Medien</b>	74
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>75</b>
<hr/>		
4.1	<b>Herstellung eukaryoter Expressionsvektoren und rekombinanter Adenoviren zur Expression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS</b>	75
	4.1.1 Polymerase-Kettenreaktions-Analyse von cDNA-Fragmenten	75
	4.1.2 Subklonierung der cDNAs in den pET-15b-Vektor	76
	4.1.3 Expression rekombinanter Proteine	79
	4.1.4 Subklonierung der cDNAs in den pBluescript SK (+/-)-Vektor	82
	4.1.5 pAdTrack / pAdEasy-1	85
4.2	<b>Transformation der rekombinanten Bakterienkolonien pAdEasy-1 / LSCII-RGS und pAdEasy-1 / KIAA380-RGS in HEK 293-Zellen</b>	96
	4.2.1 Linearisierung mit Pac I	96
	4.2.2 Transfektion	97
	4.2.3 Virustiterbestimmung	97
	4.2.3.1 Berechnung des Virustiters	100
	4.2.4 Effektivität des adenoviralen Gentransfers für LSCII-RGS und KIAA380-RGS in Kardiomyozyten neonataler Ratten	101
	4.2.5 Morphologisches Erscheinungsbild der Kardiomyozyten in der Zellkultur	103
4.3	<b>Funktionelle Bedeutung einer durch Adenoviren vermittelten Überexpression der G<math>\alpha_{12/13}</math>-spezifischen RGS-Proteine LSCII-RGS und KIAA380-RGS</b>	106
	4.3.1 Adenovirale Überexpression in HEK 293-Zellen	106
	4.3.2 Effekte von Thrombin, Endothelin-1 oder Noradrenalin auf die PLC- und PLD-Aktivität in den neonatalen Kardiomyozyten der Ratten	108
	4.3.3 Pertussis-Toxin und Pasteurella multocida Toxin als Hilfsmittel zur Charakterisierung der heterotrimeren G-Proteine	113
	4.3.4 Einfluss der adenoviralen Überexpression von LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS auf die PLC- und PLD- Aktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten	115
	4.3.5 Konzentrationsabhängigkeit	118
4.4	<b>Intrazelluläre Signalübertragung : die Proteinkinase-Kaskade der MAP-Kinase-Wege</b>	121
	4.4.1 Effekte der Agonisten auf die MAP-Kinase	121
	4.4.2 Effekt der Überexpression von LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS auf die Aktivierung von MAP-Kinasen	124

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	126
<hr/>		
5.1	<b>Herstellung der Viruskonstrukte</b>	127
5.2	<b>Identifizierung der beteiligten Rezeptor-Subtypen in Kardiomyozyten</b>	128
5.2.1	Noradrenalin stimuliert die PLD- und PLC-Aktivität in Kardiomyozyten neonataler Ratten über $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren	129
5.2.2	Endothelin-1 stimuliert die PLD- und PLC-Aktivität in Kardiomyozyten neonataler Ratten über $ET_A$ -Rezeptoren	130
5.2.3	Auswirkungen von Thrombin auf die PLD- und PLC-Aktivität	131
5.3	<b>Identifizierung der heterotrimeren G-Proteine, die an der Stimulation der PLC und PLD beteiligt sind</b>	132
5.3.1	$G_{\alpha_{i0}}$ -Proteine sind an der PLC- bzw. PLD-Aktivierung in Kardiomyozyten durch $ET_A$ -Rezeptoren, $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren und PAR1-Rezeptoren nicht beteiligt	135
5.3.2	$G_{\alpha_{q/11}}$ -Proteine vermitteln die PLC- bzw. PLD-Aktivierung in Kardiomyozyten durch $ET_A$ -Rezeptoren und $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren	136
5.3.3	$G_{\alpha_{12/13}}$ -Proteine vermitteln die PLD-Aktivierung in Kardiomyozyten durch aktivierte PAR1-Rezeptoren	137
5.4	<b>Beteiligung von ARF-Proteinen und Proteinkinase C-Isoformen an der PLD-Aktivität</b>	138
5.4.1	Monomere GTP-bindende Proteine der ARF-Familie	138
5.4.2	Proteinkinase C	139
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b>	<b>142</b>
<hr/>		
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>144</b>
<hr/>		
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>155</b>
<hr/>		
	Abkürzungsverzeichnis	155
	R- und S-Sätze	158
	Lebenslauf	161
	Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten	162
	Erklärung	163
	Danksagung	164

# 1 Einleitung

## 1.1 Herzinsuffizienz und kardiale Hypertrophie

Die kardiale Hypertrophie ist ein bedeutender Risikofaktor für die Entwicklung und das Fortschreiten einer Herzinsuffizienz (Levy et al. 1990). Es wird vermutet, dass eine physiologische Form der Hypertrophie im Laufe der Entwicklung der Herzkrankheit in eine pathologische Form übergeht. Die Aufklärung von Mechanismen, die Hypertrophie induzieren, nimmt deshalb einen zentralen Stellenwert in der kardiovaskulären Forschung ein.

Kardiomyozyten verlieren während der postnatalen Entwicklung schnell ihre Eigenschaft zu proliferieren. Das myokardiale Wachstum basiert daher auf einer Vergrößerung (Hypertrophie) von bereits existierenden Kardiomyozyten, Teilung (Hyperplasie) von nichtmuskulären Zellen und Zunahme der extrazellulären Matrix. Die zelluläre Hypertrophie bedeutet konkret Vergrößerung des Zellvolumens, Zunahme der Oberfläche und Synthese von zusätzlichen Sarkomeren. Die Myokardhypertrophie ist somit von typischen zellulären Veränderungen begleitet. Der Nachweis von ähnlichen Veränderungen an kultivierten Kardiomyozyten neonataler Ratten *in vitro* führte nach Stimulation mit verschiedenen Faktoren zur Identifikation zahlreicher Signaltransduktionswege. Eine gezielte Induktion dieser Signalwege führt dabei zur Aktivierung zellulärer Antworten, von denen bekannt ist, dass sie ebenfalls bei kardialer Hypertrophie *in vivo* auftreten.

Extrazelluläre Neurotransmitter und Hormone (u.a.  $\alpha$ -adrenerge Agonisten, Angiotensin II und Endothelin-1) und intrazelluläre Botenstoffe (cAMP-Proteinkinase A, Calcium, PLC, IP<sub>3</sub>, DAG-Proteinkinase C, Raf, ERK, JNK/SAPK) sind mögliche Mediatoren einer kardialen Hypertrophie (Schaub et al. 1997). Agonisten G $\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren gehören zu den gut charakterisierten Faktoren, für die *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden konnten, dass sie an der Entstehung einer kardialen Hypertrophie beteiligt sind. Dabei kommen Endothelin-1 (Shubeita et al. 1990, Ito et al. 1991, Yamazaki et al. 1996), Noradrenalin (Simpson 1990, LaMorte et al. 1994) und Angiotensin II (Sadoshima und Izumo 1993) eine besondere Bedeutung zu.

## 1.2 Heterotrimere G-Proteine

G-Proteine (Guaninnukleotid-bindende Proteine) sind essentielle Bestandteile zahlreicher Signalübertragungswege (Übersicht bei Gilman 1995, Neer 1995). Die Aufgabe der G-Proteine ist die Übermittlung von Signalen extrazellulärer Rezeptoren in das Zellinnere. Von den G-Proteinen wird das Signal an nachgeschaltete Effektorproteine weitergegeben. Zur Familie der G-Proteine gehören die heterotrimeren G-Proteine, die monomeren G-Proteine (z.B. Ras, Raf, ARF, Rho) sowie einige Translationsfaktoren (Ef-Tu, If-2).

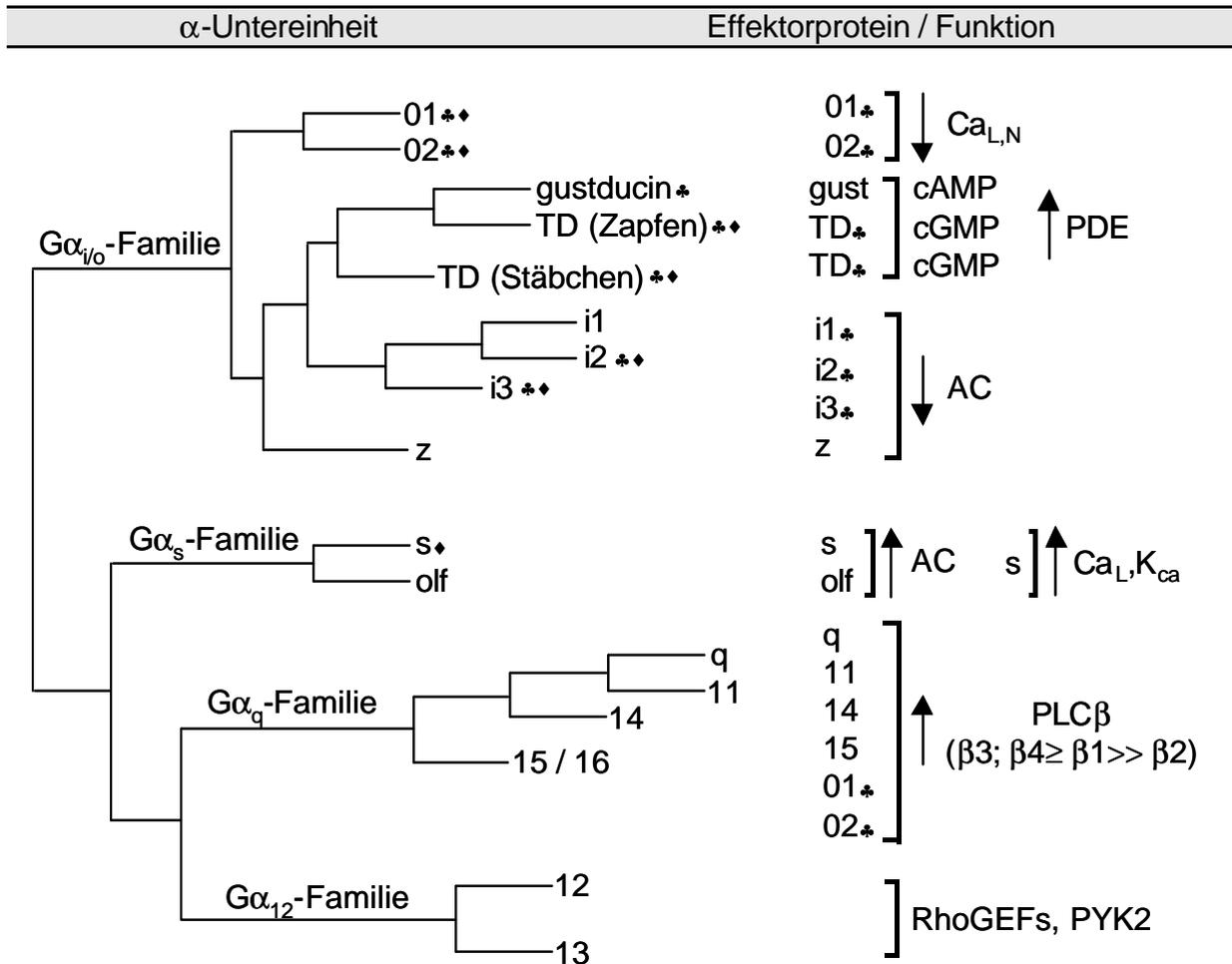
Heterotrimere G-Proteine sind membrangebunden. Gemeinsames Strukturmerkmal der heterotrimeren G-Proteine ist der Aufbau aus 3 Untereinheiten (Hepler und Gilman 1992):

- ♣ Einer  $\alpha$ -Untereinheit von 39-46 KDa
- ♣ Einer  $\beta$ -Untereinheit von 35-40 KDa
- ♣ Einer  $\gamma$ -Untereinheit von 5- 8 KDa.

Die  $\alpha$ -Untereinheit besitzt eine Bindungsstelle für Guanosin triphosphat (GTP) bzw. Guanosindiphosphat (GDP) und verfügt über eine intrinsische GTPase-Aktivität, die GTP unter Abspaltung eines Phosphatrestes hydrolysiert. Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten treten als fest assoziierter Komplex auf und sind als solcher aktiv. Alle drei Untereinheiten zeigen eine große Diversität. Heute sind mindestens 20 verschiedene Gene für die  $\alpha$ -Untereinheiten, 5 für die  $\beta$ -Untereinheiten und 12 für die  $\gamma$ -Untereinheiten kloniert und teilweise in ihrem spezifischen Kopplungsverhalten charakterisiert worden (Übersicht bei Hepler und Gilman 1992, Gilman 1995, Neer 1995, Wieland et al. 1996, Offermanns und Simon 1996, Offermanns 1999).

G-Protein  $\alpha$ -Untereinheiten erfüllen mehrere Funktionen in der Signalübertragung. Aufgrund der Strukturhomologie auf Aminosäureebene und der Funktionshomologie unterscheidet man vier verschiedene Familien von  $G\alpha$ -Untereinheiten (Tabelle 1; Simon et al. 1991, Hepler und Gilman 1992, Fields und Casey 1997, Offermanns 1999):

1. Die Cholera-Toxin-sensitive  $G\alpha_s$ -Familie
2. Die Pertussis-Toxin-sensitive  $G\alpha_i / G\alpha_o$ -Familie
3. Die  $G\alpha_q$ -Familie
4. Die  $G\alpha_{12}$ -Familie.



**Tabelle 1 Klassifizierung der heterotrimeren G-Proteine anhand der  $\alpha$ -Untereinheiten.** Phylogenetischer Stammbaum der G-Protein-Untereinheiten (modifiziert nach: Birnbaumer 1992, Hepler und Gilman 1992, Offermanns 1999).  $G\alpha_{i/o}$ -Subfamilie: inhibitorisches G-Protein; gust: Gustducin; TD: Transducin;  $G\alpha_s$ -Subfamilie: Adenylyl-Cyclase stimulierendes G-Protein; olf: olfaktorisches G-Protein; q, 11, 14, 15, 16: allgemein akzeptierte, teilweise historisch begründete Nomenklatur für  $G\alpha_q$ -Protein-Subtypen;  $Ca_{L,N}$ : L- und N-Typ-Calcium-Kanäle;  $K_{Ca}$ : Calcium-aktivierte Kalium-Kanäle; PDE: Phosphodiesterase; AC: Adenylyl-Cyclase; PLC: Phospholipase C; RhoGEF: Guaninnukleotid-Austauschfaktor für Rho; PYK2: Prolinreiche Tyrosin-Kinase 2; \*: Pertussis-Toxin-Substrat; ♦: Cholera-Toxin-Substrat

Charakteristisch für die Mitglieder der  $G\alpha_s$ -Subfamilie ist die Hemmbarkeit ihrer GTPase durch das Cholera-Toxin. Die Mitglieder der  $G\alpha_s$ -Subfamilie stimulieren u.a. die Adenylyl-Cyclase. Die zuerst gefundenen Mitglieder der  $G\alpha_i$ -Subfamilie zeigen einen inhibitorischen Effekt auf die Adenylyl-Cyclase, daher die Bezeichnung  $G\alpha_i$  für inhibitorische G-Proteine. Weitere Mitglieder der  $G\alpha_i$ -Familie haben u.a. die Phospholipase C als zugeordnetes Effektormolekül. Die Mitglieder der  $G\alpha_i$ -Familie (Ausnahme  $G\alpha_z$ ) sind durch eine Hemmbarkeit ihrer Interaktion mit Rezeptoren durch Pertussis-Toxin (PTX) charakterisiert.

Ein wesentliches Effektorprotein für die  $G\alpha_q$ -Subfamilie ist die Phospholipase C, wobei eine Aktivierung von Mitgliedern der  $G\alpha_q$ -Familie zur PTX-insensitiven Aktivierung einiger der vier Phospholipase C- $\beta$ -Isoformen führt (Taylor et al. 1991, Berstein et al. 1992, Park et al. 1992, Hepler et al. 1993, Arthur et al. 2001). Die Mitglieder der  $G\alpha_{12}$ -Subfamilie zeichnen sich durch ein ubiquitäres Vorkommen aus (Spicher et al. 1994). Sie sind nicht durch PTX modifizierbar (Strathmann und Simon 1991). Für die  $G\alpha_{12}$ -Subfamilie ist eine Aktivierung z.B. durch Thromboxan  $A_2$ - und Thrombin-Rezeptoren (Offermanns et al. 1994a) oder durch  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren (Maruyama et al. 2002) beschrieben. Zudem induzieren sie eine Aktivierung monomerer G-Proteine (Dhanasekaran und Dermott 1996), wahrscheinlich durch Interaktion mit Guaninnukleotid-Austauschfaktoren für Rho (RhoGEFs; siehe Abschnitt 1.4), und Tyrosinkinasen wie z.B. PYK2 (Fukuhara et al. 2001, Shi und Kehrl 2001, Chikumi et al. 2002). Des Weiteren induzieren sie die Bildung von Aktin-Stressfasern in einer Rho-abhängigen Art (Buhl et al. 1995, Gohla et al. 1999) und die Aktivierung extrazellulärer Signal-regulierter Kinasen (ERKs) und Stress-aktivierten Proteinkinasen (SAPK) (Prasad et al. 1995, Fromm et al. 1997, Fukuhara et al. 1999). Es gibt zudem Hinweise auf eine Beteiligung von  $G\alpha_{12/13}$  an der Entstehung der Herzmuskelhypertrophie. Finn und Mitarbeiter (1999) haben gezeigt, dass eine GTPase-defiziente Mutante von  $G\alpha_{13}$  genetische und morphologische Merkmale der Hypertrophie in Kardiomyozyten induzieren kann. Ähnlich wie bei konstitutiv aktiven  $G\alpha_q$ -Mutanten kann durch die Überexpression von konstitutiv aktiven Mutanten von  $G\alpha_{13}$  die Aktivität z.B. der Phospholipase D gesteigert werden (Plonk et al. 1998).

### **1.3 Mechanismus der Signalvermittlung über einen G-Protein-gekoppelten Rezeptor**

Heterotrimere G-Proteine sind spezifische Reaktionspartner in der Signalübertragung durch 7-Helix-Transmembranrezeptoren, weshalb die beteiligten Rezeptoren auch als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR) bezeichnet werden. Zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören zahlreiche, für die medikamentöse Therapie besonders wichtige Neurotransmitter-Rezeptoren, u.a. Adrenozeptoren und muscarinische Acetylcholinrezeptoren (m-Cholinozeptoren). Eine Vielzahl von Peptidhormon-Rezeptoren zählt ebenfalls zu dieser Gruppe.

Die heterotrimeren G-Proteine durchlaufen einen zyklischen Übergang zwischen einer inaktiven, GDP-gebundenen Form und einer aktiven GTP-gebundenen Form. Abbildung 1 skizziert die verschiedenen Funktionszustände der heterotrimeren G-Proteine. Im Ruhezustand bilden die Untereinheiten ein gemeinsames Protein, in dem GDP an die  $\alpha$ -Untereinheit gebunden ist. Der GDP-GTP-Austausch ist in Abwesenheit des Agonisten sehr gering, da die unkatalysierte Reaktion eine sehr hohe Aktivierungsschwelle hat. Deshalb liegt fast die gesamte Menge an G-Protein in der inaktiven Form vor. Nach der Bindung eines Liganden am Rezeptor interagiert zunächst das G-Protein mit dem Rezeptor und GDP wird vom G-Protein freigesetzt, so dass statt dessen GTP binden kann. Der aktivierte Rezeptor katalysiert diesen Austausch. Das aktive G-Protein dissoziiert anschließend vom Rezeptor ab und zerfällt in  $\alpha$ -GTP und  $\beta\gamma$ -Dimer. Sowohl die GTP enthaltende G-Protein  $\alpha$ -Untereinheit als auch das  $\beta\gamma$ -Dimer können das Signal an nachgeschaltete Effektorproteine weitergeben (Übersicht bei Hepler und Gilman 1992, Neer 1995, Wieland et al. 1996). Wichtige Effektormoleküle sind u.a. Adenylyl-Cyclasen, Phospholipasen sowie cGMP-spezifische Phosphodiesterasen. Die Aktivierung dieser Enzyme führt zur Konzentrationsänderung intrazellulärer Signalmoleküle wie cAMP, Diacylglycerol oder Inosit-Triphosphat,  $\text{Ca}^{2+}$  und cGMP, die weitere spezifische Reaktionen auslösen.

Um die intrazelluläre Stimulation zu beenden, muss die aktive  $\alpha$ -GTP-Form in die inaktive  $\alpha$ -GDP-Form überführt werden. Dies geschieht durch die Hydrolyse des am  $\alpha$ -Protein gebundenen Nukleotids GTP durch die GTPase-Aktivität der  $\alpha$ -Untereinheit.  $\alpha$ -GDP reassoziert anschließend mit  $\beta\gamma$  zu einem inaktiven Heterotrimer. Dies hat zur Folge, dass auch die Aktivierung der Effektorenzyme über  $\beta\gamma$  beendet wird (Gilman 1987, Birnbaumer et al. 1990). Eine Erhöhung der Geschwindigkeit der GTP-Hydrolyse durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP) verkürzt deshalb die Aktivierungsdauer des aktiven, GTP-gebundenen Zustands. GAPs spielen somit eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Dauer und Stärke der Signalübertragung.

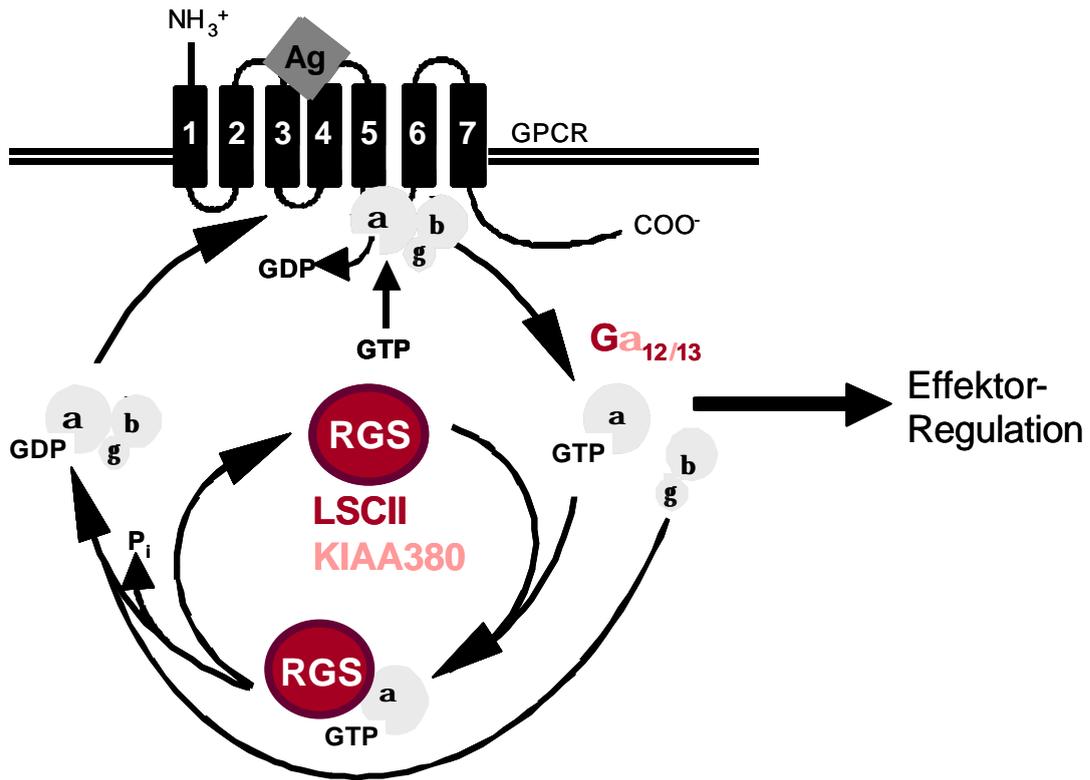


Abbildung 1 **Schematische Darstellung des Funktionszyklus der heterotrimeren G-Proteine.** G-Proteine unterliegen einem Aktivierungszyklus aus Dissoziation und Reassoziierung der  $\alpha$ -Untereinheit von dem relativ stabilen  $\beta\gamma$ -Komplex. RGS-Proteine sind GTPase-aktivierende Proteine für  $G\alpha$ -Untereinheiten. Ag: Agonist; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor;  $\alpha\beta\gamma$ : heterotrimeres G-Protein; RGS: Regulatorproteine der G-Protein-vermittelten Signalübertragung; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat;  $P_i$ : anorganisches Phosphat. (modifiziert nach Wieland und Chen 1999)

#### 1.4 Regulatorproteine der G-Protein-vermittelten Signalübertragung

Heterotrimere G-Proteine können z.B. durch die Familie der Regulatorproteine der G-Protein-vermittelten Signalübertragung (RGS-Proteine) in ihrer Aktivität beeinflusst werden. RGS-Proteine fungieren als Stimulatoren der intrinsischen GTPase-Aktivität der  $G\alpha$ -Untereinheiten und sind deshalb negative Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion. Sie beschleunigen, ähnlich wie die GTPase-aktivierenden Proteine der monomeren GTP-bindenden Proteine, die GTP-Hydrolyse durch G-Proteine (Abbildung 1; Druey et al. 1996, Dohlman und Thorner 1997, Berman und Gilman 1998, Wieland und Chen 1999). RGS-Proteinen kommt deshalb eine wichtige Funktion in der Regulation von Signalübertragungswegen zu.

Mehr als 20 verschiedene RGS-Proteine sind inzwischen identifiziert worden. Im Myokard konnten kürzlich 15 verschiedene RGS-Proteine nachgewiesen werden (Dohlman und Thorner 1997, Mittmann et al. 2002, Wieland und Mittmann 2003). Das am besten biochemisch charakterisierte RGS-Protein ist das RGS4 (Berman et al. 1996a, Berman et al. 1996b, Popov et al. 1997, Tesmer et al. 1997, Srinivasa et al. 1998). RGS4 zeigt GAP-Aktivität für  $G\alpha_i$ - und  $G\alpha_q$ -Familienmitglieder, aber nicht für  $G\alpha_{12}$ -Proteine (Berman et al. 1996a, Berman et al. 1996b, Hepler et al. 1997, Popov et al. 1997, Tesmer et al. 1997, Srinivasa et al. 1998, Berman und Gilman 1998). Außerdem deuten strukturelle Daten an, dass eine Interaktion von  $G\alpha_{12}$  oder  $G\alpha_{13}$  mit RGS4 unwahrscheinlich ist (Tesmer et al. 1997). Dagegen wurde die Interaktion eines menschlichen RGS-Proteins, p115-RhoGEF (Abbildung 2), mit Mitgliedern der G-Protein-Subfamilie  $G\alpha_{12/13}$  beschrieben (Kozasa et al. 1998).

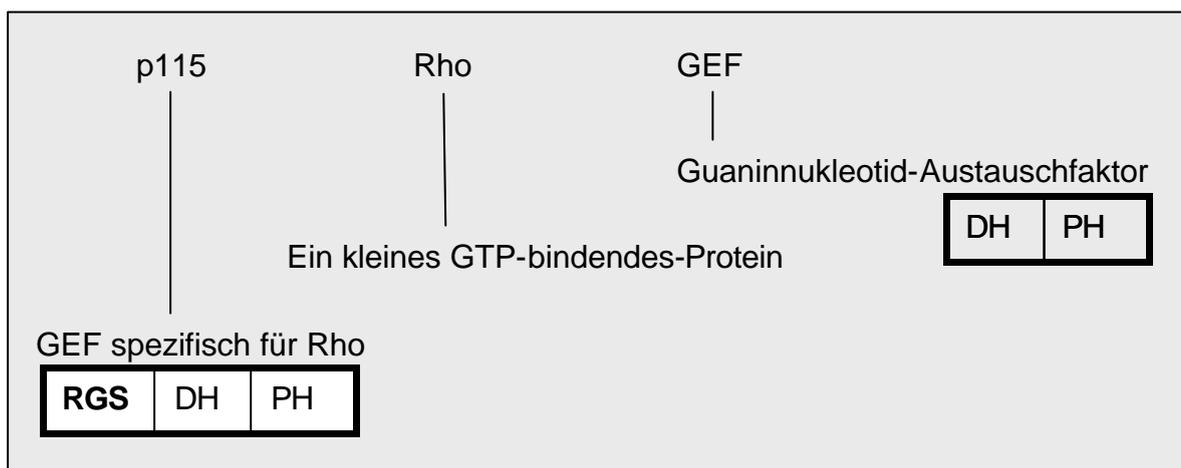


Abbildung 2 **p115-RhoGEF** enthält eine Dbf-Homologie-Domäne (DH), die als Austauschfaktor für kleine GTP-bindende-Proteine fungiert und eine RGS-Domäne, welche für die GAP-Aktivität der  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine verantwortlich ist.

Rho ist ein kleines, monomeres GTP-bindendes Protein und besitzt GTPase-Aktivität. Die Aktivierung von Rho führt zu einer Reihe zellulärer Antworten, z.B. Stimulation von Zellmigration und Zellteilung. Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEF=guanine nucleotide exchange factor) sind cytosolische Proteine, die die Bildung von aktivem Rho-GTP fördern (Abbildung 3). Da eine Beschleunigung der Abdissoziation von GDP den Anteil der aktiven Form erhöht, führen Guaninnukleotid-Austauschfaktoren zu einer vermehrten Aktivierung von Rho-Proteinen.

Alle bisher bekannten GEFs enthalten eine Domäne, die für die Guaninnukleotid-Austausch-Aktivität verantwortlich ist, die sogenannte Dbl-Homologie-Domäne (DH). Im Gegensatz zu vielen anderen GEFs ist p115 GEF spezifisch für Rho (Zheng 2001). Der NH<sub>2</sub>-terminale Bereich des Rho-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktors p115GEF enthält eine Domäne, die für RGS-Proteine charakteristisch ist (Dohlman und Thorner 1997, Berman und Gilman 1998, Kozasa et al. 1998). Diese Domäne stimuliert die intrinsische GTPase-Aktivität von G $\alpha_{12}$  und G $\alpha_{13}$ , wobei diese eine stärkere GAP für G $\alpha_{13}$  und eine schwächere für G $\alpha_{12}$  ist (Kozasa et al. 1998, Hart et al. 1998).

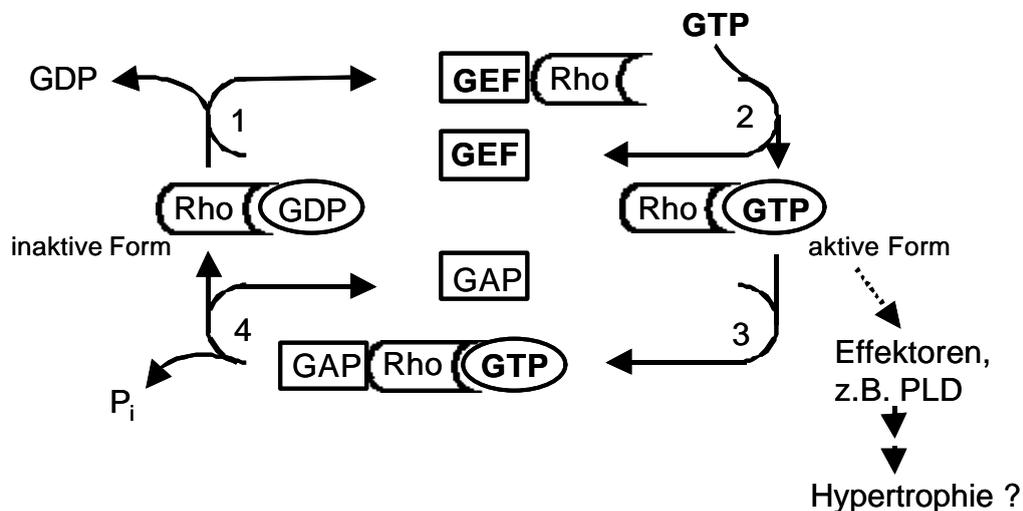


Abbildung 3 **Reversible Umwandlung der inaktiven GDP-haltigen Form des Rho-Proteins in die aktive Form mit gebundenem GTP.** Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) erleichtert die GDP-Freisetzung aus Rho (1). Dabei stabilisiert GEF den Nukleotid-freien Zustand von Rho. Anschließend wird GTP spontan gebunden; wodurch unter Freisetzung von GEF der aktive Komplex Rho/GTP entsteht (2). Durch Hydrolyse entsteht wieder die inaktive Form Rho/GDP (4). Die Reaktion wird durch ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) mehrfach beschleunigt (3).

p115-RhoGEF fungiert zudem nicht nur als GAP für G $\alpha_{12}$  und G $\alpha_{13}$ , sondern vermittelt die G $\alpha_{13}$ -induzierte Aktivierung von Rho (Hart et al. 1998). p115-RhoGEF ist also ein Vertreter aus der Reihe der RGS-Proteine, der GAP- und Effektorfunktion in einem Molekül vereinigt.

Zwei weitere Mitglieder dieser RGS-Protein-Subfamilie sind LSCII und KIAA380. LSCII ist das Mausortholog von p115-RhoGEF (Whitehead et al. 1996, Kozasa et al. 1998). Seine RGS-Homologie-Domäne zeigt GAP-Aktivität für  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  aber nicht für andere  $G\alpha$ -Proteine. KIAA380 (Barrett et al. 1997, Kozasa et al. 1998, Rümenapp et al. 1999), auch als PDZ-RhoGEF bekannt, weist eine höhere Homologie zu einem Drosophila-Protein (DRhoGEF2) auf.

## **1.5 G-Protein-gekoppelte Signalübertragungswege**

### **1.5.1 Regulation von Phospholipasen durch heterotrimere und monomere GTP-bindende Proteine**

Die Phospholipasen sind wasserlösliche Enzyme, die von den Fettsäureketten der Phospholipide innerhalb der Phospholipid-Doppelschicht gebunden werden. Sie hydrolysieren jeweils bestimmte Bindungen in den Kopfgruppen von Phospholipiden. Eine Reihe von Phospholipasen, z.B. Phospholipase C (PLC) und Phospholipase D (PLD), werden von G-Proteinen aktiviert und sind damit in Signalwege eingebunden, die von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren ausgehen.

Das Phospholipase C-System, ein Schlüsselenzym des Phosphatid-Inosit-Stoffwechsels (Übersicht bei Berridge 1993), stellt neben der Adenylyl-Cyclase eine zweite wichtige Signaltransduktionskaskade im Herzen dar. Im Herzen koppeln z.B.  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptoren, Angiotensin II-, Endothelin-, M1/M3-Acetylcholinrezeptoren und in geringerem Umfang auch M2-Acetylcholinrezeptoren über PTX-insensitive G-Proteine der  $G\alpha_q$ -Familie stimulatorisch an die PLC (Hepler und Gilman 1992, Brodde et al. 1995, Rhee 2001, Singer et al. 2002).

Die Stimulation der phosphatidylcholin-spezifischen PLD ist in unterschiedlichen Geweben und Zelltypen für ein breites Spektrum von Hormonen, Neurotransmittern und Wachstumsfaktoren beschrieben (Übersicht bei Exton 1997, Exton 1999, Houle und Bourgoin 1999, Jones et al. 1999, Frohman et al. 1999, Liscovitch et al. 2000).

Viele verschiedene zelluläre Faktoren sind an der PLD-Aktivierung über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren beteiligt. So ist z.B. die Beteiligung von PTX-sensitiven oder PTX-insensitiven heterotrimeren G-Proteinen, Proteinkinase C-Isoenzymen, bis jetzt nicht identifizierte Tyrosinkinasen, monomere GTPasen der ADP-Ribosylierungsfaktor- und Rho-Protein-Familie beschrieben worden (Exton 1997, Exton 1999, Houle und Bourgoïn 1999, Frohman et al. 1999, Jones et al. 1999). Dabei gibt es anscheinend eine große zell- und/oder rezeptorspezifische Heterogenität in den Mechanismen der PLD-Aktivierung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.

Zudem existiert nur wenig Information über die einzelnen PLD-Isoenzyme, welche die Stimulation von PLD durch einen bestimmten G-Protein-gekoppelten Rezeptor in einem bestimmten Zelltyp vermitteln. Im Myokard sind die beiden bisher klonierten und charakterisierten PLD-Isoenzyme, PLD1 und PLD2, vertreten (Exton 1999, Meier et al. 1999). Beide sind in ihrer Aktivität vom Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) abhängig (Hammond et al. 1995, Hammond et al. 1997, Colley et al. 1997). Während die PLD1 durch ADP-Ribosylierungsfaktoren (ARF)- und Rho-GTPasen bzw. durch Proteinkinase C-Isoenzyme stark aktiviert wird, zeigt PLD2 *in vitro* in der Gegenwart von PIP<sub>2</sub> eine hohe Basal-Aktivität. Sie kann nur geringfügig durch Proteinkinase C und ARF-GTPasen stimuliert werden (Exton 1997, Exton 1999, Houle und Bourgoïn 1999, Frohman et al. 1999, Jones et al. 1999, Hammond et al. 1995, Hammond et al. 1997, Colley et al. 1997). Es konnte aber vor kurzem gezeigt werden, dass PLD2 durch  $\alpha$ -Actinin gehemmt wird. Diese Hemmung wird durch aktivierte ARF-Proteine wieder aufgehoben (Park et al. 2000). Es wird deshalb vermutet, dass die PLD2-Aktivität *in vivo* durch ähnliche Faktoren wie die PLD1 reguliert sein könnte.

Interessanterweise wurde für einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren in verschiedenen Zelltypen gezeigt, dass gleichzeitig zu einer PLC-Stimulation eine Aktivierung der PLD erfolgen kann (Exton 1997, Exton 1999). So konnte z.B. in isolierten Kardiomyozyten gezeigt werden, dass einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, wie z.B. Endothelin-1-Rezeptoren, Bradykinin-Rezeptoren und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren, welche die PLC stimulieren, auch eine PLD-Aktivierung herbeiführen (Clerk und Sugden 1997).

### **1.5.1.1 Metabolismus der Phosphoinositide und des Phosphatidylcholins**

Die Aktivierung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren z.B. durch Thrombin, Endothelin-1 oder Noradrenalin kann zur Hypertrophie in Kardiomyozyten, als Folge der Aktivierung der Proteinkinase C durch Diacylglycerol, führen. Die Stimulation dieser Rezeptoren in Kardiomyozyten fördert zudem die Kontraktilität und verursacht eine Hypertrophie im Herzen (Graham et al. 1996).

Die PLC wird durch Mitglieder der PTX-insensitiven  $G\alpha_q$ -Familie aktiviert (Übersicht bei Exton 1996). Durch die Einwirkung der PLC wird aus  $PIP_2$  Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $IP_3$ ) gebildet (Abbildung 4). Beide Verbindungen stellen Botenstoffe dar, die weitere spezifische Reaktionsketten aktivieren können.  $IP_3$  bindet an seinem spezifischen Rezeptor im sarcoplasmatischen Retikulum und induziert die Freisetzung von Calcium ( $Ca^{2+}$ ) (Berridge 1993, Nishizuka 1995). DAG wirkt spezifisch auf die Proteinkinase C, die über die Phosphorylierung von Substratproteinen u.a. regulierend in die Zellproliferation eingreift. Ein anderer Weg geht vom Phosphatidylcholin aus. Die PLD setzt Phosphatidylcholin zu Phosphatidsäure um (Billah und Anthes 1990), aus dem durch Dephosphorylierung DAG entsteht. Die Phosphatidsäure stellt selbst einen zellulären Botenstoff in Kardiomyozyten dar. Sie ist anscheinend an der Entstehung der kardialen Hypertrophie, der Phosphorylierung von kardialen Proteinen, der Aktivierung des sarcolemmalen Natrium-Calcium-Austauschers und einer Zunahme des intrazellulären Calciums und der Kontraktionskraft beteiligt (Übersicht bei Dhalla et al. 1997).

Die Aktivierung beider Phospholipasen, PLC und PLD, führt demnach zur Bildung von DAG (Berridge 1993, Exton 1994a, Exton 1994b, Exton 1996) und damit zur Stimulation der Proteinkinase C in Kardiomyozyten. Die Proteinkinase C scheint bei der Vermittlung hypertropher Signale eine Schlüsselrolle einzunehmen. Eine direkte Proteinkinase C-Aktivierung mit Phorbolestern führte in kultivierten Kardiomyozyten neonataler Ratten zu zellulärer Hypertrophie (Dunmon et al. 1990, Shubeita et al. 1992). Die Beteiligung der  $G\alpha_q$ -PLC-gekoppelten Signalkaskade an Wachstumsprozessen bzw. hypertrophen Antworten scheint auch über die Aktivierung der Proteinkinase C zu erfolgen (Clerk und Sugden 1997, Takeishi et al. 2000).

Auch konnte eine Beteiligung an der Wachstumsregulation über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren und ein *cross-talk* mit dem MAP-Kinase-Signalweg (MAP = Mitogen-aktiviertes Protein) gezeigt werden (Abbildung 4; Übersicht bei Nishizuka 1995). Proteinkinase C kann eine Reihe unterschiedlicher Proteine an Threonin- und Serin-Seitengruppen phosphorylieren, u.a. auch das Protein Raf-1 (Ser/Thr-Kinase), eine Proteinkinase, die ursprünglich als Onkogen eines RNA-Tumor-Virus entdeckt worden ist. Dieses Enzym überträgt Phosphat-Gruppen auf bestimmte Serin- und Threonin-Reste der MAPKK (MAPK-Kinase), welche ihrerseits die Proteinkinase MAPK (MAP-Kinase) phosphoryliert und aktiviert. MAPK schließlich phosphoryliert einige Serin- und Threonin-Seitenketten in Transkriptions-Faktoren des Zellkerns und regt damit die Expression spezifischer Gene an. Proteinkinase C führt somit zur Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges, dem möglicherweise eine Bedeutung bei der Hypertrophieentstehung durch die Aktivierung  $G\alpha_q$ -gekoppelter Rezeptoren zukommt (Yamazaki et al. 1996).

### **1.5.1.2 Phospholipase D- und Phospholipase C-Aktivierung**

Für die PLD-Aktivierung durch den Endothelin-1-Rezeptor ( $ET_A$ -R) in Kardiomyozyten spielt die Aktivierung von PLC-abhängigen Proteinkinase C-Isoformen (höchstwahrscheinlich Proteinkinase C- $\delta$  und Proteinkinase C- $\epsilon$ ) eine wichtige Rolle. Dies basiert auf Daten, die mit verschiedenen Proteinkinase C-Inhibitoren und durch die selektive Aktivierung von bestimmten Proteinkinase C-Isoenzymen erhalten wurden (Clerk und Sugden 1997, Eskildsen-Helmond et al. 1997). In früheren Studien konnte zudem gezeigt werden, dass die Stimulation von kardialen  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren mit Noradrenalin höchstwahrscheinlich durch eine Aktivierung der PLC zur Stimulation der PLD und zur Bildung von Phosphatidsäure führt (Ye et al. 1994, Kurz et al. 1999). Vor kurzem wurde ebenfalls die selektive Aktivierung der Proteinkinase C-Isoformen,  $\delta$  und  $\epsilon$ , durch  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren in neonatalen Rattenkardiomyozyten beschrieben (Rohde et al. 2000). Dagegen ist von der Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR1 (protease activated receptor) durch Thrombin nur bekannt, dass er eine PLC-Aktivierung und hypertrophe Antworten in neonatalen Rattenkardiomyozyten hervorruft (Steinberg et al. 1991, Glembotski et al. 1993, Sabri et al. 2000).

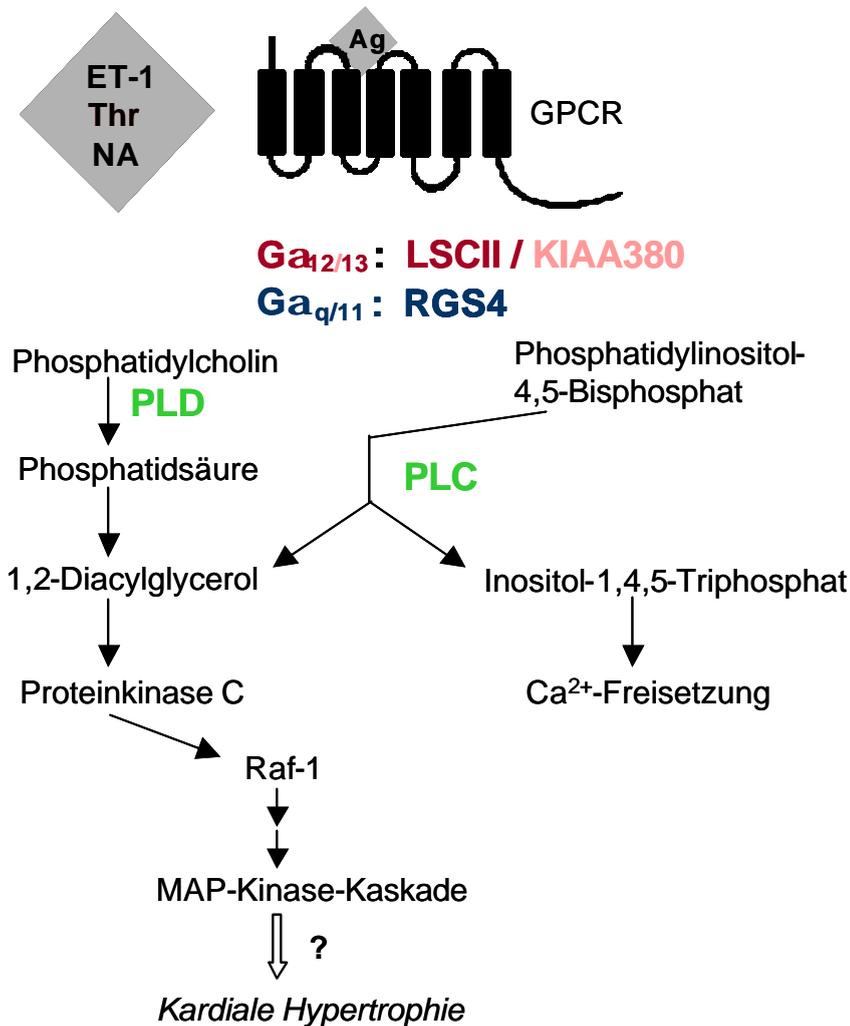


Abbildung 4 **Schematische Darstellung möglicher Phospholipase-Signalwege im Herzen.** Die Abbildung zeigt zwei mögliche Wege der Bildung von Diacylglycerol in schematischer Weise.

Ag: Agonist; GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; ET-1: Endothelin-1; Thr: Thrombin; NA: Noradrenalin; PLD: Phospholipase D; PLC: Phospholipase C; Ca<sup>2+</sup>: Calcium; Raf-1: Ser/Thr-Kinase; MAP-Kinase: Mitogen aktivierte Protein-Kinase.

Die Beteiligung der verschiedenen G-Protein-Subfamilien an der Aktivierung der PLC bzw. PLD ist dagegen oft unklar und unterscheidet sich zudem in verschiedenen Zelltypen. Sowohl die Mitglieder der PTX-insensitiven G $\alpha_q$ -Subfamilie als auch die PTX-sensitive G $\alpha_i$ -Subfamilie können PLC-Isoformen als nachgeschaltetes Effektormolekül aktivieren (Rhee und Bae 1997).

Untersuchungen über die Stimulation der PLD-Aktivität durch chemische Lockstoffe in neutrophilen Leukozyten deuten darauf hin, dass in diesen Zellen G-Proteingekoppelte Rezeptoren über  $G\alpha_i$ -Proteine sowohl mit PLC als auch mit PLD als Effektormolekül in Wechselwirkung treten (Fensome et al. 1998). Von den  $G\alpha_q$ -Proteinen wurde bis heute noch nicht über eine PLC unabhängige Aktivierung der PLD als Effektormolekül berichtet. Jedoch kann eine Überexpression von konstitutiv aktivem  $G\alpha_q$ -Protein die PLD-Aktivität stark erhöhen (Plonk et al. 1998).

M3-muscarinische Acetylcholinrezeptoren, welche in HEK 293-Zellen (Human Embrionic Kidney) stabil exprimiert werden, aktivieren sowohl PLC als auch PLD (Sandmann et al. 1991). Diese Aktivierung ist PTX-insensitiv (Offermanns et al. 1994b). Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass über M3-Acetylcholinrezeptoren weder PLC noch PLD durch  $G\alpha_i$ -Proteine aktiviert werden können. Durch weitere Untersuchungen konnte außerdem gezeigt werden, dass die durch M3-muscarinische Acetylcholinrezeptoren induzierte PLD-Aktivität weder durch Proteinkinase C-Hemmstoffe noch durch Chelatbildung von intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Ionen beeinflusst werden konnte (Schmidt et al. 1994, Rümenapp et al. 1997). Dies deutet darauf hin, dass die PLD-Aktivierung nicht sekundär zur PLC-Stimulation erfolgt.

### **1.5.2 Die Proteinkinase-Kaskade der MAP-Kinasen**

Ausgehend von aktivierten Transmembranrezeptoren erfolgt die intrazelluläre Signalleitung überwiegend über zwei Wege. Zum einen leitet die Aktivierung von Transmembranrezeptoren die Bildung von Botenstoffen ein, die an Effektorproteine binden und diese für die weitere Signalübertragung aktivieren. Ein zweiter Weg, der vor allem für die Regulation von Wachstums- und Differenzierungsreaktionen bedeutsam ist, verläuft über eine Kaskade von hintereinandergeschalteten Proteinkinasen. Cytoplasmatische Proteinkinasen werden in Säugetieren aufgrund ihrer Regulierbarkeit durch extrazelluläre, häufig mitogen (zellteilungsfördernd) wirkende Liganden als Mitogen-aktivierte Proteinkinase (=MAP-Kinase, MAPK) oder als extrazellulär regulierte Kinase (=ERK) bezeichnet.

Ein extrazelluläres Signal wird von einem Transmembranrezeptor registriert, der Rezeptor wird aktiviert und gibt dann das Signal in Form einer Stimulation der Tyrosin-Phosphorylierung nachgeschalteter Effektormoleküle weiter. Als zentrale Schaltstation wurden hier das Ras-Protein sowie Mitglieder der Rho-Familie der kleinen regulatorischen GTPasen identifiziert. Vom Ras-Protein aus wird das Signal mit Hilfe von Proteinkinasen, die in Form einer Kaskade hintereinander geschaltet sind, ins Zellinnere geleitet. Als Resultat wird die Phosphorylierung und Aktivierung von genregulatorischen Proteinen beobachtet (Übersicht bei Davis 1994, Blumer und Johnsen 1994, Cano und Mahadevan 1995, Seger und Krebs 1995).

Im Herzen führt die Stimulation von Endothelin-1-Rezeptoren oder  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren über eine Aktivierung der Proteinkinase C zur Initiierung der MAPK-Phosphorylierungskaskade (Bogoyevitch et al. 1993a, Bogoyevitch et al. 1994, Bogoyevitch et al. 1995). Es kommt zur Aktivierung der Raf-Familie, welche die MAP-Kinase ERK1/2 phosphoryliert. ERK1/2 phosphoryliert wiederum Transkriptionsfaktoren wie z. B. Jun, Fos, Egr-1 (Übersicht bei Seger und Krebs 1995, Robinson und Cobb 1997, Hefti et al. 1997, Schaub et al. 1997). Von einigen Arbeitsgruppen wurde auch eine Aktivierung der „Stress-regulierten“ MAPK-Kaskade, die sog. p38-MAPK, Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK) und c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale Kinasen (JNK), im Herzen durch  $G\alpha_{q/11}$ -gekoppelte Rezeptoren beschrieben (Bogoyevitch et al. 1995, Minamino et al. 2002).

### **1.6 Aufgabenstellung der Arbeit**

An der Aktivierung der Phospholipasen können theoretisch zwei PTX-insensitive G-Protein-Subfamilien beteiligt sein:  $G\alpha_{12/13}$  und  $G\alpha_{q/11}$ . Diese lassen sich mit Hilfe von RGS-Proteinen differenzieren. LSCII bzw. KIAA380 sind negative Regulatoren der  $G\alpha_{12/13}$ -vermittelten Signalübertragung (Kozasa et al. 1998, Hart et al. 1998, Rümenapp et al. 1999), nicht aber für andere  $G\alpha$ -Untereinheiten. Dagegen zeigt RGS4 GAP-Aktivität für  $G\alpha_q$  (Berman et al. 1996b, Hepler et al. 1997), nicht aber für  $G\alpha_{12/13}$ . Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Beteiligung von PTX-insensitiven  $G\alpha_{12/13}$ -Proteinen an der Aktivierung der PLD in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten zu untersuchen.

Zudem sollte geklärt werden, ob und wenn ja, wie die Aktivierung der PLD in neonatalen Rattenkardiomyozyten über Hypertrophie induzierende Thrombin-Rezeptoren vermittelt wird. Der Signaltransduktionsweg der Aktivierung der PLD durch Thrombin-Rezeptoren sollte dabei mit den etablierten Signalwegen über Endothelin-1-Rezeptoren und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren verglichen werden.

Als molekulares Werkzeug zur Identifizierung  $G_{\alpha_{12/13}}$ -vermittelter Signalwege sollten trunkierte Versionen der  $G_{\alpha_{12/13}}$ -spezifischen RGS-Proteine (LSCII und KIAA380) verwendet werden. Nach der Expression dieser rekombinanten Proteine, denen die zur Signalweiterleitung notwendige Dbl-Homologie-Domäne fehlt, aber die zur Signalabschaltung notwendige RGS-Domäne vorhanden ist, sollten  $G_{\alpha_{12/13}}$ -vermittelte Signale in den neonatalen Ratten-Herzmuskelzellen abgeschaltet werden.

In der vorliegenden Arbeit lassen sich somit die folgenden Aufgabenstellungen definieren:

- I. Untersuchungen zur Aktivierung der PLD in isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratten, durch Hypertrophie induzierende Thrombin-Rezeptoren, im Vergleich zu Endothelin-1 und Noradrenalin.
- II. Identifizierung der G-Proteine, die die Aktivierung der PLD in isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratten durch Thrombin-Rezeptoren (PAR1), Endothelin-1-Rezeptoren bzw.  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren vermitteln.

Um die inhaltlichen Ziele verfolgen zu können, ergaben sich die folgenden methodischen Ziele:

- Die cDNA für die RGS-Domänen von LSCII bzw. KIAA380 mittels Polymerase-Kettenreaktion zu amplifizieren, in geeignete bakterielle Expressionsvektoren zu subklonieren und die Proteine in E.coli-Bakterien zu exprimieren und zu reinigen
- Die cDNA für die RGS-Domänen von LSCII bzw. KIAA380 in einen viralen Shuttle-Vektor pAdTrack zu klonieren, und durch homologe Rekombination rekombinante Adenoviren zur Expression der rekombinanten Proteine in Kardiomyozyten herzustellen
- Den Einfluss der Überexpression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS auf die Aktivierung der PLC und PLD in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten zu untersuchen.

## 2 Methoden

### Molekularbiologische Methoden

#### 2.1 Amplifikation der cDNA mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion

Im ersten Schritt wurden die cDNA-Fragmente (Template) der zwei RGS-Proteine LSCII bzw. KIAA380 mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und anschließend gereinigt. Der zu amplifizierende Bereich wurde durch zwei kurze Abschnitte der bekannten Sequenz definiert. Gegen diese Bereiche wurden komplementäre DNA-Oligonukleotide (Primer) synthetisiert (Tabelle 2). Durch Zugabe von Desoxynukleotid-Triphosphaten und einer thermostabilen DNA-Polymerase wurde während der DNA-Synthesereaktionen der Bereich zwischen den Primer-Bindungsstellen amplifiziert.

Die Primer und die zu amplifizierende DNA wurden in einer Pufferlösung zusammen mit den vier Desoxynukleotid-Triphosphaten (ATP, CTP, GTP, TTP), Magnesium und einer thermostabilen DNA-Polymerase gemischt (Tabelle 2). Solche thermostabilen DNA-Polymerasen werden aus verschiedenen thermophilen Eubakterien, beispielsweise aus *Thermus aquaticus*, isoliert. Der Ansatz wurde sorgfältig gemischt und kurz zentrifugiert. Die Reaktionsgefäße wurden in den Block des Thermocyclers gestellt. Mit Hilfe des Thermocyclers wird ein komplexes Inkubationsprogramm kontrolliert und wiederholt durchlaufen (Tabelle 2). Denaturiert wurde für ca. 5 min bei 94 °C, dabei trennen sich die beiden Stränge der Template-DNA. Anschließend wurde die Temperatur auf 60 °C - 58 °C gesenkt, so dass es zur Hybridisierung der im Überschuss vorhandenen Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA kommt. Danach wurde die Inkubationstemperatur auf 72 °C, das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, angehoben, wobei der Primer verlängert wird, bis wieder eine doppelsträngige DNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA gleicht. Danach ist der erste Amplifikationszyklus abgeschlossen. Zur Einleitung des zweiten Amplifikationszyklus wurde erneut die Temperatur auf 95 °C – 94 °C angehoben, allerdings jetzt nur für 1 min. Es werden dadurch wiederum sämtliche Doppelstrangbereiche denaturiert. Es folgten Renaturierungs- und Polymerisationsphasen wie im ersten Zyklus. Nach dem letzten Zyklus wurde ein zehnmütiger Polymerisationsschritt angeschlossen, um der Taq-Polymerase zu ermöglichen, alle synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen.

Nach Beendigung des Programms wurden die PCR-Produkte auf 4 °C abgekühlt und direkt gelelektrophoretisch analysiert.

Template (1:100)	z.B. LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS	5 µl	1 µl
Primer-Oligonukleotid 1	10 pmol	5 µl	5 µl
Primer-Oligonukleotid 2	10 pmol	5 µl	5 µl
PCR-Puffer	10 x	5 µl	5 µl
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	1,5 µl	1,5 µl
d NTP-Mix	5 mM bzw. 1 mM	2 µl	10 µl
Aqua ad injectabilia	(ad 49,5 µl)	26 µl	22 µl
Taq-Polymerase	5U/µl	0,5 µl	0,5 µl
Mineralöl		80 µl	80 µl

### Primersequenzen

LSCII-1 5'-GGC GGA GTC CTG CAT ATG GGA GAA GTC-3'

LSCII-2 5'-TTT CCG GAA GAG GAT CCT TCA CGA CTT CTT GTC-3'

KIAA380-1 5'-GGC CCA GCA CCA TAT GCG GCA GGG CTC-3'

KIAA380-2 5'-AAG ACG GAT CCC AGC CTA GCT CAT GTA GGT-3'

	Denaturierung	Hybridisierung	Synthese	Denaturierung	Polymerisation
LSCII	94 °C 5 min	[ 60 °C 1 min, 72 °C 1 min, 95 °C 1 min ]	<sub>30</sub>		72 °C 10 min
KIAA380	94 °C 5 min	[ 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 94 °C 1 min ]	<sub>30</sub>		72 °C 10 min

Tabelle 2 **Übersicht über die Zusammensetzung der PCR-Ansätze, die Primersequenzen und das Zyklusprogramm zur Amplifikation der zwei RGS-Proteine LSCII-RGS und KIAA380-RGS.**

## **2.1.1 Kontrolle der PCR-Produkte in der Agarosegel-Elektrophorese**

### **Größenbestimmung von DNA-Fragmenten**

Die Überprüfung des Ergebnisses der PCR-Amplifikation bzw. des Restriktionsverdau erfolgte durch gelelektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel. Zur Herstellung des Agarosegels wurde 1 g Agarose eingewogen, in 100 ml Elektrophoresepuffer (1 x TBE-Puffer) suspendiert, in der Mikrowelle aufgekocht und dann die Lösung bei RT auf 50 - 60 °C abgekühlt. 2 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml Stamm) wurden der abgekühlten Lösung zugesetzt und verrührt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen zwei benachbarten Basenpaaren der DNA, die dadurch teilweise entwunden und gedehnt wird. Nach Anregung mit UV-Licht (254, 302 oder 366 nm) fluoresziert der Ethidiumbromid-Nukleinsäure-Komplex im sichtbaren Bereich (500 bis 590 nm) als rot-orange leuchtende Bande. Voraussetzung ist nur, dass eine ausreichende Menge DNA vorliegt. Somit kann das Gel unmittelbar nach dem Elektrophoreselauf unter UV-Licht betrachtet werden.

Die Agaroselösung wurde luftblasenfrei in die Gelkammer mit einem Probenkamm ausgegossen. Nach Erstarren der Gelmatrix wurde der Probenkamm entfernt und das Gel in die mit 1 x TBE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die Proben und die DNA-Größenstandards, wie 100 bp DNA-Ladder (1 µg/µl), Lambda (λ)-DNA/EcoR1+HindIII-Marker oder Lambda (λ)-DNA/HindIII-Marker (je 0,5 µg/µl), wurden mit Ladefarbe versetzt und auf das Gel in die Probenaschen (slots) mitaufgetragen. Die DNA wurde je nach Größe des Gels für 1h bzw. 2 h bei 80 Volt bzw. 120 Volt Spannung aufgetrennt. Nukleinsäuren (DNA) sind aufgrund ihrer Phosphatgruppen ionisiert, und die Polydesoxynukleotide liegen als Polyanionen vor. Sie wandern daher bei der Elektrophorese von der Kathode zur Anode. In der Gelelektrophorese werden die DNA-Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt: Die Kleinsten unter ihnen wandern am schnellsten und die Größten am langsamsten zur positiven Elektrode. Die Elektrophorese wurde solange durchgeführt, bis die Farbstoffmarker Bromphenolblau und Xylencyanol, welche sich in der Ladefarbe befinden, die erforderliche Trennstrecke zurückgelegt hatten. Nach beendeter Elektrophorese wurden die DNA-Banden im Gel auf einem UV-Transilluminator unter UV-Licht betrachtet und das Ergebnis fotografisch dokumentiert.

## **2.2 Herstellung rekombinanter cDNA-Plasmide**

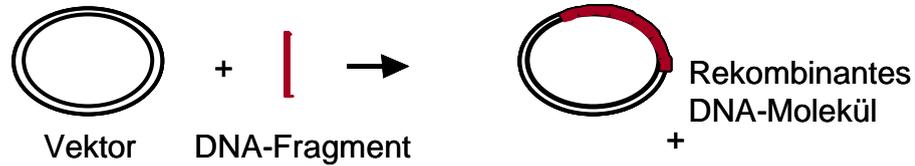
Die zu untersuchenden cDNA-Fragmente wurden jeweils mittels eines Klonierungsvektors in die Bakterien eingeschleust (Abbildung 5). Ein Klonierungsvektor muss in der Lage sein in eine Wirtszelle einzudringen und sich in der Wirtszelle zu replizieren, so dass viele Kopien des rekombinanten cDNA-Moleküls gebildet und an die Tochterzellen weitergegeben werden können. Plasmide erfüllen diese Anforderungen. Sie sind zirkuläre, nicht ins Chromosom integrierte doppelsträngige DNA-Moleküle, die in Bakterienzellen vorkommen und sich unabhängig vom bakteriellen Genom in Bakterien vermehren können.

Die Plasmide bestehen aus einem Replikationsstartpunkt (origin of replication, ori), zumeist einer Promotorregion zwecks Expression des eingeschleusten Gens, einem Selektionsgen (meist ein Antibiotika-Resistenzgen) und einer multiplen Klonierungsstelle (MCS; cloning site). Bei der multiplen Klonierungsstelle handelt es sich um ein in den Klonierungsvektor eingebautes Oligonukleotid, das definierte Schnittstellen für mehrere Restriktionsendonukleasen enthält. In der multiplen Klonierungsstelle können Fremd-DNA-Fragmente aufgenommen werden.

### **2.2.1 Schneiden von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen**

Zur Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls müssen sowohl der Vektor als auch die DNA, die man klonieren möchte, an bestimmten Stellen geschnitten werden. Angewendet wurden Restriktionsendonukleasen. Es handelt sich um Nukleasen, die DNA-Moleküle abbauen, indem sie die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotiden eines DNA-Stranges spalten. Da diese Enzyme die Phosphodiesterbindungen im Innern eines DNA-Moleküls spalten, nennt man sie Endonukleasen. Für jedes Enzym gibt es eine bestimmte Erkennungssequenz, an der es die DNA spaltet. Für Klonierungsexperimente ist es von großer Bedeutung wie der Schnitt, den eine Restriktionsendonuklease ausführt, im einzelnen aussieht. Einige Enzyme spalten beide DNA-Stränge in der Mitte der Erkennungssequenz, so dass glatte Enden (blunt ends) entstehen. Beispiel: Eco RV. Einige Restriktionsendonukleasen spalten dagegen die DNA-Stränge so, dass die entstehenden DNA-Fragmente an ihren Enden kurze überstehende Einzelstrangabschnitte besitzen, die man als klebrige Enden (sticky ends) bezeichnet.

## 1. Konstruktion eines rekombinanten DNA-Moleküls



## 2. Einschleusen in die Wirtszelle



## 3. Vermehrung des rekombinanten DNA-Moleküls

Bakterium mit rekombinanten DNA-Molekül



## 4. Vermehrung der Wirtszelle



## 5. Durch viele Zellteilungen entsteht ein Klon



Abbildung 5 **Die Schritte bei der DNA-Klonierung.** Ein DNA-Fragment, welches das zu klonierende Gen enthält, wird in den Vektor eingefügt, so dass ein rekombinantes DNA-Molekül entsteht (1). Der Vektor wirkt als Vehikel und transportiert das Gen in eine Wirtszelle. Meist ist dies ein Bakterium (2). In der Wirtszelle vermehrt sich der Vektor. Es entstehen viele identische Kopien nicht nur von ihm selbst, sondern auch von dem Gen, das er trägt (3). Die Wirtszelle teilt sich, dabei werden Kopien des DNA-Moleküls auf die Tochterzellen weitergegeben, in denen sich der Vektor erneut vermehrt (4). Durch viele Zellteilungen entsteht eine Kolonie, ein Klon gleichartiger Wirtszellen (5).

Zur Herstellung eines rekombinanten DNA-Moleküls müssen reine DNA-Proben vorbereitet werden und zwar sowohl vom Klonierungsvektor als auch von dem Gen, das man klonieren möchte. Ligationsreaktion, Transformation in *Escherichia coli*, Plasmidpräparation und cDNA Aufreinigung über Gelelektrophorese erfolgten nach Standardmethoden der Molekularbiologie.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Restriktionsendonukleasen waren:

<u>Restriktionsendonuklease</u>	<u>Erkennungssequenz</u>
Bam HI	G▼GATCC
Bgl II	A▼GATCT
Eco RI	G▼AATTC
Eco RV	GAT▼ATC
Hind III	A▼AGCTT
Nde I	CA▼TATG
Not I	GC▼GGCCGC
Pac I	TTAAT▼TAA
Pme I	GTTT▼AAAC
Sal I	G▼TCGAC
Xba I	T▼CTAGA

Der Vektor wurde so geschnitten, dass der Ring sich öffnet und ein neues DNA-Fragment aufnimmt. Die DNA-Fragmente, die kloniert werden sollten, wurden entsprechend geschnitten. Der analytische Restriktionsverdau wurde in folgendem Ansatz durchgeführt: 0,5 – 1 µg cDNA in Aqua ad injectabilia, 1 - 2 U Restriktionsendonuklease (1 U ist die Menge an Enzym, die benötigt wird, um 1 µg DNA in 60 min zu schneiden), 1 – 4 µl Restriktionspuffer (Puffer und Konzentration nach Angaben der Hersteller), Aqua ad injectabilia ad 20 µl. Inkubiert wurde für 60 min oder über Nacht bei 37 °C im Wärmeblock.

Häufig kann man problemlos mit zwei Enzymen gleichzeitig schneiden, wenn beide Enzyme in derselben Pufferlösung eine ausreichende Aktivität besitzen. Wenn kein gemeinsamer Puffer gefunden wurde, wurde zuerst mit dem Enzym, das die geringere Salzkonzentration benötigt, geschnitten und der Ansatz anschließend auf 65 °C erhitzt (nach Angaben der Hersteller), um das Enzym zu inaktivieren. Danach wurde der Ansatz mit Puffer verdünnt, bis die optimalen Bedingungen für das andere Enzym erreicht wurden.

### **2.2.2 Elution von cDNA aus LMP-Agarosegelen**

Die cDNA-Fragmente der zwei verschiedenen RGS-Proteine wurden nach dem Restriktionsverdau über ein Agarosegel getrennt. Das gewünschte DNA-Fragment wurde dann aus dem Gel isoliert. Für eine präparative Isolierung von DNA-Fragmenten wurde anstelle von normaler Agarose Low-Melting-Point-Agarose (LMP-Agarose) eingesetzt. Die Gelelektrophorese wurde, wie im Abschnitt 2.1.1 beschrieben, durchgeführt. Das LMP-Agarosegel mit den aufgetrennten DNA-Fragmenten wurde auf den UV-Transilluminator gelegt. Die gewünschten DNA-Banden wurden bei langwelligem UV-Licht (366 nm) mit einem Skalpell ausgeschnitten. Folgende Methoden wurden für die Gewinnung der DNA aus den Gelstücken verwendet:

- ❖ Aufreinigung der DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion
- ❖ Enzymatische Reinigung
- ❖ Aufreinigung von DNA durch reversible Bindung an „Glasmilch“

#### **❖ Aufreinigung der DNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion**

Die DNA-Bande wurde aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten LMP-Agarosegel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein 2 ml-Eppendorfgefäß bekannten Leergewichtes überführt und abgewogen. Es wurde 10 min bei 70 °C verflüssigt. Tris-gesättigtes Phenol pH 8,0 wurde auf 37 °C vorgewärmt. Dann wurde ein gleiches Volumen an Phenol zugegeben, sofort gemischt und 5 min bei 15800 x g zentrifugiert. Von den entstandenen 3 Phasen (wässrig/Gel/Phenol) wurde die oberste Phase abgenommen und ein gleiches Volumen Chloroform dazugegeben, gemischt und 5 min bei 13400 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen, mit 1/10 ihres Volumens an LiCl 4 M und mit gleichem Volumen Isopropanol versetzt, gemischt, und dann für ca. 30 min bei – 80 °C gefällt. Nach der Fällung wurde für 30 min bei 15800 x g zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und 20 min bei 15800 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde an der Luft getrocknet und in Aqua ad injectabilia aufgenommen.

❖ **Enzymatische Reinigung**

Die DNA-Bande wurde aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten LMP-Agarosegel ausgeschnitten. Das Gelstück wurde in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß bekannten Leergewichtes überführt, abgewogen und bei 56 °C geschmolzen. Entsprechend 1/10 des Volumens des ausgeschnittenen Gelstücks wurde Invitrogen Gelzym-Puffer zugegeben und für 5 min bei 40 °C gehalten. Anschließend wurde das Enzym „Gelzym“ zugegeben und 3 – 12 h bei 40 °C inkubiert. Die gesamte Probe wurde auf 750 µl mit Aqua ad injectabilia aufgefüllt, 750 µl Chloropan zugegeben, 2 min gemischt und 5 min in der Tischzentrifuge (15800 x g) bei RT zentrifugiert. Die wässrige Phase (Überstand) wurde in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Sie wurde mit 750 µl Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert, 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat pH 7,5 zugefügt und die DNA mit Isopropanol bei -80 °C gefällt. Anschließend wurde zentrifugiert (15800 x g), das DNA-Sediment mit 70 % ETOH gewaschen, getrocknet und in Aqua ad injectabilia aufgenommen.

❖ **Aufreinigung von DNA durch reversible Bindung an „Glasmilch“**

Der QIAquick Gel Extraction Kit ermöglicht die Reinigung und Konzentrierung von DNA-Fragmenten aus DNA-haltigen mit TBE gepufferten Agarosegelstückchen. In dem Kit sind alle notwendigen Puffer, zum Auflösen der Agarose, Waschpuffer sowie Spin-Columns mit immobilisierter Glasmilch enthalten. Dabei können pro Säule bis zu 10 µg DNA isoliert werden. Die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten LMP-Agarosegel ausgeschnitten. In einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß wurden bis zu 300 mg Gelmaterial überführt und 3 Gelvolumina QG-Puffer zugegeben. Das Auflösen der LMP-Agarose erfolgte durch Inkubation bei 50 °C für 10 min unter gelegentlichem Mischen. Nach dem vollständigen Auflösen der LMP-Agarose wurde der pH-Wert kontrolliert, da der pH-Wert der Lösung < 7,5 sein muss, damit die DNA an die Glasmilch bindet. Dann wurde 1 Gelvolumen Isopropanol zugegeben und gemischt. Die Agaroselösung wurde in die Glasmilchsäule (QIAquick spin column mit einem 2 ml-Auffanggefäß) gegeben und 1 min bei 10000 x g bei RT zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Säule wurde dann mit 500 µl QG-Puffer gespült, 1 min bei 10000 x g

bei RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl PE-Puffer (+Ethanol 100 %) gewaschen, 2 - 5 min bei RT inkubiert, 1 min bei 10000 x g bei RT zentrifugiert und der Durchlauf verworfen. Um das restliche Ethanol vollständig zu entfernen, wurde erneut für 1 min bei 10000 x g bei RT zentrifugiert. An dieser Stelle wurde die Säule mit der gebundenen DNA in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Zur Elution der DNA wurden 30 µl Elutionspuffer EB direkt, d.h. in die Mitte der Membran pipettiert. Damit die DNA sich von der Glasmilch löst, wurde sie 1 min bei RT inkubiert, anschließend für 1 min bei 10000 x g bei RT zentrifugiert. Die erhaltene DNA wurde dann nach einer Konzentrationsbestimmung weiterverwendet.

### **2.2.3 Dephosphorylierung der Vektor-DNA**

Wenn ein Vektor mit nur einem Restriktionsenzym geschnitten wird, entstehen zwei kompatible Enden, die wieder miteinander ligieren können. Die Alkalische Phosphatase hydrolysiert Phosphoresterbindungen am 5' -Ende einer Nukleinsäure. Alkalische Phosphatase entfernt somit Phosphatgruppen von den 5' -Enden und schafft damit freie 5' -OH-Gruppen. Damit kann die mögliche Religation des leeren Vektors bei einer Ligationsreaktion reduziert werden. Das DNA-Fragment, das inkloniert werden soll, besitzt dagegen noch beide Phosphatreste und kann mit der Vektor-DNA ligiert werden.

Die Dephosphorylierung wurde wie folgt durchgeführt: Zu ca. 1 µg Vektor-DNA wurde 2 µl shrimp alkaline phosphatase (SAP)-Puffer (10 x) und 1 µl SAP-Enzym zugegeben, auf 20,0 µl mit Aqua ad injectabilia aufgefüllt, durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym inaktiviert (15 min bei 65 °C). Die DNA wurde mit Chloroform und Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) extrahiert, mindestens 30 min durch Inkubation mit 500 µl Ethanol absolut bei - 80 °C gefällt und mittels Zentrifugation pelletiert. Dieses Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes mit 75 % Ethanol gewaschen und erneut präzipitiert. Nach kurzem Trocknen wurde das Pellet in 10 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen.

### 2.2.4 Ligation von DNA-Molekülen

Der nächste Schritt war der Einbau der cDNA-Fragmente der zwei RGS-Proteine LSCII bzw. KIAA380 in den aufgeschnittenen Klonierungsvektor. Das Enzym, das diesen Vorgang katalysiert, T<sub>4</sub> DNA-Ligase, wird aus Escherichia coli-Bakterien gereinigt, die mit dem Bakteriophagen T<sub>4</sub> infiziert sind. T<sub>4</sub> DNA-Ligase verbindet unter Verbrauch eines ATP-Moleküls eine freie 3' -Hydroxylgruppe mit einem 5' -Phosphatrest unter Ausbildung einer Phosphordiesterbindung. Die Ligationen wurden folgendermaßen durchgeführt: Plasmid-DNA (0,1 - 0,6 µg), DNA-Fragment (Tabelle 3) und Aqua ad injectabilia ad 10 µl wurden für 5 min bei 45 °C erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 µl 10 x Ligationspuffer und 0,5 U T<sub>4</sub> DNA-Ligase wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. 1 - 4 µl dieses Ansatzes wurde dann für die Transformation von E. coli-Bakterien verwendet.

$m \text{ [DNA-Fragment]} = m \text{ [Vektor]} \times \text{DNA-Fragment-bp} \times (1, 1,2 \text{ oder } 3) / \text{Vektor-bp}$ $V \text{ [DNA-Fragment]} = m \text{ [DNA-Fragment]} / c \text{ [DNA-Fragment]}$
---

Tabelle 3 **Formel zur Berechnung der Menge vom DNA-Fragment bei der Ligation.** Die Faktoren 1, 1,2 oder 3 entsprechen dem molaren Verhältnis von DNA-Fragment zu Vektor, z.B. ein Faktor von 3 entspricht: DNA-Fragment: Vektor=3:1.

### 2.2.5 Einschleusen von DNA in E. coli-Bakterien

Die meisten Bakterienarten können unter bestimmten Bedingungen DNA-Moleküle aus ihrem Kulturmedium aufnehmen (Abbildung 5). Oft können DNA-Moleküle sich in der Wirtszelle replizieren, vor allem dann, wenn es sich um ein Plasmid handelt, dessen Replikationsstartpunkt von der Wirtszelle erkannt wird. Anhand der Expression der auf dem Plasmid liegenden Gene erkennt man, ob ein Plasmid aufgenommen wurde. Beispiel: E. coli-Bakterien sind empfindlich gegenüber der wachstumshemmenden Wirkung der Antibiotika wie z.B. Ampicillin. Enthalten sie jedoch ein Plasmid (Klonierungsvektor), bei dem ein Gen eine β-Lactamase codiert, die das Ampicillin in eine für das Bakterium ungiftige Form umwandelt, werden sie gegen dieses Antibiotikum resistent. Zur Selektion der Transformanten plattiert man die Bakterienkultur auf einem Nährmedium (Agar), welches das betreffende Antibiotikum enthält. Allerdings muss beachtet werden, dass das Resistenzgen

exprimiert werden muss, so dass das Enzym  $\beta$ -Lactamase synthetisiert wird. Die Expression beginnt unmittelbar nach der Transformation, aber die Zellen enthalten erst nach einigen Minuten so viel von dem Enzym, dass sie gegen die Giftwirkung des Antibiotikums unempfindlich werden. Deshalb wurden die Bakterienkulturen für mindestens 30 min in einem kleinen Volumen des Flüssigmediums (ohne das Antibiotikum) inkubiert. Wenn anschließend die Zellen durch Ausplattieren mit dem Antibiotikum in Kontakt kommen, haben sie genügend Enzym gebildet, um zu überleben.

Die meisten Bakterienarten, darunter auch *E. coli*, können DNA unter normalen Bedingungen nur in begrenztem Umfang aufnehmen. Um sie wirksam zu transformieren, werden die Zellen einer chemischen Behandlung unterzogen. Diese Behandlung verstärkt ihre Fähigkeit, DNA in ihr Inneres aufzunehmen. Bakterienarten, die eine solche Behandlung durchlaufen haben, bezeichnet man als kompetent.

Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien:

1. kompetente *E. coli*-Bakterien für die Hitzeschocktransformation
2. kompetente *E. coli*-Bakterien für die Elektroporation

Um kompetente *E. coli* für die *Hitzeschocktransformation* herzustellen, wurden DH5 $\alpha$  und BJ5183 *E. coli*-Bakterien in 400 ml LB-Medium bei 37 °C bis zu einer optischen Dichte von 0,375 bei 590 nm inkubiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt: Die Kultur wurde auf Eis abgekühlt, dann dreimal mit 2500 - 3000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert. Zur Verbesserung der Transformationseffizienz folgte eine Inkubation für ca. 16 h bei 4 °C. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C aufbewahrt.

Für die Hitzeschock-Transformation wurden 50 – 100  $\mu$ l mit CaCl<sub>2</sub>-Lösung kompetent gemachte Bakterien auf Eis aufgetaut, mit der zu transformierenden DNA (meist 4  $\mu$ l eines 10  $\mu$ l Ligationsansatzes) gemischt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Bakterien für 45 sek bei 42 °C inkubiert {Hitzeschock} und gleich danach 2 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde 500  $\mu$ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und für 60 – 90 min bei 37 °C auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Bakterien auf einer LB-Agar-Platte mit Antibiotikum-Zusatz ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Um kompetente *E. coli* für die *Elektroporation* herzustellen, wurde 500 ml LB-Medium wie für die Calciumchlorid-Methode beimpft und bei 37 °C inkubiert. Sobald die Bakterienkultur eine optische Dichte von 0,5 - 0,8 bei 590 nm erreichte, wurden die Bakterien bei 2200 x g für 5 min bei 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 50 ml kaltem Aqua ad injectabilia (+ 10 % Glycerol) resuspendiert und anschließend bei 4 °C für 5 min bei 2200 x g zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde vier- bis sechsmal wiederholt. Das Pellet wurde dann in 1 ml einer kalten 15 - 20 % (v/v) Glycerollösung resuspendiert, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei - 80 °C gelagert.

Für die Elektroporation wurden 25 - 50 µl elektrokompetente DH5α bzw. BJ5183 *E. coli*-Bakterien mit der zu transformierenden DNA (meist 1 - 2 µl eines 10 µl Ligationsansatzes) gemischt. Die Mischung wurde in eine Elektroporationsküvette, die an zwei gegenüberliegenden Seiten mit dünnen Plattenelektroden ausgekleidet ist (mit 2 mm Elektrodenabstand), überführt und die Küvette in den Küvettenschlitten des Gene Pulser II gesetzt. Die Bakterienzellen wurden einem kurzen elektrischen Impuls mit 2,5 KV ausgesetzt, der Poren in der Zellmembran entstehen ließ. Die Zellmembran wurde dadurch kurzfristig permeabilisiert und die DNA-Moleküle können aus der Lösung in das Zellinnere gelangen. Die Küvetten wurden herausgenommen, der Transformationsansatz sofort mit 1000 µl LB-Medium oder SOC-Medium versorgt, in ein Falcon Röhrchen überführt und 30 min bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurde ein Teil auf LB-Agar-Platten mit Ampicillin- oder Kanamycin-Zusatz ausplattiert und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.6 Minipräparation von Plasmid-DNA**

Zur Überprüfung, ob die resistenten Bakterienkolonien das Plasmid mit dem gewünschten Insert enthielten, wurde eine sogenannte Minipräparation (Amplifikation kleiner DNA-Mengen) durchgeführt. Von der frisch ausgestrichenen Platte wurde eine einzelne Bakterienkolonie zum Animpfen von 10 ml LB-Medium, das das entsprechende Antibiotikum (Ampicillin oder Kanamycin) enthielt, verwendet und bei 37 °C über Nacht im Schüttelbad inkubiert (Übernachtskulturen).

❖ **TELT-Minipräparation von Plasmid-DNA**

Aus der Übernachtskultur wurden 3 ml für 30 sek bei 15800 x g abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Der Rest der Übernachtskultur wurde bei 4 °C gelagert. Das Pellet wurde in 250 µl TELT-Lysis-Puffer resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 5 µl frisch angesetztem Lysozym (50 mg/ml  $\cong$  250 µg/Ansatz) wurde die Lösung für 3 sek (nicht länger) gemischt und für 1 min bei 95 °C im Heizblock inkubiert. Es folgten 5 min der Abkühlung auf Eis. Danach wurde das Pellet nach 10 min Zentrifugation bei 11600 x g (RT) mit einem Zahnstocher entfernt. Die im Überstand gelöste Plasmid-DNA wurde für 15 min durch Inkubation mit 500 µl 96 % Ethanol bei RT gefällt und mittels Zentrifugation pelletiert. Dieses Pellet wurde nach Entfernen des Überstandes mit 70 % Ethanol gewaschen und erneut präzipitiert. Nach dem Trocknen wurde das Pellet in 15 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen.

❖ **Wizard-Minipräp (Promega)**

Jeweils 4,0 ml der Übernachtskultur wurden mittels Zentrifugation (15800 x g) pelletiert. Das Pellet wurde in 300 µl Resuspendierungspuffer aus dem Promega Kit resuspendiert. Dann wurden 300 µl Lysepuffer zugegeben, viermal invertiert, um den Inhalt vorsichtig zu durchmischen, und 5 min bei RT inkubiert. Schließlich wurden 300 µl Neutralisierungspuffer zugegeben, sechsmal invertiert und 5 min bei RT inkubiert. Die Suspension wurde für 10 min bei 15800 x g zentrifugiert. Der klare Überstand, der die Plasmide enthielt, wurde zu einer 1 ml Säulenmatrix-Suspension in einer Spritze gegeben und durch einen Filter in ein 2 ml-Eppendorfgefäß gedrückt. Mit 2 ml Waschpuffer wurde der Filter gewaschen und anschließend 2 min bei 15800 x g zentrifugiert. Auf die Säule wurde 50 µl 10 mM Tris pH 8,0 aufgetragen und die Säule in ein frisches 1,5 ml-Eppendorfgefäß gestellt. Zum Einwirken 1 min stehen gelassen und anschließend 10 min bei 15800 x g zentrifugiert. Zu dem mit Aqua ad injectabilia auf 500 µl aufgefüllten Eluat wurde 50 µl 3 M Natriumacetat pH 7,0 und 550 µl Isopropanol zugegeben und für 30 min bei – 80 °C präzipitiert. Nach 45-minütiger Zentrifugation bei 4 °C und 15800 x g wurde der Überstand dekantiert und das Pellet in 70 % Ethanol gewaschen. Es folgten weitere 10 min Zentrifugation und nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in 10 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen.

Die so aus den Bakterien isolierte Plasmid-DNA wurde dann überprüft, ob das Insert enthalten ist. Kontrolliert wurde dies anhand eines einstündigen Restriktionsverdau mit 5 – 10 µl Plasmideinsatz und einer Agarosegel-Elektrophorese. Dem Restriktionsverdau wurde gleichzeitig 1 µl RNase A (10 mg/ml) zugesetzt, um bakterielle RNA, d.h. Ribonukleinsäure, abzubauen.

### **2.2.7 Maxipräparation von Plasmid-DNA**

Zur Reinigung von Plasmid-DNA aus einer Bakterienkultur in größerem Maßstab wurde der Qiagen Plasmid Maxi Kit verwendet. Die Maxipräparation wurde wie folgt durchgeführt:

10 ml LB-Medium in Gegenwart des geeigneten Antibiotikums (100 µg/ml Ampicillin bzw. 20 µg/ml Kanamycin) wurden mit 1 ml einer frischen Übernachtskultur des rekombinanten Klons angeimpft und ca. 7 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. 500 ml LB-Medium in einem 2000 ml Erlenmeyerkolben mit dem geeigneten Antibiotikum wurden mit der Vorkultur beimpft. Die Kultur wurde 12 - 16 h unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Die Bakterien wurden dann in Zentrifugenbecher überführt und im entsprechenden Rotor bei 6000 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgegossen. Das Bakteriensediment wurde in 10 ml Resuspendierungspuffer P1 aufgenommen. Durch die im Resuspendierungspuffer P1 anwesende RNase A wurde die bakterielle RNA abgebaut, so dass eine separate RNase-Hydrolyse nach der erfolgten Plasmid-Präparation nicht notwendig war. Anschließend wurden 10 ml Lysepuffer P2 zugegeben, vorsichtig durch vier- bis sechsmaliges Invertieren des Zentrifugenbechers gemischt und für 5 min bei RT inkubiert. Das Lysat war anschließend viskös. Danach wurden 10 ml gekühlter Neutralisierungspuffer P3 zugegeben, durch vier- bis sechsmaliges Invertieren gemischt und danach 20 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe des Neutralisierungspuffers P3 wird das Lysat trüb und durch das Ausfällen von genomischer DNA, Proteinen und Zelltrümmern sehr viskös. Bei der Bakterienlyse mittels alkalischer Lyse wird die bakterielle DNA effektiv entfernt. Bei stark alkalischem pH denaturiert DNA. Nach der Neutralisierung mit Puffer P3 hybridisieren die beiden Stränge der Plasmid-DNA wieder, während die größere chromosomale DNA einzelsträngig bleibt und ausfällt.

Das Lysat wurde dann bei 20000 x g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand war klar (enthält die freigesetzte Plasmid-DNA) und wurde in ein frisches Polycarbonat Röhrchen durch Gaze ( $\varnothing$  120  $\mu$ m) filtriert. Es wurde nochmal bei 20000 x g für 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Währenddessen wurde die Qiagen-tip 500 Säule (Anionenaustauscher-Säule) mit 10 ml QBT-Equilibrierungspuffer equilibriert. Das Bakterienlysat wurde über Gaze auf die schon equilibrierte Säule gegeben und filtriert. Dieser Vorgang wurde noch ein zweites Mal wiederholt. Negativ geladene Phosphatgruppen der Plasmid-DNA binden an die positiv geladenen Oberflächenmoleküle des Trägermaterials der Anionenaustauschermatrix, während Kontaminationen aus dem Bakterienlysat die Säule passieren, ohne zu binden. Die Säule wurde zweimal mit 30 ml Waschpuffer QC gespült und die gereinigte Plasmid-DNA wurde mit 15 ml Elutionspuffer QF von der Säule eluiert. Das Eluat mit der Plasmid-DNA wurde mit 10,5 ml (0,7 Volumen) Isopropanol versetzt, gemischt und sofort für 30 min bei 15000 x g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig abgegossen. Das Plasmid-DNA-Sediment wurde mit 5 ml 70 % Ethanol gewaschen und für 10 min bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, ohne das Sediment aufzuwirbeln. Das Plasmid-DNA-Sediment wurde 5 - 10 min an der Luft getrocknet und anschließend in Aqua ad injectabilia gelöst. Die Konzentration wurde anhand einer photometrischen Messung bei 260 nm bestimmt. Die Lagerung der DNA erfolgte bei 4 °C.

### **2.2.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen**

Die DNA-Konzentration wurde mit Hilfe der Absorptionsspektrometrie gemessen. Die Menge der ultravioletten Strahlung, die von einer DNA-Lösung absorbiert wird, ist ihrem DNA-Gehalt direkt proportional. Die Absorption wurde bei 260 nm gemessen. Bei dieser Wellenlänge entspricht ein Absorptionswert von 1,0 bei einer Schichtdicke von 1 cm einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA. Das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 und 280 nm erlaubt außerdem eine Aussage über die Reinheit der DNA-Präparation. Bei einer reinen DNA-Probe liegt dieses Verhältnis bei 1,8. Geringere Werte weisen auf Proteinkontamination oder auf eine Verunreinigung mit Phenol hin.

### **2.3 Herstellung rekombinanter Adenoviren**

Virale Genome sind größer als Plasmid-Expressionsvektoren. Die Herstellung von Konstrukten ist daher schwieriger und die DNA-Menge, die eingebaut werden kann, ist begrenzt.

Das Genom des hier verwendeten Adenoviruses Serotyp 5 besteht aus einem linearen, doppelsträngigen, 36 kb großen DNA-Molekül. Verwendet wurden replikationsdefiziente Ad5-Mutanten mit einer Deletion in der E1- und E3-Region (Abbildung 6; Bett et al. 1994). Der produktive Zyklus, der zur Lyse der infizierten Wirtszelle führt, findet also nur in permissiven Zelllinien statt, z.B. HEK-Zellen (Human Embryonic Kidney Cells), die zu einer Komplementierung der E1-Region führen (Graham et al. 1977). Werden Zellen, die den Replikationsdefekt in der E1-Region nicht komplementieren können (z.B. Herzmuskelzellen), mit dem replikationsdefizienten Ad5-Deletionsmutanten infiziert, erfolgt keine Produktion infektiöser Viren. Somit wurden HEK 293-Monolayer u.a. für die Amplifikation rekombinanter Adenoviren verwendet (siehe Abschnitt 2.7).

Die cDNA, die für das zu exprimierende Protein codiert, wurde über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen (LSCII-RGS und KIAA380-RGS: Hind III + Not I) in den viralen Shuttle-Vektor pAdTrack einkloniert (Kanamycin-Selektion). Dieser wurde dann mit der Restriktionsendonuklease Pme I linearisiert und zusammen mit pAdEasy-1 in Bakterien kotransformiert (Abbildung 7).

Für die Kotransformation der mit Pme I linearisierten, über LMP-Agarosegel isolierten und anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigten pAdTrack / LSCII-RGS bzw. pAdTrack / KIAA380-RGS zusammen mit pAdEasy-1 wurden elektrokompente BJ-Bakterienzellen verwendet. Elektrokompente, bei -80 °C gelagerte BJ-Bakterienzellen wurden auf Eis aufgetaut und zu je 40 µl in vorgekühlte 1,5 ml-Eppendorfgefäße vorgelegt. Wie in Tabelle 4 dargestellt, wurden auch 1 µl pAdTrack / LSCII (B) bzw. 1 µl pAdTrack / KIAA380 (D) (je 100 ng/µl) jeweils den BJ-Bakterienzellen zugesetzt. Bei diesen Ansätzen handelte es sich um Kontrollversuche. Nach Ausplattieren dieser Ansätze dürften keine Kolonien wachsen, da es sich hier um linearisierte Plasmide handelt.

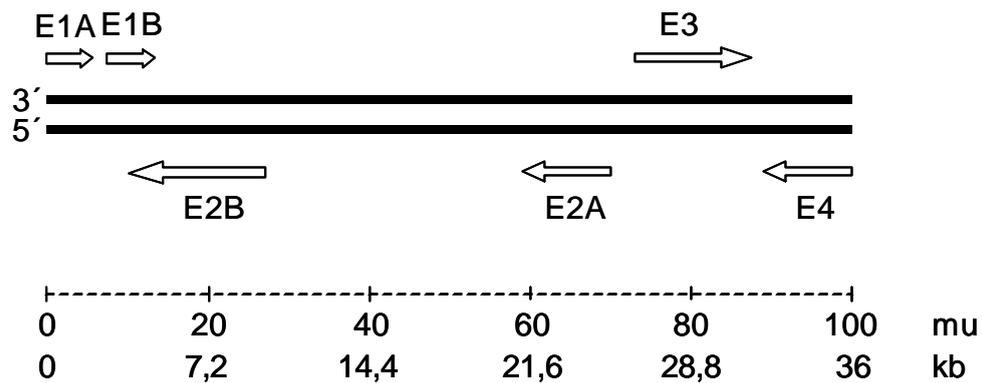


Abbildung 6 **Genomkarte von Ad5**. Die doppelte, fett gekennzeichnete Linie repräsentiert die doppelsträngige Ad5-DNA. Die Gesamtlänge der Ad5-DNA (ca. 36 kb) und die Karteneinheiten (mu=map units) sind angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung. Durch offene Pfeile sind die sogenannten frühen Regionen E1-E4 (E=early) gekennzeichnet, die vor dem Beginn der viralen DNA-Replikation in der Reihenfolge E1A, E1B, E3, E4, E2 exprimiert werden. Region E1A codiert für ein Protein, das für die Expression der anderen frühen Regionen notwendig ist.

Die E1-Regionen (E1A, E1B) sind für die produktive Infektion humaner Zellen essentiell. Bei den zum Gentransfer verwendeten Adenoviren ist die für die Replikation notwendige E1A-Region entfernt. Die Gene der E2-Region sind an der viralen Replikation beteiligt. Die E3-Region ist für die Virus-Persistenz *in vivo* wichtig, aber für die Virus-Replikation nicht essentiell. E3-Deletionsmutanten unterscheiden sich in ihrer Replikationskompetenz nicht vom Wildtyp. Die E4-Region ist an der Anschaltung der späten Funktionen beteiligt. Die Deletion der E4-Region führt zu einem Defekt in der späten Proteinsynthese, aber nicht zu einer Replikationsinkompetenz. Entsprechend der Bedeutung der deletierten Bereiche (E1A, E3) für die virale Replikation resultieren replikationsdefekte oder replikationskompetente Ad5-Mutanten. Nach Ibelgaufs (1993).

1 µl pAdTrack / LSCII (C) bzw. 1 µl pAdTrack / KIAA380 (E) (je 100 ng/ml) wurden jeweils mit 1 µl pAdEasy-1 (1 µg/µl) in 40 µl BJ-Bakterienzellen kotransformiert. Als Negativkontrolle (A) parallel zu den Transformationsansätzen wurde ein Kontrollansatz mit 1 µl pAdEasy-1 (1 µg/µl) ohne rekombinierte DNA-Moleküle mitgeführt. Die Elektrotransformation wurde, wie im Abschnitt 2.2.5 beschrieben, durchgeführt.

		A	B	C	D	E
pAdTrack / LSCII	100 ng/µl		1 µl	1 µl		
pAdTrack / KIAA380	100 ng/µl				1 µl	1 µl
PAdEasy-1	1 µg/µl	1 µl		1 µl		1 µl

Tabelle 4 **Pipettierschema bei der homologen Rekombination**. Die Ansätze wurden jeweils 10 min auf Eis inkubiert.

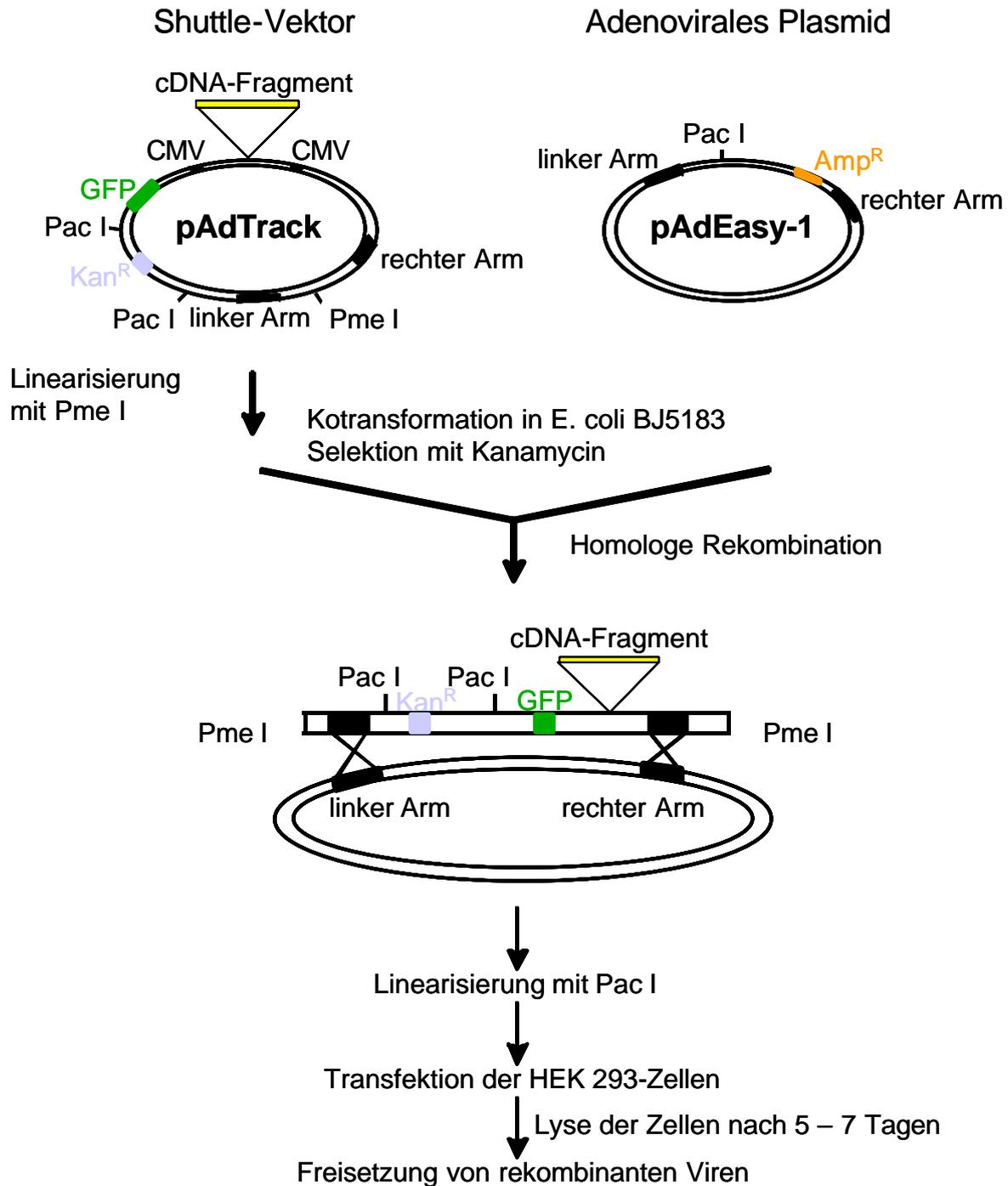


Abbildung 7 **Klonierungsstrategie zur Herstellung homologer Rekombinanten.** Die cDNA (codierend für die RGS-Domänen von jeweils LSCII und KIAA380) wurde mit den entsprechenden Restriktionsenzymen in den viralen Shuttle-Vektor pAdTrack umkloniert, dieser mit Pme I linearisiert und zusammen mit pAdEasy-1 in Bakterien kotransformiert. Durch die homologe Rekombination kommt es zur Übertragung der RGS-Domäne des Zielgens auf das Virusgenom. Nach der Identifizierung einer rekombinanten Bakterienkolonie wurde das entsprechende Plasmid aufgereinigt, mit Pac I linearisiert und in HEK 293-Zellen mittels Lipofectamin<sup>®</sup> transformiert. Nach etwa 5 – 7 Tagen kommt es zur Lyse der Zellen und damit zur Freisetzung von rekombinanten Viren.

Durch homologe Rekombination kam es zur Übertragung der cDNA des Zielgens auf das Virusgenom. Durch die homologe Rekombination wird zusätzlich das Gen für die Ampicillin-Resistenz durch ein Gen für die Resistenz gegen Kanamycin ausgetauscht. Positive Klone wurden deshalb auf Kanamycin-haltigen Agarplatten selektiert. Nach Identifizierung einer rekombinanten Bakterienkolonie wurde das entsprechende Plasmid aufgereinigt, mit der Restriktionsendonuklease Pac I linearisiert und mittels Lipofectamin® in HEK 293-Zellen transformiert. Nach etwa 5-7 Tagen kam es zur Lyse der Zellen und damit zur Freisetzung von rekombinanten Viren (Abbildung 7; Abschnitt 2.7).

Für den qualitativen Nachweis der Transfektion bzw. der Transfektionseffizienz von adenoviral-infizierten Zellen wurde das Reportergenkonstrukt im pAdTrack, GFP, verwendet (He et al. 1998). Neben der Expression des Zielgens wird in allen infizierten Zellen gleichzeitig GFP exprimiert. GFP (grün fluoreszierendes Protein) ist ein fluoreszierendes Protein, das durch blaues oder UV-Licht angeregt, grünes Licht abstrahlt. GFP ist nicht cytotoxisch. Die Absorptions- und Emissionsmaxima sind ähnlich denen von Fluorescein. Deshalb kann man GFP-positive Zellen mit den gleichen Methoden detektieren wie solche, die mit Fluorescein-gekoppelten Antikörpern gefärbt wurden, d.h. im UV-Licht oder unter dem Fluoreszenzmikroskop.

### **Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.4 Genexpression in E.coli: Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine**

Für die Produktion eines rekombinanten Proteins, d.h. für die gezielte Synthese großer Mengen eines gewünschten fremden Genprodukts in einer lebenden Zelle stehen Expressionssysteme zur Verfügung. Die Expression erfolgte in dem Expressionsvektor pET-15b. Die Expression wurde über die Zugabe von Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid (IPTG) induziert. IPTG, ein Lactosederivat, wirkt als starker Induktor der lac-Transkription und wird nicht von  $\beta$ -Galactosidase hydrolysiert. Nach der Zugabe zum Kulturmedium bleibt die Konzentration von IPTG über lange Zeit konstant, so dass die lac-Transkription kontinuierlich induziert werden kann. Die inserierten Gene wurden als Fusionsprotein mit Polyhistidin (His<sub>6</sub>) exprimiert. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte über eine Metallchelate-Affinitätschromatographie.

#### **2.4.1 Expression kleinerer Mengen rekombinanten Proteins**

4 ml LB-Medium mit 20 µl Ampicillin (50 µg/ml) wurden mit 1 ml frischer Übernachtskultur des jeweiligen positiven Klons beimpft und unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. Das Zellwachstum wurde durch Trübungsmessung bei 595 nm verfolgt. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 - 0,7 wurde 1 ml der Bakteriensuspension als Negativkontrolle vor der Induktion entnommen. Zur Induktion der Expression wurde dem Rest der Bakterienkultur (4 ml) 4 µl IPTG 1 M zugesetzt und unter Schütteln bei 37 °C für 3 h inkubiert. Nach der Induktion wurden 2 ml bzw. 1 ml der induzierten Probe bei 15800 x g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Die nicht induzierte Probe wurde ebenfalls entsprechend zentrifugiert. Der Überstand wurde jeweils verworfen. Das Sediment aus der 1 ml induzierten bzw. nicht induzierten Probe wurde in jeweils 200 µl 1 x Laemmli-Puffer resuspendiert. Das Sediment der 2 ml induzierten Probe wurde in 400 µl Puffer A resuspendiert und die Bakterien mittels Ultraschall für 5 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde bei 15800 x g für 5 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in 200 µl 1 x Laemmli-Puffer aufgenommen. Zu den 200 µl Überstand wurde 200 µl 2 x Laemmli-Puffer zugesetzt. Die Proben wurden durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese analysiert. Als Kontrolle bzw. Molekulargewichtvergleich wurde in einer Spur eine Standardproteinmischung aufgetragen.

#### **2.4.2 Expression größerer Mengen rekombinanten Proteins**

10 ml LB-medium mit 40 µl Ampicillin (50 µl/ml) wurden mit 100 µl frischer Kultur des jeweiligen positiven Klons beimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C kultiviert. 500 ml LB-Medium mit 2500 µl Ampicillin wurden mit der Übernachtskultur beimpft, unter Schütteln bei 37 °C inkubiert und das Zellwachstum durch Trübungsmessung bei 595 nm verfolgt. Bei Erreichen einer optischen Dichte von 0,5 - 0,7 wurden der Bakteriensuspension zur Induktion der Expression 500 µl IPTG 1 M und 500 µl Ampicillin (50 µl/ml) zugesetzt. Die Kultur wurde unter Schütteln bei 30 °C für 3 h inkubiert. Die Bakterienkultur wurde anschließend in Zentrifugenbecher überführt und bei 7740 x g und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Sediment in 18 ml kaltem Puffer A resuspendiert.

Nach diesem Schritt kann das Sediment bei – 80 °C gelagert oder direkt weiterverarbeitet werden. Die Bakterienzellen wurden mittels Ultraschall (5 – 15 min) lysiert. Um Erwärmung zu vermeiden, wurde auf Eis gearbeitet. Die Suspension wurde dann in Zentrifugenröhrchen überführt und bei 17500 x g und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde aufbewahrt und das Sediment verworfen.

### **2.4.3 Reinigung des Polyhistidin-Fusionsproteins**

1 ml Ni-NTA-Superflow-Säulenmaterial (Qiagen) wurde in einer Säule vorgelegt und dann mit zweimal 5 ml (zehnfachem Säulenvolumen) Puffer A equilibriert. Der proteinhaltige Überstand wurde auf die Säulenmatrix gegeben und bei 4 °C unter Schwenken für 20 - 30 min inkubiert. Anschließend wurde der Säulendurchlauf (Durchfluß) aufgefangen. Die Säule wurde dreimal mit jeweils 20 ml Puffer C (Waschpuffer, 25 mM Imidazol) gewaschen und dabei der Säulendurchlauf (Wasch) aufgefangen. Anschließend wurde 1 ml Puffer B (Elutionspuffer, 400 mM Imidazol) zugesetzt, das Säulenmaterial darin durch Auf- und Abpipettieren resuspendiert, kurz inkubiert und dann das Eluat aufgefangen. Dieser Vorgang wurde fünfmal wiederholt. Die Eluate wurden über SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese auf ihre Reinheit analysiert.

Zur Entfernung des Imidazols aus dem Eluat wurde ein Dialyseschlauch verwendet. Der Dialyseschlauch wurde dazu 30 min in kochendem Wasser gewaschen und vorgequollen. Der Schlauch wurde danach am unteren Ende abgeklemmt, das proteinhaltige Eluat hineinpipettiert und schließlich das obere Ende abgeklemmt. Der gefüllte Schlauch wurde dann in 1 l Puffer A + 5 % Glycerol gehängt und bei 4 °C unter Rühren über Nacht dialysiert. Substanzen mit kleinerem Molekulargewicht, wie z.B. Salze und kleinere Moleküle, passieren die durchlässige Membran und können so von den Proteinen abgetrennt werden.

### **2.4.4 Konzentrierung des rekombinanten Proteins**

Das proteinhaltige Eluat wurde anschließend im Konzentrator der Firma Amicon konzentriert. Der Konzentrator ist eine kleine Einheit mit einem Filter, durch den das zu konzentrierende Eluat mittels Überdruck hindurchgepresst wird.

Die Filtermembran PM 10 hatte einen Durchmesser von 25 mm. Das Protein wird vom Filter zurückgehalten, während das Lösungsmittel abgepresst wird. Anschließend wurde die Proteinkonzentration bestimmt, das Protein aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

### 2.4.5 Proteinbestimmung

Zur Quantifizierung von Proteinen wurde eine colorimetrische Messung verwendet. Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgte in Doppelbestimmung nach der Bradford-Methode (1976). Bei dieser Methode wird Coomassie Brilliantblau G250 verwendet. Dieser Farbstoff reagiert mit Proteinen und bildet Komplexe, die ein Absorptionsmaximum bei 595 nm aufweisen, während der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei 465 nm zeigt. Als Standardprotein wurde Rinder-Gamma-Globulin verwendet.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 µl Farbreagenz (BioRad®) auf die proteinhaltige Lösung ad 800 µl Aqua bidest gestartet. Nach 15 min konnte die Absorption bei 595 nm photometrisch ermittelt werden. Es wurde eine Standardkurve mit Hilfe von Proteinlösungen bekannter Konzentrationen (Stamm: 1,4 mg/ml; Rinder-Gamma-Globulin; Tabelle 5) erstellt und der molare Absorptionskoeffizient  $\epsilon$  aus der jeweiligen Kurve errechnet. Nach dem Lambert Beer'schen Gesetz konnte dann für unbekannte Probe aus den Absorptionswerten E die Proteinkonzentration c errechnet werden: Absorptionsgesetz  $E = \epsilon \times c \times d$  (d=1)

Standard	Aqua bidest	Bio-Rad Protein-Assay	Proteinmenge
0 µl	800 µl	200 µl	0 µg
10 µl	790 µl	200 µl	3,58 µg
20 µl	780 µl	200 µl	7,15 µg
30 µl	770 µl	200 µl	10,73 µg
40 µl	760 µl	200 µl	14,3 µg

Tabelle 5 **Proteinbestimmung nach Bradford.** Herstellung der Standardreihe mit Rinder-Gamma-Globulin als Standard.

## **2.5 Diskontinuierliche Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

Das grundlegende Prinzip aller elektrophoretischen Trenntechniken für Proteine ist die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld. Die wesentlichen Unterschiede in den Trennungsmethoden ergeben sich aus dem für jedes Biomolekül charakteristischen Verhältnis von Ladung zu Masse bzw. aus ihrer Molekülgröße und Molekülform. Im diskontinuierlichen System passiert die Probe zunächst ein Sammelgel mit großer Polyacrylamid-Porenweite (4 %). Beim Einwandern der Proben in das Trenngel, das eine geringere Porenweite, eine höhere Salzkonzentration sowie einen höheren pH-Wert im Vergleich zum Sammelgel besitzt, werden die Proteine aufgrund ihrer molekularen Größe getrennt.

Es wurde Minigel-System (BioRad Mini Protean II) eingesetzt, da diese Apparatur eine schnelle Trennung mit hohem Auflösungsvermögen erlaubt.

### **2.5.1 Herstellung des Polyacrylamidgels**

Zwei Glasplatten (10 cm x 10 cm) wurden gründlich gereinigt, gemäß den Angaben des Herstellers der Elektrophoreseapparatur mit den 0,75 mm Abstandshaltern (Spacer) zu einem Sandwich zusammengebaut, und in die vorgesehene Halterung zum Gießen des Gels eingeklemmt. Die Dichtigkeit der Gelkassette wurde durch Einfüllen von Wasser überprüft. Eine Taschenschablone wurde in die Gelkassette eingesetzt, auf der vorderen Glasplatte der untere Rand der Probenaschen mit einem Filzschreiber markiert und anschließend die Schablone wieder entfernt. Für den Trennbereich wurde eine Trenngellösung (12 %) vorbereitet und luftblasenfrei in die Gelkassette eingefüllt, so dass die Höhe der Lösung zwischen den Glasplatten ca. 1 cm unterhalb der Probenaschenmarkierung liegt. Die Trenngellösung wurde vorsichtig mit Aqua bidest überschichtet, damit sich eine gerade Grenzfläche während der Polymerisation ausbilden kann. Die Trenngellösung polymerisierte für 30 - 60 min bei RT, so dass die Grenzschicht zwischen dem Gel und der überschichteten Lösung deutlich sichtbar wird. Die über dem Gel stehende Flüssigkeit wurde abgegossen und Flüssigkeitsreste mittels eines Filterpapiers entfernt. Die zubereitete Sammelgellösung (4 %) wurde bis zum oberen Rand der Gelkassette eingefüllt. Die Schablone für die Probenaschen wurde sofort eingesetzt,

wobei Luftblasenbildung an den unteren Enden der Probestaschen vermieden wurde. Die Sammelgellösung polymerisierte für 30 - 45 min bei RT. Nach erfolgter Polymerisation wurde eine optische Diskontinuität um die Probestaschen herum deutlich sichtbar.

### **2.5.2 Probenvorbereitung**

3 Teile der zu analysierenden Proteinlösung wurde mit 1 Teil 3 x Laemmli-Probenpuffer gemischt und anschließend 5 min bei 95 °C denaturiert. Das maximal aufzutragende Volumen richtet sich u.a. nach der Vollständigkeit der ausgebildeten Probestaschen, d.h. wie hoch die Stege zwischen den Taschen auspolymerisiert sind. Beim Minigel (BioRad Mini Protean II) mit 0,75 mm dicken Abstandshaltern wurden jeweils 15 - 20 µl Probe pro Spur aufgetragen.

Zur Molekulargewichtszuordnung wurde eine Standardproteinmischung aufgetragen. Für die Western-Blot-Analysen wurde eine farbstoffmarkierte Proteinmischung verwendet. Sie erlaubt zum einen eine Laufkontrolle während der Elektrophorese und zum anderen eine einfache Identifizierung der Standardproteine nach erfolgtem Elektrotransfer auf die Blot-Membran.

### **2.5.3 Elektrophorese**

Die Gelkassette wurde nach Herstellerangaben in die Elektrophoreseapparatur eingebaut und die Elektrophoresekammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Probenschablone wurde aus dem auspolymerisierten Gel vorsichtig entfernt. Anschließend wurden die Proben mittels Pipetten mit Einmalspitzen durch den Laufpuffer hindurch auf den Boden der Taschen eingetragen. In allen Taschen wurden möglichst gleiche Volumina eingetragen, um Verzerrungen (Smile-Effekt) während der Elektrophorese zu verhindern. Die Elektroden wurden mit dem Stromgeber verbunden und die Elektrophorese für 1 - 2 h bei 150 V und einer Temperatur von ca. 10 °C durchgeführt. Sobald die Farbstoff-Front den unteren Gelrand erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet. Das Gel wurde aus der Kammer entnommen und die Proteine mit Coomassie-Blau-Färbung detektiert, oder das Gel zum Transfer der Proteine auf Membranen verwendet.

#### **2.5.4 Coomassie-Blau-Färbung**

Nach beendeter Elektrophorese wurde das Gel in die Färbelösung (Coomassie Brilliant Blau R-250, ein Farbstoff, der unspezifisch an fast alle Proteine bindet) gelegt, für 2 min in der Mikrowelle aufgekocht und dann unter leichtem Schütteln bei RT für 15 min inkubiert. Danach wurde die Färbelösung abgegossen und in einem geeigneten Gefäß aufgefangen, da sie mehrmals verwendet werden kann. Anschließend wurde das blau eingefärbte Gel mit einer Entfärberlösung bis zur gewünschten Farbverringerng des Hintergrundes entfärbt, dabei wurde die Entfärberlösung mehrmals gewechselt.

#### **2.5.5 Vakuumtrocknung des Gels**

Nach Erreichen des gewünschten Entfärbungsgrades wurde das Gel unter Vakuum getrocknet. Vor dem Trocknen des Gels muss die vollständige Entfernung von Essigsäure sowie Alkohol aus dem Gel gewährleistet sein, da schon geringe Reste zu einem Reißen des Gels während des Trocknungsvorgangs führen können. So wurde das Gel gewässert. Cellophanpapier wurde für 15 min in Wasser eingeweicht. Das gefärbte Gel wurde zwischen zwei Lagen des gut durchfeuchteten Cellophanpapiers luftblasenfrei auf feuchtem Whatman 3 MM-Papier auf dem Geltrockner gelegt. Bei angeschalteter Heizung wurde unter Vakuum 1 h bei 70 - 80 °C nach Anleitung des Geräteherstellers getrocknet.

#### **2.5.6 Immunoblot**

Beim Immunoblot (Western-Blott) werden die einzelnen Komponenten einer Proteinmischung nach gelelektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran überführt und dort einer Nachweisreaktion unterzogen, die für bestimmte Proteine der getrennten Mischung spezifisch sein soll. Das Blotten der getrennten Proteine auf einer Membran bietet den Vorteil, dass die Membran als Trägermatrix viel einfacher zu handhaben ist als ein Gel und die Proteine auf der Oberfläche der Membran immobilisiert sind.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurde eine der Glasplatten abgenommen und der zum Transfer vorgesehene Teil des Gels ausgeschnitten. Die Nitrocellulose-Membran und das Whatman-Papier wurden auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten und für 15 min im Transferpuffer getränkt. Ein Schaumstoffschwamm wurde ebenfalls mit Transferpuffer getränkt. Das Trenngel wurde luftblasenfrei in den Träger eingebaut, der den folgenden Aufbau hatte (in der Reihenfolge von Kathode zur Anode): Kunststoffgitter, Schaumstoffschwamm, zwei Lagen Whatman-Papier, Trenngel, Nitrocellulose-Membran, zwei Lagen Whatman-Papier, Schaumstoffschwamm, Kunststoffgitter. Der Träger („Sandwich“) sollte zügig zusammengebaut und immer feucht gehalten werden. Luftblasen wurden aus dem „Sandwich“ durch vorsichtiges Rollen mit einem angefeuchteten Glasstab entfernt. Der Träger wurde in die dafür vorgesehenen Halteschienen im Puffertank geschoben und zwar so, dass die Membran zur Anode (+) und das Gel zur Kathode (-) zeigt. Der Transfertank wurde verschlossen und der Elektrotransfer wurde für 1 h bei 150 mA und 4 °C durchgeführt. Anschließend wurde die Nitrocellulose-Membran für 5 - 10 min mit Ponceau S-Lösung bei RT unter Schütteln gefärbt und danach mit Aqua bidest gespült. Die Proteinbanden waren dann sichtbar. Ponceau S bietet den Vorteil, dass die Anfärbung nicht permanent und daher mit den meisten Nachweisreaktionen und Visualisierungsverfahren kompatibel ist. Die Höhe der Banden des Proteinstandards wurde zur späteren Identifikation des Molekulargewichts spezifisch gefärbter Banden dauerhaft markiert. Wenn als Molekulargewichtsstandard eine farbstoffmarkierte Proteinmischung (z.B. Rainbow-Marker, Amersham Bioscience) aufgetragen wurde, war in der Regel eine Ponceau S-Färbung des geblotteten Proteins nicht mehr notwendig.

Anschließend wurde die Membran zunächst zweimal für je 10 min mit TBS pH 7,4 gewaschen und anschließend für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit 3 % Milchpulver in TTBS pH 7,4 (Blocking-Puffer) unter langsamem Schwenken auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Die Behandlung mit Milchpulver führte dazu, dass überschüssige Proteinbindestellen der Membran abgesättigt und eine unspezifische Bindung der Nachweisreagenzien verhindert wurde. Der Blocking-Puffer wurde entfernt und die Membran dreimal für je 10 min bei RT mit TBS pH 7,4 gewaschen. Der Blot wurde für 2 – 3 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem 1. Antikörper unter Schwenken inkubiert, wobei die Membran von der ersten Antikörperlösung ausreichend bedeckt sein soll. Die Verdünnung des Antikörpers (1 : 500) erfolgte in

TTBS. Die erste Antikörperlösung wurde entfernt und es folgte dreimaliges Waschen mit TTBS für je 10 min bei RT. Die Nitrocellulose-Membran wurde nun mit dem zweiten Antikörper (Anti-Rabbit IgG, Peroxidase-konjugiert) für 1 – 2 h bei RT unter langsamem Schwenken inkubiert und anschließend dreimal für je 10 min mit TTBS gewaschen. Die Verdünnung des zweiten Antikörpers (1 : 2000) erfolgte in TTBS.

Die Detektion erfolgte mittels ECL (Enhanced chemiluminescence)-Technik. Bei dem ECL-Reagenz handelt es sich um eine Fertigs substratmischung mit z.T. unbekannter Zusammensetzung. Dabei oxidiert die an dem sekundären Antikörper gebundene Peroxidase das Luminol. Das Produkt fluoresziert und schwärzt einen aufgelegten Röntgenfilm.

Die Blot-Membran wurde auf eine Folie gelegt, mit ECL-Lösung (400 µl Lösung I, 400 µl Lösung II) benetzt und mit einer zweiten Folie luftblasenfrei abgedeckt. Ein Röntgenfilm wurde nun auf die folienbedeckte Membran aufgelegt (ohne sie zu verschieben) und für 10 - 60 sek exponiert. Der Röntgenfilm wurde nach folgendem Schema entwickelt: 2 min Entwickler, 30 sek Zwischenwässerung, 5 - 10 min Fixierer und 15 min Wasser. Die ECL-Reaktion wurde in der Dunkelkammer durchgeführt.

### **Zellbiologische Methoden**

#### **2.6 HEK 293-Zellen**

Für die Amplifikation der Adenoviren wurden HEK 293-Zellen in Monolayer Kultur verwendet. Bei HEK 293-Zellen (Human Emryonic Kidney) handelt es sich um eine Zelllinie, die durch Einführung eines Teils des Genoms von Adenoviren Typ 5 in menschliche embryonale Nierenzellen entstanden ist. Sie hat einen kleinen DNA-Bereich aus dem linken Ende des viralen Genoms (E1-Region; Abbildung 6) ins zelluläre Genom integriert. Durch die konstitutive Expression der E1-Gene ist diese Zelllinie in der Lage, Ad5-Mutanten mit einer Deletion in der essentiellen E1-Region zu komplementieren. Der produktive Zyklus führt zur Lyse der infizierten Zellen und Freisetzung der rekombinanten Viren.

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

### **2.6.1 Kultivieren von HEK 293-Zellen**

Zur Kultivierung von HEK 293-Zellen wurden 250 ml Zellkulturflaschen mit integrierten hydrophoben Filtern in der Schraubkappe (Durch diesen Filter wird ein optimaler Gas-Austausch garantiert) oder Zellkulturschalen benutzt. Um die Adhäsion der Zellen zu verbessern, wurden die Zellkulturgefäße zuvor mit Kollagen-PBS-Lösung (Rat tail Kollagenase, 50 µg/ml) beschichtet und für 10 - 15 min bei 37 °C stehen gelassen. Es wurden ca.  $1 \times 10^6$  Zellen in einer Kulturflasche bzw. Kulturschale mit 25 ml bzw. 15 ml HEK-Medium kultiviert. HEK-Medium enthält DMEM als Kulturmedium und zusätzlich 10 % FCS, 1 % L-Glutamin und 1 % P/S. FCS steht für fetales Kälberserum („fetal calf serum“), das vor Gebrauch bei 56 °C für 30 min inaktiviert wurde. Die Hitzeinaktivierung vermindert oder beseitigt ganz allgemein störende Einflüsse verschiedenster Art aus dem Serum. L-Glutamin ist für kultivierte Zellen eine essentielle Aminosäure. Penicillin und Streptomycin (P/S) setzt man dem Medium bei, um einer Bakterienkontamination oder Bakterienvermehrung vorzubeugen. Es folgte eine 3 - 4 tägige Inkubation bei 37 °C in einem CO<sub>2</sub>-Brutschrank (5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luft), wobei ein Wasserreservoir mit großer Oberfläche für eine wasserdampf-gesättigte Atmosphäre sorgte.

### **2.6.2 Subkultivieren (Passagieren) von HEK 293-Zellen**

War die gesamte Kulturfläche der Flasche bzw. Schale von Zellen bedeckt (konfluent), so mussten die Zellen auf neue Flaschen bzw. Schalen verteilt werden. Bei hoher Zelldichte sinkt die Proliferationsrate stark ab, was zum Absterben der Zellen führen kann. Deshalb ist es notwendig, die Zellen nach erreichter Maximaldichte zu teilen. Dies geschieht durch das Passagieren der Zellen: Zunächst wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden mit 5 ml Citrat-Salz-Lösung bzw. mit Isotonischer Kochsalzlösung kurz gewaschen und anschließend mit 3 - 4 ml Citrat-Salz-Lösung für 1 - 5 min bei RT inkubiert. Inkubationszeiten über 5 min können die Zellen irreversibel schädigen. Während der Inkubation wurden die Zellen durch Klopfen oder Schlagen auf die Unterseite der Kulturflasche oder Kulturschale abgelöst sowie durch Spülen mit 7 ml HEK-Medium in Suspension gebracht. Mit einer Pipette wurden noch lose anhaftende Zellen abgespült. Die HEK 293-Zellen wurden durch Zentrifugation (500 x g, < 5 min, 20 °C) vom alten Medium getrennt.

Das Zellsediment wurde in frischem HEK-Medium aufgenommen. Die so erhaltene Zellsuspension wurde auf neue Kollagen-beschichtete Kulturflaschen oder Kulturschalen verteilt und mit HEK-Medium überschichtet. Eine Passage war in der Regel nach 3 - 4 Tagen erforderlich.

## **2.7 Amplifikation rekombinanter Adenoviren in HEK 293-Zellen**

Zur Gewinnung rekombinanter Adenoviren in größeren Mengen war es notwendig, die Adenoviren durch mehrmalige Infektion von HEK 293-Zellen zu amplifizieren.

### **2.7.1 Transfektion des Ligationsproduktes in HEK 293-Zellen**

Die Übertragung proteinfreier DNA in Zellkultur-Zellen wird als Transfektion bezeichnet. Die Effizienz, d.h. der Anteil an transfizierten Zellen, ist sehr stark vom Zelltyp und den jeweiligen Bedingungen (Zelldichte, DNA-Konzentration, Dauer der Inkubation) abhängig. Sobald die HEK 293-Zellen zu 30 - 50 % konfluent waren, erfolgte die Lipofectamin<sup>®</sup>-vermittelte Transfektion der homologen Rekombinanten. Zur Lipofektion war ein Gemisch aus dem kationischen Lipid, N[1-(2,3-dioleoyl-oxy) propyl]-N,N,N-trimethylammoniumchlorid (DOTMA), mit einem ungeladenen Helferlipid, z.B. L-Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) verwendet. Er erleichtert die Fusion der Vesikel mit der Zelle und die Aufnahme der DNA in die Zellen. Die Lipofektion liefert häufig hohe Transfektionseffizienzen.

Die DNA des jeweiligen rekombinanten Adenovirus wurde mit Pac I linearisiert und mit Hilfe von Lipofectamin<sup>®</sup> in HEK 293-Zellen transfiziert. Hierzu wurden 6 cm-Kulturschalen mit HEK 293-Zellen herangezogen. Dabei war es wichtig, dass sich die HEK 293-Zellen in einer niedrigen Passage befanden, d.h. noch nicht so häufig subkultiviert worden waren, einen Zellrasen bildeten und noch nicht konfluent waren (30 - 50 %), da sie bis zum Einsetzen der Zelllyse, ungefähr nach 5 - 10 Tagen, nicht erneut passagiert werden sollten. 4 µg Pac I linearisierte Plasmid-DNA wurde in 1 ml serumfreiem Medium verdünnt, 20 µl Lipofectamin<sup>®</sup> zugegeben, durch Auf- und Abpipettieren gut gemischt und die Mischung für 15 min bei RT inkubiert. Die HEK 293-Zellen wurden in der Zwischenzeit zweimal mit je 2 ml serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und

die Lipofectamin-DNA-Mischung vorsichtig auf die Mitte der Schalen getropft, damit die HEK 293-Zellen nicht abgelöst werden. Das geringe Volumen soll eine optimale Adsorption der Liposomen-DNA-Komplexe an die Zelloberfläche ermöglichen und somit die Transfektionseffizienz verbessern. Die Transfektion wurde in serumfreien Medien durchgeführt, da kationische Lipide teilweise sehr effizient von Serumproteinen adsorbiert werden. Nach 20 min Inkubation im Zellinkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden 4 ml serumhaltiges Medium (HEK-Medium) zugegeben und für weitere 48 h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium gegen serumhaltiges Medium ausgetauscht und die Zellen weiterkultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen wie bei der Transfektion, jedoch ohne Zugabe von DNA bzw. Transfektionsreagenz behandelt. Zum Schluss wurde das Medium bis zur Lyse der Zellen nicht mehr gewechselt, um die Adenoviren, die nach Lyse der Zellen in den Überstand freigesetzt wurden, zu erhalten. Die erfolgte Transfektion wurde durch Expression des Reportergens GFP (grün-fluoreszierendes Protein) unter dem Fluoreszenz-Mikroskop verifiziert.

### **2.7.2 Infektion der HEK 293-Zellen mit Adenoviren (Virus-Large-Scale)**

Die noch anhaftenden Virus-produzierenden Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und zusammen mit den nach der Lyse der Zellen in den Überstand freigesetzten Adenoviren in 50 ml Falcon Röhrchen überführt. In 3 – 4 Zyklen wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37 °C aufgetaut. Dadurch sollten die noch intakten Zellen aufgebrochen und alle Viren freigesetzt werden. Die Zelltrümmer wurden von dem Überstand durch Zentrifugation (800 x g, 5 min, 4 °C) abgetrennt. Neue HEK 293-Zellen wurden in der Zwischenzeit mit 5 ml serumfreiem Medium gewaschen. HEK 293-Zellen in 10 cm- oder 15 cm-Kulturschale eignen sich für die Infektion mit Ad5, wenn sie zu 60 - 80 % konfluent sind. Anschließend wurde das serumfreie Medium abgesaugt und der Virus-Überstand (≈ 3,5 ml) vorsichtig auf die Mitte der 10 cm-Kulturschale getropft, damit die Zellen nicht abgelöst wurden. Das geringe Volumen des Infektionsansatzes und eine Inkubation im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) für 10 - 30 min sollte durch eine verbesserte Adsorption der Viren an die Zelloberfläche eine optimale Transduktionseffizienz ermöglichen. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Zellen mit 12 ml HEK-Medium überschichtet.

Nach der vollständigen Lyse der Zellen in den 10 cm-Kulturschalen und somit der Freisetzung der Adenoviren in den Überstand (etwa nach 5 Tagen) wurden die rekombinanten Adenoviren in 40 (bis 50) 15 cm-Kulturschalen weitervermehrt. Die lysierten Zellen ( $\approx 20$  ml) wurden in 50 ml Falcon Röhren überführt und mit serumfreiem Medium auf 42 ml aufgefüllt. 420  $\mu$ l P/S (1/100 des Volumens) wurde zugegeben. Das Medium der HEK 293-Zellen in den 15 cm-Kulturschalen wurde abgesaugt, 1 ml lysierte Zellen pro Schale zugegeben, 15 min im Zellinkubator (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert und anschließend die Zellen mit 22 ml HEK-Medium überschichtet. Innerhalb der nächsten 20 - 48 h wurden die Zellen beobachtet.

### **2.7.3 Cäsiumchlorid (CsCl) - Gradient zur Aufreinigung**

Infolge der Virusvermehrung kommt es 20 - 48 h nach der Infektion zur Zerstörung der HEK 293-Zellen und zur Freisetzung der Viren (Lyse). Die Standardmethode zur Aufreinigung und Konzentrierung der Viren ist die CsCl-Gradient-Aufreinigung. Bei dieser Methode wurden die infizierten HEK 293-Zellen bei beginnender Lyse geerntet. Vor Beginn der Zelllyse zeichneten sich die HEK 293-Zellen dadurch aus, dass sie „aufquollen“. Die anhaftenden Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst und der Überstand und Zellbruch in 50 ml Falcon Röhren auf Eis überführt. Es wurde bei 500 x g für 5 min (4 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf ein geringes Volumen von 5 - 10 ml abgesaugt. Das Zellpellet wurde im restlichen Überstand resuspendiert und in 3 - 4 Zyklen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei 37 °C aufgetaut. Es folgte eine Inkubation mit 35 mM MgCl<sub>2</sub>, 6  $\mu$ g/ml DNase I und 100  $\mu$ g/ml RNase A für 30 min bei 37 °C und Zentrifugation für 30 min bei 1500 x g und 4 °C. Der Überstand wurde zweimal für 2 min mit dem gleichen Volumen Trichlortrifluorethan extrahiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer von dem Überstand, der die Viren enthielt, durch Zentrifugation (1500 x g, 5 min, 4 °C) abgetrennt. Der nach Trichlortrifluorethan-Extraktion erhaltene virushaltige Überstand wurde vorsichtig auf den CsCl-Gradienten geschichtet.

Der CsCl-Dichtegradienten wurde hergestellt (Tabelle 6), indem zuerst die Lösung mit der geringsten Dichte in das Zentrifugationsröhrchen pipettiert und vorsichtig mit der CsCl-Lösung höherer Dichte unter Zuhilfenahme einer Spritze und Kanüle unterschichtet wurde.

	Leichter CsCl-Stock	Schwerer CsCl-Stock
CsCl	11,02 g	21,1 g
VSB	ad 50,00 g	ad 50,00 g
Dichte	22,4 % (w/w)	42,2 % (w/w)
Kontrolle	1 ml $\cong$ 1,2 g	1 ml $\cong$ 1,46 g

Tabelle 6 **Zusammensetzung der CsCl-Gradienten.** Der CsCl-Gradient besteht aus der schwereren, unteren {42,2 % (w/w)} und der leichteren, oberen {22,4 % (w/w)} CsCl-Phase und wurde in den Ultrazentrifugationsröhrchen vorbereitet.

Zentrifugiert wurde in einem Schwenkbecher-Rotor. In den Schwenkbecher-Rotor werden bewegliche Zentrifugenbecher am Rand des Rotorkörpers eingehängt, die während des Laufes ausschwingen. Nach Zentrifugation über Nacht (20 h) in der Ultrazentrifuge (100000 x g, 4 °C) stellt sich ein kontinuierlicher Dichtegradient ein. Makromoleküle, die sich bei der Zentrifugation in der CsCl-Lösung befinden, bilden an bestimmten Stellen des Gradienten Banden. Wo die jeweiligen Moleküle sich genau sammeln, hängt von ihrer Schwimmdichte ab. Für DNA liegt die Dichte bei etwa 1,7 g/cm<sup>3</sup>. Deshalb wandert die DNA in dem Gradienten an die Stelle, an dem die Dichte der CsCl-Lösung ebenfalls diesen Wert erreicht. Proteine (leere Kapside) haben dagegen eine geringere Dichte und schwimmen deshalb oberhalb der DNA im Ultrazentrifugationsröhrchen (Abbildung 8). Da sich Proteine (leere Kapside) und DNA in ihrer Dichte unterscheiden, kann man diesen Gradienten zur DNA-Reinigung nutzen.

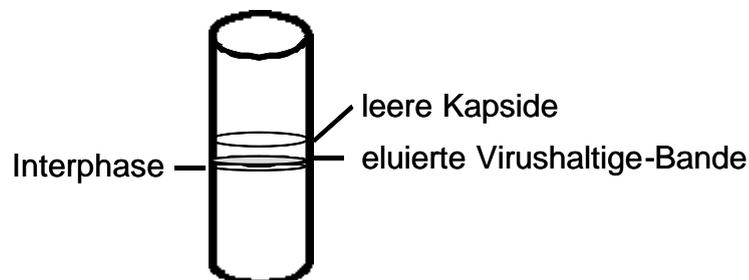


Abbildung 8 **Schematische Darstellung der Ad5-Virus-Bande.** Eine dünne weiße Bande (eluierte Bande, rekombinante Viren) an der Interphase zwischen der leichten (22,4 %) und schweren (42,2 %) Phase des CsCl-Gradienten und eine etwas dickere weiße Bande (leere Kapside) im oberen Drittel des Ultrazentrifugationsröhrchen waren nach der Ultrazentrifugation sichtbar.

Die untere Bande (Ad5-Virus-Bande an der Interphase) wurde mit einer Spritze nach Anstechen des Ultrazentrifugationsröhrchens abgesaugt. Die virushaltige Suspension wurde in einem Dialyseschlauch (Slide-A-Lyzer<sup>®</sup> Kassete) zweimal für je 2 h gegen PBS und einmal über Nacht gegen VSB (Virus Storage Buffer) bei 4 °C dialysiert. Die dialysierte Virussuspension wurde mit dem gleichen Volumen VSB / 50 %-igem Glycerol versetzt, aliquotiert und bei – 20 °C gelagert.

## **2.8 Bestimmung des Virustiters**

Um schneller und einfacher den Virustiter zu bestimmen, als mit einem biologischen Assay (z.B. Plaque Assay,  $\beta$ -Gal-Test), wurden 100  $\mu$ l aufgereinigter Virussuspension deproteinisiert, so dass nur die Virus-DNA vorhanden war. Diese wurde auf einem 0,8 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand der Bandendicke war es möglich, eine grobe Abschätzung des Virustiters vorzunehmen (siehe Abschnitt 4.2.3).

### **2.8.1 Deproteinierung der Virussuspension**

Zu je 100  $\mu$ l Virussuspension wurden 5  $\mu$ l Proteinase K (10 mg/ml) sowie 2,7  $\mu$ l SDS 20 % (w/v) zugefügt und 2 h bei 55 °C inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf 300  $\mu$ l aufgefüllt und dreimal mit je 300  $\mu$ l Chloroform vorsichtig ausgeschüttelt. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) bewirkt die Auflösung der Virushülle. Proteinase K baut die Polypeptide zu kleineren Molekülen ab, die sich mit Chloroform ausschütteln lassen. Dieses organische Lösungsmittel fällt die Proteine aus, während die DNA in der wässrigen Lösung bleibt. Die Phasen wurden jedesmal durch Zentrifugation bei 100 x g für 8 min bei RT getrennt, die wässrige Phase mit einer Pipette abgenommen und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Proteine befinden sich als weiße zusammengeballte Masse in der Interphase.

### **2.8.2 Konzentrierung der DNA**

Die wässrigen Phasen wurden in einem 1,5 ml-Eppendorfgefäß vereinigt. Die wässrige DNA-Lösung wurde vorsichtig auf den Centrikon-Mikrokonzentratoren (Centricon-100, Millipor), der in ein 2 ml-Auffanggefäß gestellt wurde, pipettiert und für 40 min bei 2500 x g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde nacheinander zweimal je 2 ml Aqua bidest auf den Mikrokonzentratoren gegeben, und je 40 min bei 2500 x g und 4 °C gewaschen. Zur Elution der DNA wurde der Mikrokonzentratoren umgedreht, in ein sauberes Auffanggefäß gestellt und für 5 min bei 1180 x g und 4 °C zentrifugiert. Er wurde dann mit 35 µl Aqua bidest nachgespült und für 5 min bei 1180 x g und 4 °C zentrifugiert. Die eluierte DNA wurde anschließend zur Bestimmung des Titors direkt in der Agarosegel-Elektrophorese eingesetzt.

### **2.8.3 Darstellung der Virus-DNA in der Agarosegel-Elektrophorese**

Zunächst wurde eine Verdünnungsreihe (10, 20, 30, 50, 100, 200, 300 und 500 ng) von Plasmid-DNA (pAdEasy-1) bekannter Konzentration mit Aqua bidest hergestellt. Dann wurde 100 ml 0,8 % Agarose in TBE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht, nach Abkühlung auf ca. 50 °C 2 µl Ethidiumbromid hinzugefügt und in einem gereinigten Gelträger blasenfrei gegossen. Nach Erstarren wurde das Gel in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt (vergleiche Abschnitt 2.1.1). Es wurden 10, 20 oder 30 µl der aufgereinigten Virus-DNA, die Verdünnungsreihe und der DNA-Größenstandard (Eco RV / Hind III geschnittene λ-Phagen DNA) mit 2 oder 3 µl DNA-Ladefarbe versetzt und auf das Gel mitaufgetragen. Die Laufzeit betrug 1 h bei 120 V. Die Banden wurden unter UV-Licht betrachtet und fotografiert (siehe Abschnitt 4.2.3).

## **2.9 Isolierung von Kardiomyozyten neonataler Ratten**

Die *in vitro*-Kultur von Zellen, Geweben und Organen, die direkt aus dem Organismus entnommen werden, wird als Primärkultur bezeichnet. Die für die Zellkultur verwendeten Kardiomyozyten wurden aus den Herzen neonataler Ratten gewonnen. Es lag eine Genehmigung der Tierschutz-Kommission vor.

Die Isolation von Herzzellen neonataler Ratten wurde in Anlehnung an ein von Simpson und später von Zimmermann und Mitarbeitern beschriebenes Protokoll durchgeführt (Simpson 1983, Zimmermann et al. 2000). Für die Gewinnung von Kulturzellen ist eine vollständige Dissoziation des Gewebes bzw. des Organs notwendig. Das Gewebe kann entweder durch mechanische oder enzymatische Dissoziation in Einzelzellen zerlegt werden. Die Methode der Wahl ist die Gewinnung von Primärkulturen auf enzymatischem Weg. Das Gewebe sollte vorher mit einem Skalpell oder einer Schere möglichst fein zerschnitten werden. Trypsin erzielt oft die beste und vollständigste Dissoziierung von Gewebe in Einzelzellen. DNase II wird bei der Trypsinierung von Geweben eingesetzt, um freigesetzte DNA, die die Aggregation von Einzelzellen fördert, zu hydrolysieren.

Bei den verwendeten neonatalen Ratten handelte es sich um Wistar-Ratten. Sie wurden von der Tierhaltung des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf gezüchtet. Die Muttertiere wurden bei handelsüblichem Laborfutter und Leitungswasser ad libitum gehalten. Die neonatalen Wistar-Ratten waren zwischen null (Tag der Geburt) und drei Tage alt und beiderlei Geschlechts. Die in der folgenden Beschreibung erwähnten Mengenangaben beziehen sich auf eine Präparation mit ca. 40 - 85 Tieren.

Die Tiere wurden dekapitiert, durch einen zum Sternum parallelen Schnitt wurde der Thorax eröffnet und das Herz vorsichtig mit einer Pinzette entnommen. Dieses wurde umgehend in eine 100 mm-Petrischale gegeben, die mit 10 ml sterilem, einfach konzentriertem PBS (Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung) gefüllt war. Nachdem sämtliche Herzen entnommen waren, wurden die Vorhöfe und Gefäßreste mit einer Schere vorsichtig entfernt. Das ventrikuläre Myokard wurde in eine weitere Zellkulturschale mit sterilem Calcium- und Bikarbonatfreiem Hanks-Puffer mit HEPES (CBFHH) überführt, in welcher es zweimal mit CBFHH gespült wurde. Nach vorsichtigem Absaugen der CBFHH-Lösung wurden ca. 2 ml CBFHH hinzupipettiert und das Gewebe mit einer gebogenen Schere fein zerschnitten (ca. 9 min). Diese Suspension von Gewebeteilen wurde mit einer Pipette, welche über eine weite Öffnung ( $\varnothing$  3 mm) verfügte, in ein steriles 50 ml-Falcon Röhrchen überführt. Die Petrischale wurde zweimal mit jeweils 5 ml CBFHH nachgespült und die Suspension in das Falcon Röhrchen gegeben. Der Überstand wurde nach Absetzen des Gewebepellets verworfen. Das Pellet wurde in 10 ml Trypsin-Arbeitslösung in CBFHH für 20 min bei 4 °C auf einem

rotierenden Schüttler geschwenkt. Dieser Trypsinverdaulich löste Zellen des Herzgewebes aus ihrem Verband und führte dadurch zu einer deutlichen Trübung der Suspension. Nach einer kurzen Absetzphase wurde der erste Überstand, welcher vorwiegend Zellbruch und Erythrozyten enthielt, vorsichtig abgesaugt und verworfen. Das Gewebepellet wurde in weiterer 10 ml Trypsin-Arbeitslösung für 12 min bei RT unter rotierenden Bewegungen inkubiert. Der Überstand wurde in ein mit 2,5 ml aktivem FCS gefülltes Sammelröhrchen (auf Eis gelagert) pipettiert. Das aktive FCS wurde zur Inaktivierung des Trypsins verwendet. Das verbleibende Pellet wurde in 9 ml DNase II-Arbeitslösung durch wiederholtes Auf- und Abpipettieren (27 mal) dissoziiert. Durch das Triturieren der Suspension 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 Sammelröhrchen überführt. Diese Schritte des Trypsinverdaulich und der DNase-Behandlung mit dem jeweiligen Überführen des Überstandes in das Sammelröhrchen wurden mit einer langsamen Verringerung der zugesetzten Volumina und der Trypsin-Expositionszeit fortgeführt. Die Anzahl der Zyklen und damit die Dauer des Verdaulich ließen sich nicht eindeutig festlegen, da diese multifaktoriell beeinflusst wurden (Tieranzahl, Zerkleinerungsgrad des Herzgewebes, Wirksamkeit des Trypsins). Der kombinierte Trypsin-DNase-Verdaulich wurde so lange wiederholt, bis das Gewebe sich fast zur Gänze aufgelöst hatte und es zu keiner weiteren Trübung des Überstandes (als Ausdruck aus dem Gewebeverband gelöster Zellen) kam. Es konnten in der Regel 4 - 6 Sammelröhrchen á 50 ml gefüllt werden. Die gekühlten Sammelröhrchen wurden dann in einer auf 4 °C vorgekühlten Ausschwingrotor-Zentrifuge bei 60 x g für 15 min zentrifugiert und die Überstände verworfen, da sich die Zellen als Pellet am Boden abgesetzt haben sollten. Die Zellpellets mit ca. 1 ml Restvolumen vom Überstand wurden in 2 ml Minimal Essential Medium (MEM), welches 10 % inaktives FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) enthielt, resuspendiert. Nach Vereinigen aller Zellpellets in einem Falcon Röhrchen wurden die restlichen Röhrchen nochmals mit je 2 ml MEM (10 % FCS i.a. , 1 % P/S) gespült, um eventuell verbliebene Herzmuskelzellen vom Röhrchenboden auszuwaschen. Je nach Volumen wurde dann auf jeweils 10 ml Suspension 100 µl DNase II-Stammlösung hinzugefügt. Die Zellsuspension wurde mit der weitlumigen Pipette mehrmals trituriert, um einem

Verkleben vorzubeugen und wieder bei 60 x g für 15 min zentrifugiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Zellpellet in 32 ml MEM aufgenommen. Die Zellsuspension wurde über ein vorher mit MEM befeuchtetes Zellsieb ( $\text{\O} 60 \mu\text{m}$  Porengröße) gegeben und zu gleichen Teilen auf vier 10 cm-Kulturschalen verteilt. Um die Kardiomyozyten von den Nichtkardiomyozyten (kardiale Fibroblasten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen) zu trennen, wurden die Kulturschalen für eine bis zwei Stunden in Brutschrank bei 37 °C (5 %  $\text{CO}_2$  , 95 %  $\text{O}_2$ ) inkubiert (Preplating). Diese Zeit reichte aus, um aufgrund unterschiedlicher Anheftungseigenschaften am Boden der Kulturschale eine weitgehende Trennung von Nicht-Kardiomyozyten und Kardiomyozyten zu erreichen. Die Nicht-Kardiomyozyten wuchsen am Schalenboden fest, während die Herzmuskelzellen überwiegend noch frei im Nährmedium schwammen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Kardiomyozyten von den Kulturschalen durch Abpipettieren des Überstandes und Überführen in ein Sammelröhrchen gewonnen.

### **2.9.1 Zellzahlbestimmung**

Die absolute Zellzahl der Kardiomyozyten wurde in einer Neubauer-Zählkammer (Hämocytometer) bestimmt. Nach guter Durchmischung der Zellsuspension wurde ein Tropfen auf jede Seite einer Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellen ausgezählt. Es wurden drei bis vier Zählungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet. Das Ergebnis wurde mit 10000 multipliziert, um die Zellzahl pro ml zu erhalten. Die Gesamtzellzahl ergab sich durch Multiplikation des Volumens der Zellsuspension mit der Zellzahl pro ml. Die mittlere Ausbeute betrug 2 - 3 x  $10^6$  Zellen pro Herz.

### **2.9.2 Aussäen der Zellen**

Die Zellen wurden anschließend auf die errechnete Konzentration zur Herstellung von Kardiomyozyten-Monolayern mit dem Medium verdünnt und auf neue Gewebekulturschalen verteilt. Die Kultivierung der Kardiomyozyten erfolgte mit MEM-Medium. Es enthielt 10 % hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum und 1% Penicillin/Streptomycin zur Antibiose. Damit die Herzmuskelzellen nicht von teilungsfähigen Fibroblasten überwuchert wurden, war zusätzlich 0,1 mM 5-Bromo-2'-Desoxyuridin (BrdU; ein Thymidin-Analogon) enthalten. BrdU, ein sogenannter Antimetabolit, blockiert die Proliferation und stört in den Zellen die DNA-Replikation.

Es hat sich gezeigt, dass die Zellkulturbedingungen einen Einfluss auf die Ergebnisse haben können. Zum Beispiel zeigen Zellkulturen mit einer niedrigeren Zelldichte (20000 Zellen/cm<sup>2</sup>), dass der Effekt von Noradrenalin auf das Hypertrophie-Markergen skeletales  $\alpha$ -Aktin ausschließlich über die Stimulation von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren vermittelt wird (Simpson 1990, Bishopric und Kedes 1991). Untersucht man hingegen Zellkulturen mit einer hohen Zelldichte (100000 Zellen/cm<sup>2</sup>), wird der Effekt von Noradrenalin auf die Promotoraktivität von skeletalem  $\alpha$ -Aktin ausschließlich über  $\beta$ -Adrenozeptoren vermittelt (Bishopric und Kedes 1991). Wir haben für die hier gezeigten Untersuchungen 3 Millionen neonatale Herzmuskelzellen pro 6 cm-Gewebekulturschale in 3 ml MEM-Medium (10 % FCS <sub>i.a.</sub>, 1 % P/S, 1 % BrdU) im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) kultiviert.

### **2.9.3 Kultivierung von Kardiomyozyten**

Die Kardiomyozyten brauchten in der Regel einen Tag, bis sie am Boden der Gewebekulturschale festgewachsen waren und einen gleichmäßigen Zellrasen (Monolayer) ausgebildet hatten. Nach spätestens zwei Tagen fingen die Zellen an zu schlagen, indem sich zuerst einzelne Zellen später größere Zellverbände kontrahierten. Die direkt nach der Präparation polymorphen Zellen mit rundem oder stabförmigem Aspekt begannen beim Festwachsen auf der 6 cm-Zellkulturschale, sich einheitlich abzuflachen und abzurunden. Die damit verbundene Ausdehnung führte zum Zusammenwachsen der Zellen. War dieses Wachstum abgeschlossen, veränderte sich die Morphologie im weiteren Verlauf nicht wesentlich. Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurden das Wachstum und das morphologische Erscheinungsbild der Kardiomyozyten in der Zellkultur verfolgt.

Der Tag der Zellpräparation wurde als Tag 0 bezeichnet. Am zweiten Tag nach der Präparation wurde der erste Mediumwechsel durchgeführt, da die vitalen Zellen sich nicht mehr vom Boden lösten. Dieser Vorgang wurde je nach Versuchsbedingung am vierten Tag wiederholt.

## **2.10 Phospholipase C- und Phospholipase D–Aktivitätsmessung in HEK 293-Zellen**

### **2.10.1 Infektion der HEK 293-Zellen**

Mit den in Abschnitten 2.3 und 2.7 hergestellten, vermehrten und aufgereinigten rekombinanten Adenoviren wurden HEK 293-Zellen infiziert. HEK 293-Zellen in Zellkulturschalen eignen sich für die Infektion mit Ad5, wenn sie zu 60 - 80 % konfluent sind. Pro 15 cm-Zellkulturschale wurde 20 ml Adenoviren-haltiges HEK-Medium auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 24 h – 4 d bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### **2.10.2 Markierung der HEK 293-Zellen**

Nach 24 h – 4d Inkubation erfolgte die radioaktive Markierung der Zellen. Transfizierte HEK 293-Zellen auf 15 cm-Zellkulturschalen wurden mit 0,5 µCi/ml <sup>3</sup>H-myo-Inositol und / oder 2 µCi/ml <sup>3</sup>H-Ölsäure versetzt und für etwa 24 h in dem Brutschrank (37 °C / 5 % CO<sub>2</sub>) inkubiert.

### **2.10.3 Bestimmung der PLC- und PLD-Aktivität in HEK 293-Zellen**

Die HEK 293-Zellen wurden nach erfolgter Infektion und radioaktiver Markierung von den 15 cm-Zellkulturschalen abgelöst und durch Zentrifugation für 5 min bei 4 °C und 500 x g pelletiert. Anschließend wurde in HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) eine Zellzahl von 1 x 10<sup>7</sup> Zellen/ml eingestellt. Die Versuche fanden in einem Gesamtvolumen von 200 µl HBSS-Puffer (komplementiert mit 400 mM Ethanol), in welchem die verschiedenen Agonisten enthalten waren, statt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 µl Zellsuspension bei 37 °C gestartet. Nach 1 h Inkubation wurde die Reaktion durch Zugabe von 2 ml Chloroform/Methanol (1/1 ; v/v) auf Eis gestoppt. Zur Phasenextraktion wurde 1 ml Aqua ad injectabilia zugefügt. Die Proben wurden gemischt und bei 4 °C und 1180 x g für 10 min zentrifugiert. Die weitere Aufarbeitung erfolgte wie bei den Kardiomyozyten der neonatalen Ratten in Abschnitten 2.11.3.1 und 2.11.3.2.

## **2.11 Phospholipase C- und Phospholipase D–Aktivitätsmessung in Kardiomyozyten neonataler Ratten**

### **2.11.1 Infektion der Kardiomyozyten der neonatalen Ratten**

Mit den in Abschnitten 2.3 und 2.7 hergestellten, vermehrten und aufgereinigten rekombinanten Adenoviren wurden die Kardiomyozyten am Tag 4 nach Präparation infiziert. Die Infektion wurde ausschließlich bei Kardiomyozyten durchgeführt, die sich in morphologisch gutem Zustand befanden und regelmäßig kontrahierten.

Die Kardiomyozyten wurden mit serumfreiem MEM-Medium gewaschen. Pro 6 cm-Zellkulturschale wurden 1 ml Adenoviren-haltiges MEM-Medium (serumfrei) auf die Zellen pipettiert. Es folgte eine Inkubation von 20 min bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Danach wurde das Medium auf 4 ml mit MEM-Medium aufgefüllt. Zwei Tage nach Infektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt.

Zur Bestimmung der optimalen Infektionszahl wurden Kulturen von Kardiomyozyten neonataler Ratten mit Ad5-LSCII-RGS bzw. Ad5-KIAA380-RGS in verschiedenen Konzentrationen für 4 Tage infiziert. Zur Ermittlung der optimalen Infektionszeit wurden Kulturen von Kardiomyozyten neonataler Ratten an verschiedenen Tagen (7, 4, 3, 2 und 1 d) mit einer bestimmten Dosis von Ad5-LSCII-RGS bzw. Ad5-KIAA380-RGS infiziert. Nach Beenden der Inkubationszeit wurde das Medium abgesaugt. Die Zellen wurden fotografiert (siehe Abschnitt 4.2.5), mit 3 ml PBS kurz gewaschen, anschließend mit 200 µl Murakami-Puffer überschichtet, mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Der Proteingehalt wurde nach der Bradford-Methode bestimmt. Die optimale Transduktionseffizienz und Infektionszeit wurde mit Hilfe des Western Blots ermittelt.

### **2.11.2 Markierung der Kardiomyozyten der neonatalen Ratten**

Zur Bestimmung der Phospholipase C (PLC)- (nach Abschnitt 2.11.3.1.1) und Phospholipase D (PLD)-Aktivität wurden noch nicht infizierte oder infizierte Kardiomyozyten der neonatalen Ratten mit 2 µCi/ml <sup>3</sup>H-myo-Inositol und / oder 2,5 µCi/ml <sup>3</sup>H-Ölsäure versetzt und für 24 h (>12 h) im Brutschrank inkubiert.

### **2.11.3 Bestimmung der PLC- und PLD-Aktivität in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten**

Die Bestimmung der PLC-Aktivität erfolgte mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden (siehe Abschnitt 2.11.3.1). Die PLD-Aktivität wurde nach Markierung der Zellen mit  $^3\text{H}$ -Ölsäure als Bildung von Phosphatidylethanol bestimmt. Dabei wurde die Aktivität unter Basalen und verschiedenen Stimulationsbedingungen gemessen [Stimuli: Endothelin-1 (1  $\mu\text{M}$ ), Thrombin (1 U/ml), Noradrenalin (10  $\mu\text{M}$ ), Nadolol (1  $\mu\text{M}$ ), Noradrenalin/Nadolol (10  $\mu\text{M}$  / 1  $\mu\text{M}$ ), Pertussis-Toxin (100 ng/ml)].

Es wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Jede Dreiergruppe wurde im Minutentakt (55, 60, 65 sek) weiterbehandelt. Das Medium wurde nach Beendigung der Markierungszeit direkt abgesaugt. Zur Equilibrierung wurden 1000  $\mu\text{l}$  HBSS/LiCl, versetzt mit 2,34 % (400 mM) Ethanol (ETOH), auf die Kardiomyozyten gegeben und 10 – 15 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Der Zusatz von LiCl zum HBSS-Puffer verhinderte den Abbau der gebildeten Inositol-Phosphate und ermöglichte so deren Akkumulation. Durch den Zusatz von ETOH im Reaktionsansatz wurde die PLD-Aktivität als die spezifische Bildung von  $^3\text{H}$ -Phosphatidylethanol (PET) messbar. Nach der Equilibrierung wurde der HBSS/LiCl-Puffer vorsichtig abgesaugt. Die Zugabe der Stimulantien bzw. Hemmstoffe erfolgte in 1000  $\mu\text{l}$  HBSS/LiCl pro Schale. Die Schalen wurden im Brutschrank bei 37 °C für 30 min inkubiert. Danach wurde die Reaktion durch Absaugen der Lösung und Zugabe von 500  $\mu\text{l}$  kaltem Methanol (MeOH) bzw. 500  $\mu\text{l}$  kalter NaOH (zur Bestimmung der Proteinkonzentration) gestoppt. Die Kardiomyozyten wurden bei RT mit Hilfe von "Rubber-policeman" abgelöst und in gut verschließbare 3 ml Sarstedt Röhrchen überführt. Die Zellkulturschalen wurden dann jeweils mit weiteren 500  $\mu\text{l}$  kaltem Methanol oder 500  $\mu\text{l}$  kaltem NaOH gewaschen und dieses Volumen ebenfalls in die 3 ml Sarstedt Röhrchen überführt. Zur Phasenextraktion wurde 1000  $\mu\text{l}$  Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ) und 500  $\mu\text{l}$  Aqua bidest zugegeben. Die Proben wurden gemischt und zur Phasentrennung 10 min bei 4 °C und 1180 x g zentrifugiert. Von den entstandenen 3 Phasen (wässrig/Proteine/Chloroform) wurde die obere Phase für die PLC- und die untere Phase zur Bestimmung der PLD-Aktivität abgenommen (Schmidt et al. 1994; Abbildung 9).

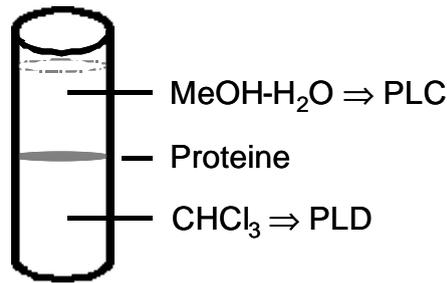


Abbildung 9 **Schematische Darstellung der Phasentrennung zur Bestimmung der Phospholipase C- und Phospholipase D-Aktivität.** MeOH: Methanol; H<sub>2</sub>O: Aqua bidest; CHCl<sub>3</sub>: Chloroform; PLC: Phospholipase C; PLD: Phospholipase D

### **2.11.3.1 Phospholipase C-Aktivitätsmessung**

Die Bestimmung der PLC-Aktivität erfolgte mit Hilfe von zwei verschiedenen Methoden, zum einen als die Bildung von zellulärem Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) und zum anderen als Akkumulation von Gesamt-Inositol-Phosphaten (IP<sub>x</sub>) in neonatalen Rattenkardiomyozyten und HEK 293-Zellen mit M3-muscarinischen Acetylcholinrezeptoren

#### **2.11.3.1.1 Bestimmung von Gesamt-Inositol-Phosphaten**

Die PLC-Aktivität wurde in diesem Assay als die Bildung aller Inositol-Phosphate (IP<sub>3</sub> < IP<sub>2</sub> < IP<sub>1</sub>) bestimmt. Die Zellen wurden durch das exogene Substrat <sup>3</sup>H-myo-Inositol radioaktiv markiert und die gebildeten <sup>3</sup>H-Inositol-Phosphate nach Extraktion im Szintillationszähler bestimmt. Die Bestimmung der Inositol-Phosphat-Menge erfolgte nach Schmidt und Mitarbeitern (1994).

Die Aufreinigung der Inositol-Phosphate erfolgte affinitätschromatographisch über Anionenaustauscher-Säulen. Für ca. 50 Säulen wurden 50 g Säulenmaterial (Ag 1X-8, BIO-RAD) in 100 ml Aqua bidest resuspendiert und 30 min bei RT gerührt. Das gequollene Harz sedimentierte und der Überstand wurde mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Das Sediment wurde danach in 100 ml Aqua bidest resuspendiert. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt. Die Säulen wurden vorsichtig mit 2 ml 50 %-iger Suspension (1 ml Säulenbettvolumen) gefüllt.

Nach der Phasenextraktion wurde 1 ml der wässrigen oberen Phase (Abbildung 9) abgenommen, direkt auf die Säule gegeben und komplett durchlaufen gelassen. Danach wurde die Säule mit 6 ml Aqua bidest und 5 ml 50 mM Ammoniumformiat / 0,1 M Ameisensäure gewaschen. Die unspezifische I. Phase (freies Inositol  $\approx$  Glycerophosphoinositol; 12 ml), wurde im Szintillationsröhrchen gesammelt. 1 ml dieser Lösung wurde in ein neues Szintillationsgefäß überführt, 3 ml hydrophile Szintillationslösung zugegeben, gemischt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Die II. Phase (Inositol-Phosphate) wurde mit 6 ml 1 M Ammoniumformiat / 0,1 M Ameisensäure eluiert. Das Eluat wurde in einem neuen Gefäß gesammelt. 1 ml dieser Lösung wurde in ein Szintillationsröhrchen überführt, 3 ml hydrophile Szintillationslösung zugegeben, gemischt und die Radioaktivität im Szintillationszähler bestimmt. Zum Regenerieren der Säule wurden 2 M Ammoniumformiat / 0,1 M Ameisensäure und Aqua bidest verwendet.

### **2.11.3.1.2 Bestimmung von Inositol-(1,4,5)-Triphosphat**

Die Bestimmung von Inositol-(1,4,5)-Triphosphat ( $IP_3$ ) erfolgte nach der Vorschrift von Challis (1995). In diesem Rezeptor-Bindungs-Assay wurde die Bindung des zellulären Produktes  $IP_3$  an den  $IP_3$ -Rezeptor in Konkurrenz zu exogenem  $^3H$ - $IP_3$  bestimmt. Dafür wurden  $IP_3$ -Rezeptor-haltige Membranen aus Nebennieren des Rindes präpariert.

### **Präparation von $IP_3$ -Rezeptor-haltigen Membranen aus Nebennieren des Rindes**

Die Präparation bezieht sich auf ca. 70 Nebennieren des Rindes. Diese wurden, auf Eis liegend, longitudinal aufgeschnitten und nach Entfernen der Medulla wurde das Cortextgewebe von der Rinde abgeschabt. Das gesammelte Cortextgewebe wurde mit dem doppelten Volumen an Homogenisationspuffer versetzt und 3 x 20 sek homogenisiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 5.000 x g und 4 °C wurden die Überstände vereinigt. Es folgte eine Ultrazentrifugation für 20 min bei 40.000 x g und 4 °C. Das Pellet wurde in 40 ml Homogenisationspuffer resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde insgesamt 4 x wiederholt. Die Proteinbestimmung des aufgereinigten Cortextgewebes erfolgte nach Bradford (1976).

Bestimmung des IP<sub>3</sub>-Gehaltes in neonatalen Rattenkardiomyozyten

Neonatale Kardiomyozyten der Ratten wurden für 15 min mit 1000 µl HBSS-Puffer bei 37 °C equilibriert. Die Stimulation mit den Agonisten Endothelin-1 (1 µM; gelöst in 1000 µl HBSS-Puffer) oder Thrombin (1 U/ml; gelöst in 1000 µl HBSS-Puffer) erfolgte für 30 sek bei 37 °C. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 500 µl kalter 0,5 M Trichloressigsäure gestoppt, die Kulturschalen auf Eis überführt und 20 min auf Eis inkubiert. Die extrahierten wasserlöslichen Komponenten wurden in ein Sarstedtgefäß überführt und dreimal mit 1,5 ml Wasser-gesättigtem Ether (2 : 1) ausgeschüttelt. Nach Abdampfen der Etherphase wurden 200 µl aus der wässrigen, IP<sub>3</sub>-haltigen Phase mit 50 µl 30 mM EDTA (pH 7,0) und 50 µl 60 mM NaHCO<sub>3</sub> versetzt und bei 4 °C gelagert. Zur Bestimmung des IP<sub>3</sub>-Gehaltes wurden Standardreihen mit aufsteigenden Mengen an IP<sub>3</sub> erstellt, die im Rezeptor-Bindungs-Assay immer mitgeführt wurden. Es wurden folgende Standardreihen in Doppelbestimmungen erstellt: H<sub>2</sub>O (Nullwert), 4 nM IP<sub>3</sub>, 12 nM IP<sub>3</sub>, 40 nM IP<sub>3</sub>, 120 nM IP<sub>3</sub>, 400 nM IP<sub>3</sub> und 1200 nM IP<sub>3</sub>. Je 30 µl des mit EDTA/NaHCO<sub>3</sub> versetzten Probenvolumens bzw. 30 µl IP<sub>3</sub> (Standardreihe) wurden mit 30 µl Assay-Puffer und 30 µl 0,12 µCi/ml <sup>3</sup>H-IP<sub>3</sub> (≈ 5.000 cpm) in einem Sarstedtgefäß versetzt und auf Eis gestellt. Die Reaktion wurde auf Eis durch Zugabe von 30 µl der homogenen Rindernebennieren-Cortexmembransuspension gestartet. Gestoppt wurde nach exakt 30 min durch Zugabe von 3 ml kaltem Waschpuffer. Das gesamte Reaktionsvolumen wurde auf eine mit GF/C-Filtern ausgestattete Absaugfiltrationsvorrichtung gegeben und das Reaktionsgefäß noch zweimal mit je 3 ml Waschpuffer nachgespült. Der Filter jedes Reaktionsansatzes wurde in ein Szintillationsgefäß überführt, mit Szintillationsflüssigkeit versetzt und mindestens 30 min bei RT über Kopf geschüttelt (Rotator REAX2, Hettich). Die Radioaktivität wurde im Szintillationszähler bestimmt.

### 2.11.3.2 Phospholipase D-Aktivitätsmessung

Nach der Phasenextraktion wurde 1 ml der unteren Phase (Abbildung 9) in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und in einem Vakuumtrockner (Speed-Vac Kühlzentrifuge, Savant) zur Trockene eingengt. Das Vakuum führt zu einer Siedepunktniedrigung des Lösungsmittels und damit zu einem raschen Verdampfen der Flüssigkeit. Das Sediment wurde in 25 µl Chloroform/Methanol (1:1) resuspendiert. Jeweils 10 µl dieser Lösung wurden auf eine Kieselgel-Chromatographie-Platte aufgetragen. Als Lipid-Standards wurden 10 µl Phosphatidylethanol (PET; 5 mg/ml) zusammen mit 10 µl Phosphatidsäure (PA; 5 mg/ml) auf der ersten Spur der Platte aufgetragen. Zusätzlich wurden jeweils ca. 3 µl Phosphatidylethanol und Phosphatidsäure alternierend aufgetragen. Die Dünnschichtplatte wurde in Ethylacetat/Isooktan/Essigsäure/Wasser (13:2:3:10 ; v/v/v/v) als mobiler Phase etwa 2 h lang chromatographisch entwickelt. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft war, wurden die Lipide durch Anfärbung mit Jod (10 min) sichtbar gemacht und auf der Platte mit Bleistift markiert (Abbildung 10). Mittels des Phosphatidsäure / Phosphatidylethanol-Standards wurden die entsprechenden Fraktionen identifiziert.

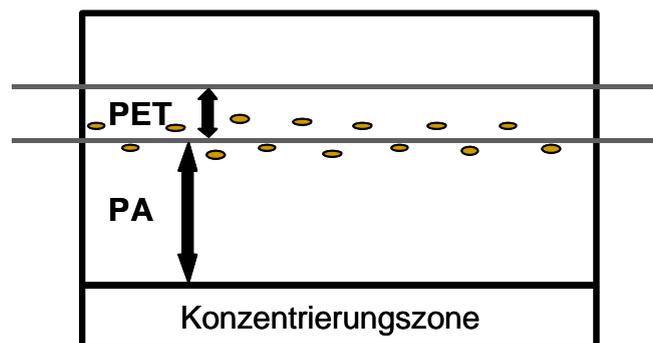


Abbildung 10 **Schematische Darstellung einer Dünnschichtplatte nach chromatographischer Auftrennung der Lipide zur Phospholipase D-Aktivitätsmessung.**

Anschließend wurde die Konzentrierungszone (Abbildung 10) von den mit Aqua bidest besprühten Platten abgekratzt und verworfen. Die Phosphatidsäure (PA)-Zone wurde jeweils von der Kieselgel-Chromatographie-Platte abgekratzt und in die entsprechenden Szintillationsröhrchen, in denen jeweils 1 ml Methanol vorgelegt war, gegeben. Der untere Teil der Platte wurde gesäubert. Anschließend wurde die Phosphatidylethanol (PET)-Zone abgekratzt und wiederum in die entsprechenden Szintillationsröhrchen, in denen ebenfalls 1 ml Methanol vorgelegt war, gegeben. Danach wurden 3 ml lipophile Szintillationsflüssigkeit hinzugegeben und gründlich gemischt. Die Bestimmung der Radioaktivität erfolgte im Szintillationszähler.

### **2.12 Statistik**

Alle dargestellten Werte sind arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler der Mittelwerte (SEM) und wurden mit den Programmen MS-Excel und GraphPad Prism berechnet. Die Anzahl der Einzelwerte wurde mit n bezeichnet. Statistische Signifikanzen wurden mit dem „Student`s t-Test“ ermittelt. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als signifikant angenommen.

### 3 Material

#### 3.1 Chemikalien

Acrylamid/Bisacrylamid 37,5 : 1 (40 %)	BIO-RAD (München)
Agar (Bacto)	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Agarose	Serva (Heidelberg)
Ameisensäure 85 %	Merck (Darmstadt)
Ammoniumformiat	Merck (Darmstadt)
Ampicillin	Sigma (Taufkirchen)
APS [Ammoniumpersulfat]	BIO-RAD (München)
Ascorbinsäure	Merck (Darmstadt)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bradford-Reagenz	BIO-RAD (München)
BrdU [5-Bromo-2'-Desoxyuridin]	Sigma (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
BSA [bovines Serumalbumin]	Sigma (Taufkirchen)
Caesiumchlorid, rein	Paesel und Lorei (Hanau)
Calciumchlorid	Merck (Darmstadt)
Carbachol	Sigma (Taufkirchen)
Chloroform	Merck (Darmstadt)
Desoxynukleotide	Amersham Bioscience (Freiburg)
Dimethylformamid	Merck (Darmstadt)
DMEM (Dulbecco's MEM 1 x) -Medium	Biochrom KG (Berlin)
DMSO	Merck (Darmstadt)
DNA-Ladefarbe	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
DTT [Dithiothreitol]	Sigma (Taufkirchen)
ECL [Enhanced Chemiluminescence]-Kit	Amersham Bioscience (Freiburg)
EDTA	Merck (Darmstadt)
EGTA	Merck (Darmstadt)
Endothelin-1	Sigma (Taufkirchen)
Entwickler G 150	Agfa-Gevaert (Leverkusen)
Essigsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol 96 % (mit Ethylmethylketon vergällt)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Fluka Biochemika (Buchs, CH)
Ethylacetat	Merck (Darmstadt)
FCS [fetales Kälberserum]	Invitrogen (Karlsruhe)
Fixierer G 350	Agfa-Gevaert (Leverkusen)
Glucose	Merck (Darmstadt)
L-Glutamin 200 MM (100 X)	Invitrogen (Karlsruhe)
Glycerol	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)
Harnstoff	Merck (Darmstadt)
Hefe-Extrakt (Bacto)	Difco Laboratories (Detroit, USA)
HEPES	Sigma (Taufkirchen)
Inositol-(1,4,5)-Triphosphat, CA 430	Biomol (Hamburg)
Isoamylalkohol	Merck (Darmstadt)
Isooktan	Merck (Darmstadt)
Isopropanol	Merck (Darmstadt)

## Material

---

Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck (Darmstadt)
Kanamycin	Invitrogen (Karlsruhe)
Kollagen Typ I, rat tail	Upstate Biotechnology (Lake Placid, USA)
Lipofectamin <sup>®</sup>	Invitrogen (Karlsruhe)
Lithiumchlorid	Merck (Darmstadt)
Low Melting Point (LMP)-Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
MEM (Minimum Essential Medium)	Invitrogen (Karlsruhe)
MgCl <sub>2</sub>	Merck (Darmstadt)
MgSO <sub>4</sub>	Merck (Darmstadt)
Mercaptoethanol	Serva (Heidelberg)
Methanol	Merck (Darmstadt)
Milchpulver, fettarm	Nestle´ (Frankfurt)
NaCl	Merck (Darmstadt)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sigma (Taufkirchen)
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Merck (Darmstadt)
NaOH	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumcitrat	Sigma (Taufkirchen)
Noradrenalin	Sigma (Taufkirchen)
PBS Dulbecco	Biochrom KG (Berlin)
Penicillin/Streptomycin (10.000 IE/ml)	Invitrogen (Karlsruhe)
Phenol	Merck (Darmstadt)
Phosphatidsäure	Sigma (Taufkirchen)
Phosphatidylethanol	Sigma (Taufkirchen)
Ponceau S	Sigma (Taufkirchen)
Proteinmolekulargewichtsmarker	BIO-RAD (München)
Proteinstandard (gamma Globulin)	BIO-RAD (München)
PTX [Pertussis-Toxin]	List Biological Laboratories Inc. (USA)
Salzsäure	Merck (Darmstadt)
Säulenmaterial AG 1-X8 Resin	BIO-RAD (München)
SDS [Sodiumdodecylsulfat]	Merck (Darmstadt)
Szintillationsflüssigkeit (Ready Value <sup>®</sup> )	Beckmann (München)
Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold <sup>®</sup> )	Beckmann (München)
TEMED <sup>®</sup> [Tetramethylethylendiamin]	Merck (Darmstadt)
Thrombin (from human plasma)	Sigma (Taufkirchen)
Trichloressigsäure	Merck (Darmstadt)
Trichlortrifluorethan (Uvasol <sup>®</sup> )	Merck (Darmstadt)
Tris	Merck (Darmstadt)
Triton X-100	Sigma (Taufkirchen)
Trypsin 250	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Trypton (Bacto)	Difco Laboratories (Detroit, USA)
Tween 20 <sup>®</sup>	Serva (Heidelberg)
<sup>3</sup> H-Inositol-(1,4,5)-Triphosphat, 10 nCi/µl	Amersham Bioscience (Freiburg)
<sup>3</sup> H-myo-Inositol, 1 µCi/µl	Amersham Bioscience (Freiburg)
<sup>3</sup> H-Ölsäure, 5 µCi/µl	Amersham Bioscience (Freiburg)

### **3.1.1 Substanzen mit Gefahrenhinweisen und Sicherheitsratschlägen**

Acrylamid/Bisacrylamid	R: 45-46-23/24/25-48	S: 53-20-28-36/37/39-45
APS [Ammoniumpersulfat]	R: 8-22-36/37/38-42/43	S: 17-22-24-26-37-43
Bradford-Reagenz	R: 34-20/21/22	S: 24-25-45-36/37/39
BrdU [5-Bromo-2'-Desoxyuridin]	R: 46-61-20/21/22	S: 45-36/37/39
Calciumchlorid	R: 36	S: (2)-22-24
Chloroform	R: 22-38-40-48/20/22	S: 36/37
CsCl [Caesium Chlorid]	R: 22-36/37/38	S: 26-36
Dimethylformamid	R: 61-20/21-36	S: 53-45
DMSO	-	S: 24/25
DTT [Dithiothreitol]	R: 36/37/38	S: 26-36
EDTA	R: 36/37	S: 22-24/25
EGTA	R: 36/37	S: 22-24/25
Essigsäure	R: 10-35	S: 23-26-45
Ethanol	R: 11	S: 7-9-16-29
Ethidiumbromid	R: 22-26-36/37/38-40	S: 26-28.1-36/37-45
Ethylacetat	R: 11-36-66-67	S: 16-26-33
Isoamylalkohol	R: 10-20	S: 24/25
Isooctan	R: 11-38-50/53-65-66-67	S: 9-16-29-33-60-61-62
Isopropanol	R: 11-36-37	S: (2)-7-16-24/25-26
Kollagenase	R: 36/37/38-42/43	S: 22-24-37
Lithiumchlorid	R: 22-36/37/38	S: 26-36
Mercaptoethanol	R: 23/24/25	S: 45
Methanol	R: 11-23/24/25-39	S: 7-16-36/37-45
MgCl <sub>2</sub>	R: 36/37/38	S: 26-37/39
NaCl	R: 36/37/38	S: 26-36
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	R: 36	S: (2)-22-26
NaOH	R: 35	S: (1/2)-26-37/39-45
Penicillin/Streptomycin	R: 20/21/22-42/43	S: 36
Phenol	R: 24/25-34	S: (1/2)-28-45
Ponceau S	R: 36/37/38	S: 26-36
Protein Assay	R: 10-20/22-34	S: 7-26-45
PTX [Pertussis-Toxin]	R: 23/24/25	S: 36/37/39-45
Salzsäure (konz.)	R: 10-35-37	S: 26-36/37/39-45
Säulenmaterial AG 1-X8 Resin	R: 16	S: 50-24/25
SDS [Sodiumdodecylsulfat]	R: 22-36/38	-
TEMED <sup>®</sup>	R: 11-20/22-34	S: (1/2)-16-26-36/37/39-45
Trichloressigsäure	R: 35	S: 1/2-24/25-26-45
Trichlortrifluoethan (Uvasol <sup>®</sup> )	R: 59	S: 23-24/25-61
Tris-HCl	R: 36/37/38	S: 26-36
Triton X-100	R: 22-41	S: 24-26-39
Trypsin 250	R: 36/37/38-42	S: (2)-22-24-26-36/37

### **3.2 Reaktionssysteme**

Plasmid Maxi Kit	Qiagen (Hilden)
Plasmid Mini Kit	Qiagen (Hilden)
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden)
Wizard <sup>®</sup> Plus Minipreps	Promega (Mannheim)

### **3.3 Bakterien, DNA und Vektoren**

DNA Standard 100 bp	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA Standard 100 bp	New England Biolabs (Bad Schwalbach)
DNA Standard 1 Kb	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Lambda ( $\lambda$ ) DNA/HindIII-DNA-Marker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Lambda ( $\lambda$ ) DNA/HindIII-EcoRV-DNA-Marker	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
Escherischia Coli BJ5183	Stratagene (Heidelberg)
Escherischia Coli BL 21	Stratagene (Heidelberg)
Escherischia Coli DH5 $\alpha$	Stratagene (Heidelberg)
pAdEasy-1	Dr. B. Vogelstein (Baltimore, USA)
pAdTrack	Dr. B. Vogelstein (Baltimore, USA)
pBluescript SK (+/-)	Stratagene (Heidelberg)
pET-15b	Invitrogen (Karlsruhe)

### **3.4 Enzyme**

Alkalische Phosphatase, shrimp 1000 U	Roche (Mannheim)
DNase I, bovine pancreas	Roche (Mannheim)
DNase II, bovine spleen	Sigma (Taufkirchen)
Gelzym	Roche (Mannheim)
Kollagenase	Biochrom KG (Berlin)
Lysozym	Serva (Heidelberg)
Proteinase K	Roche (Mannheim)
Restriktionsenzyme und Puffer	Amersham Bioscience (Freiburg)
	Biolabs (Schwalbach)
	MBI Fermentas (St. Leon-Rot)
	Roche (Mannheim)
RNase A, bovine pancreas	Roche (Mannheim)
Taq DNA Polymerase	Biolabs (Schwalbach)
T <sub>4</sub> DNA Ligase, 1000 U/ $\mu$ l	Roche (Mannheim)

### **3.5 Zelllinien**

HEK 293-Zellen	DSMZ (Braunschweig)
HEK 293-Zellen mit stabil exprimierten M3-Cholinozeptoren	Dr. M. Schmidt (Essen)

### **3.6 Antikörper**

Anti-Rabbit IgG-HRP (Peroxidase-konjugiert)	Sigma (Taufkirchen)
His-probe (H-15, sc-803) (rabbit polyclonal Ig6)	Santa Cruz (Heidelberg)
Kaninchen-anti-RGS4	Dr. Kehrl (Bethesda, USA)
MAP-Kinasen (Phospho-p44/42, Phospho-p38, Phospho-SAPK/JNK, p38 MAP-Kinase)	Cell Signaling Technology

### **3.7 Verbrauchsmaterial**

Aqua ad injectabilia	Baxter (Unterschleißheim)
Dialyseschlauch	Serva (Heidelberg)
Einmal-Injektions-Kanülen	Braun (Melsungen)
Einwegpipetten (2 ml, 10 ml, 25 ml), steril	Becton Dickinson (Heidelberg)
Elektroporationsküvetten 1 mm, steril	PeQLab (Nürnberg)
Eppendorfgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Falcon Röhrchen (50 ml)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Filmmaterial (X-OMAT AR)	Kodak (Stuttgart)
Filterpapier 3 MM	Whatman (Maidstone, UK)
Filter, GF/C	Whatman (Maidstone, UK)
Gaze, Nylon	Nytal (Thal, CH)
Gewebekulturröhrchen TC steril	Greiner (Frickenhausen)
Isotone Kochsalzlösung	Baxter (Unterschleißheim)
Kanülen	Braun (Melsungen)
Kieselgel-Chromatographie-Platten, LK 6D Silica Gel (20 X 20 cm)	Whatman (Maidstone, UK)
Kulturflaschen (80 cm <sup>2</sup> , 260 ml)	Nunclon (Roskilde, DK)
Kulturschalen (Ø 6 cm, 10 cm, 15 cm)	Greiner (Frickenhausen)
Mikrokonzentratssäule, Centrikon <sup>®</sup>	Millipore (Schwalbach)
Nitrocellulosemembran (Protran <sup>®</sup> , 0,45 µm)	Schleicher&Schuell (Dassel)
Nylonmembran	Schleicher&Schuell (Dassel)
Parafilm	American National Can (USA)
Pasteurpipetten	Brand GmbH (Wertheim)
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 1 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Polystyren-Säulen, 0,5-2 ml	Pierce (Rockford, USA)
Röhrchen TC steril 14 ml	Greiner (Frickenhausen)
Sarstedt Röhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Slide-A-Lyzer Dialysekassetten	Pierce (Rockford, USA)
Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm CM	Qualilab (Bruchsal)
Sterilfilter (0,2 µm, 0,45 µm)	Schleicher&Schuell (Dassel)
Szintillationsgefäße, Pony Vial <sup>™</sup>	Packard (Dreieich)
Ultrazentrifugationsröhrchen	Beckmann (Palo Alto, USA)
Zählkammer	Neubauer Assistent
Zellschaber	Greiner (Frickenhausen)
Zentrifugen-Tube	Beckman (Palo Alto, CA, USA)

### **3.8 Laborgeräte**

Agarosegel-Kammer	BIO-RAD (München)
Amicon-Zelle	Amicon
Analysenwaage	Mettler (Gießen)
Autoklav	Systec (Wettenberg)
Blotkammer	BIO-RAD (München)
Brutschrank	Grumbach (Asslar)
Digitalwaage	Mettler (Greifensee, CH)
Elektrophoresekammer	BIO-RAD (München)
Eppendorfszentrifuge	Eppendorf (Hamburg)

Fluoreszenzmikroskop, Axioplan	Zeiss (Oberkochen)
Flüssigkeitsszintillationszähler	Beckman (München)
Gene Pulser II	BIO-RAD (München)
Heizblock	Eppendorf (Hamburg)
Hood Lamin Air HB 2448	Heraeus (Hanau)
Inkubator für Bakterien	Heraeus (Hanau)
Inkubator für Zellkulturen, IR Auto Flow	Nuaire (Hanau)
Inkubator für Zellkulturen	Heraeus (Hanau)
Kamera	Pentax GmbH (Hamburg)
Kühltruhe (- 20 °C, - 80 °C)	Kryotec (Hamburg)
Kühlzentrifuge, JA-20	Beckman (Palo Alto, USA)
Kühlzentrifuge, J2-21	Beckman (Palo Alto, USA)
Kühlzentrifuge, J6-B	Beckman (Palo Alto, USA)
Magnetrührer	Heidolph (Kehlheim)
Mikroskop, Axioplan	Zeiss (Oberkochen)
Mikroskop, Axioplan 2	Zeiss (Oberkochen)
PCR-Heizblock Express	Hybaid Omni Gene (Heidelberg)
PH-Meter (Digital)	Knick (Berlin)
Präparationsbesteck	Hammacher Instrumente (Solingen)
Rotator, REAX 2	Hettich (Tuttlingen)
Schüttelinkubator für Bakterienkulturen	CFL (Emersacker)
SDS-Page-Kammer	BIO-RAD (München)
Speed Vac-Kühlzentrifuge	Savant (Albertville, USA)
Spektrophotometer	Perkin Elmer (München)
Szintillationszähler LS 3800	Beckman (Palo Alto, USA)
Tischzentrifuge	Eppendorf (Hamburg)
Trockenschrank	Heraeus (Hanau)
Ultrazentrifuge (Centricon T-2170)	Kontron (Mailand, I)
UV-Tisch	Bachofer (Reutlingen)
Vakuumfiltration	BIO-RAD (München)
Vortexer	Heidolph (Kelheim)
Wärmeblock	Eppendorf (Hamburg)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore (Eschborn)
Zellsieb (Ø 60 µm Porengröße)	Sigma (Taufkirchen)
Zentrifuge 5415 S	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifugen: Universal 30 RF, EBA 12 R	Hettich (Tuttlingen)

### 3.9 Zusammensetzung der verwendeten Gele und Lösungen

Agarose-Gel (DNA)	0,8 % bis 1 % (w/v) 1 x 0,07 µg/ml	Agarose TBE-Puffer Ethidiumbromid
Ammoniumformiat 50 mM	3,153 g/l 3,75 ml	Ammoniumformiat Ameisensäure (0,1 M)
Ammoniumformiat 1 M	63,06 g/l 3,75 ml	Ammoniumformiat Ameisensäure (0,1 M)
Ammoniumformiat 2 M	126,12 g/l 3,75 ml	Ammoniumformiat Ameisensäure (0,1 M)
Ampicillin-Agar	4 µl Agar geliert bei 40 °C; Ampicillin hitzelabil ab 50 °C	Ampicillin-Stamm/ml Agar
Ampicillin-Stammlösung	2,5 % 60 mM	Ampicillin NaOH
Blocking-Puffer	3 % (w/v)	Fettarmes Milchpulver in TTBS
Blocking-Puffer (MAPK)	7,5 g 15 ml 135 ml 0,15 ml	Fettarmes Milchpulver 10 x TBS Aqua bidest Tween-20 (100 %)
BrdU-Stammlösung 10 mM (100 x)	0,1535 g ad 50 ml	BrdU Aqua ad injectabilia
<u>C</u> alcium und <u>B</u> icarbonat <u>f</u> reier <u>H</u> anks Puffer mit <u>H</u> EPES = CBFHH, pH 7,4 (Zellpräparation)	136,6 mM 20 mM 5,55 mM 5,36 mM 0,81 mM 0,44 mM 0,34 mM ad 1000 ml	NaCl HEPES Dextrose KCl MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O Aqua ad injectabilia
Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1)	480 ml 20 ml	Chloroform Isoamylalkohol
Chloropan (DNA)	25 % (v/v) 24 % (v/v) 1 % (v/v)	Phenol, Tris-gepuffert, pH 8,0 Chloroform Isoamylalkohol
Citric saline	10,06 g 4,4 g ad 1000 ml 1 % (w/v)	KCl Na-Citrat Aqua ad injectabilia Bromphenolblau

## Material

DNA-Ladefarbe	1 % (w/v) 50 % (v/v) 50 % (v/v)	Xylencyanid Glycerol 1 x TBE
DNase I-Lösung	1mg/ml	DNase I in Aqua ad injectabilia
DNase II-Arbeitslösung (Zellpräparation)	1,3 ml 0,5 ml 0,5 ml ad 50 ml	FCS (aktiv) DNase II-Stammlösung Penicillin/Streptomycin 100 x CBFHH
DNase II-Stammlösung	2 mg/ml	DNase II in PBS (1 x)
Ethidiumbromid-Lösung	1 % (w/v)	Ethidiumbromid in Aqua bidest
HBSS [ <u>H</u> anks <u>B</u> alanced <u>S</u> alt <u>S</u> olution]	118 mM 5 mM 1 mM 1 mM 15 mM 0,9 g Mit Aqua ad injectabilia auf 1000 ml auffüllen, auf pH 7,4 einstellen und erst dann Glucose zugeben	NaCl KCl CaCl <sub>2</sub> MgCl <sub>2</sub> HEPES Glucose
HBSS / 10 mM LiCl	10 ml 990 ml	1 M LiCl HBSS pH nochmal überprüfen
Homogenisationspuffer, pH 8,0	20 mM 1 mM	NaHCO <sub>3</sub> DTT
Kanamycin (10mg/ml)	500 mg 50 ml	Kanamycin Aqua ad injectabilia; Sterilfiltrieren
KCl-Lösung 4 M	298,24 g ad 1000 ml	KCl Aqua bidest
Laemmli-Puffer	2 % (w/v) 5 % (v/v) 10 % (v/v) 62,5 mM 0,0125 % (v/v)	SDS 2-Mercaptoethanol Glycerol Tris/HCl pH 6,8 Bromphenolblau
Laufpuffer, pH 8,3	1 g 6 g 28,8 g ad 1000 ml	SDS (0,1% (w/v)) Tris-HCl (50 mM) Glycin (384 mM) Aqua bidest
LiCl-Lösung 4 M	8,478 g ad 50 ml	LiCl Aqua ad injectabilia

## Material

---

MgCl <sub>2</sub> 2 M	40,66 g ad 100 ml 50 mM	MgCl <sub>2</sub> Aqua bidest; autoklavieren Tris-HCl, pH 7,4
Murakami-Puffer	5 mM 5 mM 5 mM	MgCl <sub>2</sub> EDTA EGTA
PBS-Puffer	9,55 g ad 1000 ml	PBS Dulbecco, Instant Aqua bidest Auf pH 7,4 einstellen und autoklavieren
Phosphatidsäure 5 mg/ml  Trockensubstanz wird entweder in 10 mg oder in 50 mg Ampullen geliefert.	10 mg 2 ml 50 mg 10 ml	Phosphatidsäure Chloroform Phosphatidsäure Chloroform
Phosphatidylethanol 5 mg/ml	20 mg/ml  Stocklösung wird 1:4 in Chloroform verdünnt, aliquotiert und bei – 20 °C gelagert	1,2 Dipalmitoyl-sn-Glycero-3- Phosphoethanol (Stocklösung)
Ponceau-S-Arbeitslösung	1 Teil 9 Teile	Ponceau-S-Stammlösung Aqua bidest
PTX-Lösung	PTX Trockensubstanz in Aqua ad injectabilia: 0,2 µg/µl	
Puffer A, pH 8	100 ml 1 M Tris pH 8 11,65 g 0,81 g 840 µl 100 ml ad 2000 ml	Tris-HCL (50 mM) NaCl (100 mM) MgCl <sub>2</sub> (2 mM) β-Mercaptoethanol (6 mM) Glycerin (5 %) Aqua bidest; pH 8 einstellen
Puffer B (400 mM Imidazol)	27,25 g 1000 ml	Imidazol Puffer A; pH 8 einstellen
Puffer C (25 mM Imidazol)	6,25 ml 93,75 ml	Puffer B Puffer A
Rat tail Kollagenaselösung	680 µl ad 50 ml	Rat tail Typ I PBS 1 x
RNase A-Lösung (10 mg/ml)	10 mg 1 ml	RNase A Aqua ad injectabilia

## Material

---

Sammelgel (4 %)	800 µl 300 µl 15 µl 1,9 ml 15 µl 1,5 µl	Tris/HCl pH 6,8 (0,5 M) Acrylamid/Bis (37,5 : 1) 40 % SDS (20 %) Aqua bidest APS (10 %) TEMED
SDS 20 %	100 g ad 500 ml	Natrium-dodecylsulfat Aqua bidest
SDS 0,1 %	2500 µl ad 500 ml	SDS 20 %, Aqua bidest
SDS Proben-Puffer (MAPK)	62,5 mM (pH 6,8) 2 % (w/v) 10 % (v/v) 50 mM 0,1 % (w/v)	Tris-HCl SDS Glycerol DTT Bromphenolblau
Strippen-Puffer	699 µl 10 ml 12,5 ml ad 100 ml	2-Mercaptoethanol (100 mM) SDS 20 % (2 %) Tris-HCl 0,5 M (62,5 mM) pH 6,7 Aqua bidest
TBE-Puffer (10 x), pH 8,0 [Tris-Borat-Puffer]	216 g 123,4 g 80 ml ad 2000 ml	Tris-HCl Borsäure EDTA 0,5 M pH 8,0 Aqua bidest; autoklavieren
TBS-Puffer	18 g 2,42 g ad 2000 ml	NaCl Tris-HCl Aqua bidest; pH 7,4 einstellen
10 x TBS (MAPK)	24,2 g 80 g ad 1000 ml	Tris-Base NaCl Aqua bidest; pH 7,6 einstellen
1 x TBS (MAPK)	100 ml ad 1000 ml	10 x TBS (MAPK) Aqua bidest
TBST-Puffer	18 g 2,42 g 2,5 ml ad 2000 ml	NaCl Tris-HCl, pH 7,9 Tween 20 Aqua bidest; pH 7,4 einstellen
TBST (MAPK)	0,1 % (v/v)	Tween-20 1 x TBS

## Material

---

Telt-Lysis-Puffer	50 mM 62,5 mM 2,5 M 0,4 % (v/v)	Tris-HCl pH 7,5 EDTA LiCl Triton X 100
Thrombin 100 U/ml (lyophilisiert)	250 U 2,5 ml In 1,5 ml-Eppendorfgefäß a` 100 µl aliquotieren, in flüssigem Stickstoff einfrieren, bei – 20 °C lagern	Thrombin Aqua ad injectabilia
Transferpuffer, pH 8,3	48,46 g 225,21 g 5 ml ad 1000 ml beim Laufen lassen: + 20 % Methanol	Tris-HCl pH 7,4 Glycin SDS 20 % Aqua bidest;
Transferpuffer (MAPK) pH 8,5	25 mM 0,2 M 20 % (v/v)	Tris-Base Glycin Methanol
Trenngel 12 % (15 %)	1,52 ml (1,9 ml) 1,0 ml (1,0 ml) 2,48 ml (2,1 ml) 25 µl (25 µl) 25 µl (25 µl) 2,5 µl (2,5 µl)	Acrylamid/Bis (37,5 : 1) 40 % Tris-HCl 2 M pH 8,8 Aqua bidest SDS 20 % APS 10 % TEMED
Trypsin-Stammlösung (Zellpräparation)	0,6 g Über Nacht unter Rotation bei 4 °C gelöst	Trypsin in 6 ml CBFHH
Trypsin-Arbeitslösung	1,5 ml 0,5 ml 0,5 ml ad 50 ml	Trypsin-Stammlösung, steril filtriert DNase II-Stammlösung Penicillin/Streptomycin 100 x CBFHH
VSB [Virus Storage Buffer]- Puffer	16,0 g 20 ml von 1 M-Stock 0,744 g 0,408 g ad 2000 ml	NaCl Tris KCl MgCl <sub>2</sub> Aqua ad injectabilia; pH 7,4 einstellen

### 3.10 Medien

#### Für molekularbiologische Arbeiten

LB-Medium, pH 7,5	10,0 g	Tryptone (Bacto)
	10,0 g	Hefe-Extrakt (Bacto)
	5,0 g	NaCl
	Mit Aqua bidest auf 1000 ml auffüllen, mit NaOH auf pH 7,5 einstellen und autoklavieren	

LB-Agar-Platten	LB-Medium + 15 g/l Agar (Bacto), autoklavieren.	
	Antibiotika erst zugeben, wenn die Lösung auf unter 50 °C abgekühlt ist:	
	2000 µl	Amp/500 ml LB
	2500 µl	Kana/500 ml LB

SOB-Medium, pH 7,0	20 g	Trypton (Bacto)
	5 g	Hefe-Extrakt (Bacto)
	0,5 g	NaCl
	10 ml	KCl (0,25 M)
	5 ml	MgCl <sub>2</sub> (2 M)
	ad 1000 ml	Aqua bidest
	mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren.	

#### Für zellbiologische Arbeiten

HEK-Medium (DMEM)	10 % (v/v)	FCS (hitze-inaktiviert)
(Dulbeccos modified essential medium)	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin, 100 x
	1 % (v/v)	L-Glutamin, 200 mM

MEM-Medium	10 % (v/v)	FCS (hitze-inaktiviert)
	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin, 100 x
	1 % (v/v)	BrdU-Stammlösung, 100 mM

MEM-Medium	10 % (v/v)	FCS (hitze-inaktiviert)
(Nicht-kardiomyozyten Medium)	1 % (v/v)	Penicillin/Streptomycin, 100 x

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Herstellung eukaryoter Expressionsvektoren und rekombinanter Adenoviren zur Expression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS

Als erster Schritt hierzu wurden die cDNAs für die RGS-Domänen von LSCII und KIAA380 mit Hilfe der PCR amplifiziert und in geeignete bakterielle Expressionsvektoren subkloniert. Die Proteine wurden dann in E. coli-Bakterien exprimiert und anschließend gereinigt. Die regulatorischen Domänen von LSCII und KIAA380 wurden zusätzlich in den adenoviralen Shuttle-Vektor pAdTrack subkloniert. Die cDNA-Sequenz für die LSCII und KIAA380 ist in der EMBL/Gen-Datenbank jeweils unter U58203 und 0/5085 abgelegt.

#### 4.1.1 Polymerase-Kettenreaktions-Analyse von cDNA-Fragmenten

Die cDNA-Fragmente für die RGS-Domänen von LSCII und KIAA380 wurden mit Hilfe der PCR amplifiziert. Das Ergebniss wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft (Abbildung 11).

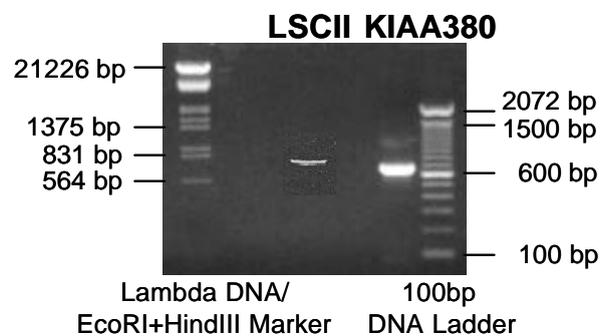


Abbildung 11 **Fotografie eines Agarosegels nach der PCR-Amplifikation der RGS-Proteine LSCII und KIAA380.** Der Ansatz aus den entsprechenden Oligonukleotidprimern, der zu amplifizierenden DNA, Pufferlösung, vier Desoxynukleotid-Triphosphaten, Magnesium und Taq-Polymerase wurde in einem 50 µl Reaktionsansatz sorgfältig gemischt und in einen Thermocycler gestellt. Denaturiert wurde bei 94 °C (5 min). Die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA fand bei 58 °C – 60 °C statt (1 min). Danach wurde die Temperatur auf 72 °C angehoben (1 min), bis wieder eine doppelsträngige DNA vorlag. Zur Einleitung des zweiten Amplifikationszyklus wurde die Temperatur erneut auf 95 °C angehoben (1 min). Nach dem letzten Zyklus wurde ein zehninütiger Polymerisationsschritt angeschlossen. Nach der PCR-Amplifikation waren folgende Banden zu erwarten:

RGS-Protein	Fragmentgröße
LSCII	750 bp
KIAA380	700 bp

#### 4.1.2 Subklonierung der cDNAs in den pET-15b-Vektor

Die mit Hilfe der PCR amplifizierten cDNAs für die RGS-Domänen von LSCII und KIAA380 wurden nach der LMP-Reinigung in den bakteriellen Expressionsvektor pET-15b (5708 bp, Invitrogen; Abbildung 12) subkloniert. Das Plasmid pET-15b wurde mit den Restriktionsenzymen Nde I und Bam HI linearisiert. Wie in Abbildung 13 schematisch dargestellt, wurde anschließend jeweils das cDNA-Fragment für die RGS-Domänen von LSCII bzw. KIAA380, das gleichfalls mit Nde I und Bam HI geschnitten war, hineinligiert. Die Schnittstellen für die beiden Restriktionsenzyme wurden bei der Synthese der Primer in die Sequenz eingeführt.

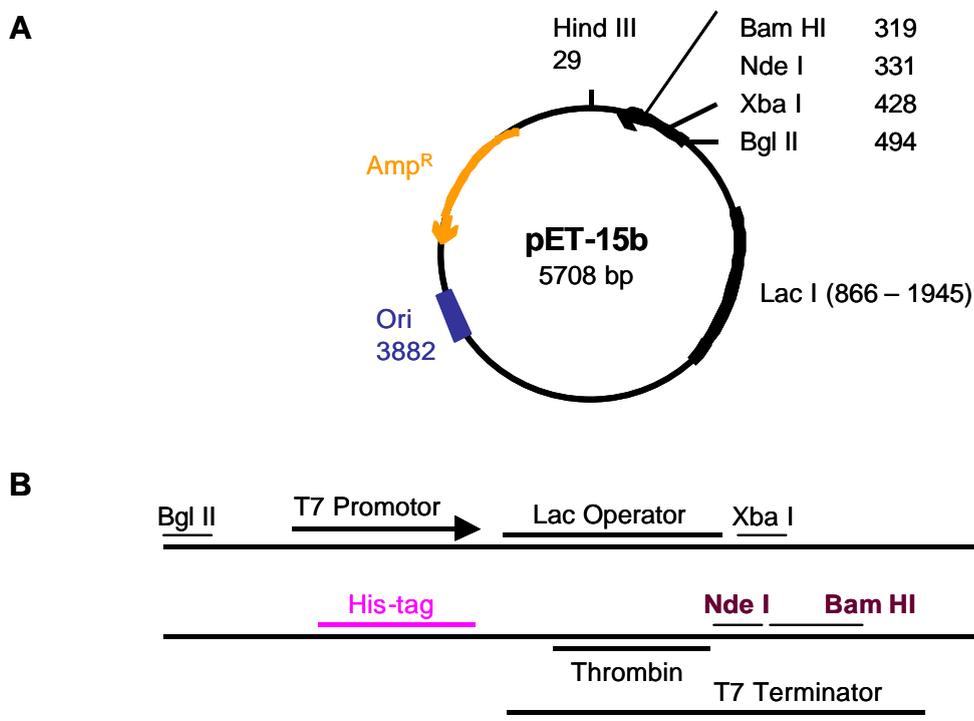


Abbildung 12 **Das Klonierungsplasmid pET-15b.** (A) Der pET-15b-Translationsvektor besitzt ein Origin (die Sequenz, die von der DNA-Polymerase aus *E. coli* als Initiationspunkt für die Replikation erkannt wird und sicher stellt, dass das Plasmid unabhängig von der genomischen DNA repliziert werden kann und neben der genomischen DNA in der Zelle persistiert), ein Amp<sup>R</sup>-Gen (Ampicillin-Resistenz durch das Gen für die  $\beta$ -Lactamase), einen phagenspezifischen T7 Promotor, einen T7 Transkriptions-Terminator (T7 Terminator), ein Lac Operator, eine Signalsequenz für die Translation (rbs = Ribosomen-Bindestelle), ein kurzes offenes Leseraster mit mehreren Histidin-Codons (His-tag) und eine multiple Klonierungsstelle (MCS; ein Bereich, der die zu klonierenden fremden DNA-Fragmente aufnimmt) (A und B). Das pET-15b-Plasmid wurde zur Subklonierung der cDNA-Fragmente von LSCII bzw. KIAA380 in seiner multiplen Klonierungsstelle mit den Restriktionsendonukleasen Nde I und Bam HI linearisiert (B).

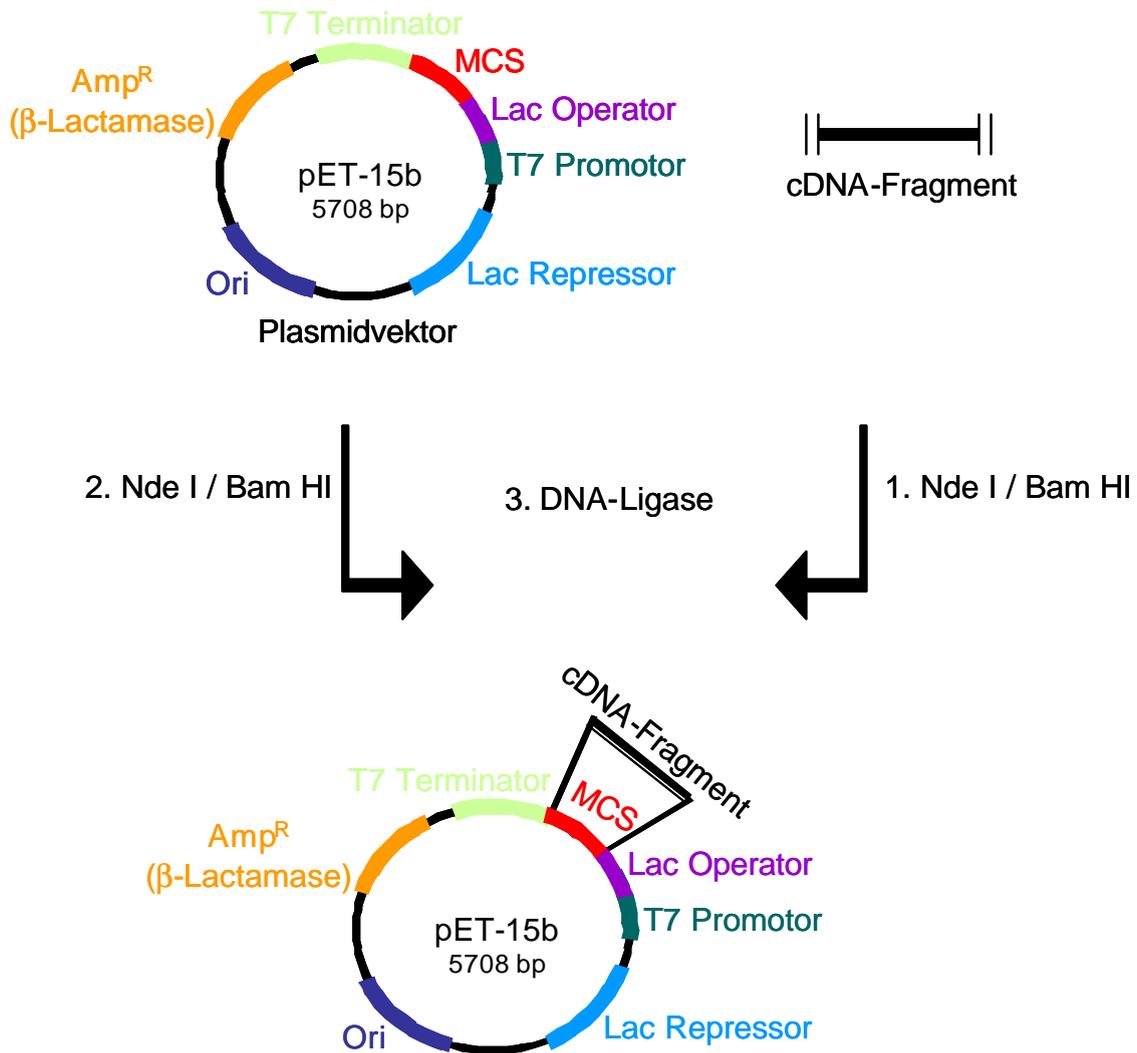


Abbildung 13 **Schematische Darstellung der Subklonierung der cDNA-Fragmente in pET-15b.** Das jeweilige cDNA-Fragment aus der PCR wurde nach der LMP-Agarosegel-Elektrophorese und anschließender Aufreinigung mit Nde I/Bam HI für 1 h bei 37 °C geschnitten. Nach dem Restriktionsverdau erfolgte eine Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion. Das pET-15b-Plasmid wurde in seiner multiplen Klonierungsstelle (MCS) mit denselben Restriktionsendonukleasen linearisiert. Anschließend wurde das cDNA-Fragment mit dem pET-15b zu einem neuen Plasmid ligiert. Die Ligation erfolgte nach Abschnitt 2.2.4 und die Transformation von kompetenten BL21 E. coli-Bakterien wurde gemäß Abschnitt 2.2.5 durchgeführt. Die Transformanten konnten aufgrund der erworbenen Ampicillin-Resistenz auf Ampicillin-haltigem Agar selektiert werden. Nach der Präparation der DNA erfolgte die Kontrolle in einem Agarosegel.

Der Ligationsansatz wurde in BL21 E. coli-Bakterien transformiert und die Klone auf Ampicillin-Platten selektiert. Positive Klone wurden durch einen Restriktionsverdau mit Nde I und Bam HI identifiziert (Abbildung 14).

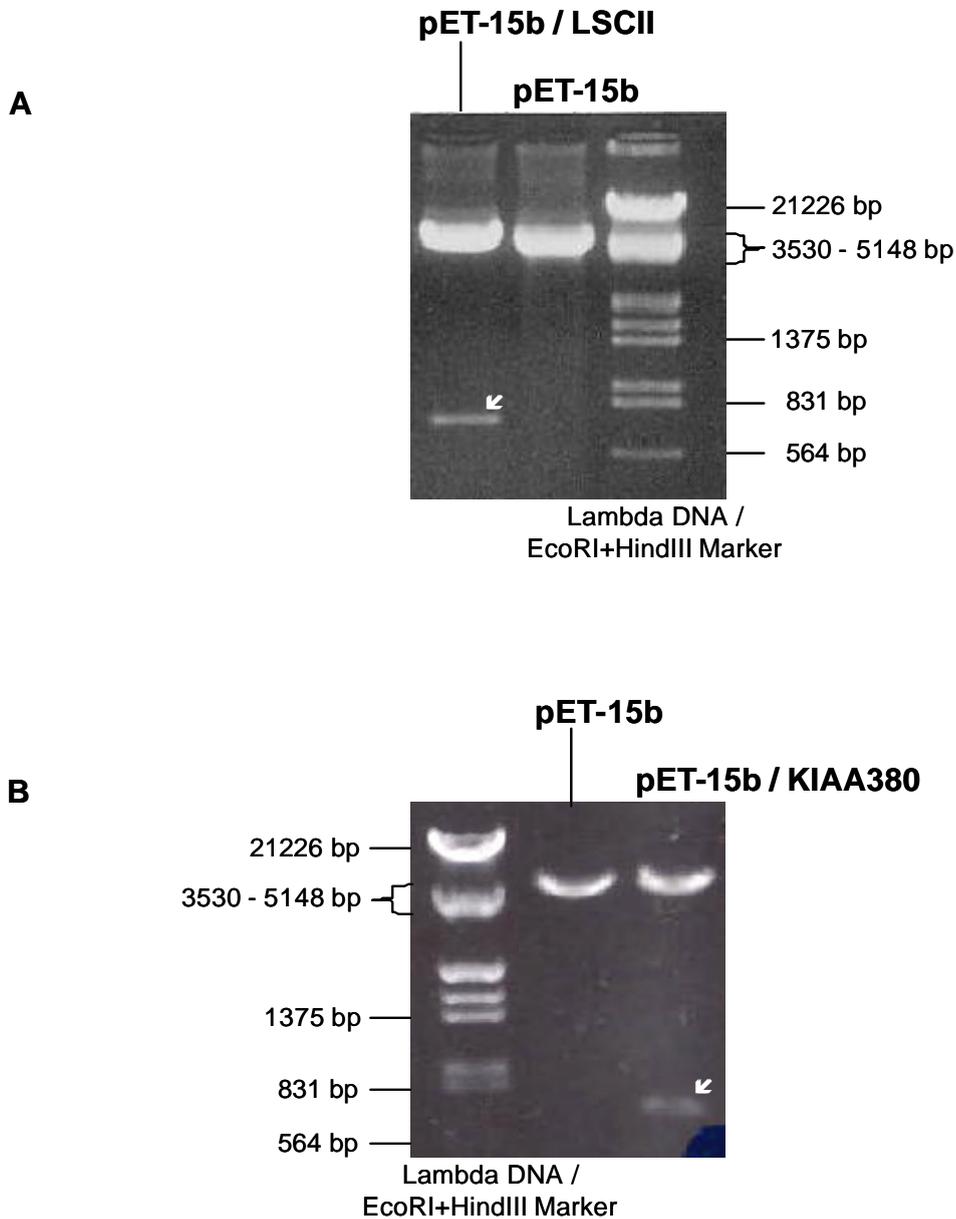


Abbildung 14 **Positive rekombinante Konstrukte der pET-15b mit LSCII-RGS- und KIAA380-RGS-cDNA.** Fotografien der 1 %-igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegele. Das Ligationsprodukt aus pET-15b mit LSCII-RGS (A) und das Ligationsprodukt aus pET-15b mit KIAA380-RGS (B) nach dem Restriktionsverdau mit Nde I und Bam HI für 1 h bei 37 °C.

### **4.1.3 Expression rekombinanter Proteine**

Die cDNA-Fragmente (codierend für LSCII-RGS und KIAA380-RGS) wurden mit Hilfe des pET-15b-Vektors transkribiert und translatiert. pET-15b, ein Klonierungsvektor, der zur gentechnischen Proteinherstellung verwendet wird, wird auch als Expressionsvektor bezeichnet. Die Abkürzung pET steht für „*plasmid for expression by T7 RNA polymerase*“. Im Unterschied zu den Klonierungsvektoren besitzt pET-15b vor der multiplen Klonierungsstelle einen bakteriellen Promotor, der die Expression des klonierten Gens kontrolliert. Das rekombinante Plasmid wurde deshalb in BL21 E. coli-Bakterien transformiert.

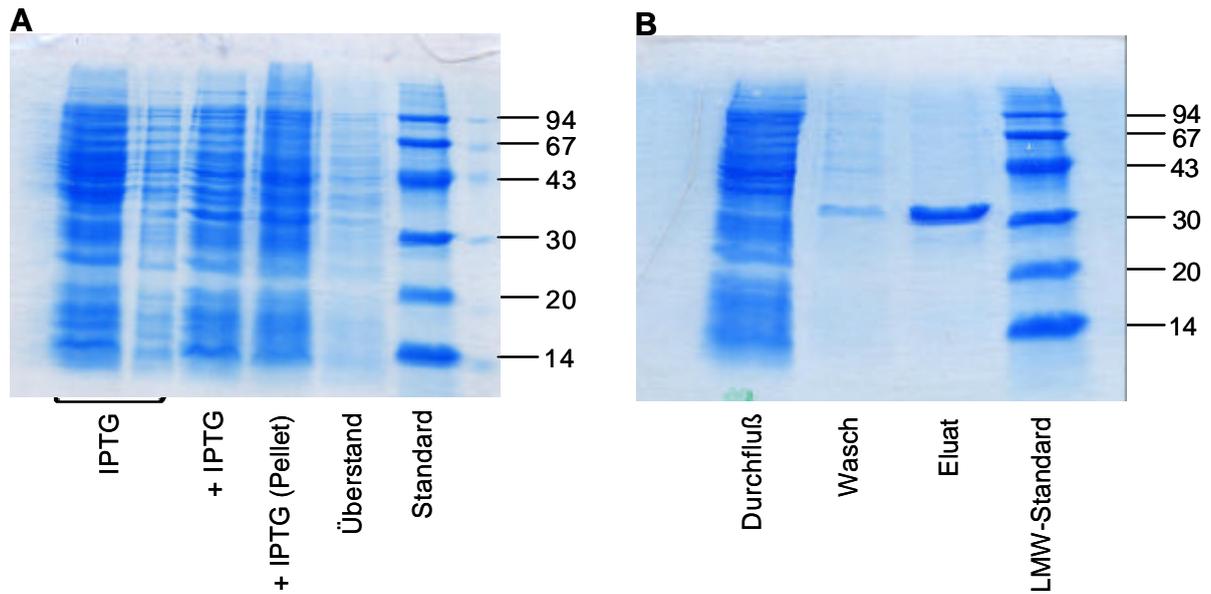
Bei E. coli-Bakterien sind zwei Haupttypen der Genregulation bekannt: die Induktion und die Repression. Bei einem induzierbaren Gen wird die Transkription angeschaltet, wenn man dem Wachstumsmedium eine bestimmte chemische Verbindung, den Induktor, zusetzt. Der Induktor signalisiert der Zelle, dass eine Stoffwechsellage eingetreten ist, die die Aktivierung eines reprimierten Operons erfordert. Als Induktoren fungieren Lactose oder andere Galactoside, die Substrate der  $\beta$ -Galactosidase sind. Es gibt aber auch Induktoren, die dem Enzym  $\beta$ -Galactosidase ein Substrat vortäuschen, die aber von ihm nicht gespalten werden können. Ein Beispiel dafür ist Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid (IPTG), das wegen seiner thioglycosidischen Bindung nicht gespalten werden kann. Wird der nicht metabolisierbaren Induktor IPTG zu der Kultur gegeben, dann bindet dieses Galactosid an den Repressor. Dadurch ändert sich die Konformation des Repressors, sodass er seine Affinität zum Operon verliert und von seiner Bindungsstelle abdissoziiert. Er gibt damit den Promotor für die Bindung der RNA-Polymerase und somit zur Transkription frei.

Die transformierten E. coli-Zellen wurden zunächst unter Bedingungen vermehrt, bei denen der Promotor inaktiv ist. Bei einer optischen Dichte von 0,5 – 0,6 (wenn sich die Bakterien noch in der logarithmischen Wachstumsphase befanden) wurde die Expression des Fremd-Proteins induziert, indem IPTG dem Medium hinzugefügt wurde (siehe Abschnitt 2.4).

Durch die In-Frame-Ligation der cDNA-Fragmente in den pET-15b-Vektor wurde dann eine N-terminale Hexahistidinsequenz (Histidin-tag, His-tag) an das Protein synthetisiert. Das His-tag erlaubt eine einfache Aufreinigung des exprimierten Proteins über eine Chromatographie an immobilisierten Metall-Chelat-Komplexen (IMAC). Beim Durchlaufen durch die Säule interagieren diese Histidine z.B. mit Nickel-Ionen auf der Säulenmatrix unter Ausbildung eines His-Chelat-Komplexes. Somit werden die Fusionsproteine über ihren His-tag zurückgehalten. Die übrigen Moleküle können die Säule aber ungehindert passieren. Von den Säulen wurden die Fusionsproteine durch Imidazol eluiert (siehe Abschnitt 2.4.3).

Wie in Abbildung 15 dargestellt, wurden Proteine der erwarteten Größe synthetisiert und selektiv aufgereinigt. Das Eluat wurde konzentriert und das enthaltende Imidazol durch Dialyse entfernt. Danach wurde das Protein in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei – 80 °C bis zur Weiterverwendung gelagert.

**LSCII-RGS**



**KIAA380-RGS**

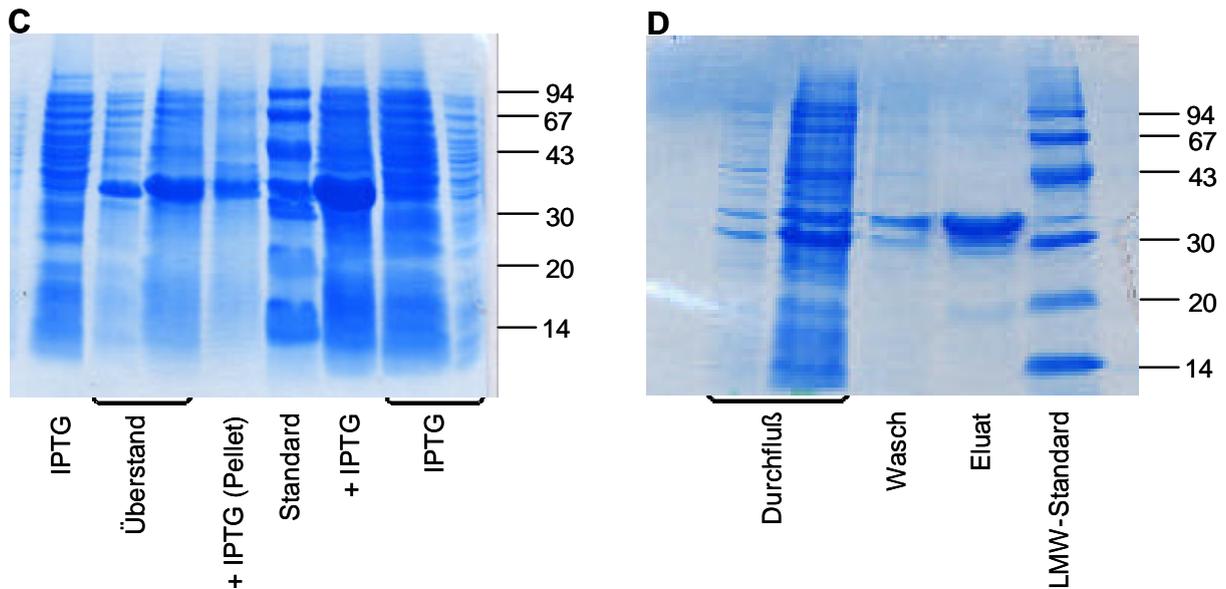


Abbildung 15 **Produktion und Reinigung rekombinanter Proteine von LSCII-RGS und KIAA380-RGS.** Nachdem jeweils die regulatorischen Subdomänen von LSCII und KIAA380 in dem pET-15b-Expressionsvektor subkloniert waren, wurden die Proteine in BL21 E. coli-Bakterien exprimiert und gereinigt. Zunächst wurden zur Kontrolle kleine Mengen rekombinanter Proteine LSCII (A) bzw. KIAA380 (C) exprimiert. Danach wurden größere Mengen rekombinanter Proteine LSCII (B) bzw. KIAA380 (D) exprimiert und gereinigt. Die Expression wurde über die Zugabe von IPTG induziert. Die inserierten Gene wurden als Fusionsprotein mit Polyhistidin exprimiert. Die Reinigung des Fusionsproteins erfolgte über die Metall-Chelat-Affinitätschromatographie. Die dialysierten und konzentrierten Proteine von LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS wurden mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese elektrophoretisch aufgetrennt. Die aufzutragenden Proben wurden in einer Sammelgelschicht (4 % Polyacrylamid) konzentriert. Von dort wanderten sie in das eigentliche Trenngel (15 % Polyacrylamid) hinein. Zur Anfärbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurde Coomassie-Blau verwendet.

#### 4.1.4 Subklonierung der cDNAs in den pBluescript SK (+/-)-Vektor

Die Anordnung der Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen in dem Expressionsvektor pET-15b war zur Umklonierung des LSCII-RGS- bzw. KIAA380-RGS-Fragmentes in den adenoviralen Shuttle-Vektor pAdTrack nicht geeignet. Die Fragmente wurden deshalb zuerst in den Klonierungsvektor pBluescript SK (+/-) (2958 bp, Stratagene; Abbildung 16) umkloniert.

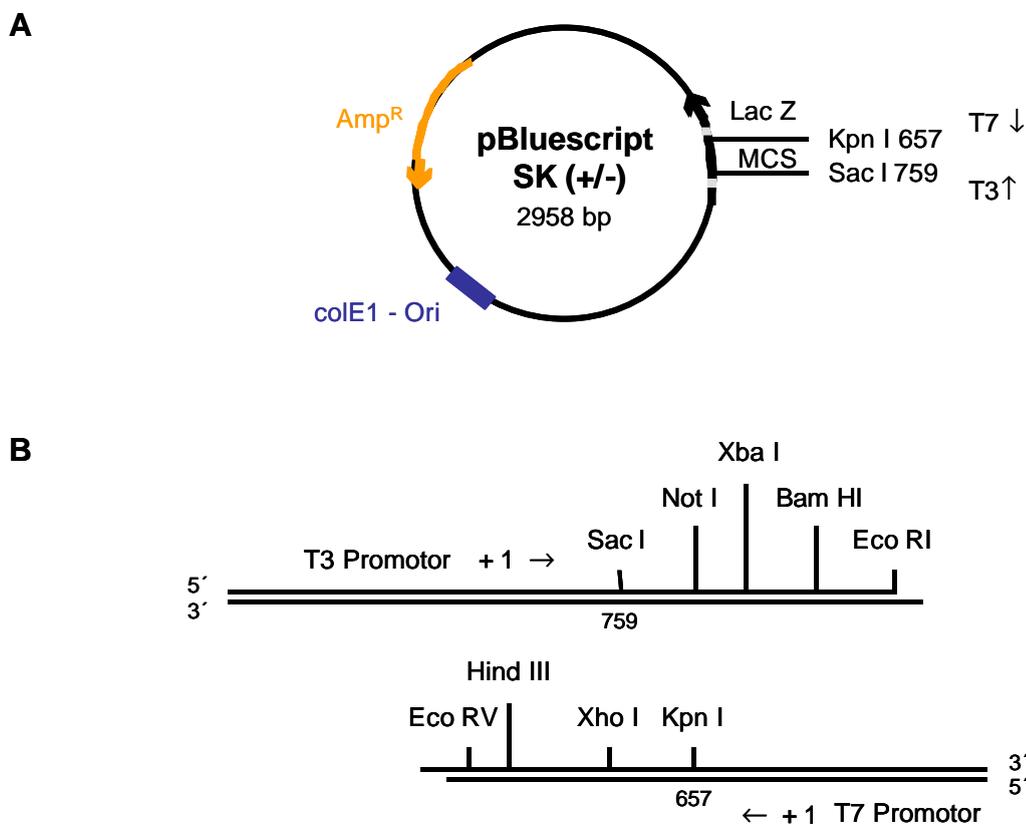
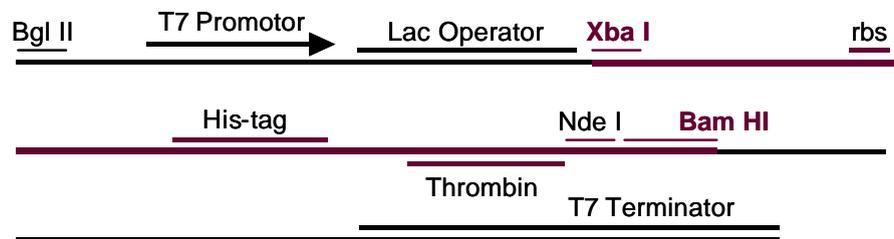


Abbildung 16 **Das Klonierungsplasmid pBluescript SK (+/-).** Das pBluescript-Plasmid (A) enthält einen colE1-Replikationsursprung (colE1 - Ori), den die DNA-Polymerase aus *E. coli*-Bakterien erkennt und damit das Plasmid autonom, d.h. unabhängig vom bakteriellen Genom, replizieren kann. Das Plasmid enthält das Gen für die  $\beta$ -Lactamase. Zellen, die dann das Plasmid enthalten, lassen sich auf Ampicillin-Agar selektionieren ( $Amp^R$ ). Auf dem pBluescript-Plasmid befindet sich auch eine multiple Klonierungsstelle (MCS). Diese enthält eine Vielzahl von Erkennungssequenzen für unterschiedliche Restriktionsendonukleasen (B).

Da der His-tag-Anteil des Fusionsproteins als Hilfe für die spätere Identifizierung der Proteine mit entsprechendem Antikörper mitenthalten bleiben sollte, wurden die inserierten cDNA-Fragmente der regulatorischen Subdomänen von LSCII und KIAA380 in pET-15b mit den Restriktionsendonukleasen Xba I und Bam HI aus dem Expressionsvektor pET-15b herausgeschnitten. Der Vektor pBluescript SK wurde mit den gleichen Restriktionsendonukleasen (Xba I und Bam HI) geschnitten (Abbildung 17).

**A pET-15b / LSCII bzw. pET-15b / KIAA380**



**B pBluescript SK (+ / -)**

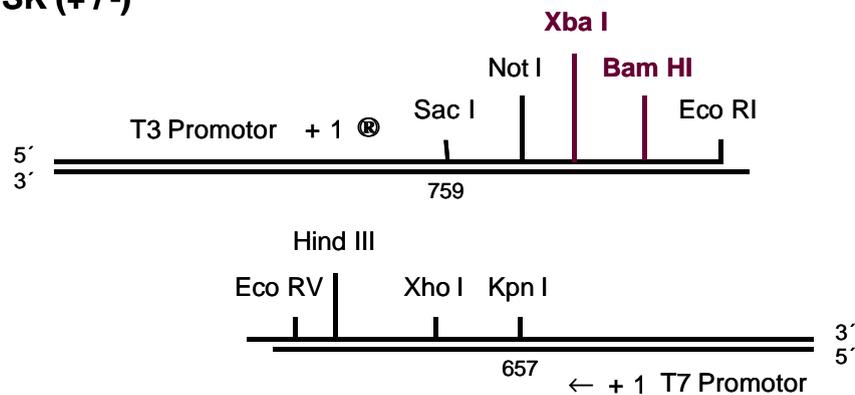
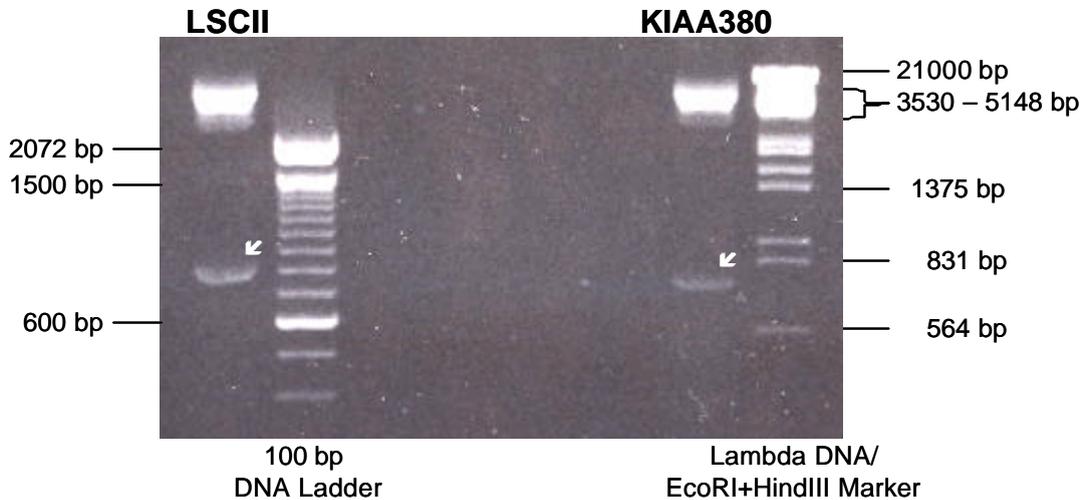


Abbildung 17 **Schematische Darstellung der verwendeten Restriktionserkennungsstellen für die Ligation.** Das pET-15b-Plasmid/LSCII-RGS bzw. pET-15b-Plasmid/KIAA380-RGS (A) wurden mit Restriktionsendonukleasen Xba I und Bam HI geschnitten. Der Klonierungsvektor pBluescript SK (B) wurde mit den gleichen Restriktionsendonukleasen (Xba I und Bam HI) in seiner multiplen Klonierungsstelle linearisiert.

Die entstandenen Fragmente wurden anschließend über die LMP-Agarosegel-Elektrophorese gereinigt (Abbildung 18).



**Abbildung 18 Aufreinigung der DNA-Fragmente der RGS-Proteine LSCII und KIAA380 aus dem Ethidiumbromid-gefärbten LMP-Agarosegel.** Die rekombinierten DNA-Moleküle pET-15b / LSCII und pET-15b / KIAA380 wurden jeweils mit den Restriktionsendonukleasen Xba I + Bam HI für 1 h bei 37 °C geschnitten. Nach dem Restriktionsverdau mit Xba I und Bam HI waren folgende Banden zu erwarten:

RGS-Protein	Restriktionsenzyme	Größe des Inserts
LSCII	Xba I + Bam HI	800 – 850 bp
KIAA380	Xba I + Bam HI	750 – 800 bp

Für die Isolierung der DNA-Fragmente wurde ein 1 %-iges LMP-Agarosegel verwendet. Die getrennten DNA-Fragmente wurden auf dem UV-Transilluminator ausgeschnitten und aufgereinigt. Mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie wurden die DNA-Konzentrationen gemessen.

Der Klonierungsvektor pBluescript SK wurde ebenfalls durch die Restriktionsenzyme Xba I und Bam HI, deren Erkennungssequenzen in seiner multiplen Klonierungsstelle vorhanden sind, geschnitten.

Der nächste Schritt war der Einbau der Fragmente der RGS-Proteine LSCII bzw. KIAA380 in den linearisierten pBluescript-Vektor.

Nach der Ligation der Fragmente in pBluescript SK wurden DH5 $\alpha$  E. coli-Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert. pBluescript SK besitzt ein Ampicillin-Resistenzgen (Amp<sup>R</sup>). Somit wurden positive Klone auf Ampicillin-haltigen Agarplatten selektioniert. Positive Klone wurden durch einen Restriktionsverdau mit Xba I und Bam HI identifiziert (Abbildung 19). Nachdem mittels Minipräparation und anschließendem Restriktionsverdau durch Kontrolle in einem Agarosegel festgestellt wurde, welche der transformierten Zellen tatsächlich den Vektor mit dem gewünschten cDNA-Fragment des rekombinierten DNA-Moleküls enthalten, wurden die rekombinierten Plasmide amplifiziert und gereinigt (Maxipräparation von Plasmid-DNA; siehe Abschnitt 2.2.7).

### **4.1.5 pAdTrack / pAdEasy-1**

Die Herstellung der rekombinanten Adenoviren von LSCII-RGS und KIAA380-RGS erfolgte nach der Methode von He und Mitarbeitern (1998). Grundlage war eine Methode, bei der die adenoviralen Konstrukte nicht durch die Ligationsreaktion kloniert wurden, sondern durch die homologe Rekombination. Bei der homologen Rekombination kommt es durch Anlagerung identischer Sequenzen des rechten und linken Arms des Shuttle-Vektors pAdTrack an den rechten bzw. linken Arm von pAdEasy-1 zu einer fast vollständigen Integration des Shuttle-Vektors in das adenovirale Konstrukt (siehe Abschnitt 2.3 und Abbildung 26).

pAdTrack (9220 bp, Dr. Vogelstein; Abbildung 20B) besitzt zwei CMV-Promotoren, die cDNA für GFP (fluoreszenzmikroskopische Identifizierung infizierter Zellen), eine multiple Klonierungsstelle, die den Einbau eines DNA-Fragmentes ermöglicht und außerdem eine Pme I- und zwei Pac I-Schnittstellen außerhalb der MCS.

Das adenovirale Plasmid pAdEasy-1 (33414 bp, Dr. Vogelstein; Abbildung 26B) enthält alle Ad5-Sequenzen außer den Nukleotiden für E1-Gen (1 – 3533) und den Nukleotiden für E3-Gen (28130 - 30820) (siehe Abschnitt 2.3).

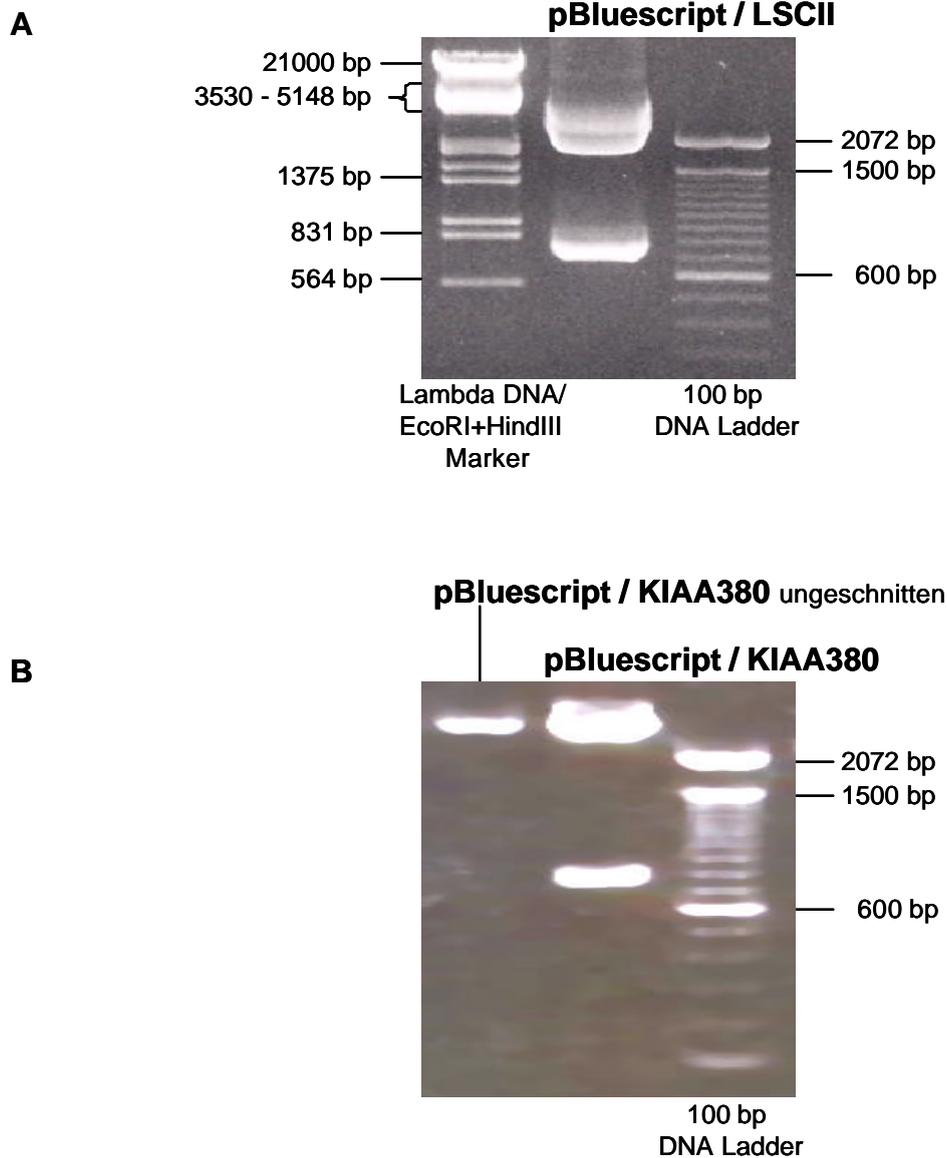
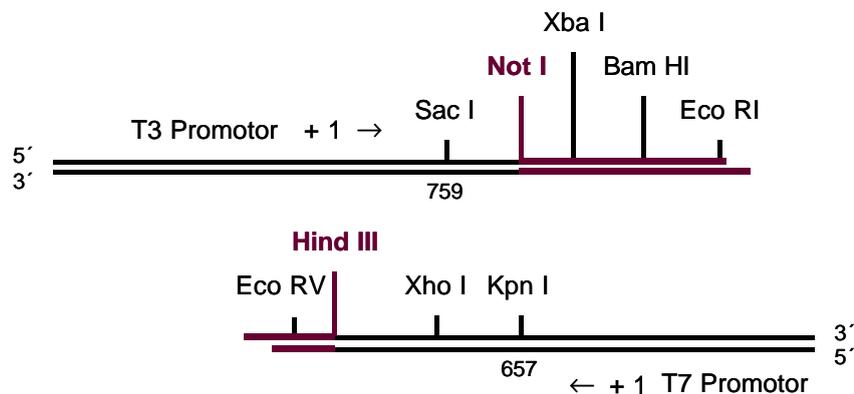


Abbildung 19 **Positive rekombinante Konstrukte des pBluescript mit LSCII-RGS (A) und KIAA380-RGS (B).** Fotografien der 1 %-igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegele. Die DNA-Fragmente von LSCII-RGS und KIAA380-RGS wurden nach der Elution aus dem LMP-Agarosegel und einer anschließenden Aufreinigung jeweils mit pBluescript SK zu einem neuen Plasmid ligiert. Mit dem neuen Plasmid wurden kompetente DH5 $\alpha$  E. coli-Bakterien transfiziert, die aufgrund der durch die Transfektion erworbenen Ampicillin-Resistenz auf Ampicillin-haltigem Agar selektiert werden konnten. Zur Kontrolle der Ligationsprodukte wurde ein Restriktionsverdau mit Xba I und Bam HI für 1 h bei 37 °C durchgeführt.

Die DNA, codierend für die RGS-Domänen von LSCII bzw. KIAA380, sollte somit als nächstes in den viralen Shuttle-Vektor pAdTrack umkloniert werden. Als Restriktionsschnittstellen für die Klonierung wurden Hind III und Not I ausgesucht (Abbildung 20). pBluescript, der die cDNA für LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS enthielt, sowie der Shuttle-Vektor pAdTrack wurden somit mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Not I verdaut.

### A pBluescript / LSCII bzw. pBluescript / KIAA380



### B pAdTrack

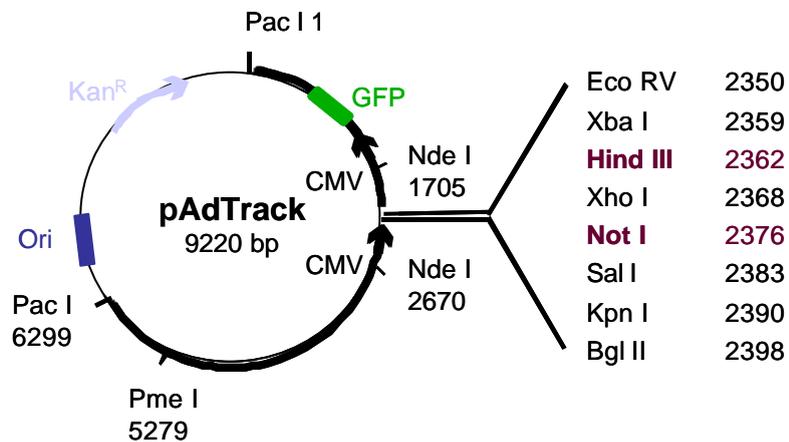


Abbildung 20 **Schematische Darstellung der verwendeten Restriktionserkennungsstellen für die Ligation.** Das pBluescript SK-Plasmid / LSCII-RGS bzw. pBluescript SK-Plasmid / KIAA380-RGS (A) wurden mit den Restriktionsendonukleasen Hind III und Not I geschnitten. Der Klonierungsvektor pAdTrack (B) wurde mit den selben Restriktionsendonukleasen (Hind III und Not I) in seiner multiplen Klonierungsstelle linearisiert.

Die LSCII-RGS- und die KIAA380-RGS-DNA-Fragmente wurden über ein LMP-Agarosegel aufgetrennt (Abbildung 21), die richtige Bande ausgeschnitten und über Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Bei LSCII-RGS wurde eine Bande bei 800 – 850 bp und bei KIAA380-RGS eine Bande von 700 – 750 bp ausgeschnitten. Diese Fragmente wurden anschließend in den linearisierten und aufgereinigten Klonierungsvektor-DNA pAdTrack ligiert.

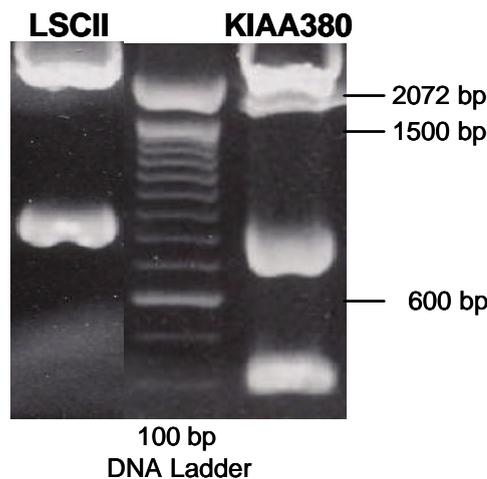


Abbildung 21 **Aufreinigung der DNA-Fragmente der RGS-Proteine LSCII und KIAA380 aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten LMP-Agarosegel.** Die rekombinanten DNA-Moleküle pBluescript SK / LSCII-RGS und pBluescript SK / KIAA380-RGS wurden jeweils mit den Restriktionsendonukleasen Hind III für 3 h und Not I über Nacht bei 37 °C geschnitten. Nach dem Restriktionsverdau mit Hind III und Not I waren folgende Banden zu erwarten:

RGS-Protein	Restriktionsenzyme	Größe des Inserts
LSCII	Hind III und Not I	800 – 850 bp
KIAA380	Hind III und Not I	700 – 750 bp 400 bp

Bei pBluescript SK / LSCII-RGS entstanden nach dem Restriktionsverdau mit Hind III und Not I zwei Banden: Eine obere Bande von pBluescript SK und eine Bande bei 800 – 850 bp von LSCII-RGS. Bei pBluescript SK / KIAA380-RGS entstanden dagegen drei Banden: Eine obere Bande von pBluescript SK, eine Bande von 700 - 750 bp und eine zusätzliche Bande von ca. 400 bp. Die 400 bp-Bande entsteht durch eine zusätzliche Hind III-Schnittstelle außerhalb der cDNA-Sequenz, die für KIAA380-RGS codiert.

Zur Isolierung der DNA-Fragmente wurde ein 1 %iges LMP-Agarosegel verwendet. Die getrennten DNA-Fragmente wurden auf dem UV-Transilluminator ausgeschnitten. Die Gewinnung der DNA aus den Gelstücken erfolgte nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion. Mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie wurden die DNA-Konzentrationen gemessen.

Der Ligationsansatz wurde in DH5 $\alpha$  E. coli-Bakterien transformiert. Die Selektion der positiven Rekombinanten erfolgte auf Kanamycin-Platten. Die positiven Klone wurden durch einen Restriktionsverdau mit Hind III und Not I überprüft (Abbildung 22).

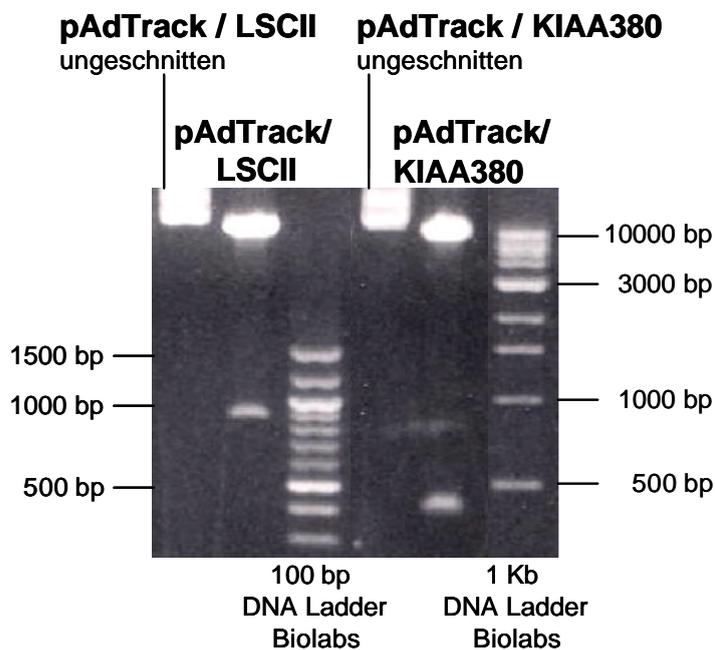


Abbildung 22 **Positive rekombinante Konstrukte von pAdTrack mit LSCII-RGS und mit KIAA380-RGS.** Fotografie eines 1 %-igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegels. Die DNA-Fragmente von LSCII-RGS und KIAA380-RGS wurden nach der Elution aus dem LMP-Agarosegel und einer anschließenden Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion jeweils mit pAdTrack zu einem neuen Plasmid ligiert. Mit dem neuen Plasmid wurden elektrokompetente DH5 $\alpha$  E. coli-Bakterien transfiziert, die aufgrund der durch die Transfektion erworbenen Kanamycin-Resistenz auf Kanamycin-haltigem Agar selektiert werden konnten. Zur Kontrolle der Ligationsprodukte wurde ein Restriktionsverdau mit Hind III und Not I für 1 h bei 37 °C durchgeführt. Nachdem erfolgreich gezeigt werden konnte, dass die gewachsenen Bakterienklone die rekombinanten DNA-Moleküle enthalten, wurden mit der Maxipräparation größere Mengen aus Bakterien gewonnen. Die DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie gemessen.

Zur Kontrolle der Ligationsprodukte, pAdTrack/LSCII-RGS und pAdTrack/KIAA380-RGS, wurden diese mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Abbildungen 23 und 24).

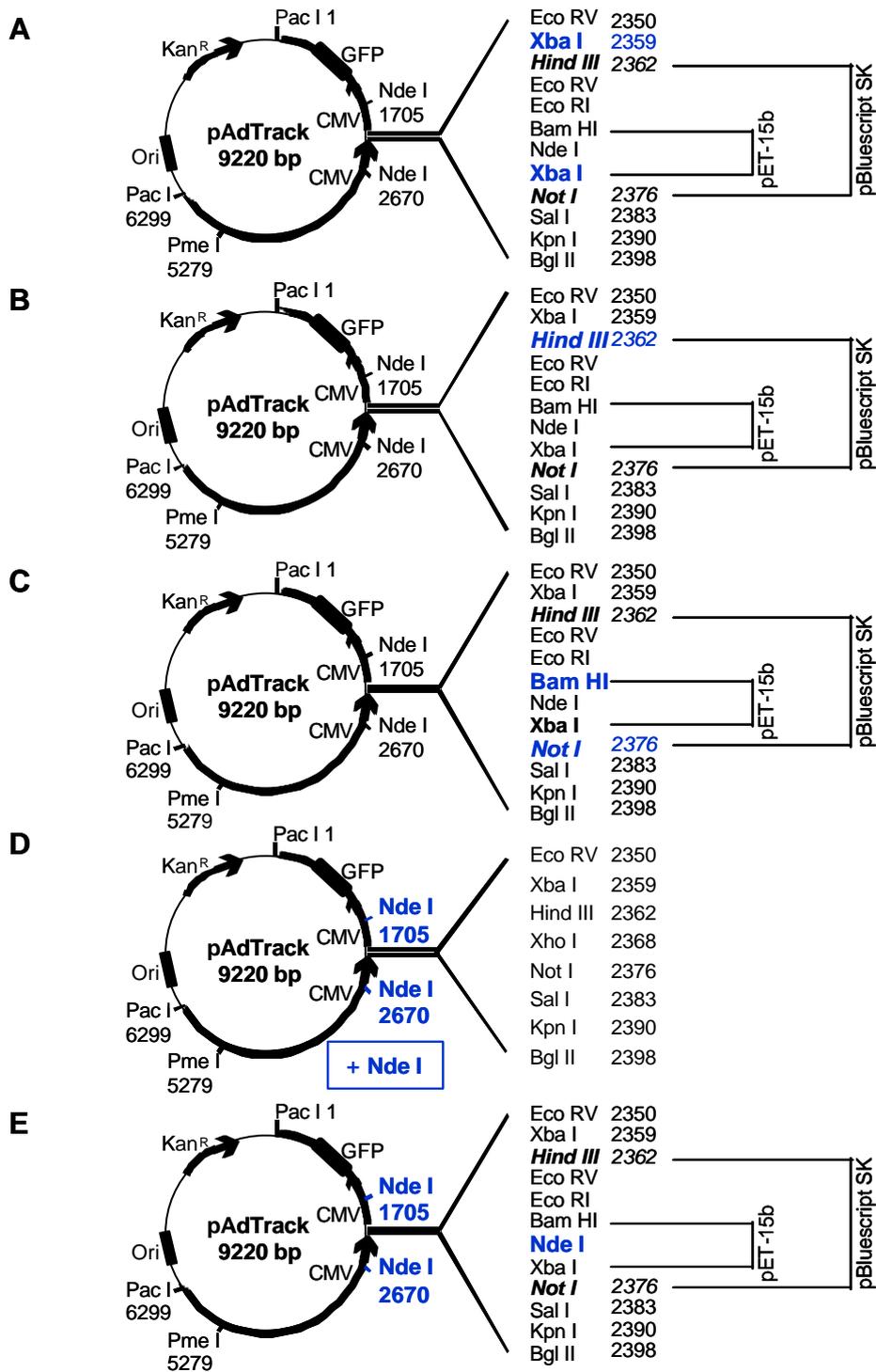
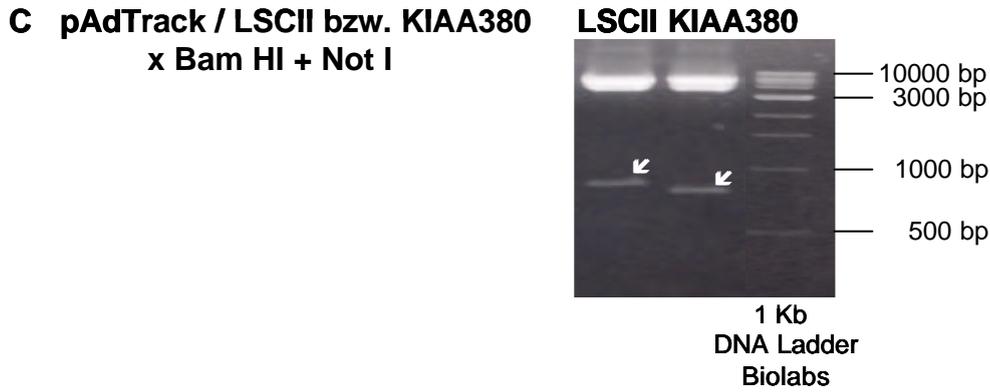
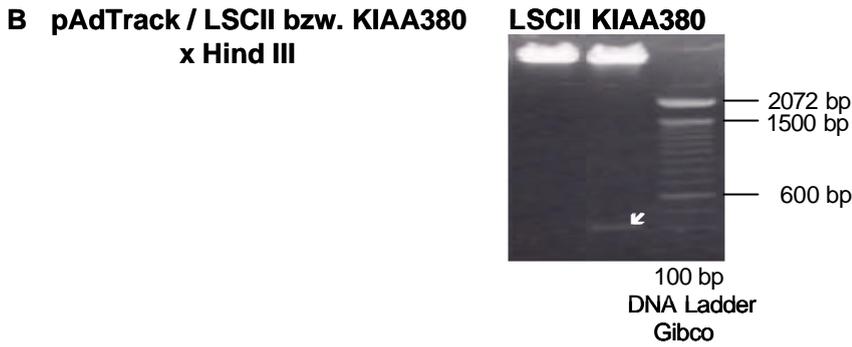
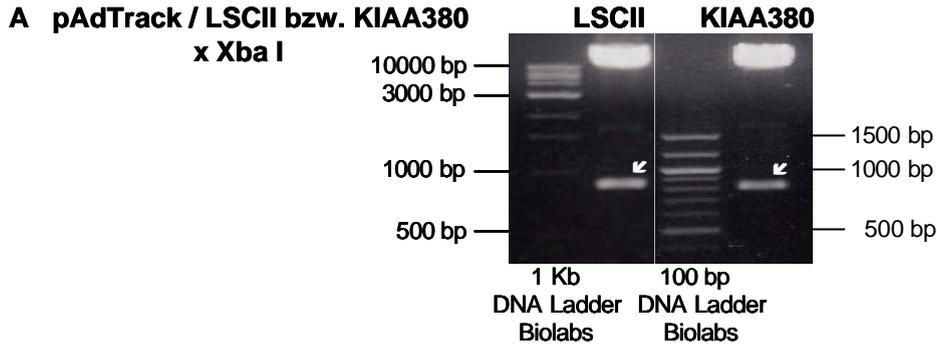
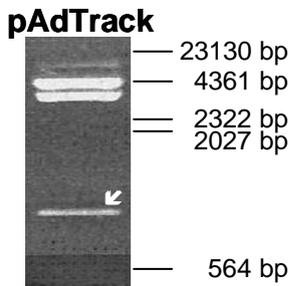


Abbildung 23 Schematische Darstellung des Restriktionsverdaus zur Kontrolle der Ligationsprodukte pAdTrack / LSCII und pAdTrack / KIAA380. Die Lage der Erkennungssequenzen für Xba I (A), Hind III (B), Bam HI + Not I (C) und Nde I (D und E).



**D pAdTrack x Nde I**



**E pAdTrack / LSCII bzw. KIAA380 x Nde I**

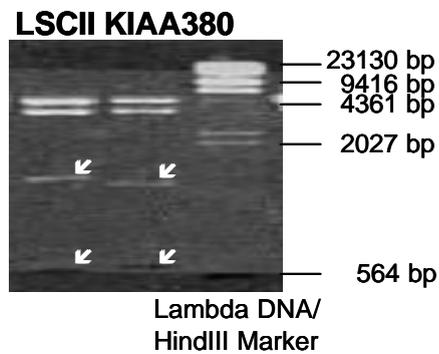


Abbildung 24 **Restriktionsverdau zur Kontrolle der Ligationsprodukte pAdTrack / LSCII-RGS und pAdTrack / KIAA380-RGS.** Fotografien der mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegele nach Restriktionsverdau der Ligationsprodukte pAdTrack / LSCII und pAdTrack / KIAA380 (je 0,5 µg) mit Xba I (A), Hind III (B), Bam HI + Not I (C) und Nde I (D,E). Die Tabelle zeigt in der Übersicht die eingesetzten Restriktionsendonukleasen und die zu erwartenden Fragmente:

RGS-Protein	Größe des Inserts (bp)	Größe des Ligationsproduktes mit pAdTrack (bp)	Restriktionsenzyme	Fragment (bp)	Fragment (bp)
LSCII	850	≈ 10 000	Xba I	850 - 900	9200
LSCII	850	≈ 10 000	Hind III	-	10000
LSCII	850	≈ 10 000	Bam HI + Not I	850 - 900	9200
LSCII	850	≈ 10 000	Nde I	1200 500 – 600	≈ 4500 ≈ 3000

RGS-Protein	Größe des Inserts (bp)	Größe des Ligationsproduktes mit pAdTrack (bp)	Restriktionsenzyme	Fragment (bp)	Fragment (bp)
KIAA380	800	≈ 10 000	Xba I	800	9200
KIAA380	800	≈ 10 000	Hind III	400	10000
KIAA380	800	≈ 10 000	Bam HI + Not I	800	9200
KIAA380	800	≈ 10 000	Nde I	1100 500 – 600	≈ 4500 ≈ 3000

Beim Restriktionsverdau mit Hind III (B) kam es zur Linearisierung von pAdTrack / LSCII, da nur eine Schnittstelle für Hind III vorhanden ist. Bei pAdTrack / KIAA380 entstanden zwei Banden, da die cDNA-Sequenz für KIAA380 auch eine Hind III-Schnittstelle enthält.

Nach dem Restriktionsverdau von pAdTrack mit Nde I (D) entstanden Banden wie erwartet: Zwei Banden von ca. 4500 bp und 3000 bp und eine Bande bei 800 bp.

Nach Kontrolle der Ligationsprodukte (des pAdTrack mit den LSCII-RGS- bzw. KIAA380-RGS-DNA-Fragmenten) wurden diese mit dem Restriktionsenzym Pme I über Nacht bei 37 °C geschnitten und linearisiert (Abbildung 25). Die mit Pme I linearisierten Plasmide wurden über LMP-Agarosegel aufgereinigt und anschließend dephosphoryliert (siehe Abschnitt 2.2.3), um eine Religation zu verhindern.

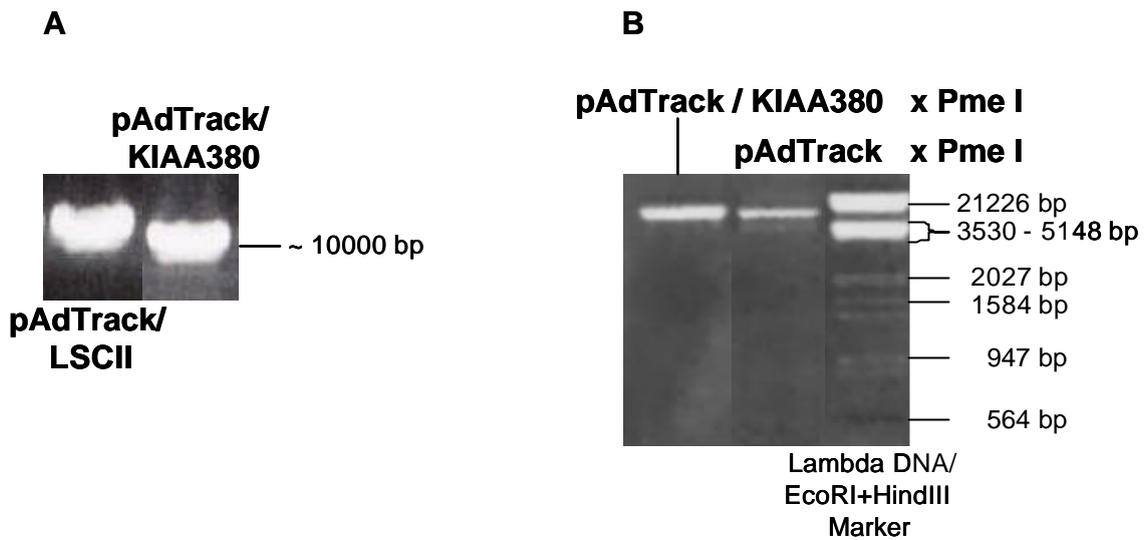
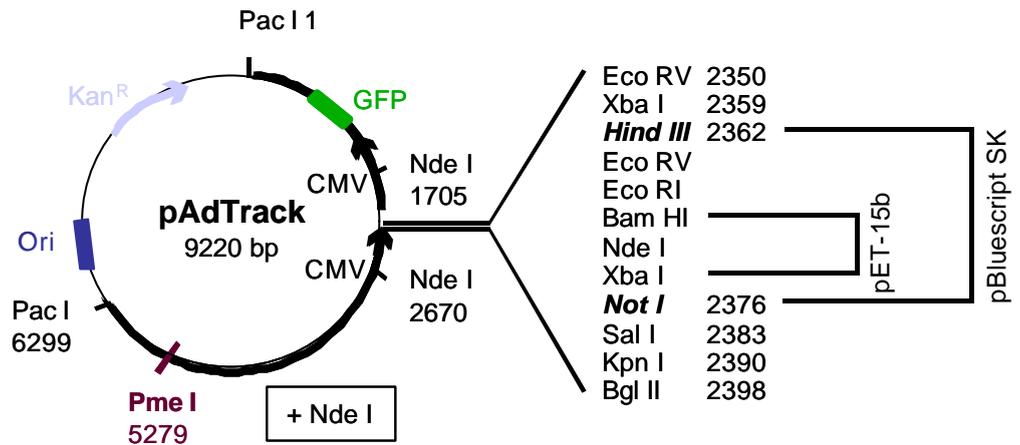


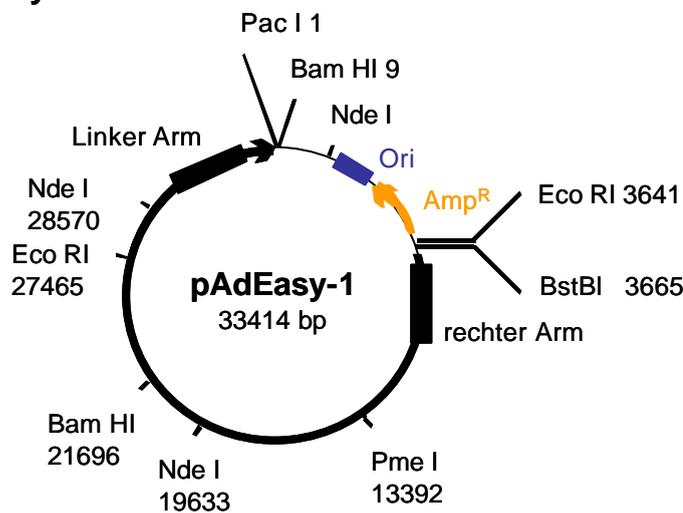
Abbildung 25 **Aufreinigung der mit Pme I geschnittenen DNA-Fragmente der RGS-Proteine LSCII und KIAA380.** Die rekombinante DNA (je 20 µg) pAdTrack / LSCII-RGS (A) bzw. pAdTrack / KIAA380-RGS (A und B) wurde jeweils mit der Restriktionsendonuklease Pme I (1 Unit/µg) über Nacht bei 37 °C geschnitten. Als Kontrolle wurde pAdTrack (B) entsprechend mit der Restriktionsendonuklease Pme I über Nacht bei 37 °C geschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte aus dem mit Ethidiumbromid gefärbten LMP-Agarosegel durch Phenol-Chloroform-Extraktion.

Die Kotransformation der mit Pme I linearisierten, über LMP-Agarosegel isolierten und anschließend durch Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigten pAdTrack / LSCII-RGS und pAdTrack / KIAA380-RGS zusammen mit pAdEasy-1 erfolgte in elektrokompenten BJ5183-Bakterienzellen (siehe Abschnitt 2.3). Die Transformation wurde mittels Elektroporation durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.5). Die Selektion von positiven Rekombinanten erfolgte auf LB-Agar-Kanamycin-Platten. Von den positiven Klonen wurde eine TELT-Minipräparation durchgeführt (siehe Abschnitt 2.2.6). Klone, bei denen durch die Rekombination der cDNA für LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS die Aufnahme ins Virusgenom erfolgt war, wurden durch einen Verdau mit der Restriktionsendonuklease Nde I identifiziert. pAdEasy-1 zeigte nach dem Restriktionsverdau mit Nde I im Agarosegel drei Banden im Bereich von ~ 16000 bp, ~10000 bp und ~ 8000 bp. Nach homologer Rekombination zeigten positive Rekombinanten die charakteristischen Fragmente für pAdEasy-1 plus drei Banden bei ca. 5000, 1100-1200 und 500-600 bp, die aus dem rekombinanten pAdTrack / LSCII-RGS bzw. pAdTrack / KIAA380-RGS stammten.

**A pAdTrack / LSCII bzw. pAdTrack / KIAA380**



**B pAdEasy-1**



**C Homologe Rekombinante Ad5-LSCII bzw. Ad5-KIAA380**

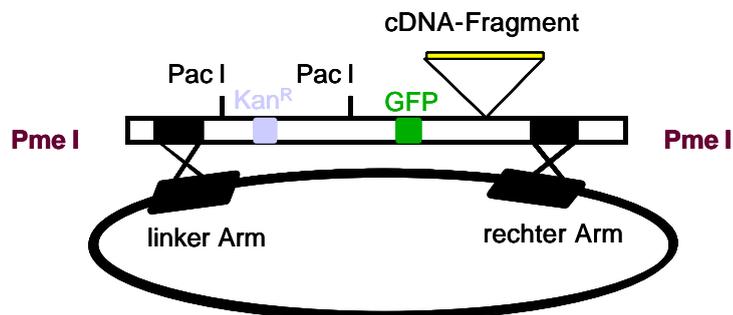
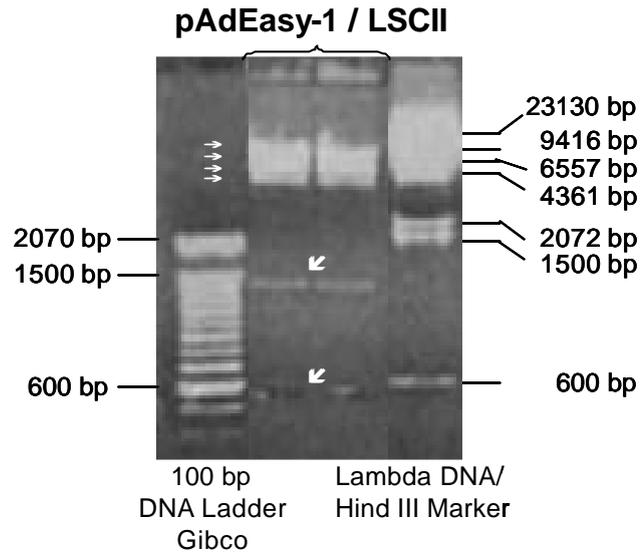


Abbildung 26 Schematische Darstellung von pAdTrack mit LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS (A), pAdEasy-1 (B) und der homologen Rekombination (C). Die DNA, codierend für die RGS-Domänen von jeweils LSCII und KIAA380, umkloniert in den viralen Shuttle-Vektor pAdTrack wurde mit Pme I linearisiert (A) und zusammen mit pAdEasy-1 (B) in Bakterien kotransformiert. Durch die homologe Rekombination (C) kommt es zur Übertragung der RGS-Domänen des Zielgens auf das Virusgenom.

**A pAdEasy-1 / LSCII  
x Nde I**



**B pAdEasy-1 / KIAA380  
x Nde I**

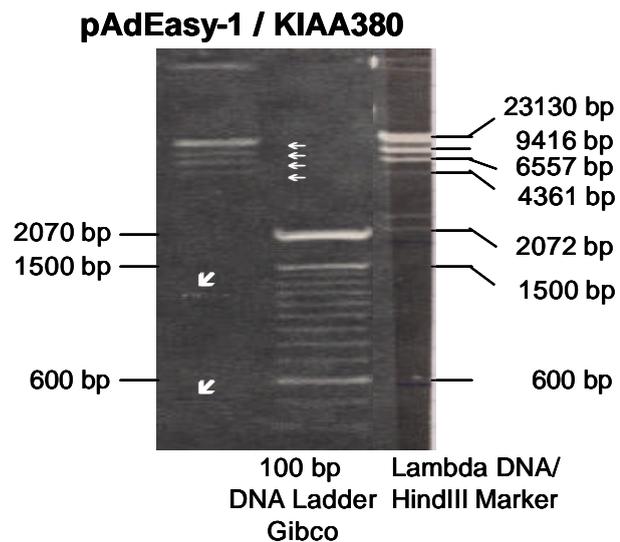


Abbildung 27 **Positive homologe Rekombinanten von pAdEasy-1 mit LSCII-RGS (A) und mit KIAA380-RGS (B).** Fotografien der 1 %-igen Ethidiumbromid-haltigen Agarosegele. DNA-Fragmente von pAdTrack / LSCII und pAdTrack / KIAA380 wurden nach der Linearisierung mit Pme I, der Elution aus dem LMP-Agarosegel und einer anschließenden Aufreinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion jeweils mit pAdEasy-1 in elektrokompenten BJ5183-Bakterienzellen kotransformiert und auf Kanamycin-haltigem Agar ausplattiert. Zur Kontrolle der Rekombinanten wurde ein Restriktionsverdau mit Nde I für 1 h bei 37 °C durchgeführt.

## 4.2 Transformation der rekombinanten Bakterienkolonien pAdEasy-1/LSCII-RGS und pAdEasy-1/KIAA380-RGS in HEK 293-Zellen

### 4.2.1 Linearisierung mit Pac I

Nach der Identifizierung der rekombinanten Bakterienkolonien, pAdEasy-1 / LSCII-RGS und pAdEasy-1 / KIAA380-RGS, wurde die DNA in einer DNA-Präparation im großen Maßstab amplifiziert, die Plasmide mit Pac I linearisiert (Abbildung 28) und anschließend die HEK 293-Zellen transfiziert (siehe Abschnitt 2.7).

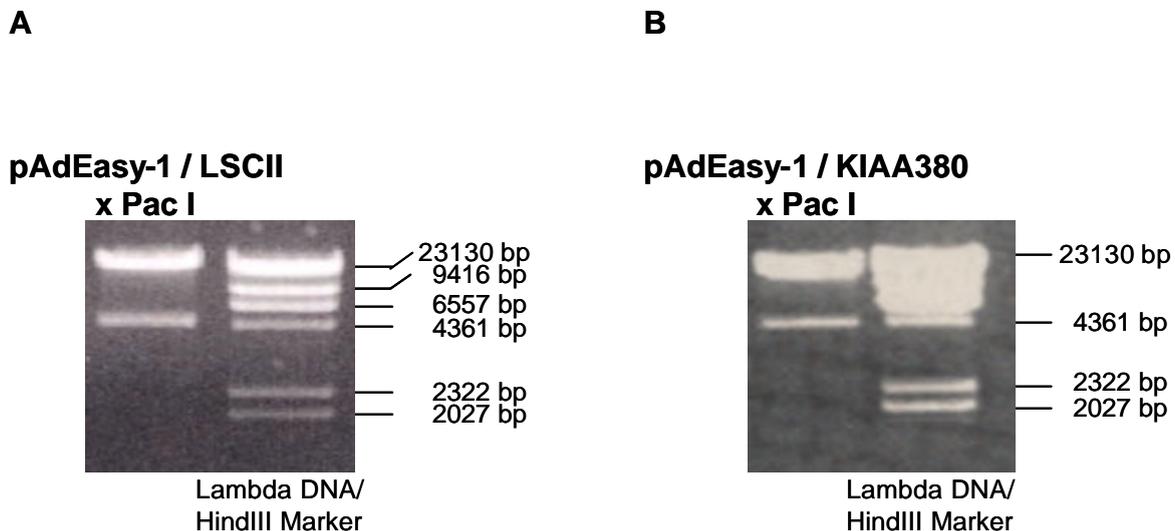


Abbildung 28 **Fotografien der Agarosegele nach dem Restriktionsverdau mit Pac I.** Je 20 µg rekombinante Bakterienkolonien pAdEasy-1 / LSCII (A) und pAdEasy-1 / KIAA380 (B) wurden jeweils mit der Restriktionsendonuklease Pac I über Nacht bei 37 °C geschnitten und linearisiert. Die Aufreinigung der DNA erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion. Nach der Fällung bei – 80 °C (30 min) wurde für 30 - 150 min bei 15800 x g (4 °C) zentrifugiert. Die entstandenen Pellets wurden zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen (10 min bei 15800 x g und 4 °C). Das Pellet wurde getrocknet und in 20 µl Aqua ad injectabilia aufgenommen (Sterilbank für Zellkultur). Die Schritte ab der Fällung erfolgten unter sterilen Bedingungen, da die DNA sauber sein muss, damit die Zellen die Prozedur überleben. Die DNA-Konzentrationen wurden mit Hilfe der Ultraviolettabsorptionsspektrometrie gemessen.

### **4.2.2 Transfektion**

Sobald die HEK 293-Zellen zu 30 - 50 % konfluent waren, erfolgte die Lipofectamin®-vermittelte Transfektion der homologen Rekombinanten. Die infizierten HEK 293-Zellen in der kleinen 6 cm-Kulturschale lysierten nach etwa 5 - 10 Tagen. Dies deutete auf eine erfolgreiche Vermehrung der Viren hin. Wenn es nach 8 - 10 Tagen zu keiner Lyse kommt, bedeutet dies nicht, dass keine Viren produziert worden sind, sondern nur, dass nicht genügend Viren vorhanden sind, um die HEK 293-Zellen zu lysieren. In allen infizierten Zellen wurde gleichzeitig GFP exprimiert, welche die fluoreszenzmikroskopische Identifizierung infizierter Zellen erlaubte. Die HEK 293-Zellen wurden bei beginnender Zelllyse mit einem Zellschaber abgelöst und geerntet, in 3 – 4 Zyklen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37 °C aufgetaut. Der gesamte Zellüberstand wurde anschließend auf eine neue Zellkulturschale (Ø 10 cm) überführt. Nach etwa 5 Tagen kam es zur vollständigen Lyse der HEK 293-Zellen. Danach wurden die Viren in einer Large-scale-Präparation auf 40 bis 50 15 cm-Zellkulturschalen weitervermehrt (Amplifikation von rekombinanten Adenoviren, siehe Abschnitt 2.7). Die Adenoviren wurden aus den lysierten HEK 293-Zellen über CsCl-Gradienten aufgereinigt. Abschließend wurde die DNA dialysiert, um sie in einer zur Lagerung geeigneten Puffer zu bringen.

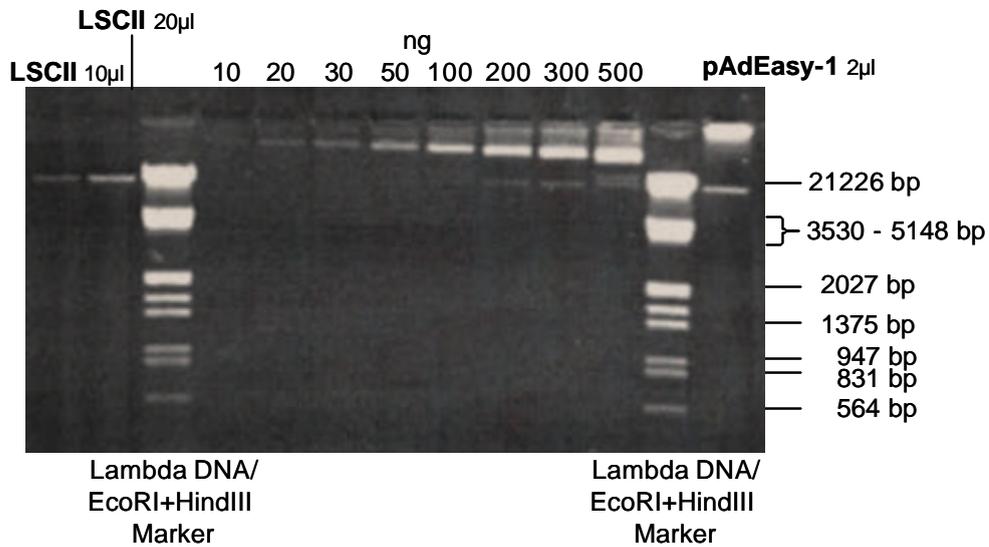
### **4.2.3 Virustiterbestimmung**

Eine wichtige Voraussetzung zum Arbeiten mit Adenoviren ist die Bestimmung des Virustiters. Die Anzahl von Viruspartikeln, mit denen eine Zelle infiziert wird, bezeichnet man als „Multiplizität der Infektion“ (MOI : multiplicity of infection). Da eine Präparation von Viren in der Regel auch defekte Partikel enthält, die nach dem Eindringen in eine Zelle keine lytische Infektion hervorrufen, muss die Anzahl an *biologisch aktiven Viren* (bav) näherungsweise bestimmt werden. Die Anzahl an Viruspartikeln und die Anzahl an biologisch aktiven Viren (bav/ml) differiert um den Faktor 20 - 30. So erhält man gewöhnlich eine *plaque forming unit* (pfu) als Maß der biologischen Aktivität für jedes 20 – 30ste Viruspartikel.

Der Titer der von uns hergestellten Viruskonstrukte wurde mittels Virus-DNA-Quantifizierung auf einem 0,8 %-igen Agarosegel bestimmt. Diese Titerbestimmung ist eine sehr zuverlässige Methode und zudem einfach und schnell in der Durchführung. Nach der Amplifikation rekombinanter Adenoviren und Aufreinigung wurden zur Bestimmung des Titers zunächst Verunreinigungen wie Proteine entfernt, sodass die DNA schließlich in reiner Form übrig bleibt. Um die Proteine zu entfernen, wurde ein Gemisch von gleichen Teilen Phenol und Chloroform zugesetzt. Diese organischen Lösungsmittel fällen die Proteine aus, während die Nukleinsäuren (DNA und RNA) in der wässrigen Lösung bleiben. Phenol ist ein guter Wasserstoffbrückenbildner und kann auch gleichzeitig hydrophobe Wechselwirkungen mit Aminosäure-Seitenketten ausbilden. So dissoziiert Phenol Protein-Nukleinsäure-Komplexe in die freien Komponenten. Die Proteine werden denaturiert und reichern sich in der Phenolphase an. Wenn man die Phasen durch Zentrifugation trennt, findet man somit die ausgefällten Proteinmoleküle als weiße, zusammengeballte Masse an der Grenze zwischen wässriger und organischer Phase. Die wässrige Nukleinsäurelösung wurde mit einer Pipette entnommen. Es sind meistens so viel Proteine enthalten, dass eine einmalige Phenol-Chloroform-Extraktion nicht ausreicht, um die Nukleinsäuren vollständig zu reinigen. Durch mehrfaches Wiederholen der Behandlung mit Phenol und Chloroform würde jedes Mischen und Zentrifugieren einen gewissen Anteil der etwa 32 - 36 kb großen Virus-DNA-Moleküle brechen. Deshalb wurden 100 µl aufgereinigter Virussuspension vor der Phenol-Chloroform-Extraktion mit der Proteinase K behandelt. Dieses Enzym baut die Polypeptide zu kleineren Molekülen ab, die sich dann mit Phenol und Chloroform leichter entfernen lassen.

In 1,5 ml-Eppendorfgefäßen wurde eine Verdünnungsreihe (10 ng, 20 ng, 30 ng, 50 ng, 100 ng, 200 ng, 300 ng und 500 ng) des pAdEasy-1 in Aqua bidest hergestellt. Als Stocklösungen dienten eine 1 : 100 bzw. eine 1 : 1000 Verdünnung. Ein Aliquot der Virus-DNA-Lösung wurde gemeinsam mit der Verdünnungsreihe der DNA von bekannter Konzentration (pAdEasy-1) auf ein 0,8 %-iges Agarosegel aufgetragen. Ein DNA-Größenmarker wurde ebenfalls mit auf das Gel aufgetragen. Nach dem Probenauftrag auf der Kathodenseite des Gels (DNA wandert in Richtung Anode) wurde eine Spannung von 100 - 120 V für 1 h angelegt. Nach beendeter elektrophoretischer Auftrennung wurde das Gel dokumentiert (Abbildung 29).

**A Ad5-LSCII-RGS**



**B Ad5-KIAA380-RGS**

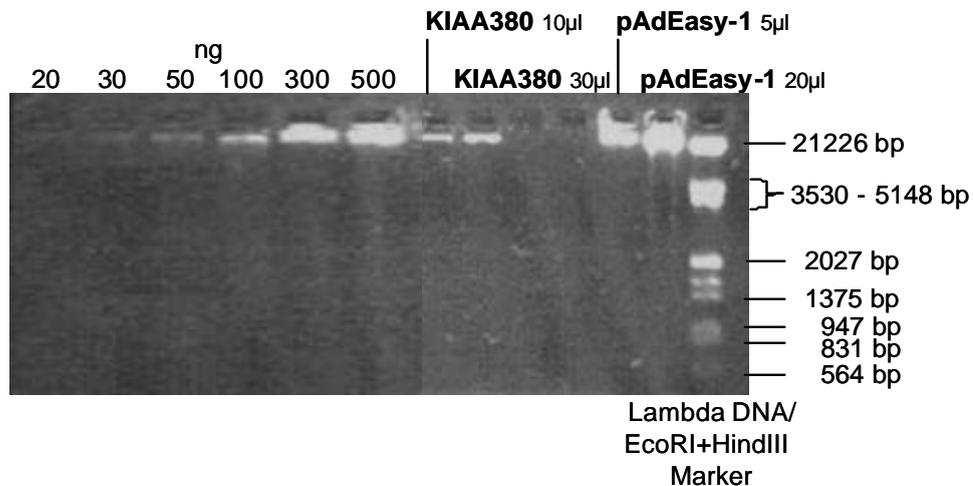


Abbildung 29 **Fotografien der Agarosegele zur Bestimmung des Virustiters.** Es wurde ein Aliquot der LSCII-RGS (A)- und KIAA380-RGS (B)-Viruslösung gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe von DNA bekannter Konzentration (pAdEasy-1) auf das Gel aufgetragen. Als Kontrolle wurde aufgereinigtes pAdEasy-1 aufgetragen. Anschließend wurde durch Vergleich der Bandenintensitäten die DNA-Konzentration für Ad5-LSCII-RGS (A) und Ad5-KIAA380-RGS (B) eingeschätzt und der Titer errechnet.

**4.2.3.1 Berechnung des Virustiters**

Der Virustiter von Ad5-LSCII-RGS und Ad5-KIAA380-RGS wurde anhand der Virus-DNA-Menge mit Hilfe eines 0,8 %-igen Agarosegels bestimmt (siehe Abschnitt 2.8.3). Anhand der Bandendicke war es möglich, eine Einschätzung des Virustiters vorzunehmen. Die DNA-Menge von 10 µl Ad5-LSCII-RGS wurde auf 30 ng (Abbildung 29A) und die von 10 µl Ad5-KIAA380-RGS auf 100 ng geschätzt (Abbildung 29B). Der Titer von Ad5-LSCII-RGS und Ad5-KIAA380-RGS wurde wie folgt errechnet:

Virus-DNA / 100µl	<p><u>Ad5-LSCII-RGS</u>      30 ng x 48 µl : 10 µl = 144 ng</p> <p><u>Ad5-KIAA380-RGS</u>    100 ng x 69 µl : 10 µl = 690 ng</p> <p>Dabei ist 48 µl bzw. 69 µl das Gesamtvolumen von Ad5-LSCII-RGS bzw. Ad5-KIAA380-RGS nach Beendigung der Phenol-Chloroform-Extraktion (siehe Abschnitt 2.8.2) und 10 µl das Volumen der DNA-Lösung, die auf das Gel aufgetragen wurde.</p>
Virus-Dichte / 100 µl	<p><u>Ad5-LSCII-RGS</u>      144 ng : 21 ng x 6,2 x 10<sup>8</sup> Viren = 4,3 x 10<sup>9</sup> Viren / 100 µl</p> <p><u>Ad5-KIAA380-RGS</u>    690 ng : 21 ng x 6,2 x 10<sup>8</sup> Viren = 2 x 10<sup>10</sup> Viren / 100 µl</p> <p>21 ng DNA entspricht 6,2 x 10<sup>8</sup> Ad5-Viren (Standardbezugsgröße).</p>
Virus-Dichte / ml	<p><u>Ad5-LSCII-RGS</u>      4,3 x 10<sup>10</sup> Viren / ml</p> <p><u>Ad5-KIAA380-RGS</u>    2 x 10<sup>11</sup> Viren / ml</p>
Dichte „biologisch aktive Viren“ (bav)	<p><b><u>Ad5-LSCII-RGS</u></b>      4,3 x 10<sup>10</sup> : 30 = 1,42 x 10<sup>9</sup> bav / ml</p> <p><b><u>Ad5-KIAA380-RGS</u></b>    2 x 10<sup>11</sup> : 30 = 6,8 x 10<sup>9</sup> bav / ml</p> <p>30 Viruspartikel entsprechen 1 biologisch aktiven Virus (bav).</p>

#### **4.2.4 Effektivität des adenoviralen Gentransfers für LSCII-RGS und KIAA380-RGS in Kardiomyozyten neonataler Ratten**

Um optimale MOI-Werte sowie die günstigste Inkubationszeit nach der Infektion zu ermitteln, wurden diese in Vorexperimenten mit kleineren Ansätzen ermittelt. Zur Dosisfindung wurden Kulturen von Kardiomyozyten neonataler Ratten jeweils mit Ad5-LSCII-RGS und Ad5-KIAA380-RGS in verschiedenen Konzentrationen für 4 Tage infiziert. Zur Bestimmung der günstigsten Inkubationszeit wurden Kardiomyozyten neonataler Ratten an verschiedenen Tagen mit einer bestimmten Menge Ad5-LSCII-RGS bzw. Ad5-KIAA380-RGS infiziert. Die Infektion wurde durch mikroskopische Betrachtung der Zellen verfolgt. Eine morphologische Veränderung der Kardiomyozyten, die mit Ad5-LSCII bzw. Ad5-KIAA380 infiziert wurden, konnte im Vergleich zu den uninfizierten Kardiomyozyten nicht festgestellt werden. Die Überexpression der RGS-Proteine LSCII und KIAA380 wurde durch die Analyse der Proben (50 µg Protein des Zelllysats) über Polyacrylamidgel-Elektrophorese und anschließendem Western-Blot überprüft. Zur Detektion wurde ein anti-His<sub>6</sub>-Antikörper (sc-803; ein Antikörper, der gegen die His<sub>6</sub>-Sequenz der Fusionsproteine gerichtet ist) verwendet. Der anti-His<sub>6</sub>-Antikörper erkannte in den Immunoblots Banden der exprimierten und mit einem His-tag versehenen Proteine LSCII-RGS und KIAA380-RGS auf einer Höhe von 30 kDa.

Die Immunoblots in Abbildungen 30 B und 30 D zeigen die konzentrationsabhängig gesteigerte LSCII-RGS- und KIAA380-RGS-Proteinexpression. Bereits bei 0,3 µl Ad5-LSCII-RGS (MOI=0,15) (Abbildung 30 B) bzw. 0,1 µl Ad5-KIAA380-RGS (MOI=0,23) (Abbildung 30 D) war eine deutliche Überexpression detektierbar.

Abbildungen 30 A und 30 C zeigen die Überexpression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS in Abhängigkeit von der Infektionsdauer. Es ist zu erkennen, dass es bei 0,3 µl Ad5-LSCII-RGS (MOI=0,15) nach 4 Tagen und bei 0,3 µl Ad5-KIAA380-RGS (MOI=0,7) bereits nach 3 Tagen zur deutlichen Überexpression kommt. LSCII-RGS-Protein und KIAA380-RGS-Protein wurden auch bis zum siebten Tag nach der Infektion stabil exprimiert.

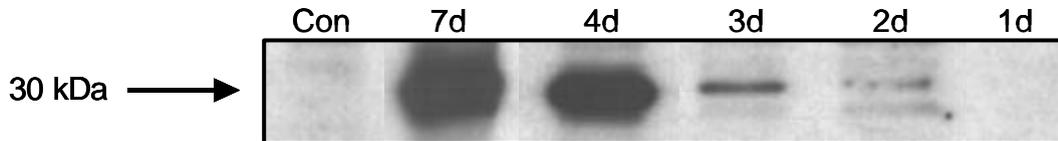
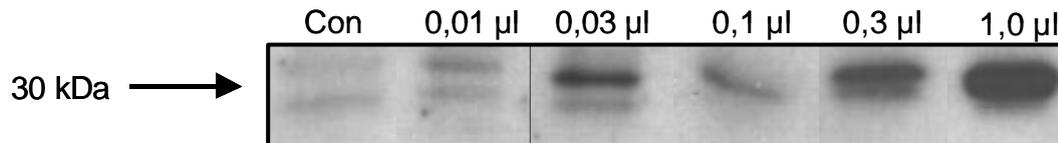
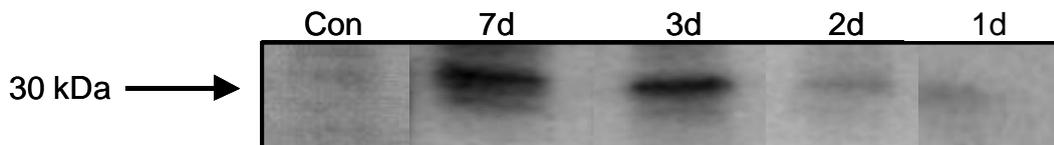
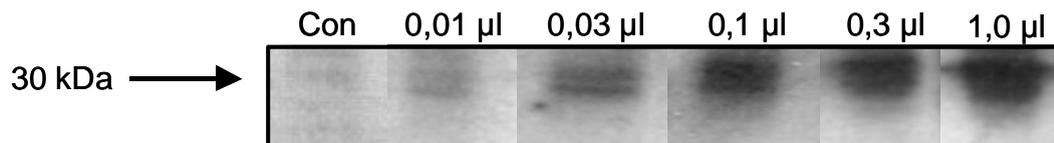
**Ad5-LSCII-RGS****A Zeitabhängigkeit****B Konzentrationsabhängigkeit****Ad5-KIAA380-RGS****C Zeitabhängigkeit****D Konzentrationsabhängigkeit**

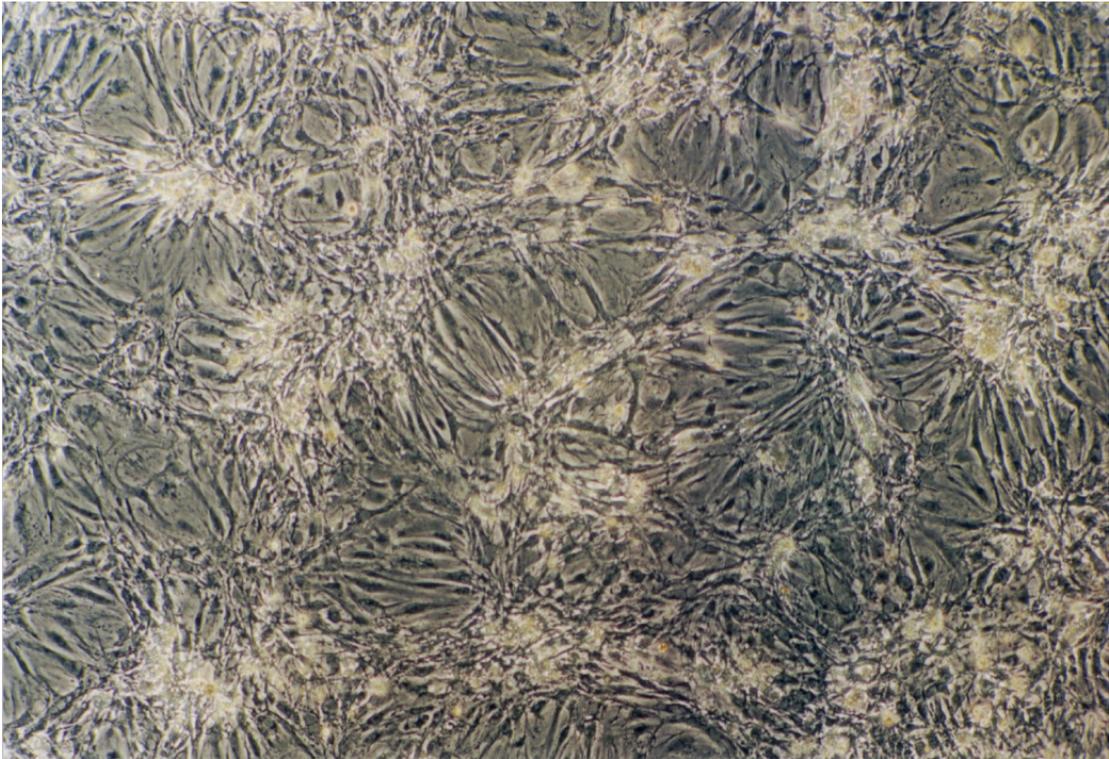
Abbildung 30 **Adenovirus-vermittelte Überexpression der RGS-Proteine LSCII und KIAA380 in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** Die isolierten Kardiomyozyten der neonatalen Ratten wurden am Tag 3, 6, 7, 8 und 9 mit 0,3 µl Ad5-LSCII-RGS (A) bzw. 0,3 µl Ad5-KIAA380-RGS (C) behandelt (7, 4, 3, 2 und 1 d Infektion) und weiter kultiviert. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden am Tag 6 mit verschiedenen Mengen rekombinanter Adenoviren (0,01, 0,03, 0,1, 0,3 und 1,0 µl) LSCII-RGS (B) und KIAA380-RGS (D) infiziert und für weitere 4 Tagen kultiviert. Es wurden Zweifachbestimmungen durchgeführt. Nach der Gewinnung der infizierten Kardiomyozyten wurden die Proteine (50 µg) mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese (12 % Trenngel, 4 % Sammelgel) aufgetrennt. Der Nachweis der RGS-Proteine Ad5-LSCII und Ad5-KIAA380 erfolgte mittels Western-Blot (1 h bei 150 mA) auf Nitrocellulose, ein Immunoblot mit dem anti-His<sub>6</sub>-Antikörper {1 : 500} als 1. Antikörper (2. Antikörper : Anti-Rabbit-IgG-HRP {1 : 2000}) und anschließender ECL-Detektion (siehe Abschnitt 2.5.6).

#### **4.2.5 Morphologisches Erscheinungsbild der Kardiomyozyten in der Zellkultur**

Mittels Phasenkontrastmikroskopie wurden das Wachstum und das morphologische Erscheinungsbild der Kardiomyozyten in der Zellkultur verfolgt. Die Kardiomyozyten brauchten nach der Präparation in der Regel einen Tag, bis sie am Boden der Gewebekulturschale festgewachsen waren und einen gleichmäßigen Zellrasen ausgebildet hatten. Nach spätestens zwei Tagen fingen die Zellen an zu schlagen, indem sich zuerst einzelne Zellen später größere Zellverbände kontrahierten. Die direkt nach der Präparation polymorphen Zellen, mit rundem oder stabförmigem Aspekt, begannen beim Festwachsen auf der 6 cm-Zellkulturschale, sich abzuflachen. Die damit verbundene Ausdehnung führte zum Zusammenwachsen der Zellen. Das Zusammenwachsen der Zellen ist somit nicht durch Zellvermehrung, sondern durch das Größenwachstum und die damit verbundene Ausdehnung zu erklären, denn es wurde zur Blockierung der Proliferation, v.a. der teilungsfähigen Fibroblasten, BrdU [5-Bromo-2'-Desoxyuridin] zugesetzt. War dieses Wachstum abgeschlossen, veränderte sich die Morphologie der unter Kontrollbedingungen kultivierten Zellen im weiteren Verlauf nicht wesentlich.

Zur Kontrolle, ob funktionsfähige Adenoviren entstanden waren, musste der Nachweis der Überexpression der  $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteine LSCII bzw. KIAA380 erbracht werden. Eine auffallende morphologische Veränderung der Kardiomyozyten, die mit Ad5-LSCII-RGS bzw. Ad5-KIAA380-RGS infiziert wurden, konnte nicht festgestellt werden (Abbildung 31). Der primäre Nachweis einer adenoviralen Infektion erfolgte durch die Expression des grün-fluoreszierenden Proteins GFP. GFP war als Reporter gen im Shuttle-Vektor pAdTrack inkloniert. Nach der homologen Rekombination besaßen alle rekombinanten adenoviralen Konstrukte dieses Reporterkonstrukt. Neben der Expression des Zielgens wurde somit in allen infizierten Zellen gleichzeitig GFP exprimiert. Unter dem Fluoreszenzmikroskop waren infizierte Zellen als grün leuchtende Zellen zu detektieren (Abbildung 32). Mit ansteigender Infektionsrate waren mehr grüne Zellen zu erkennen.

A



B

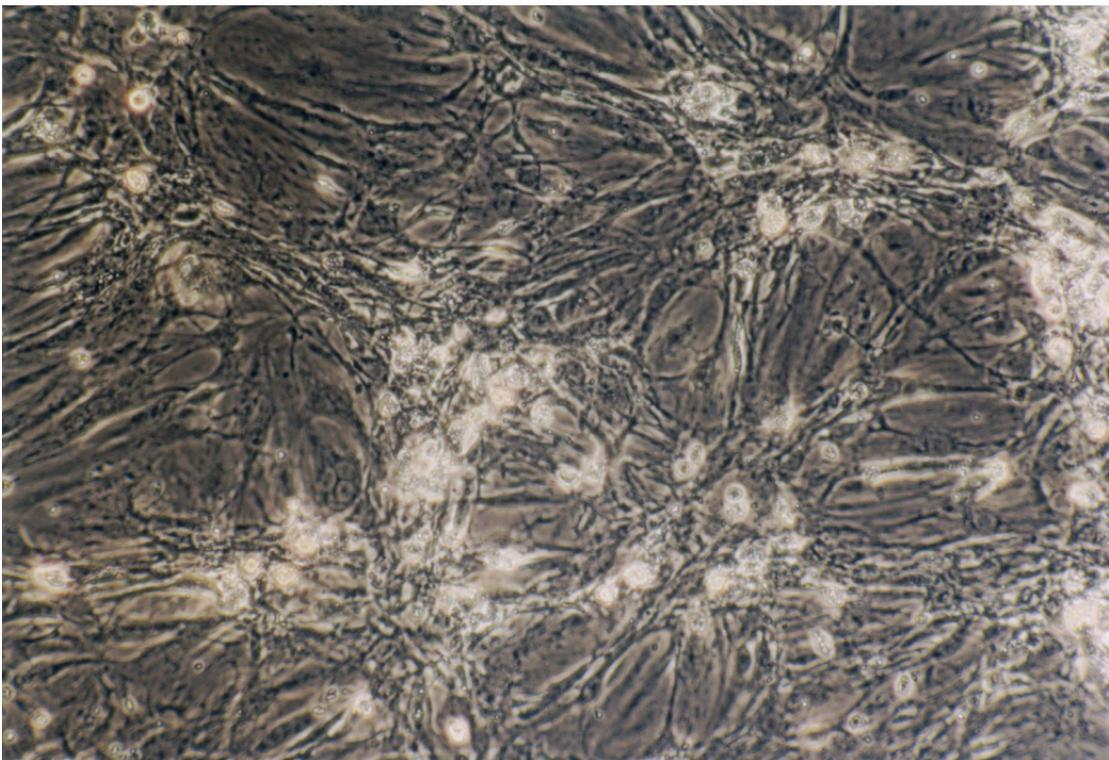
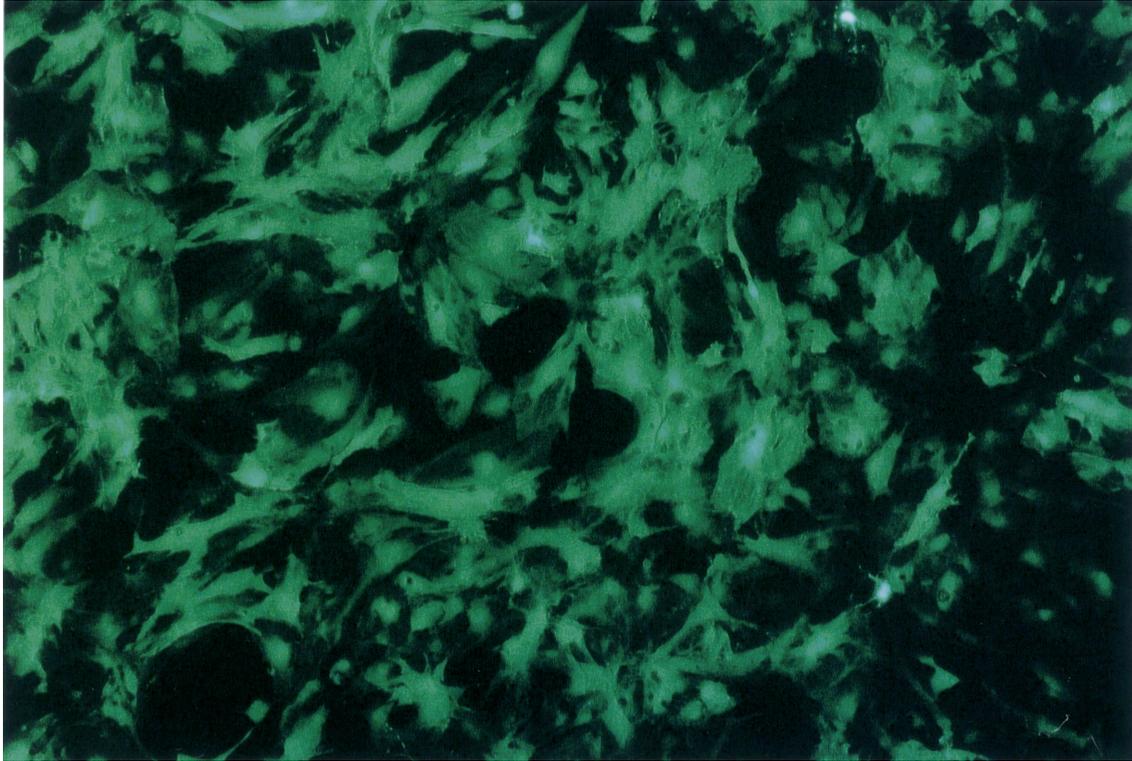


Abbildung 31 **Fotografien einer Phasenkontrastmikroskopie.** Neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 6 nach Präparation mit 0,3  $\mu$ l (MOI=0,7) rekombinanter Adenoviren KIAA380-RGS infiziert und für weitere 4 Tagen kultiviert.  
A: 10 x Objektiv-Vergrößerung / B: 20 x Objektiv-Vergrößerung

A



B

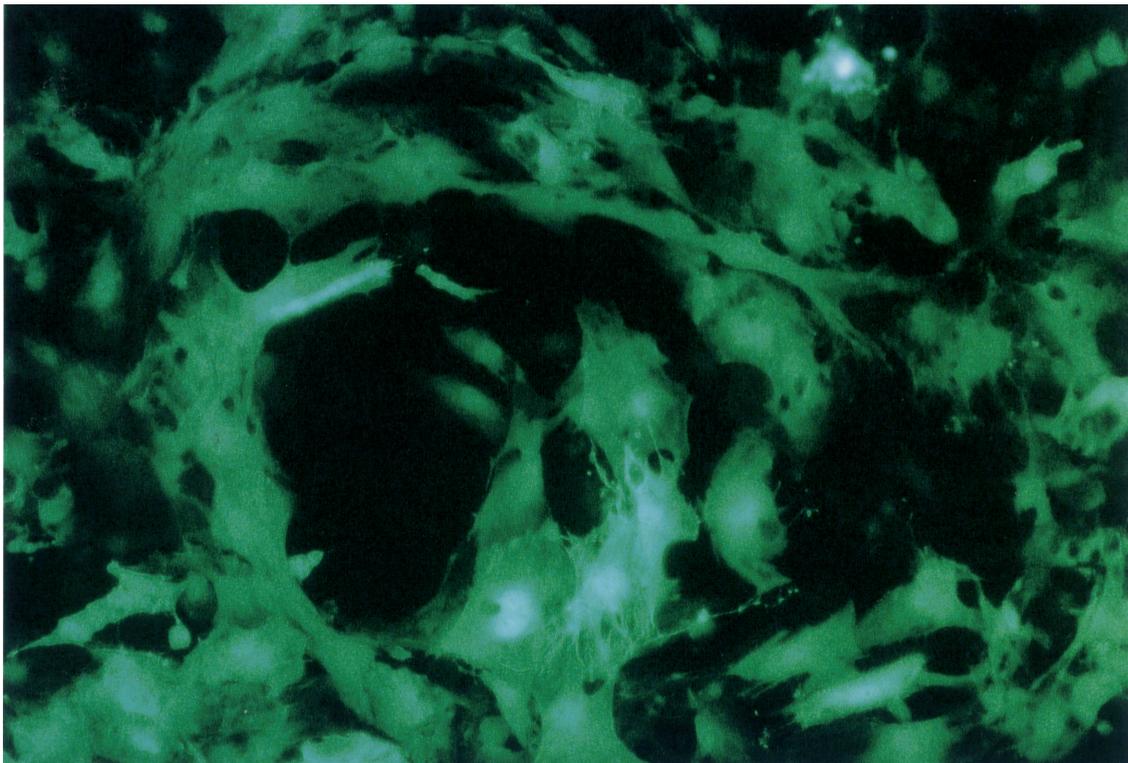


Abbildung 32 **Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der GFP-Expression.** Fluoreszenzmikroskopische Identifizierung der durch Adenoviren vermittelten Überexpression von LSCII-RGS (0,3  $\mu$ l; MOI=0,15) (A: 10 x Objektiv-Vergrößerung) und KIAA380-RGS (0,1  $\mu$ l; MOI=0,23) (B: 20 x Objektiv-Vergrößerung) in Kardiomyozyten neonataler Ratten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) am vierten Tag nach der Infektion.

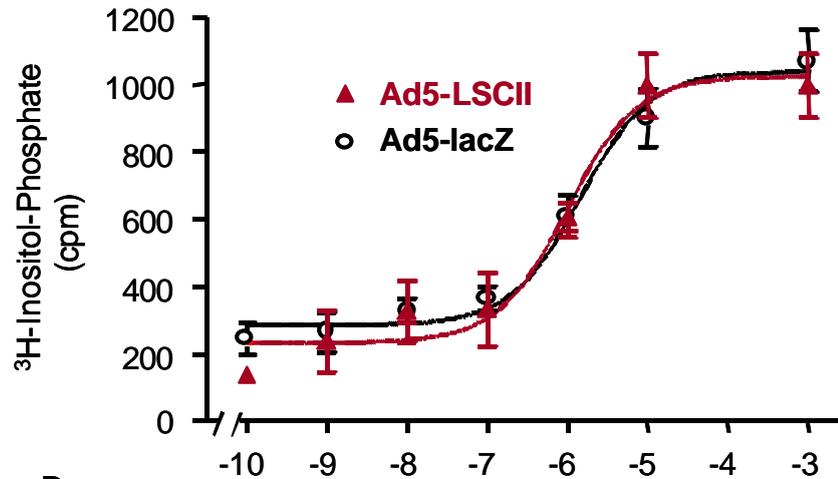
### **4.3 Funktionelle Bedeutung einer durch Adenoviren vermittelten Überexpression der $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteine LSCII-RGS und KIAA380-RGS**

Im dritten Teil der vorliegenden Arbeit sollte die Aktivierung der PLD in isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratten untersucht werden. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, welche Folgen eine Überexpression der  $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteine LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS auf die Aktivität von PLC und PLD in neonatalen Rattenkardiomyozyten haben. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem rekombinanten Adenovirus, welcher für bakterielle  $\beta$ -Galactosidase codiert, Ad5-lacZ, infiziert. Ad5-lacZ wurde freundlicherweise von Prof. Dr. T. Eschenhagen zur Verfügung gestellt.

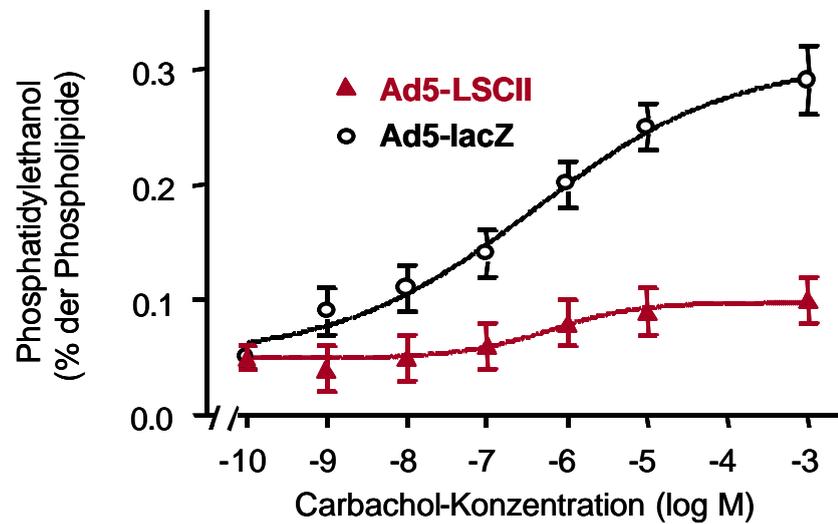
#### **4.3.1 Adenovirale Überexpression in HEK 293-Zellen**

Um zu untersuchen, welche Auswirkungen die Überexpression eines  $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteins auf die Aktivität der Phospholipase hat, wurde der Einfluss einer adenoviral-vermittelten Überexpression von LSCII-RGS auf die PLC- und PLD-Aktivität zuerst in HEK 293-Zellen mit stabil exprimierten M3-Cholinozeptoren untersucht. Die M3-muskarinische Acetylcholinrezeptoren, die in HEK 293-Zellen exprimiert wurden, aktivieren  $G\alpha_{q/11}$ - und  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine (Rümenapp et al. 2001). Außerdem stimulieren sie die PLC und die PLD. Abbildung 33 zeigt die PLC- und PLD-Aktivität nach der Überexpression von LSCII-RGS in den HEK 293-Zellen mit M3-Cholinozeptoren. Die PLC-Aktivität in mit Ad5-lacZ bzw. Ad5-LSCII-RGS infizierten Zellen stieg mit steigender Carbacholkonzentration mit gleicher Potenz und Effektivität (Abbildung 33A). Die PLD-Aktivität in den gleichen Zellen, gemessen als die Bildung von Phosphatidylethanol in Prozent der Gesamtpospholipide, ist in Abbildung 33B dargestellt. Die Bildung von Phosphatidylethanol stieg mit steigender Carbacholkonzentration in mit Ad5-lacZ infizierten Zellen an. Nach der LSCII-RGS-Überexpression dagegen war die Carbachol-induzierte PLD-Aktivität in ihrer Effizienz stark gehemmt. Die Überexpression von Ad5-LSCII-RGS wurde durch Immunoblot verifiziert (Abbildung 33C). Dazu wurden 50  $\mu$ g Protein des Zelllysats eingesetzt. Der anti-His<sub>6</sub>-Antikörper erkannte das rekombinante Fusionsprotein als eine Bande bei ca. 30 kDa.

**A Phospholipase C**



**B Phospholipase D**



**C Immunoblot**

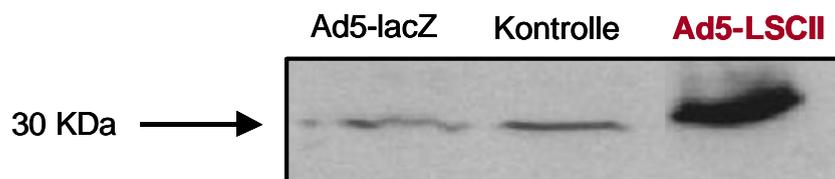


Abbildung 33 Einfluss der Überexpression des  $G_{\alpha_{12/13}}$ -spezifischen RGS-Proteins LSCII auf die PLC (A)- und PLD (B)-Aktivität in den HEK 293-Zellen mit M3-Cholinozeptoren. Die zu 70 % konfluenten HEK 293-Zellen (15 cm-Zellkulturschale) wurden mit Ad5-LSCII-RGS (MOI=1,5) infiziert und für 4 Tage kultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit Ad5-lacZ infiziert. 4 Tage nach der Infektion wurden die HEK 293-Zellen gleichzeitig mit 0,5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -myo-Inositol und 2  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Ölsäure markiert und für etwa 24 h im Brutschrank inkubiert. Stimuliert wurden die Zellen mit Carbachol (30 min). Die Überexpression von LSCII-RGS wurde mittels Western-Blot (anti-His<sub>6</sub>-Antikörper, der die angehängte poly-Histidin-Sequenz aus dem Expressionsvektor pET-15b detektierte) und ECL-Detektion verifiziert (C). n=6, MW  $\pm$  SEM.

#### **4.3.2 Effekte von Thrombin, Endothelin-1 oder Noradrenalin auf die PLC- und PLD-Aktivität in den neonatalen Kardiomyozyten der Ratten**

Noradrenalin, als  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Agonist, induziert die PLC- und PLD-Aktivierung in Kardiomyozyten (Ye et al. 1994, Kurz et al. 1999). Phenylephrin wird häufig benutzt, um die PLC-Aktivität spezifisch über  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren in neonatalen Rattenkardiomyozyten zu stimulieren. Es wurde allerdings berichtet, dass eine PLD-Aktivierung mit Phenylephrin nicht oder nur schwach erfolgt (Clerk und Sudgen 1997, Eskildsen-Helmond et al. 1997). Um die Möglichkeiten der Stimulation der PLD durch  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren in neonatalen Rattenkardiomyozyten zu überprüfen, wurde die Aktivierung der PLC und der PLD durch  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren innerhalb der gleichen Zellpopulation bestimmt. Deshalb wurden die isolierten Kardiomyozyten gleichzeitig mit 2  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -myo-Inositol und 2,5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Ölsäure markiert. Die PLC- und PLD-Aktivität wurde nach der Markierung der Zellen als die Bildung von Gesamt-Inositol-Phosphaten bzw. Phosphatidylethanol bestimmt. Stimuliert wurden die Zellen mit 10  $\mu\text{M}$  Noradrenalin, 10  $\mu\text{M}$  Noradrenalin in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Nadolol oder 10  $\mu\text{M}$  Phenylephrin. Zur Kontrolle wurde auch der Effekt des  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten Nadolol (1 $\mu\text{M}$ ) alleine untersucht. Noradrenalin, Noradrenalin in Gegenwart von Nadolol und Phenylephrin führten zu einer 2 – 3 fachen Zunahme der PLC-Aktivität (Abbildung 34A). Die PLD-Aktivität wurde durch Noradrenalin bzw. Noradrenalin in Gegenwart von Nadolol zu einem ähnlichen Betrag (3 – 4 fach) erhöht (Abbildung 34B). Phenylephrin blieb dagegen ohne Wirkung. Auch Nadolol alleine zeigte keinen Einfluss auf die PLC- bzw. PLD-Aktivität in Kardiomyozyten.

Es wurde überprüft, über welchen  $\alpha_1$ -Adrenozeptor die Noradrenalin-induzierte PLD-Aktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten vermittelt wird. Die Kardiomyozyten wurden deshalb mit  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Antagonisten behandelt (Abbildung 35). Die Noradrenalin-induzierte PLD-Aktivität konnte durch  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor-Subtyp-spezifischen Antagonisten 5-Methyl-Urapidil und WB-4101 gehemmt werden. Der  $\alpha_{1B}$ -Subtyp-Antagonist Chloroethylclonidine, ebenso wie der selektive  $\alpha_{1D}$ -Antagonist BMY 7378 waren ohne Effekt. Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Noradrenalin-induzierte PLD-Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten der Ratten über  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor vermittelt wird.

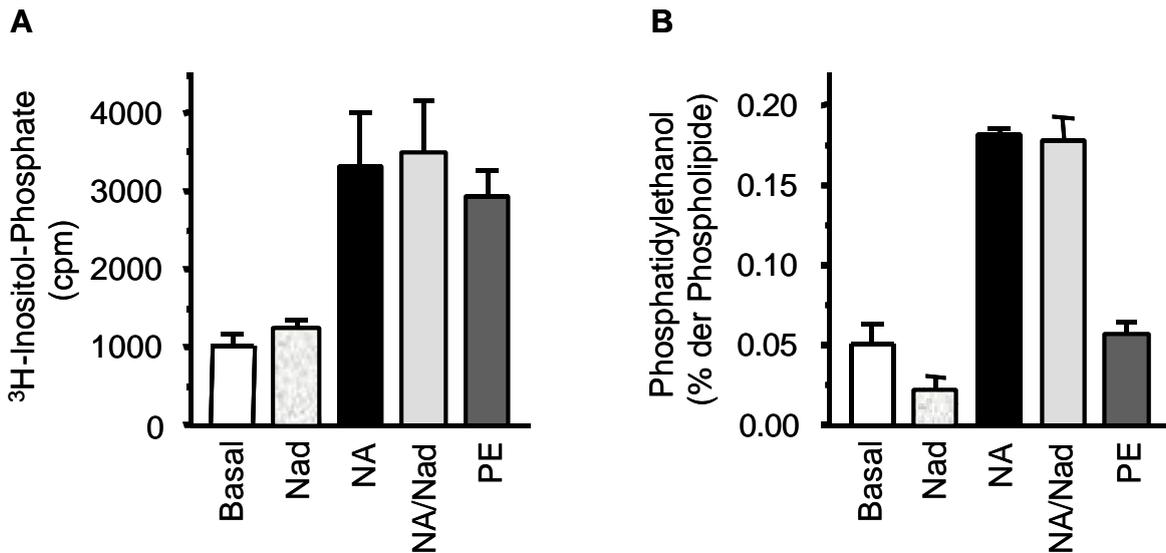


Abbildung 34 **Vergleich der Agonisten-induzierten PLC- und PLD-Aktivität in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten.** Neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 6 mit 2  $\mu$ Ci/ml <sup>3</sup>H-myo-Inositol und 2,5  $\mu$ Ci/ml <sup>3</sup>H-Ölsäure für 24 h markiert. Stimuliert wurden die Zellen mit 10  $\mu$ M Noradrenalin (NA), 10  $\mu$ M Noradrenalin in Gegenwart von 1  $\mu$ M Nadolol (NA/Nad), 10  $\mu$ M Phenylephrin (PE) oder zur Kontrolle mit 1  $\mu$ M Nadolol (Nad). n = 6, MW  $\pm$  SEM.

A: Phospholipase C-Aktivität. Auf der Ordinate aufgetragen ist die Gesamtbildung radioaktiv-markierter Inositol-Phosphate in „counts per minutes“ (cpm).  
 B: Phospholipase D-Aktivität. Auf der Ordinate ist die Bildung von Phosphatidylethanol in Prozent der Gesamtphospholipide dargestellt.

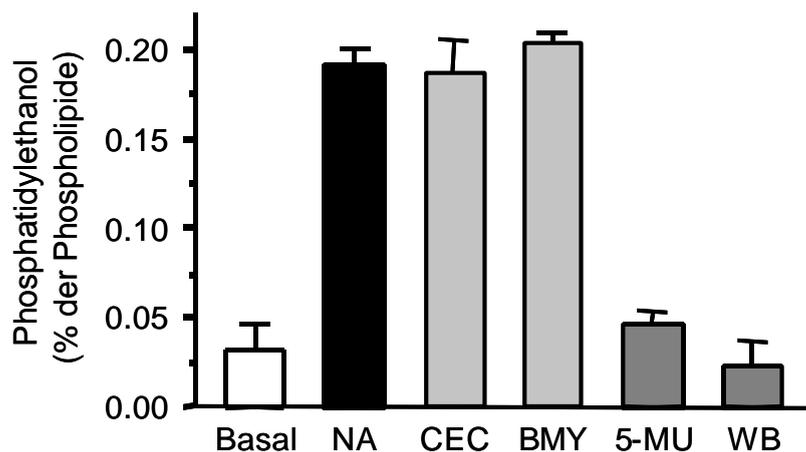
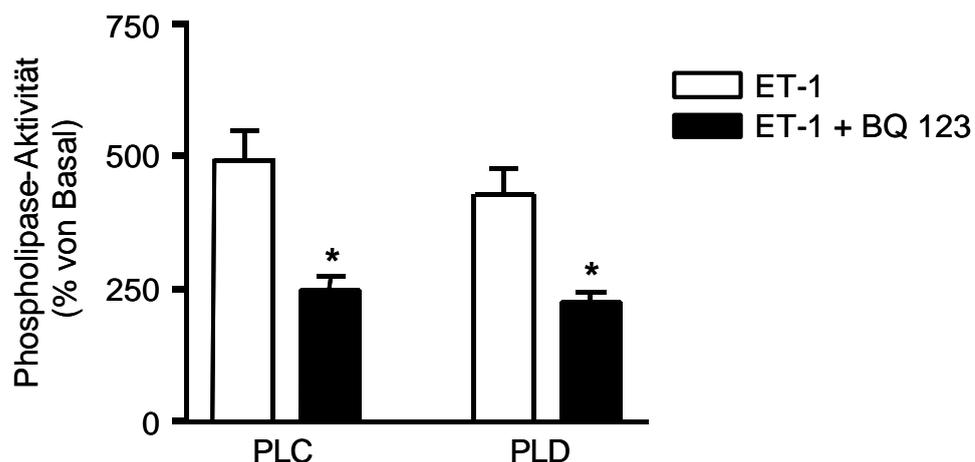


Abbildung 35 **Die Noradrenalin-induzierte PLD-Aktivität in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten wird über  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren vermittelt.** Neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 6 mit 2,5  $\mu$ Ci/ml <sup>3</sup>H-Ölsäure für 24 h markiert. Behandelt wurden die Zellen mit Noradrenalin (NA, 10  $\mu$ M), Noradrenalin (NA, 10  $\mu$ M) plus Chloroethylclonidine (CEC, 10  $\mu$ M), BMY 7378 (BMY, 100 nM), 5-Methyl-Urapidil (5-MU, 100 nM) oder WB-4101 (WB, 100 nM). n = 4, MW  $\pm$  SEM.

In Kardiomyozyten können PLC und PLD durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden. Eine Vielzahl von aktivierten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stimulieren neben der PLC gleichzeitig die PLD. Es gibt Hinweise, dass einige G-Protein-gekoppelte Rezeptoren die PLD über die PLC-vermittelte Proteinkinase C-Aktivierung stimulieren können (Exton 1997, Exton 1999, Houle und Bourgoïn 1999, Jones et al 1999, Frohman et al. 1999). Dies trifft z.B. für die Endothelin-1-induzierte PLD-Aktivität in Kardiomyozyten zu. Höchstwahrscheinlich sind mehrere Proteinkinase C-Isoformen beteiligt (Clerk und Sudgen 1997, Eskildsen-Helmond et al. 1997, Fahimi-Vahid et al. 2002).

Es wurde zunächst überprüft, über welchen Endothelin-Rezeptor die Endothelin-1-induzierte PLC- und PLD-Aktivität in isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratten vermittelt wird. Die Kardiomyozyten wurden deshalb mit dem hochselektiven Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptor-Antagonisten BQ 123 behandelt. Die PLC- und PLD-Aktivität wurde nach der radioaktiven Markierung der Zellen als die Bildung von Gesamt-Inositol-Phosphaten bzw. Phosphatidylethanol bestimmt. Die Endothelin-1-induzierte PLC- und PLD-Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten der Ratten waren nach der Behandlung mit BQ 123 signifikant um ungefähr 50 % gehemmt (Abbildung 36). Die Ergebnisse sprechen dafür, dass die Endothelin-1-induzierte PLC- und PLD-Aktivität in neonatalen Kardiomyozyten der Ratten über Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptoren (ET<sub>A</sub>-Rezeptoren) vermittelt wird.



**Abbildung 36 Die Endothelin-1-induzierte PLC- und PLD-Aktivität in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten wird über ET<sub>A</sub>-Rezeptoren vermittelt.** Neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 6 mit 2 µCi/ml <sup>3</sup>H-myo-Inositol und 2,5 µCi/ml <sup>3</sup>H-Ölsäure für 24 h markiert. Behandelt wurden die Zellen mit 0,1 µM Endothelin-1 (ET-1) mit 1 µM BQ 123 (■ ET-1 + BQ 123) oder ohne BQ 123 (□ ET-1). Die PLC- und PLD-Aktivität sind als die Phospholipase-Aktivität in Prozent von Basal angegeben. n=4, MW ± SEM, \*p < 0,05 vs. Endothelin-1.

Zum Vergleich der Aktivierung der PLC und der PLD durch Endothelin-1-Rezeptoren (ET<sub>A</sub>-R) und Thrombin-Rezeptoren (PAR1) wurden diese Aktivitäten ebenfalls innerhalb der gleichen Zellpopulation bestimmt. Dazu wurden die isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten gleichzeitig mit 2 µCi/ml <sup>3</sup>H-myo-Inositol und 2,5 µCi/ml <sup>3</sup>H-Ölsäure markiert. Die PLC- und PLD-Aktivität wurde nach der Markierung der Zellen als die Bildung von Inositol-Phosphaten bzw. Phosphatidylethanol bestimmt. Stimuliert wurden die Zellen mit 1 µM Endothelin-1 bzw. 1 U/ml Thrombin. Endothelin-1 führte wie Noradrenalin zu einer 2 – 3 fachen Zunahme der PLC-Aktivität. Thrombin führte dagegen nicht zu einer signifikanten Erhöhung der Menge gebildeter Inositol-Phosphate. Die PLD-Aktivität wurde aber durch beide Agonisten in einem ähnlichen Ausmaß (3 – 4 fach) erhöht (Abbildung 37).

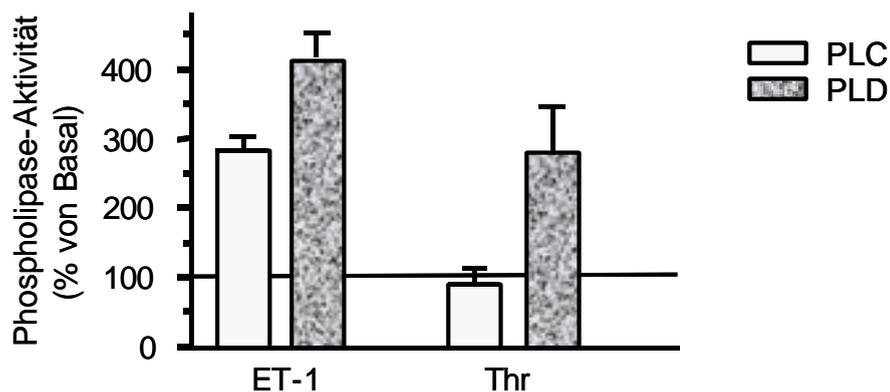


Abbildung 37 **Vergleich der Agonisten-induzierten PLC- und PLD-Aktivität in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten.** Neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 6 mit 2 µCi/ml <sup>3</sup>H-myo-Inositol und 2,5 µCi/ml <sup>3</sup>H-Ölsäure für 24 h markiert. Stimuliert wurden die Zellen mit 1 µM Endothelin-1 (ET-1) und 1 U/ml Thrombin (Thr). Auf der Ordinate aufgetragen ist die Phospholipase-Aktivität in Prozent von Basal. n = 9, MW ± SEM.

Unsere Daten (Abbildung 37) zeigten zunächst, dass Thrombin im Gegensatz zu Endothelin-1 und Noradrenalin nicht zu einer Erhöhung der PLC-Aktivität führt. Die PLC-Aktivität wurde in diesem Versuchsansatz als die Akkumulation gebildeter Inositol-Phosphate (IP<sub>3</sub> < IP<sub>2</sub> < IP<sub>1</sub>) bestimmt. Die Akkumulation der Inositol-Phosphate wurde durch den Zusatz von 10 mM LiCl zum Reaktionsgemisch herbeigeführt (siehe Abschnitt 2.11.3.1.1).

Zur Aufklärung der Frage, ob Thrombin tatsächlich die PLC-Aktivität nicht stimuliert, wurde in einem Rezeptor-Bindungs-Assay die Bildung des primären zellulären PLC-Produktes Inositol-(1,4,5)-Triphosphat ( $IP_3$ ) im Zeitverlauf bestimmt (Abbildung 38).

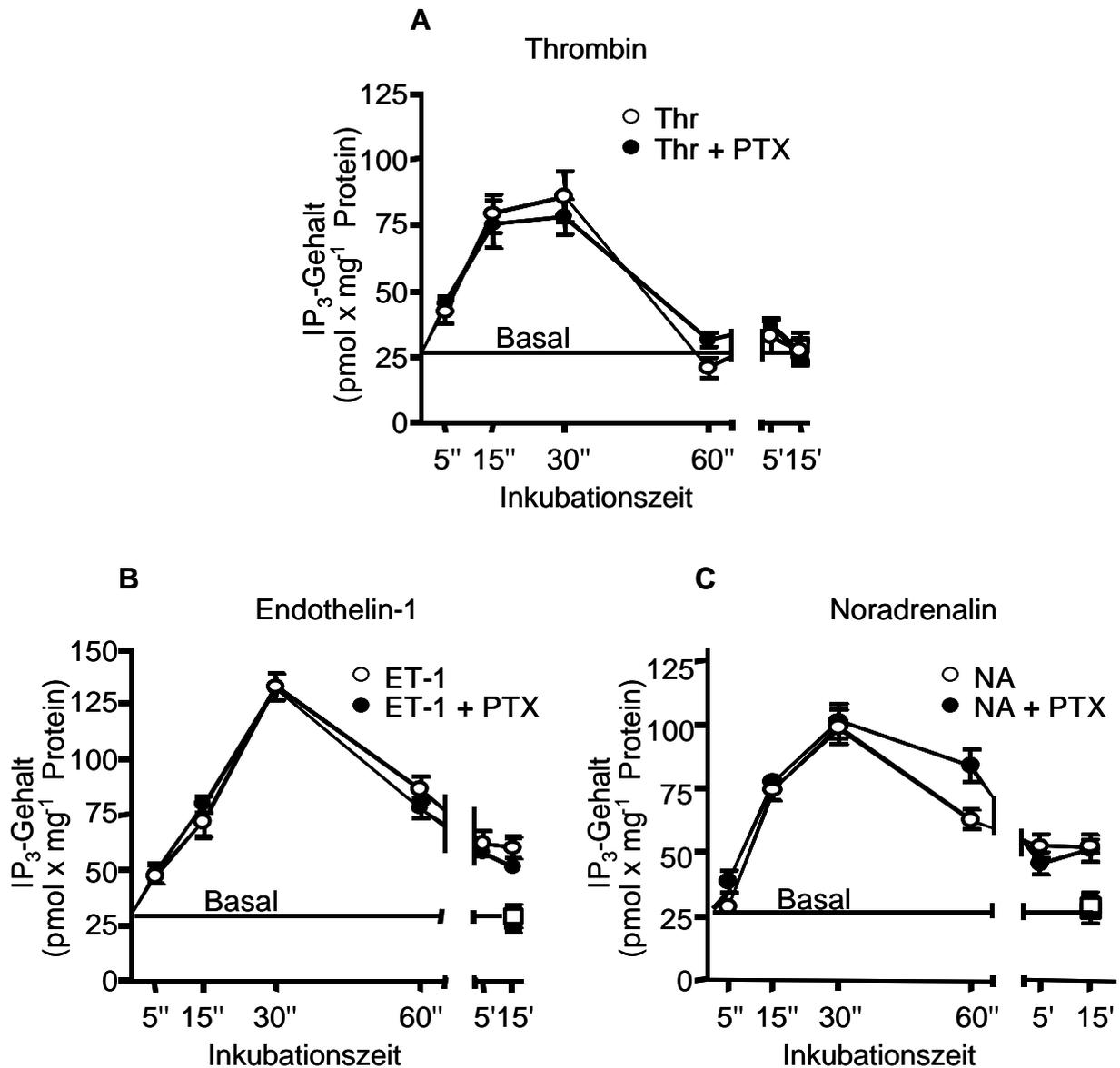


Abbildung 38 **Zeitverlauf der  $IP_3$ -Bildung nach der Stimulation neonataler Rattenkardiomyozyten mit Thrombin (A), Endothelin-1 (B) und Noradrenalin (C).** Die isolierten Kardiomyozyten der neonatalen Ratten wurden entweder mit 100 ng/ml Pertussis-Toxin (● PTX) für 24 h vorbehandelt oder wurden Pertussis-Toxin-unbehandelt verwendet (○ Kontrolle). Der  $IP_3$ -Gehalt wurde nach der Stimulation mit Thr (1 U/ml; A), ET-1 (1  $\mu$ M; B) und mit NA (10  $\mu$ M ; C) in Abhängigkeit von der Zeit bestimmt. n = 4, MW  $\pm$  SEM.

Der IP<sub>3</sub>-Gehalt der Zellextrakte wurde durch die Bindung an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor in bovinen adrenocorticalen Fraktionen ermittelt. Die Bindung des zellulären PLC-Produktes IP<sub>3</sub> an den IP<sub>3</sub>-Rezeptor kompetierte dabei mit exogen zugesetztem <sup>3</sup>H-IP<sub>3</sub>. Anhand von Proben mit definierten Konzentrationen von unmarkiertem IP<sub>3</sub> als Standardwerte konnte der gebildete IP<sub>3</sub>-Gehalt pro Probe bestimmt werden. Die Bestimmung des IP<sub>3</sub>-Gehaltes erfolgte in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten. Die Kardiomyozyten waren zum Teil mit 100 ng/ml Pertussis-Toxin (PTX) für 24 h vorbehandelt. Der IP<sub>3</sub>-Gehalt wurde nach der Stimulation mit 1 U/ml Thrombin, 1 µM Endothelin-1 und 10 µM Noradrenalin bestimmt. Der Zeitverlauf der IP<sub>3</sub>-Bildung in neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigt, dass sowohl durch Endothelin-1 (Abbildung 38B) und Noradrenalin (Abbildung 38C) als auch durch Thrombin (Abbildung 38A) eine maximale Bildung von zellulärem IP<sub>3</sub> nach 30 sek erreicht wurde. Die Thrombin-induzierte PLC-Stimulation, ausgedrückt als die Bildung von IP<sub>3</sub>, war nur sehr kurzlebig. 60 sek nach der Stimulation mit Thrombin ging der IP<sub>3</sub>-Gehalt auf Basalwerte zurück. Im Gegensatz dazu konnte sogar 15 min nach der Stimulation der Kardiomyozyten mit Endothelin-1 bzw. Noradrenalin noch ein erhöhter IP<sub>3</sub>-Gehalt gemessen werden. Die Vorbehandlung der Kardiomyozyten mit PTX hatte keinen Einfluss auf die IP<sub>3</sub>-Bildung weder nach der Stimulation mit Endothelin-1 bzw. Noradrenalin, noch nach der Stimulation mit Thrombin.

### **4.3.3 Pertussis-Toxin und Pasteurella multocida Toxin als Hilfsmittel zur Charakterisierung der heterotrimeren G-Proteine**

In Bezug auf die Aktivierung der PLD existiert nur wenig Information über die beteiligten heterotrimeren G-Protein-Subtypen. Vor allem ist eine mögliche Rolle der PTX-insensitiven G $\alpha_{12/13}$ -Subfamilie nicht ausreichend untersucht. Um die mögliche Beteiligung der PTX-sensitiven G $\alpha_i$ /G $\alpha_o$ -Familie an der Aktivierung der PLD in neonatalen Rattenkardiomyozyten durch  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren, ET<sub>A</sub>-Rezeptoren und PAR1-Rezeptoren zu bestimmen, wurden die Kardiomyozyten mit 100 ng/ml PTX für 24 h behandelt. Die Thrombin- (Abbildung 38A), Endothelin-1- (Abbildung 38B), und Noradrenalin-(Abbildung 38C) induzierte PLC-Aktivierung war durch die PTX-Behandlung nicht signifikant verändert.

Die Stimulation der PLD-Aktivität wurde bei allen eingesetzten Agonisten nach einer PTX-Behandlung nicht gehemmt (Abbildung 39). Interessanterweise wurde die Endothelin-1-induzierte PLD-Aktivität in mit PTX vorbehandelten Kardiomyozyten sogar signifikant um 100 % erhöht.

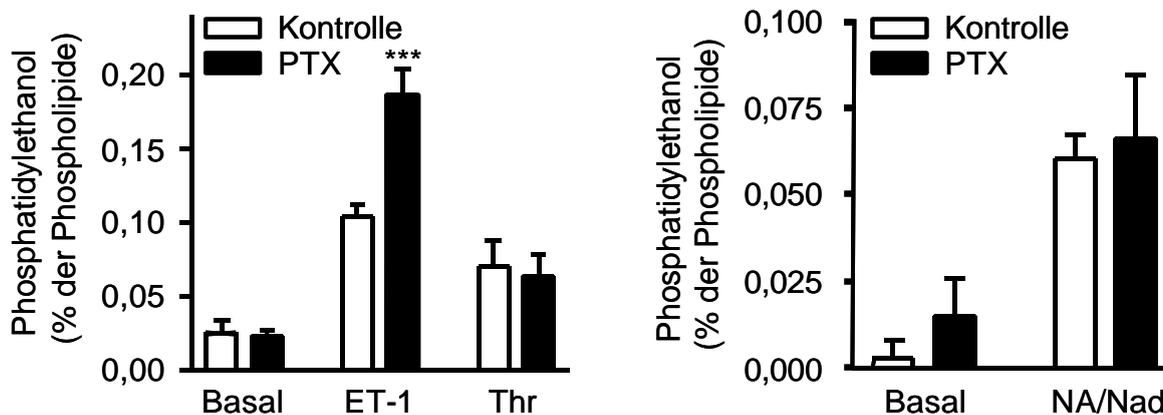


Abbildung 39 **Aktivierung der PLD durch Endothelin-1, Thrombin oder Noradrenalin in neonatalen Rattenkardiomyozyten in der Ab- bzw. Anwesenheit von Pertussis-Toxin.** Die isolierten Kardiomyozyten der neonatalen Ratten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 5 mit 100 ng/ml Pertussis-Toxin (■ PTX) oder ohne Pertussis-Toxin (□ Kontrolle) behandelt. Die PTX-Behandlung erfolgte gleichzeitig mit der radioaktiven Markierung der Zellen. Die PLD-Aktivität wurde nach der Markierung der Kardiomyozyten mit 2,5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Ölsäure für 24 h als die Bildung von Phosphatidylethanol bestimmt. Stimuliert wurden die vorbehandelten, markierten Kardiomyozyten mit 1  $\mu\text{M}$  Endothelin-1 (ET-1), 1 U/ml Thrombin (Thr) oder 10  $\mu\text{M}$  Noradrenalin (NA) in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Nadolol (Nad).  $n=9$ ,  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ , \*\*\* $p < 0,001$  vs. Kontrolle.

Es ist allgemein bekannt, dass Endothelin-1-Rezeptoren und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren in Kardiomyozyten über  $G\alpha_q$ -Proteine zur Aktivierung der PLC führen. Überprüft wurde deshalb als nächstes, ob eine direkte Aktivierung der  $G\alpha_q$ -Proteine eine Stimulation der Endothelin-1-Rezeptoren und der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren nachahmen kann. Dazu wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten für 1 h mit dem  $G\alpha_q$ -aktivierenden Toxin von *Pasteurella multocida* (PMT) behandelt. PMT wurde freundlicherweise von Dr. C. Busch aus Feiburg zur Verfügung gestellt. Wie in Abbildung 40 dargestellt, wurde die PLC- und PLD-Aktivität in den Kardiomyozyten nach der PMT-Behandlung jeweils in einem ähnlichen Ausmaß (4 fach) erhöht.

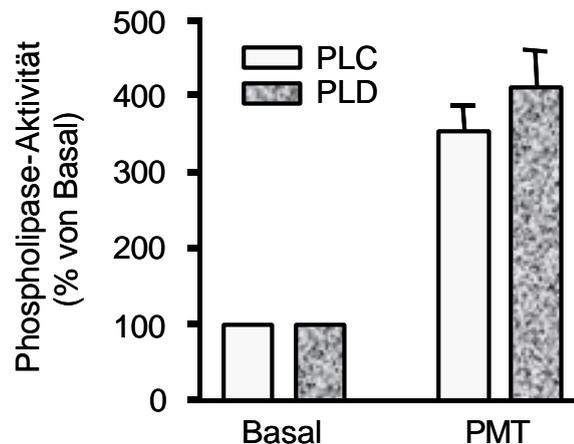


Abbildung 40 **Aktivierung der PLC und PLD in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten durch Pasteurella multocida Toxin.** Die PLC- und PLD-Aktivität wurde nach der Markierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) mit 2  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -myo-Inositol und 2,5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Ölsäure für 24 h als die Bildung von Inositol-Phosphaten bzw. Phosphatidylethanol bestimmt. Die Kardiomyozyten wurden für 1 h mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Pasteurella multocida Toxin (PMT) behandelt.  $n = 3$ ,  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ .

#### **4.3.4 Einfluss der adenoviralen Überexpression von LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS auf die PLC- und PLD-Aktivität in neonatalen Rattenkardiomyozyten**

Es sollte näher untersucht werden, durch welche G-Proteine die Aktivierung der PLD in isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratten über Hypertrophie-induzierende PAR1-Rezeptoren, im Vergleich zu  $\text{ET}_A$ -Rezeptoren und  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren, vermittelt wird.

Die Beteiligung der PTX-insensitiven G-Proteine der  $\text{G}\alpha_{12/13}$ -Familie an der GPCR-induzierten PLD-Aktivierung kann durch die Überexpression von  $\text{G}\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteine (z.B. LSCII-RGS) untersucht werden (siehe Abschnitt 4.3.1). Deshalb wurde der Einfluss der adenoviralen LSCII-RGS-Überexpression auf die Agonisten-induzierte PLC- und PLD-Aktivität in den isolierten Kardiomyozyten der neonatalen Ratten bestimmt.

Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem rekombinanten Adenovirus Ad5-lacZ infiziert. Die Effektivität des adenoviralen Gentransfers war 48 h nach der Infektion mit rekombinantem Ad5-LSCII (MOI=0,5) ungefähr 75 %. Stimuliert wurden die Kardiomyozyten der neonatalen Ratten mit Endothelin-1, Thrombin oder Noradrenalin in Gegenwart des  $\beta$ -Adrenozeptor-Antagonisten Nadolol. Wie in Abbildung 41A gezeigt, führten nur Endothelin-1 und Noradrenalin in Gegenwart von Nadolol zu einer Erhöhung der Gesamt-Inositol-Phosphat-Bildung. Diese wurde durch die Überexpression von Ad5-LSCII-RGS nicht beeinflusst. In mit Ad5-lacZ infizierten Zellen stimulierten alle drei Agonisten die PLD in einem vergleichbaren Ausmaß um den Faktor 3 bis 4. Nach der LSCII-RGS-Überexpression war die Thrombin-induzierte PLD-Aktivität signifikant um ca. 60 % gehemmt, während die Basal- sowie Endothelin-1- und Noradrenalin (in Gegenwart von Nadolol)-stimulierte PLD-Aktivität unverändert blieb (Abbildung 41B).

Zur Bestätigung dieses Effektes wurde die RGS-Homologie-Domäne des zweiten Regulatorproteins der  $G_{\alpha_{12/13}}$ -vermittelten Signalübertragung KIAA380-RGS (PDZ-RhoGEF; Analog zu p115-RhoGEF; Rümenapp et al. 1999) überexprimiert. Es konnte zuvor gezeigt werden, dass KIAA380 die  $G_{\alpha_{12/13}}$ -vermittelte Stressfaser-Bildung in J82-Zellen hemmt (Rümenapp et al. 1999). Ähnlich wie bei dem RGS-Protein LSCII wurde die Thrombin-induzierte PLD-Aktivität nach der KIAA380-RGS-Überexpression signifikant gehemmt, während die Endothelin-1-stimulierte PLD-Aktivität unverändert blieb (Abbildung 42). In mit Ad5-lacZ infizierten Kardiomyozyten der neonatalen Ratten stimulierten Endothelin-1 und Thrombin die PLD in einem vergleichbaren Ausmaß.

Die Daten deuten auf eine Beteiligung der  $G_{\alpha_{12/13}}$ -Protein-Familie an der Thrombin-induzierten PLD-Aktivität hin. Deshalb wurde der Einfluss der Überexpression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS auf die Thrombin-stimulierte PLD-Aktivierung eingehender charakterisiert.

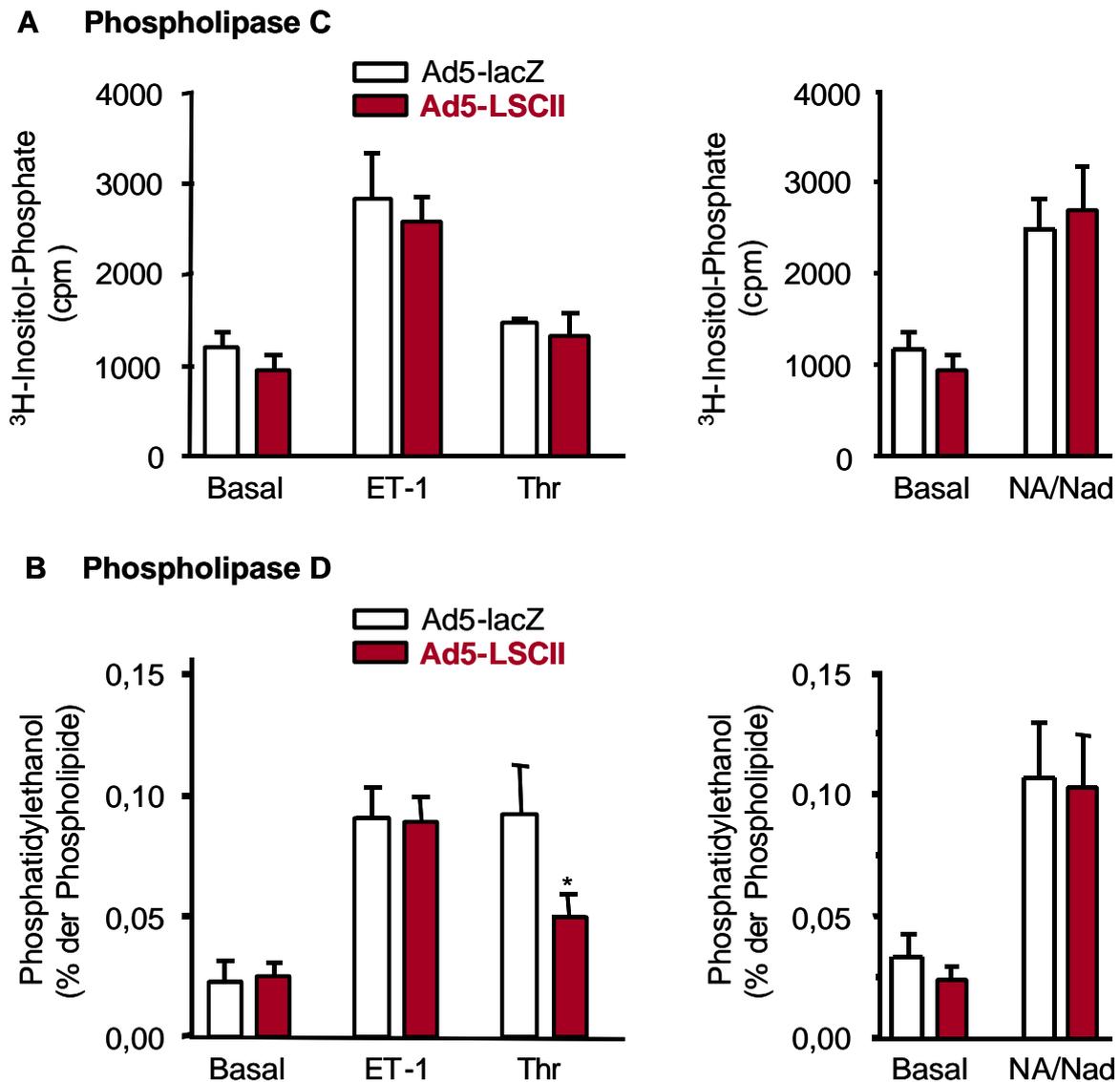


Abbildung 41 **Einfluss der LSCII-RGS-Überexpression auf die Agonisten-induzierte PLC (A)- und PLD (B)-Aktivität in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten.** Neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 5 mit rekombinantem Adenovirus Ad5-LSCII-RGS (MOI=0,5) infiziert und für weitere 48 h kultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Adenovirus Ad5-lacZ infiziert. Die Zellen wurden am Tag 6 mit 2  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -myo-Inositol und 2,5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Ölsäure für 24 h markiert. Stimuliert wurden die Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Endothelin-1 (ET-1), 1 U/ml Thrombin (Thr) oder 10  $\mu\text{M}$  Noradrenalin in Gegenwart von 1  $\mu\text{M}$  Nadolol (NA/Nad). n = 6, MW  $\pm$  SEM, \* p < 0,05 vs. Ad5-lacZ.

A: Phospholipase C-Aktivität. Auf der Ordinate aufgetragen ist die Gesamtbildung radioaktiv-markierter Inositol-Phosphate in „counts per minutes“ (cpm).

B: Phospholipase D-Aktivität. Auf der Ordinate ist die Bildung von Phosphatidylethanol in Prozent der Gesamtphospholipide dargestellt.

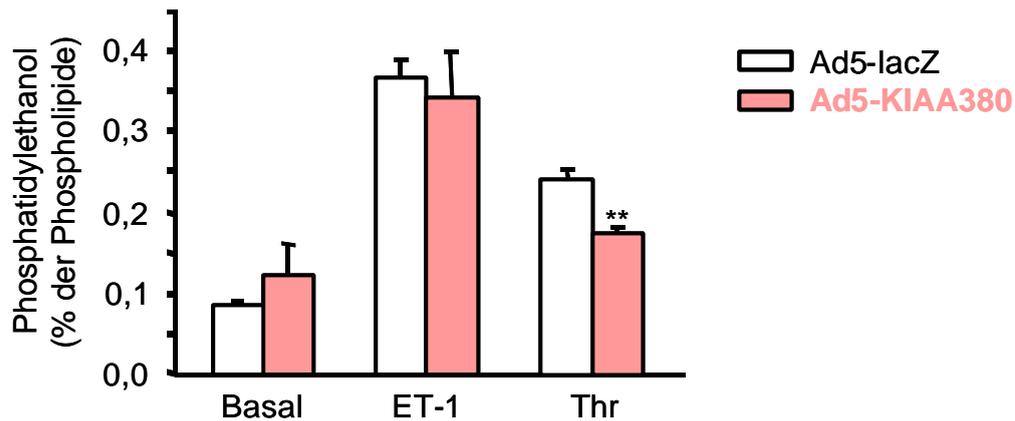


Abbildung 42 **Vergleich der Agonisten-induzierten PLD-Aktivität nach der Überexpression des adenoviralen KIAA380-RGS-Proteins in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten.** Isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 5 mit Ad5-KIAA380 (MOI=2,3) für 48 h infiziert. Als Kontrolle wurden die Kardiomyozyten mit Ad5-lacZ infiziert. Am Tag 6 wurden die Zellen mit 2,5  $\mu\text{Ci/ml}$  3H-Ölsäure markiert. Die Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte mit 1  $\mu\text{M}$  Endothelin-1 (ET-1) oder 1 U/ml Thrombin (Thr). Auf der Ordinate ist die Bildung von Phosphatidylethanol in Prozent der Gesamtpospholipide dargestellt. n = 6, MW  $\pm$  SEM, \*\* p < 0,01 vs. Ad5-lacZ.

#### **4.3.5 Konzentrationsabhängigkeit**

Der Einfluss der LSCII-RGS-Überexpression auf die Thrombin-stimulierte PLD-Aktivität ist in Abbildung 43 und Abbildung 44A dargestellt. Mit steigender Thrombinkonzentration stieg die Bildung von Phosphatidylethanol an und erreichte ein Maximum bei ca. 1 U/ml. Durch die Überexpression von Ad5-LSCII-RGS (MOI=0,7) verringerte sich das Maximum der Thrombin-stimulierten PLD-Aktivität um ca. 50 %. Die Abhängigkeit der Stimulation von der Thrombinkonzentration blieb unverändert. Die Überexpression des  $G\alpha_{i/o}$ - und  $G\alpha_{q/11}$ -spezifischen RGS4 (MOI=4,3) hatte keinen Einfluss auf die Thrombin-stimulierte PLD-Aktivität (Abbildung 43). Die Überexpression von LSCII-RGS und RGS4 wurde im Immunoblot nachgewiesen. Dazu wurden jeweils 50  $\mu\text{g}$  Protein des Zelllysats eingesetzt. Der anti-His<sub>6</sub>-Antikörper erkannte bei LSCII-RGS eine Bande im Bereich von 30 kDa. Der anti-RGS4-Antikörper richtete sich gegen das N-terminale Fragment im RGS4-Protein (Druey et al. 1998) und erkannte das RGS4-Protein bei knapp 30 kDa. Weiterhin wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit steigender Virenmenge des rekombinanten Adenoviruses für LSCII-RGS infiziert. Steigende MOI des rekombinanten Adenoviruses für LSCII-RGS führte zu einer Zunahme der Hemmung der Thrombin-induzierten PLD-Aktivität (Abbildung 44A).

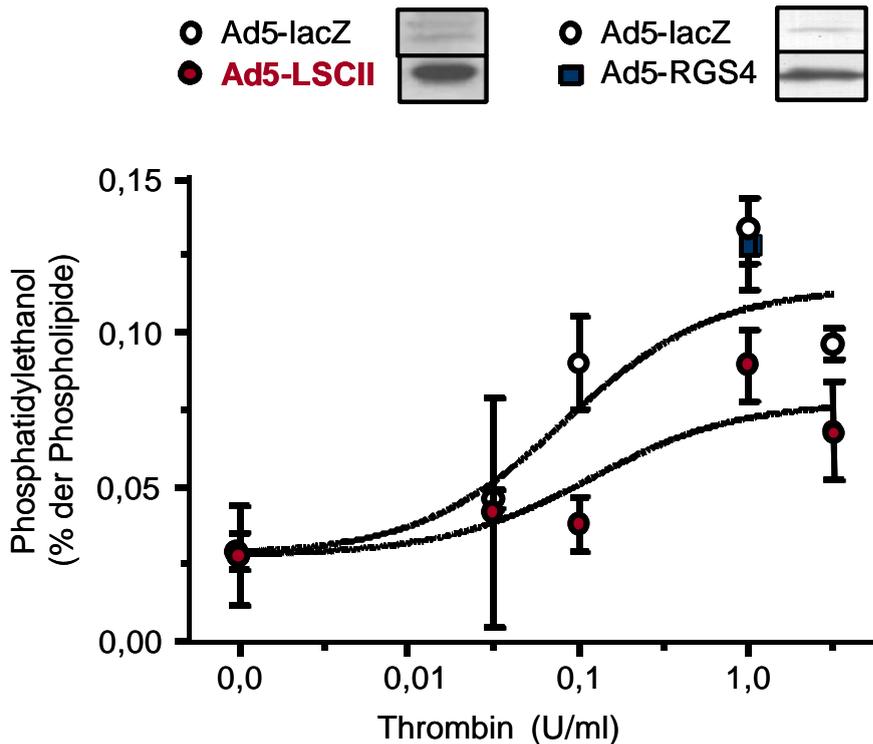
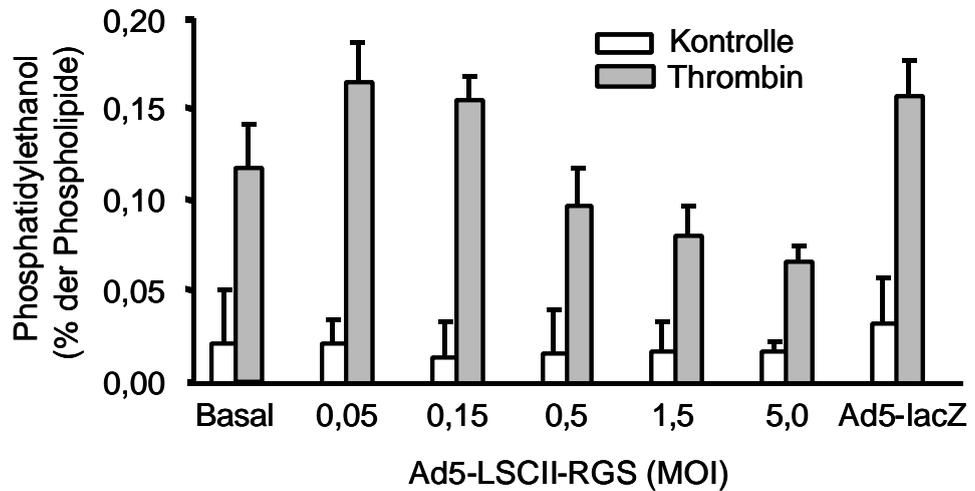


Abbildung 43 **Einfluss der Überexpression von Ad5-LSCII auf die Thrombin-stimulierte PLD-Aktivität.** Neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 5 mit Ad5-LSCII (MOI=0,7) bzw. Ad5-RGS4 (MOI=4,3) infiziert und für weitere 48 h kultiviert. Als Kontrolle wurden die Kardiomyozyten mit dem rekombinanten Adenovirus Ad5-lacZ infiziert. Zur Bestimmung der PLD-Aktivität wurden infizierte Kardiomyozyten (24 h Inkubation) am Tag 6 mit 2,5  $\mu$ Ci/ml  $^3$ H-Ölsäure markiert und für etwa 24 h im Brutschrank inkubiert. Stimuliert wurden die Kardiomyozyten mit steigenden Thrombinkonzentrationen. Die Überexpression von Ad5-LSCII-RGS und Ad5-RGS4 wurde durch Immunoblot verifiziert. Auf der Ordinate ist der prozentuale Anteil von Phosphatidylethanol an den Gesamtphospholipiden und auf der Abszisse die Konzentration von Thrombin angegeben. n = 6, MW  $\pm$  SEM.

Zur Verifizierung eines  $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen Effektes wurde die RGS-Homologie-Domäne von KIAA380-RGS überexprimiert. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit steigender Virenmenge des rekombinanten Adenoviruses für KIAA380-RGS infiziert. Die Überexpression von Ad5-KIAA380-RGS wurde durch Immunoblot verifiziert. Dazu wurden 50  $\mu$ g Protein des Zelllysats eingesetzt. Der anti-His<sub>6</sub>-Antikörper erkannte eine Bande im Bereich von 30 kDa. Steigende MOI des rekombinanten Adenoviruses führte zu einer erhöhten Expression des Proteins. Mit ansteigender Expression wurde die Thrombin-induzierte PLD-Aktivität um maximal 75 % reduziert (Abbildung 44B).

**A Ad5-LSCII**



**B Ad5-KIAA380**

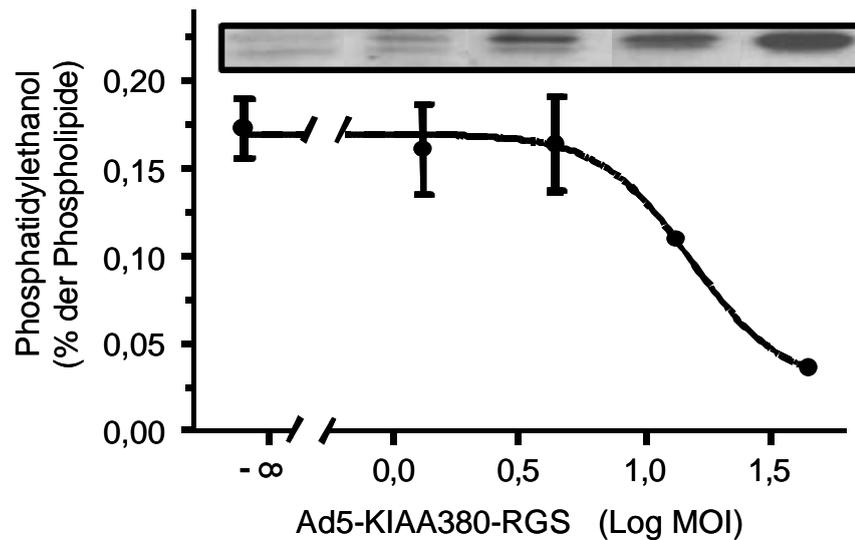


Abbildung 44 **Wirkung von Ad5-LSCII-RGS (A) und Ad5-KIAA380-RGS (B) auf die Thrombin-stimulierte PLD-Aktivität.** Neonatale Rattenkardiomyozyten (3 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 5 mit steigenden MOI von Ad5-LSCII (A) bzw. Ad5-KIAA380 (B) infiziert und für weitere 48 h kultiviert. Als Kontrolle wurden die Zellen mit dem Adenovirus Ad5-lacZ (MOI=1,2) infiziert. Die Zellen wurden am Tag 6 mit 2,5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^3\text{H}$ -Ölsäure für 24 h markiert. Stimuliert wurden die Kardiomyozyten mit 1 U/ml Thrombin. Die Überexpression von Ad5-KIAA380 (B) wurde durch Immunoblot verifiziert. Aufgetragen ist die Thrombin-stimulierte PLD-Aktivität gemessen als Bildung von Phosphatidylethanol gegen eingesetzte Virenmenge angegeben als MOI.  $n = 6$ ,  $\text{MW} \pm \text{SEM}$ .

#### **4.4 Intrazelluläre Signalübertragung : die Proteinkinase-Kaskade der MAP-Kinase-Wege**

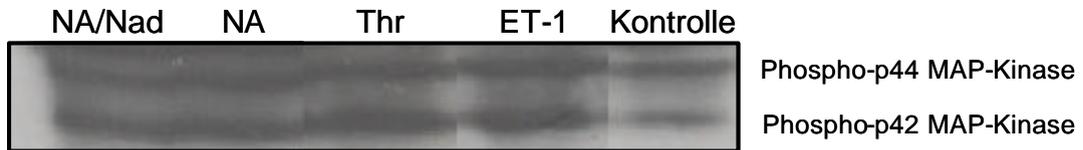
Nachdem gezeigt werden konnte, dass LSCII-RGS und KIAA380-RGS signifikant die Thrombin-stimulierte  $G\alpha_{12/13}$ -vermittelte PLD-Aktivität hemmen können, sollte untersucht werden, welche Auswirkungen eine Überexpression dieser RGS-Proteine auf die Aktivierung von MAP-Kinasen haben. Es wurde deshalb die Aktivierung der MAP-Kinasen durch Endothelin-1, Thrombin oder Noradrenalin in infizierten und nicht infizierten neonatalen Rattenkardiomyozyten untersucht.

##### **4.4.1 Effekte der Agonisten auf die MAP-Kinase**

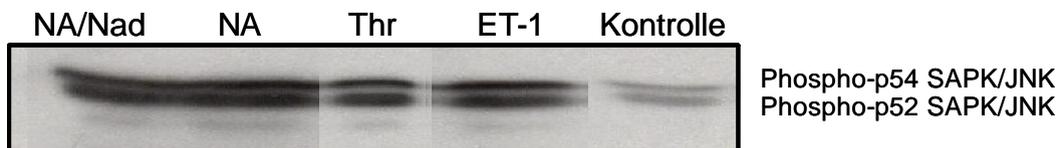
Nach der Isolierung von Kardiomyozyten aus den Herzen neonataler Ratten wurden diese (1 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) für fünf Tage in Kultur gehalten. Am fünften Tag wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten für etwa 10 min mit 1  $\mu$ M Endothelin-1, 1 U/ml Thrombin, 10  $\mu$ M Noradrenalin oder 10  $\mu$ M Noradrenalin in Gegenwart von 1  $\mu$ M Nadolol stimuliert. Als Kontrolle wurden nicht behandelte Kardiomyozyten verwendet. Nach 10 min Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Kardiomyozyten nach der Zugabe von SDS-Proben-Puffer durch Abkratzen geerntet. Die Proteinkomponenten wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und dort immunochemisch nachgewiesen. Die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk 1/2 , SAPK/JNK und p38 in neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde im Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierten Formen untersucht (Phospho-MAPK Antikörper; Cell Signaling Technology). Wie in Abbildung 45 dargestellt, führte die Stimulation von nicht-infizierten Kardiomyozyten durch Endothelin-1, Thrombin und Noradrenalin in Gegenwart von Nadolol zu einer Aktivierung der MAP-Kinasen Erk 1/2, SAPK/JNK und p38.

Als Beladungskontrolle wurde die Anfärbung der p38 MAP-Kinase mit einem Antikörper gegen die unphosphorylierte Form verwendet (Abbildung 45D). Da die Gesamtmenge an p38-Protein im Gegensatz zum Anteil an phosphorylierten Protein von der Aktivierung durch Agonisten nicht beeinflusst wird, sollte dieses Signal in allen Spuren gleich stark sein.

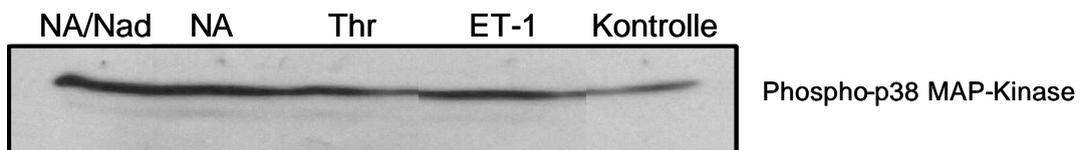
**A Phospho-p44/42 MAP-Kinase Antikörper**



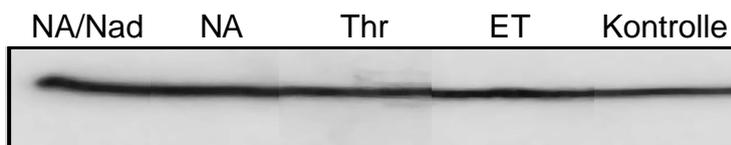
**B Phospho-SAPK/JNK Antikörper**



**C Phospho-p38 MAP-Kinase Antikörper**



**D p38 MAP-Kinase Antikörper**



**Abbildung 45 Auswirkungen der Stimulation von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit Agonisten auf die Aktivierung von MAP-Kinasen.**

Neonatale Rattenkardiomyozyten (1 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 5 mit 1  $\mu$ M Endothelin-1 (ET-1), 1 U/ml Thrombin (Thr), 10  $\mu$ M Noradrenalin (NA) oder 10  $\mu$ M Noradrenalin in Gegenwart von 1  $\mu$ M Nadolol (NA/Nad) für 10 min stimuliert. Als Kontrolle wurden nicht behandelte Kardiomyozyten genommen. Nach 10 min Inkubationszeit bei 37 °C wurde das Medium mit der Agonistenlösung abgesaugt, 100  $\mu$ l SDS-Proben-Puffer zur Lyse der Zellen zugegeben, mit einem Zellschaber vorsichtig abgekratzt, mit einer Pipette in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt und dann auf Eis gestellt. Mittels Ultraschall (2 sek – 15 sek) wurde die Viskosität der Probe vermindert. 20  $\mu$ l Zelllysate wurde 5 min bei 95 – 100 °C denaturiert, anschließend 5 min auf Eis abgekühlt, in der Tischzentrifuge bei 15800 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und für die Elektrophorese verwendet. Mit Hilfe der Polyacrylamidgel-Elektrophorese wurden die Proteine aufgetrennt.

Der qualitative Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western-Blot auf Nitrocellulosemembran, ein Immunoblot mit dem Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (A), Phospho-SAPK/JNK (B) oder Phospho-p38 MAPK (C) (jeweils 1 : 1000) als 1. Antikörper [2. Antikörper : Anti-Rabbit-IgG-HRP (1 : 2000)] und anschließender ECL-Detektion. Die mittlere Expositionszeit betrug 30 sek.

Um die Blots nach dem Immunnachweis mit dem *Phospho-p38* MAP-Kinase Antikörper mit dem p38 MAP-Kinase Antikörper untersuchen zu können („Reproben“), mussten die an den Blots gebundenen Antikörper möglichst vollständig entfernt werden („Strippen“). Die Entfernung der an den Blots gebundenen Antikörper erfolgte durch 30 bis 60 minütige Inkubation der Blotmembranen in dem Stripping-Puffer (100 mM 2-Mercaptoethanol, 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7) und 2 % SDS) bei 50 – 70 °C (Wasserbad). Anschließend wurden die Blots dreimal mit TBS (pH 7,4) gewaschen und erneut geblockt. Dann wurde der Immunoblot mit dem p38 MAP-Kinase Antikörper (1 : 1000) als 1. Antikörper und Anti-Rabbit-IgG-HRP (1 : 2000) als 2. Antikörper durchgeführt. Abschließend wurde ECL-Detektion für HRP-Konjugat (Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) eingesetzt. Die mittlere Expositionszeit betrug 30 sek.

#### **4.4.2 Effekt der Überexpression von LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS auf die Aktivierung von MAP-Kinasen**

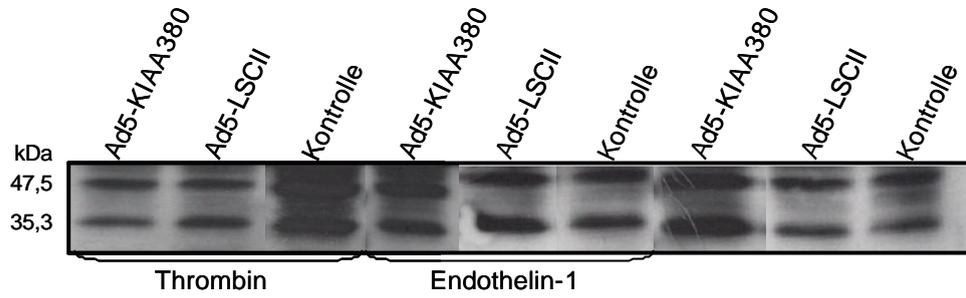
Um zu untersuchen, ob sich die Stimulation der MAP-Kinasen durch Hemmung heterotrimerer G-Proteine der  $G\alpha_{12/13}$ -Familie beeinflussen lässt, wurden neonatale Rattenkardiomyozyten mit den  $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteinen Ad5-LSCII-RGS bzw. Ad5-KIAA380-RGS infiziert. Die Infektion der isolierten Kardiomyozyten aus den Herzen neonataler Ratten mit Adenoviren erfolgte am fünften Tag. Der MAP-Kinase-Assay wurde (wie im Abschnitt 4.4.1 beschrieben) 24 h später durchgeführt. Die Überexpression der Adenoviren Ad5-LSCII und Ad5-KIAA380 wurde über das in allen infizierten Zellen exprimierte GFP unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Abbildung 46 zeigt, dass die Aktivierung aller drei MAP-Kinasen durch Thrombin in nicht-infizierten Kardiomyozyten (Kontrollzellen) stark stimuliert war. Nach der Überexpression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS wurde die MAP-Kinasen-Aktivierung durch Thrombin deutlich gehemmt. Der stimulatorische Einfluss von Endothelin-1 war dagegen unbeeinflusst.

Zur Beladungskontrolle wurde die Blot-Membran, die mit dem Anti-Phospho-p38 MAP-Kinase Antikörper gefärbt worden war, gestriipt und mit dem Anti-p38-MAP-Kinase Antikörper (unphosphorylierte Form) nachgefärbt (Abbildung 46D).

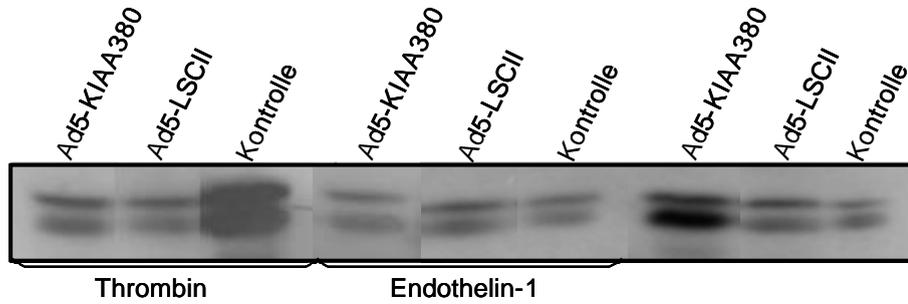
**Abbildung 46 Auswirkungen der durch Adenoviren vermittelten Überexpression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS auf die Aktivierung von MAP-Kinasen.** Die neonatalen Rattenkardiomyozyten (1 Millionen Zellen / 6 cm-Gewebekulturschale) wurden am Tag 5 mit jeweils 0,5  $\mu$ l (pro  $1 \times 10^6$  Kardiomyozyten) rekombinanten Adenoviren Ad5-LSCII (MOI=0,24) bzw. Ad5-KIAA380 (MOI=1,14) infiziert und für 24 h kultiviert, am Tag 6 mit 1  $\mu$ M Endothelin-1 oder 1 U/ml Thrombin stimuliert. Als Kontrolle wurden nicht infizierte Kardiomyozyten aufgetragen. Der qualitative Nachweis der Proteine erfolgte mittels Western-Blot auf Nitrocellulosemembran mit dem Phospho-p44/42 MAPK (Erk 1/2) (A), Phospho-SAPK/JNK (B) oder Phospho-p38 MAPK (C) (jeweils 1 : 1000) als 1. Antikörper [2. Antikörper : Anti-Rabbit-IgG-HRP 1 : 2000) und anschließender ECL-Detektion.

Um die Blots nach dem Immunnachweis mit dem *Phospho*-p38 MAP-Kinase Antikörper mit dem p38 MAP-Kinase Antikörper untersuchen zu können („Reproben“), mussten die an den Blots gebundenen Antikörper möglichst vollständig entfernt werden („Strippen“). Dann wurde der Immunoblot mit dem p38 MAP-Kinase Antikörper (1 : 1000) als 1. Antikörper und Anti-Rabbit-IgG-HRP (1 : 2000) als 2. Antikörper durchgeführt. Abschließend wurde ECL-Detektion für HRP-Konjugat (Meerrettich-Peroxidase-Konjugat) eingesetzt. Die mittlere Expositionszeit betrug 30 sek (D).

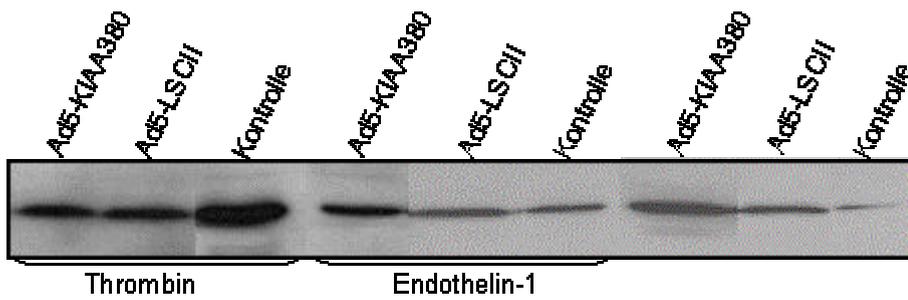
**A Phospho-p44/42 MAP-Kinase Antikörper**



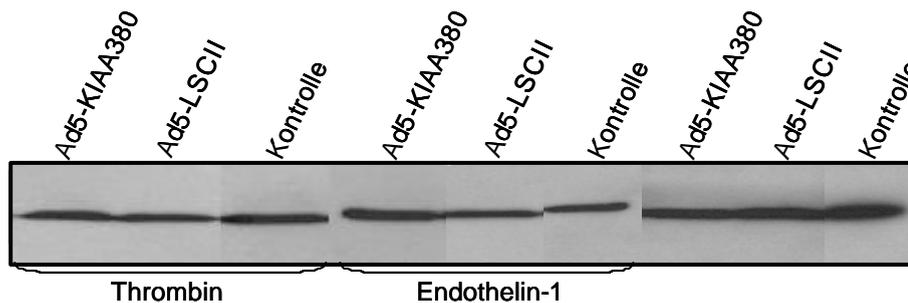
**B Phospho-SAPK/JNK Antikörper**



**C Phospho-p38 MAP-Kinase Antikörper**



**D p38 MAP-Kinase Antikörper**



## 5 Diskussion

Es war Ziel der vorliegenden Arbeit zu klären, ob und wenn ja, durch welche G-Proteine die Aktivierung der PLD in isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratten durch Hypertrophie-induzierende, Protease-aktivierte Rezeptoren (PAR1), im Vergleich zu Endothelin-1-Rezeptoren und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren, vermittelt wird und ob Hinweise für die Beteiligung dieser Aktivierung an der hypertrophen Antwort bestehen. Die Interaktion von Regulatorproteinen der G-Protein-vermittelten Signalübertragung mit heterotrimeren G-Proteinen der Subfamilie  $G\alpha_{12/13}$  sollte benutzt werden, um  $G\alpha_{12/13}$ -vermittelte Signalwege in den Herzmuskelzellen der neonatalen Ratten zu identifizieren. Die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit sind im Folgenden kurz zusammengefasst:

### Herstellung der Viruskonstrukte

1. Es wurden rekombinante Ad5-Adenoviren für LSCII-RGS und KIAA380-RGS hergestellt und anschließend in HEK 293-Zellen amplifiziert (He et al. 1998). Da diese Konstrukte gleichzeitig auch das grün-fluoreszierende Protein GFP exprimieren, konnte eine fluoreszenzmikroskopische Identifizierung infizierter Zellen durchgeführt werden.

### Adenoviraler Gentransfer in HEK 293-Zellen

2. Die Überexpression des  $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteins LSCII-RGS in HEK 293-Zellen mit stabil exprimierten M3-muscarinischen Acetylcholinrezeptoren führte zur signifikanten Hemmung der Carbachol-induzierten PLD-Aktivität. Die Carbachol-induzierte PLC-Aktivität blieb unverändert.

### Effekte von Agonisten in neonatalen Rattenkardiomyozyten

3. Endothelin-1 und Noradrenalin führten in neonatalen Rattenkardiomyozyten zur Erhöhung der PLC- und PLD-Aktivität. Thrombin stimulierte die PLD-Aktivität, während keine PLC-Aktivierung in Form der Bildung an Inositol-Phosphaten messbar war. Die Bildung des zellulären PLC-Produktes Inositol-(1,4,5)-Triphosphat ( $IP_3$ ) im Zeitverlauf zeigte jedoch, dass eine PLC-Stimulation durch Thrombin zwar vorhanden aber sehr kurzlebig war.

### Pertussis-Toxin-Behandlung der neonatalen Rattenkardiomyozyten

4. In Gegenwart von PTX in neonatalen Rattenkardiomyozyten blieb die Thrombin- und die Noradrenalin-stimulierte PLC- und PLD-Aktivität unverändert. Die Endothelin-1-induzierte Stimulation der PLC wurde durch PTX nicht verändert. Interessanterweise führte die Behandlung der Kardiomyozyten mit PTX zu einer Steigerung der Endothelin-1-induzierten PLD-Aktivität.

#### Adenoviraler Gentransfer in neonatalen Rattenkardiomyozyten

5. Nach der Überexpression von LSCII-RGS in neonatalen Rattenkardiomyozyten war die Thrombin-induzierte PLD-Aktivität signifikant gehemmt, während die Basal-, die Endothelin-1- und die Noradrenalin-stimulierte PLD-Aktivität unverändert blieb. Die durch Endothelin-1- und Noradrenalin-induzierte PLC-Aktivität wurde durch die Überexpression von LSCII-RGS nicht beeinflusst.

6. Durch die Überexpression von LSCII-RGS verringerte sich das Maximum der Thrombin-stimulierten PLD-Aktivität um ca. 50 %. Ein Einfluss auf die Potenz von Thrombin war dagegen nicht erkennbar. Die Überexpression von RGS4 hatte keinen Einfluss auf die Thrombin-stimulierte PLD-Aktivität.

7. Die Überexpression von KIAA380-RGS in neonatalen Rattenkardiomyozyten führte ebenfalls zu einer Abnahme der Thrombin-stimulierten PLD-Aktivität. Analog zur Überexpression von LSCII-RGS hatte die Überexpression von KIAA380-RGS keinen Einfluss auf die Endothelin-1-induzierte PLD-Aktivität.

#### MAP-Kinase-Aktivierung

8. Durch die Zugabe der Agonisten Endothelin-1, Thrombin und Noradrenalin konnte eine Aktivierung der MAP-Kinasen p44/42, SAPK/JNK und p38 in nicht-infizierten Rattenkardiomyozyten beobachtet werden. Die Überexpression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS in neonatalen Rattenkardiomyozyten führte ausschließlich zu einer Hemmung der Thrombin-induzierten Aktivierung der MAP-Kinasen.

### **5.1 Herstellung der Viruskonstrukte**

Der Einsatz von Adenoviren zur Überexpression rekombinanter Proteine ist eine etablierte Methode. Die Vorteile von Adenoviren zum Gentransfer in Zellen sind vielfältig. Adenoviren können ein sehr breites Spektrum von replizierenden und nichtreplizierenden Zelltypen mit hoher Effizienz infizieren. Adenoviren gelangen über eine rezeptorvermittelte Endozytose in die Zellen. Die Übertragung ist effizient, allerdings wird die eingeschleuste DNA nicht in das Genom der Zelle integriert, sondern verbleibt episomal (Hitt et al. 1995) und rekombinante Proteine werden deshalb nur transient exprimiert.

Weitere Vorteile des adenoviralen Systems besteht darin, dass die Vektoren in der Regel bis zu 8 kb Fremd-DNA aufnehmen können und dass bei der Virusaufreinigung leicht hohe Titer erhalten werden (bis zu  $10^{12}$  pfu/ml; Bett et al. 1993, David und Lorna 1995, Hitt et al. 1995). Ein besonderer Vorteil der hier verwendeten Konstrukte ist die im adenoviralen Plasmid inklonierte GFP-cDNA, welche eine Identifikation der adenoviral-infizierten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop durch exprimiertes GFP erlaubt und so Aufschlüsse über die Effizienz der Infektion gibt (He et al. 1998).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass sich die RGS-Proteine LSCII-RGS und KIAA380-RGS in kultivierten Herzmuskelzellen adenoviral-vermittelt überexprimieren ließen. LSCII-RGS-Protein und KIAA380-RGS-Protein wurden dabei bis zum siebten Tag nach der Infektion stabil exprimiert. Eine morphologische Veränderung der Kardiomyozyten, die die RGS-Proteine überexprimierten, wurde nicht beobachtet. Wie mit Versuchen durch Infektion mit dem Ad5-lacZ-Virus gezeigt wurde, hatte die virale Infektion selbst keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter, dies bedeutet, dass alle beobachteten Effekte den überexprimierten Proteinen zugeordnet werden können.

### **5.2 Identifizierung der beteiligten Rezeptor-Subtypen in Kardiomyozyten**

Die Beteiligung der verschiedenen Rezeptor-Subtypen der Endothelin-1-Rezeptoren bzw.  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren an der Aktivierung in isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratte war bis dato unklar bzw. für Protease-aktivierte Rezeptoren nicht untersucht. Es wurde deshalb versucht, die beteiligten Subtypen, die die Aktivierung der PLC und/oder PLD in neonatalen Kardiomyozyten der Ratte vermitteln, zu charakterisieren.

### **5.2.1 Noradrenalin stimuliert die PLD- und PLC-Aktivität in Kardiomyozyten neonataler Ratten über $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren**

Noradrenalin vermittelt seine Effekte im Myokard u.a. über den kardialen  $\alpha_1$ -Adrenozeptor, der in den Subtypen  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{1B}$  und  $\alpha_{1D}$  existiert (Michelotti et al. 2000). Zwei von den drei klonierten  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Subtypen, nämlich die  $\alpha_{1A}$ - und  $\alpha_{1B}$ -Rezeptoren können die nachgeschaltete PLC und die PLD aktivieren (Taguchi et al. 1998). Obwohl  $\alpha_{1A}$ - und  $\alpha_{1B}$ -Adrenozeptoren beide in neonatalen Rattenkardiomyozyten koexprimiert sind, wird die Noradrenalin-induzierte Aktivierung der Proteinkinasen C  $\delta$  und  $\epsilon$   $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren zugeschrieben (Disatnik et al. 1994, Rohde et al. 2000). Zur Aufklärung solcher Spezifitäten werden meist Subtyp-spezifische Antagonisten verwendet. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die  $\alpha_{1A}$ -Subtyp-spezifischen Antagonisten 5-Methyl-Urapidil und WB-4101 die Stimulation der PLD durch Noradrenalin in neonatalen Rattenkardiomyozyten blockierten. Der  $\alpha_{1B}$ -spezifische Antagonist Chloroethylclonidine, ebenso wie der selektive  $\alpha_{1D}$ -Antagonist BMY 7378 waren ohne Effekt. Diese Befunde sprechen für den  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptor als zur Vermittlung der stimulatorischen Effekte von Noradrenalin auf die PLD-Aktivität notwendigen Rezeptor. Außerdem wurde von Taguchi und Mitarbeitern (1998) gezeigt, dass rekombinant exprimierte  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren effizient die PLD aktivieren.

Bislang gab es, wie eingangs erwähnt, widersprüchliche Daten, ob und wie kardiale  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren die PLD stimulieren. Während die  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Antagonisten selektiv die Noradrenalin-stimulierte PLD-Aktivität und somit die Bildung von Phosphatidsäure und anderen PLD-Produkten wie Phosphatidylethanol und Phosphatidylbutanol blockierten (Ye et al. 1994, Kurz et al. 1999), führte der  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-Agonist Phenylephrin in neonatalen Rattenkardiomyozyten zu keiner (Clerk und Sudgen 1997) oder nur einer schwachen Stimulation der PLD (Eskildsen-Helmond et al. 1997). Unsere Daten zeigen für die in neonatalen Rattenkardiomyozyten exprimierten  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren ähnliche Ergebnisse. Da Noradrenalin sowohl  $\alpha$ - als auch  $\beta$ -adrenerge Rezeptoren aktiviert, wurde zum Ausschluss der  $\beta$ -Adrenozeptoren-gekoppelten Signalkaskade der Antagonist Nadolol zugesetzt. Die Stimulation der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren durch Noradrenalin führte innerhalb derselben Kardiomyozytenpopulation in einem vergleichbaren Ausmaß zur PLC- und PLD-Aktivierung. Dagegen stimulierte Phenylephrin die PLC, während

die PLD-Aktivität unverändert blieb. Wahrscheinlich kann Phenylephrin im Gegensatz zu Noradrenalin nicht alle Signalkomponenten, welche für die  $\alpha_1$ -Adrenozeptor-induzierte PLD-Aktivierung in den neonatalen Herzmuskelzellen der Ratten benötigt werden, aktivieren. Minneman und Mitarbeiter haben gezeigt (1994), dass Phenylephrin ein partieller Agonist an  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren ist. Da partielle Agonisten sich in ihrer Wirksamkeit, z.B. die Aktivierung verschiedener Signalwege von Agonisten unterscheiden, ist anzunehmen, dass die partielle agonistische Eigenschaft des Phenylephrins die Ursache für die beobachteten Widersprüche darstellt.

### **5.2.2 Endothelin-1 stimuliert die PLD- und PLC-Aktivität in Kardiomyozyten neonataler Ratten über ET<sub>A</sub>-Rezeptoren**

Endothelin zeigt am Myokard neben der Gefäßkonstriktion eine Reihe von Wirkungen an Herzmuskelzellen. Dazu gehören die Beeinflussung der Kontraktionskraft sowie die Regulation des Kardiomyozytenwachstums während der ontogenetischen Entwicklung und die Induktion einer Myokardhypertrophie (Ito et al. 1991). Die Analyse humaner genomischer Sequenzen ergab drei verschiedene Gene, welche für drei unterschiedliche Peptide kodierten. Diese wurden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung Endothelin-1, Endothelin-2 und Endothelin-3 benannt (Inoue et al. 1989, Bloch et al. 1989, Bloch et al. 1991).

Neben seinen vasoaktiven Effekten führt eine Stimulation mit Endothelin-1 im Myokard zu hypertrophen Antworten (Sugden 2002). Über Endothelin-Rezeptoren werden die Phospholipasen des Typs  $\text{C}\beta$  durch  $\text{G}\alpha_{q/11}$ -Proteine aktiviert (Berstein et al. 1992, Sugden et al. 1993, Takigawa et al. 1995, Clerk und Sugden 1997, Eskildsen-Helmond et al. 1997). Die verschiedenen Wirkungen von Endothelin-1 werden über mindestens zwei Rezeptor-Subtypen, nämlich den Endothelin<sub>A</sub> (ET<sub>A</sub>)- und den Endothelin<sub>B</sub> (ET<sub>B</sub>)-Rezeptor, vermittelt (Takasuka et al. 1992, Modesti et al. 1999). Auch in diesem System werden selektive ET<sub>A</sub>- und ET<sub>B</sub>-Rezeptor-Antagonisten verwendet, um zu charakterisieren, durch welchen ET-Rezeptor die Endothelin-1-induzierte Wirkung vermittelt wird. Im menschlichen Myokard konnten Pieske und Mitarbeiter (1999) beide ET-Rezeptor-Subtypen nachweisen. Die Aktivierung der PLC und PLD durch Endothelin-1 in den von uns verwendeten ventrikulären neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde über den ET<sub>A</sub>-Rezeptor

vermittelt. Der hochselektive peptiderge  $ET_A$ -Rezeptor-Antagonist BQ 123 unterdrückte die Endothelin-1-induzierte PLC- und PLD-Aktivierung mit gleichem Potenz. Der Zeitverlauf der  $IP_3$ -Bildung zeigte, dass die Bildung des zellulären PLC-Produktes  $IP_3$  sein Maximum 30 sek nach der Stimulation mit dem Agonisten Endothelin-1 erreichte. Übereinstimmend dazu haben Clerk und Sugden (1997) eine schnelle PLC-Aktivierung nach der Endothelin-1-Stimulation beschrieben, die mit Translokation und Aktivierung der Proteinkinase C einhergeht (Fahimi-Vahid et al. 2002).

### **5.2.3 Auswirkungen von Thrombin auf die PLD- und PLC-Aktivität**

Thrombin ist ein proteolytisches Enzym (eine Serin-Protease) mit Wirkung auf die Hämostase und die entzündlichen und proliferativen Prozessen (Shuman 1986, Coughlin 1994). Zelluläre Antworten durch Thrombin werden über die G-Protein-gekoppelten, Protease-aktivierten Rezeptoren (PAR) vermittelt. Vier verschiedene PAR-Rezeptoren sind bislang identifiziert (Vu et al. 1991, Nystedt et al. 1994, Ishihara et al. 1997, Xu et al. 1998, Cottrell et al. 2002). Der Prototyp PAR-1 wird durch die Spaltung seiner N-terminalen Exodomäne durch Thrombin aktiviert. PAR1 fördert die Inositol-Triphosphat-Akkumulation, stimuliert die MAP-Kinasen und moduliert die Kontraktilität (Steinberg et al. 1991). Frühere Untersuchungen zeigten, dass Kardiomyozyten den PAR1, welcher eine hohe Affinität zu Thrombin besitzt, exprimieren (Jiang et al. 1996). PAR2 besitzt zu 30 % eine identische Sequenz wie PAR1. Im Gegensatz zu PAR1 wird PAR2 nicht durch Thrombin, sondern durch Trypsin aktiviert. PAR3 und PAR4, welche auch durch Thrombin stimuliert werden (Coughlin 1999), sind in neonatalen Rattenkardiomyozyten nicht exprimiert.

Die Aktivierung des G-Protein-gekoppelten Rezeptors PAR1 durch Thrombin kann in Kardiomyozyten zu einer Aktivierung der Proteinkinase C und damit zur Hypertrophie führen (Steinberg et al. 1991, Sabri et al. 2000). Die Ergebnisse dieser Arbeit haben an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten gezeigt, dass Thrombin die PLD in einem vergleichbaren Ausmaß wie Endothelin-1 und Noradrenalin stimuliert. Eine Stimulation der PLC durch Thrombin konnte im Gegensatz zu Endothelin-1 und Noradrenalin durch die Akkumulation gebildeter Inositol-Phosphate ( $IP_3 < IP_2 < IP_1$ ) nicht nachgewiesen werden. Aufgrund dieses Befundes wurde in einem Rezeptor-Bindungs-Assay die Bildung des zellulären PLC-Produktes  $IP_3$  im

Zeitverlauf bestimmt. Der Zeitverlauf der  $IP_3$ -Bildung in neonatalen Rattenkardiomyozyten zeigte, dass sowohl durch Endothelin-1 und Noradrenalin als auch durch Thrombin eine maximale Bildung von zellulärem  $IP_3$  nach 30 sek erreicht wurde. Die Thrombin-induzierte PLC-Stimulation war nur sehr kurzlebig. 60 sek nach der Stimulation mit Thrombin ging der  $IP_3$ -Gehalt zurück und erreichte somit die Basallinie. Im Gegensatz dazu konnte sogar noch 15 min nach der Stimulation der Kardiomyozyten mit Endothelin-1 bzw. Noradrenalin erhöhter  $IP_3$ -Gehalt gemessen werden. Es ist deshalb anzunehmen, dass diese sehr transiente Aktivierung der PLC durch Thrombin nicht ausreicht, um eine über Proteinkinase C-vermittelte Aktivierung der PLD hervorzurufen.

### **5.3 Identifizierung der heterotrimeren G-Proteine, die an der Stimulation der PLC und PLD beteiligt sind**

G-Proteine sind Enzyme, die in verschiedenen Konformationen existieren können und die mit unterschiedlichen Effektormolekülen in Wechselwirkung treten (Übersicht bei Hepler und Gilman 1992, Neer 1995). Aus früheren experimentellen Untersuchungen in verschiedenen Zelllinien sind eine Vielzahl von PLD-aktivierenden G-Protein-gekoppelten Rezeptoren bekannt (Exton 1997, Exton 1999, Houle und Bourgoïn 1999, Jones et al 1999, Frohman und Morris 1999). Einer Vielzahl von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren stimulieren neben der PLC gleichzeitig die PLD. Kurz und Mitarbeiter (1999) berichteten, dass die Stimulation von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren im ischämischen Herz die Bildung von Phosphatidsäure und Diacylglycerol induziert. Ihre Untersuchungen zeigten, dass Phosphatidsäure durch eine Aktivierung der PLD, während Diacylglycerol überwiegend durch die PLC-Aktivierung, gebildet wurde.

Die Stimulation der beiden Phospholipasen über G-Protein-gekoppelten Rezeptoren könnte möglicherweise eine nachgeschaltete Reaktion sein, indem der Rezeptor zuerst zu einer Stimulation der PLC führt und diese nachfolgend die PLD aktiviert. Die Aktivierung der PLD kann z.B. durch die intrazelluläre Calcium-Ionen-Konzentrationszunahme und/oder die Stimulation der Proteinkinase C, als Folge einer PLC-Aktivierung, eingeleitet werden (Exton 1997, Exton 1999). In neonatalen und adulten Kardiomyozyten konnte eine Aktivierung der PLD über PLC-aktivierende G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, z.B. ET-1-Rezeptoren und Bradykinin-Rezeptoren, von Clerk und Sudgen (1997) und Eskildsen-Helmond und Mitarbeitern

(1997) nachgewiesen werden. Demgegenüber besteht die alternative Möglichkeit der unabhängigen Regulation der PLC und der PLD durch den aktivierten Rezeptor. Einerseits könnte derselbe G-Protein-Subtyp sowohl die PLC als auch die PLD stimulieren, andererseits könnten aber auch verschiedene G-Protein-Subtypen, die durch denselben Rezeptor aktiviert werden, für die Aktivierung der PLC bzw. der PLD verantwortlich sein. Der M3-muscarinische Acetylcholinrezeptor ist ein Prototyp der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der PLD und PLC gleichzeitig stimuliert (Sandmann et al. 1991, Offermanns et al. 1994b, Schmidt et al. 1994). Aus früheren experimentellen Untersuchungen in HEK 293-Zellen ist bekannt, dass nicht jede Stimulation der PLD durch Änderungen der intrazellulären Calcium-Ionen oder durch die Proteinkinase C-Aktivierung erfolgen muss (Schmidt et al. 1994, Rümenapp et al. 1997). Diese Beobachtungen führten zu der Vermutung, dass die PLD-Aktivierung nicht eindeutig eine Folge der PLC-Stimulation ist.

Für den Nachweis der Aktivierung von  $G\alpha_q$ - und  $G\alpha_{12}$ -Proteinen haben Rümenapp und Mitarbeiter (2001) die Bindung des photoreaktiven GTP-Analogens [ $\gamma^{32}$ -P]-GTP-Azidoanilid in  $G\alpha_q$ - und  $G\alpha_{12}$ -Proteine, welche in HEK 293-Zellen über M3-muscarinische Acetylcholinrezeptoren überexprimiert waren, untersucht. Das gebundene [ $\gamma^{32}$ -P]-GTP-Azidoanilid wird von der GTPase nicht oder nur sehr langsam hydrolysiert, so dass das G-Protein in der aktiven Konformation verbleibt. Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen (Offermanns et al. 1994b) wurde gezeigt, dass die Zugabe von Carbachol die Aufnahme von [ $\gamma^{32}$ -P]-GTP-Azidoanilid in  $G\alpha_q$ -Proteine stark erhöhte. Ebenso konnte eine Aktivierung von  $G\alpha_{12}$ -Protein nachgewiesen werden, die allerdings erst nach Überexpression von  $G\alpha_{12}$  bzw.  $G\alpha_{13}$  aufgetreten war. Rümenapp und Mitarbeiter (2001) haben außerdem gezeigt, dass die Basal- und die über M3-muscarinische Acetylcholinrezeptor-stimulierte PLD-Aktivität nach der  $G\alpha_q$ -Überexpression (Wildtyp oder konstitutiv aktive Form) unverändert blieb, während die M3-muscarinische Acetylcholinrezeptor-induzierte PLC-Aktivität anstieg. Nach der Überexpression des  $G\alpha_q$ -spezifischen RGS-Proteins RGS4, welches GAP-Aktivität für  $G\alpha_{q/11}$  und  $G\alpha_{i/o}$  zeigt (Berman et al. 1996a, Berman et al. 1996b, Hepler et al. 1997, Popov et al. 1997, Tesmer et al. 1997, Srinivasa et al. 1998, Berman und Gilman 1998, Wieland und Chen 1999), wurde die M3-muscarinische Acetylcholinrezeptor-induzierte PLC-Aktivität gehemmt (Rümenapp et al. 2001). Die PLD-Aktivität wurde durch die Überexpression von RGS4 nicht beeinflusst.

Aufgrund dieser Beobachtungen, welche mit früheren experimentellen Untersuchungen über die Regulation der PLC durch G-Proteine der Subfamilie  $G\alpha_q$  und RGS4 übereinstimmen (Fields und Casey 1997, Yan et al. 1997, Huang et al. 1997, Berman und Gilman 1998, Wieland und Chen 1999, Xu et al. 1999), ist anzunehmen, dass die Aktivierung der PLD in HEK 293-Zellen über die stabil exprimierte M3-muscarinische Acetylcholinrezeptoren nicht eine Folge der  $G\alpha_q$ -induzierten PLC-Stimulation ist (Rümenapp et al. 2001). Rümenapp und Mitarbeiter (2001) konnten ebenfalls zeigen, dass die Basal- und die über M3-muscarinische Acetylcholinrezeptor-stimulierte PLD-Aktivität nach der Überexpression von  $G\alpha_{12}$  und  $G\alpha_{13}$  anstieg, während die M3-muscarinische Acetylcholinrezeptor-induzierte PLC-Aktivität unverändert blieb. Nach der Überexpression des negativen Regulators der  $G\alpha_{12/13}$ -vermittelten Signalübertragung, LSCII-RGS (das Mausortholog und relativ nahe verwandt zu dem menschlichen RGS-Protein p115-RhoGEF; Whitehead et al. 1996, Kozasa et al. 1998, Hart et al. 1998, Mao et al. 1998), wurde die Carbachol-induzierte PLD-Aktivität gehemmt. Die PLC-Aktivität wurde durch die Überexpression von LSCII-RGS nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse bestätigen, dass die  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine an der Aktivierung der PLC in HEK 293-Zellen nicht beteiligt sind (Singer et al. 1994, Kozasa und Gilman 1995, Dhanasekaran und Dermott 1996, Fields und Casey 1997, Singer et al. 1997) und zeigen weiterhin, dass die Aktivierung der PLD durch M3-muscarinische Acetylcholinrezeptoren über  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine vermittelt wird. In dieser Arbeit konnte außerdem gezeigt werden, dass die  $G\alpha_{12}$ -,  $G\alpha_{13}$ - und LSCII-Überexpression die Stimulation der PLD durch Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA), einem spezifischen Aktivator von Proteinkinase C-Isoformen, nicht beeinflusste (Rümenapp et al. 2001). Diese Ergebnisse zeigen, dass  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine auch an der Proteinkinase C-abhängigen Aktivierung der PLD in HEK 293-Zellen nicht beteiligt sind.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse von Rümenapp und Mitarbeiter (2001) in HEK 293-Zellen, dass es mindestens zwei Wege der PLD-Aktivierung gibt: zum einen eine Aktivierung über  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine und zum anderen eine Aktivierung über Proteinkinase C. Es wurde außerdem gezeigt, dass sich die Beteiligung von G-Proteinen der  $G\alpha_{q/11}$ - bzw.  $G\alpha_{12/13}$ -Subfamilie mit Hilfe Subtyp-spezifischer RGS-Proteine differenzieren lassen. Dieser Ansatz wurde deshalb zur Differenzierung der PTX-insensitiver Signalwege der PLD-Aktivierung in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten gewählt.

### **5.3.1 $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteine sind an der PLC- bzw. PLD-Aktivierung in Kardiomyozyten durch $ET_A$ -Rezeptoren, $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren und PAR1-Rezeptoren nicht beteiligt**

Ein anerkanntes Hilfsmittel zum Nachweis der Beteiligung von  $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteinen an Signalwegen ist das PTX. PTX katalysiert die ADP-Ribosylierung an einem Cystein-Rest nahe des C-Terminus von  $G_{\alpha_{i/o}}$ -Untereinheiten. Die Modifikation verhindert die Interaktion des modifizierten G-Proteins mit dem Rezeptor, wodurch die Signalübertragung gehemmt wird (Birbaumer et al. 1990, Hepler und Gilman 1992). In mit PTX behandelten Kardiomyozyten der neonatalen Ratten blieb die Thrombin- und die Noradrenalin-stimulierte PLC- und PLD-Aktivität unverändert.

Die Endothelin-1-induzierte Zunahme der PLC-Aktivität wurde durch PTX ebenfalls nicht verändert. Interessanterweise führte die Behandlung von Kardiomyozyten mit PTX zu einer Steigerung der Endothelin-1-induzierten PLD-Aktivität. Zur Zeit kann über die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Beobachtungen nur spekuliert werden. Aus früheren experimentellen Untersuchungen ist bekannt, dass die  $ET_A$ -Rezeptoren über PTX-sensitive G-Proteine der  $G_{\alpha_i}$ -Familie zu einer Hemmung der Adenylyl-Cyclase führen und somit an der  $ET_A$ -Rezeptor-induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten beteiligt sind (Pönicke et al. 1998, Pönicke et al. 1999). Eine mögliche Erklärung für die Steigerung der Endothelin-1-induzierten PLD-Aktivität wäre, dass die aktivierten  $ET_A$ -Rezeptoren in Kardiomyozyten zusätzlich zur Proteinkinase C-abhängigen PLD-Stimulation die inhibitorischen G-Proteine ( $G_{\alpha_i}$ -Familie) aktivieren. Durch die Behandlung der Kardiomyozyten mit PTX würde somit die Aktivierung der PTX-sensitiven  $G_{\alpha_i}$ -Proteine durch den  $ET_A$ -Rezeptor verhindert und möglicher inhibitorischer Effekt auf die PLD entfallen.

Da aber weder die Endothelin-1-, Noradrenalin- noch Thrombin-stimulierte PLC- bzw. PLD-Aktivitäten durch die PTX-Behandlung gehemmt wurden, zeigen die Daten dieser Arbeit, dass die PTX-sensitiven  $G_{\alpha_{i/o}}$ -Proteine an der Aktivierung von PLC und PLD nicht beteiligt sind.

### **5.3.2 $G_{\alpha_{q/11}}$ -Proteine vermitteln die PLC- bzw. PLD-Aktivierung in Kardiomyozyten durch $ET_A$ -Rezeptoren und $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren**

Die Stimulation von ET-1-Rezeptoren und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren in Kardiomyozyten kann eine zelluläre Hypertrophie induzieren (Moravec et al. 1989, Graham et al. 1996, Hines und Thorburn 1998). Milano und Mitarbeiter (1994) zeigten, dass die Expression einer konstitutiv aktiven Mutante des  $\alpha_1$ -Adrenozeptors in transgenen Mäusen zu einer kardialen Hypertrophie führt. Die kardiale Überexpression von  $G_{\alpha_q}$  führt in den entsprechenden Maus-Linien ebenfalls zu einer kardialen Hypertrophie (Mende et al. 1998, Mende et al. 1999). Endothelin-1 und Noradrenalin führen über PTX-insensitive G-Proteine der  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Familie zu einer Aktivierung der PLC- $\beta$  (Exton 1993). Um zu überprüfen, ob in dem hier bearbeiteten Modell eine direkte Aktivierung von  $G_{\alpha_q}$ -Proteinen sowohl die PLC als auch die PLD, ähnlich einer Stimulation von ET-1-Rezeptoren und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren, stimulieren kann, wurden die neonatalen Rattenkardiomyozyten mit dem  $G_{\alpha_q}$ -aktivierenden Toxin *Pasteurella multocida* (PMT; Wilson et al. 1997, Zywiets et al. 2001) behandelt. Beide Aktivitäten, PLC- und PLD-Aktivität, waren nach einer Behandlung der Kardiomyozyten mit dem PMT in einem ähnlichen Ausmaß (4-fach) erhöht.

Die Überexpression des  $G_{\alpha_{q/11}}$ -inhibierenden RGS-Proteins RGS4 hemmte sowohl die Endothelin-1-induzierte PLC-Aktivität (Fahimi-Vahid et al. 2002) als auch die Noradrenalin-stimulierte PLC-Aktivität und PLD-Aktivität (Gosau et al. 2002). Die Überexpression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS hatten dagegen keinen Einfluss.

Die Gesamtheit dieser Ergebnisse spricht deshalb dafür, dass kardiale  $\alpha_{1A}$ -Adrenozeptoren und  $ET_A$ -Rezeptoren über der Aktivierung von  $G_{\alpha_q}$ -Proteinen und PLC nachgeschaltete Signale, wahrscheinlich durch Stimulation der Proteinkinase C (siehe Abschnitt 5.4.2), zur Aktivierung der PLD führen (Clerk und Sugden 1997, Eskildsen-Helmond et al. 1997). Da dagegen die Überexpression von RGS4 keinen Einfluss auf die PLD-Stimulation durch aktivierte PAR1-Rezeptoren hatte (Fahimi-Vahid et al. 2002), ist anzunehmen, dass  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Proteine zur PLD-Aktivierung durch PAR1-Rezeptoren nicht beitragen (Abbildung 47).

### **5.3.3 $G\alpha_{12/13}$ -Proteine vermitteln die PLD-Aktivierung in Kardiomyozyten durch aktivierte PAR1-Rezeptoren**

Der Einfluss der Expression des  $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteins LSCII-RGS auf die PLC und die PLD wurde in den isolierten neonatalen Kardiomyozyten der Ratten untersucht. Durch die LSCII-RGS-Expression wurde die Thrombin-induzierte PLD-Aktivität signifikant gehemmt, während die Basal-, Endothelin-1- und Noradrenalin-stimulierte PLD-Aktivität unverändert blieb. Die Endothelin-1- und Noradrenalin-induzierte Stimulation der PLC-Aktivität wurde durch die Expression von LSCII-RGS ebenfalls nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse zusammen mit den Daten, die in den Abschnitten 5.4.1 und 5.4.2 diskutiert werden, zeigen, dass die PLD-Aktivierung über PAR1-Rezeptoren nicht von der PLC ausgeht.

Da die Überexpression von RGS4 keinen Einfluss auf die Thrombin-stimulierte PLD-Aktivität hatte, während LSCII-RGS das Maximum der Thrombin-stimulierten PLD-Aktivität um ca. 50 % verringerte, war anzunehmen, dass die Thrombin-induzierte PLD-Aktivierung in neonatalen Kardiomyozyten der Ratten über  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine vermittelt wird. Zur Verifizierung dieser Annahme, wurde die RGS-Homologie-Domäne eines zweiten Regulatorproteins der  $G\alpha_{12/13}$ -vermittelten Signalübertragung KIAA380-RGS (PDZ-RhoGEF; Kozasa et al. 1998, Rügenapp et al. 1999) in neonatalen Kardiomyozyten der Ratten überexprimiert. Mit ansteigender Expression wurde die Thrombin-induzierte PLD-Aktivität um maximal 75 % reduziert. Analog zur Expression von LSCII-RGS hatte die Expression von KIAA380-RGS keinen Einfluss auf die Endothelin-1-induzierte PLD-Aktivität.

Interessanterweise, hemmte die adenoviral-vermittelte Überexpression von LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS in Kardiomyozyten auch die Thrombin-induzierte Aktivierung der MAP-Kinasen Erk 1/2, SAPK/JNK und p38 (Bogoyevitch 1996, Ramirez et al. 1997, Zechner et al. 1997). Die Aktivierung der MAP-Kinasen durch Endothelin-1 wurden dagegen durch die Überexpression von LSCII-RGS bzw. KIAA380-RGS nicht beeinflusst. Die Ergebnisse zeigen, dass an der Aktivierung von MAP-Kinasen in neonatalen Rattenkardiomyozyten durch Thrombin ebenfalls  $G\alpha_{12/13}$ -Proteine beteiligt sind. Mit Hilfe verschiedener Hemmstoffe des PAR1- $G\alpha_{12/13}$ -PLD-Signalweges in neonatalen Rattenkardiomyozyten konnten wir inzwischen zeigen, dass die Thrombin-induzierte Stimulation der PLD zumindest an der Aktivierung der MAP-Kinase Erk 1/2 beteiligt ist (Z Kardiol 2003).

## **5.4 Beteiligung von ARF-Proteinen und Proteinkinase C-Isoformen an der PLD-Aktivität**

Da eine direkte Aktivierung der PLD durch heterotrimere G-Proteine einschließlich des  $G_{\alpha_{12}}$ -Proteins nicht beobachtet wurde (Exton 1997, Exton 1999, Jones et al. 1999, Liscovitch et al. 2000), ist anzunehmen, dass auch diese G-Proteine höchstwahrscheinlich andere Komponenten einer Signaltransduktionskaskade aktivieren, die dann schließlich zur Aktivierung der PLD führen. Zu den am besten charakterisierten Komponenten solcher Signaltransduktionskaskaden, welche an der Rezeptor-induzierten PLD-Stimulation beteiligt sein können, gehören monomere GTP-bindende Proteine der ARF-Familie und Proteinkinase C-Isoformen (Exton 1997, Exton 1999, Jones et al. 1999, Liscovitch et al. 1999).

### **5.4.1 Monomere GTP-bindende Proteine der ARF-Familie**

In unserer Arbeitsgruppe wurden Hinweise darauf erarbeitet, dass an der Thrombin-induzierten PLD-Aktivierung monomere GTP-bindende Proteine der ARF-Familie beteiligt sind (Fahimi-Vahid et al. 2002). Isolierte neonatale Kardiomyozyten der Ratten wurden mit Brefeldin A (BFA), einem spezifischen Hemmstoff des ARF-Guaninnukleotid-Austauschfaktors (Donaldson et al. 1992, Morinaga et al. 1997), behandelt. BFA hemmte die Thrombin-induzierte PLD-Aktivität hoch signifikant um ca. 50 %. Im Gegensatz dazu blieb die Endothelin-1-induzierte PLD-Aktivität nahezu unverändert (Fahimi-Vahid et al. 2002). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass es durch die Stimulation der PAR1-Rezeptoren in neonatalen Kardiomyozyten der Ratten, die zur Aktivierung von  $G_{\alpha_{12/13}}$ -Proteinen führt, zu einer Aktivierung von ARF-GTPasen und damit letztendlich zur PLD-Stimulation kommt (Abbildung 47). Es konnte gezeigt werden, dass zwei der klonierten PLD-Isoformen, PLD1 und PLD2, durch ARF-Proteine reguliert werden (Hammond et al. 1995, Hammond et al. 1997, Park et al. 2000). Von Park und Mitarbeitern (2000) wurde gezeigt, dass in Kardiomyozyten der Ratten PLD2 durch  $\alpha$ -Actinin gehemmt wird. Diese Hemmung konnte jedoch durch ARF rückgängig gemacht werden. In adulten Rattenkardiomyozyten ist die PLD2 die überwiegend exprimierte PLD-Isoform (Park et al. 2000). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die Thrombin-vermittelte PLD-Stimulation in Kardiomyozyten über die ARF-abhängige Regulation der PLD2 erfolgt. Eine Beteiligung der ebenfalls ARF-aktivierbaren PLD1 kann aber bei dem bisherigen Stand der Untersuchungen nicht ausgeschlossen werden.

### **5.4.2 Proteinkinase C**

Höchstwahrscheinlich wird die Aktivierung der PLD in Kardiomyozyten durch Endothelin-1 über ET<sub>A</sub>-Rezeptoren und PLC-abhängige Proteinkinase C vermittelt. Es gibt zunehmend Hinweise darauf, dass mehrere Proteinkinase C-Subtypen beteiligt sind (Bogoyevitch et al. 1993b, Clerk und Sudgen 1997, Eskildsen-Helmond et al. 1997). Zur Klärung, ob die Proteinkinase C an der Stimulation der PLD durch Endothelin-1, Noradrenalin oder Thrombin in isolierte neonatale Kardiomyozyten der Ratten beteiligt ist, wurden die Zellen mit dem Proteinkinase C-Hemmstoff Ro 31-8220 (Bisindolylmaleimide IX) vorbehandelt (Fahimi-Vahid et al. 2002). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von früheren Arbeiten, die eine Erhöhung der PLD-Aktivität durch Endothelin-1 in Abhängigkeit von Proteinkinase C beobachtet haben (Clerk und Sudgen 1997, Eskildsen-Helmond et al. 1997), wurde beobachtet, dass in Gegenwart von Ro 31-8220 die Endothelin-1- und die Noradrenalin-induzierte PLD-Aktivität signifikant reduziert waren. Ro 31-8220 hemmt die Proteinkinase C-Isoenzyme durch ein Konkurrenz mit ATP um dessen Bindungsstelle (Davis et al. 1989). Der inhibitorische Effekt von Ro 31-8220 auf die Endothelin-1- und Noradrenalin-induzierte PLD-Aktivität (Fahimi-Vahid et al. 2002, Gosau et al. 2002) legt deshalb die Vermutung nahe, dass die PLD-Aktivierung in den Kardiomyozyten über Proteinkinase C Phosphorylierungsabhängig erfolgt. Vor kurzem wurde von Kim und Mitarbeitern (2000) gezeigt, dass PLD1 nicht aber die PLD2 über eine Proteinkinase C-induzierte Phosphorylierung aktiviert wird. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die PLD1 die über Proteinkinase C regulierte Isoform der PLD darstellt.

Weitergehende Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe hatten versucht zu charakterisieren, welche der Proteinkinase C-Isoformen nach der Stimulation von neonatalen Rattenkardiomyozyten mit Endothelin-1, Noradrenalin und Thrombin aktiviert werden (Fahimi-Vahid et al. 2002, Gosau et al. 2002). Als Kontrolle wurden die Zellen mit PMA behandelt, welches alle Isoformen direkt aktiviert und die PLD in Kardiomyozyten deutlich stimuliert (Fahimi-Vahid et al. 2002). PMA führte zu einer Translokation, d.h. Aktivierung aller untersuchten Proteinkinase C-Isoformen ( $\alpha$ ,  $\delta$  oder  $\varepsilon$ ). Die Stimulation von ET<sub>A</sub>-Rezeptoren durch Endothelin-1 induzierte im Wesentlichen die Aktivierung der Proteinkinase C-Isoformen  $\delta$  und  $\varepsilon$ , wie auch in früheren Untersuchungen in neonatalen und adulten Rattenkardiomyozyten

beobachtet wurde (Bogoyevitch et al. 1993b, Clerk et al. 1994, Eskildsen-Helmond et al. 1997, Fahimi-Vahid et al. 2002). Eine Aktivierung der Proteinkinase C-Isoform  $\alpha$  durch  $ET_A$ -Rezeptoren konnte nicht nachgewiesen werden. Von Rohde und Mitarbeitern (2000) wurde gezeigt, dass die Stimulation der  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren mit Noradrenalin ebenfalls zu einer Aktivitätserhöhung der Proteinkinasen C  $\delta$  und  $\epsilon$  führt, während Proteinkinase C  $\alpha$  und  $\lambda$  trotz ihres höheren Expressionsniveaus nicht aktiviert wurden. Aus früheren experimentellen Untersuchungen (Pönicke et al. 1999) ist auch bekannt, dass hypertrophe Antworten von  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren in neonatalen Rattenkardiomyozyten auf die Aktivierung der Proteinkinase C-Subtypen  $\delta$  und/oder  $\epsilon$  zurückzuführen sind. Die Gesamtheit diese Untersuchungen legt deshalb nahe, dass die Aktivierung der PLD in neonatalen Rattenkardiomyozyten über  $ET_A$ -Rezeptoren und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren durch Proteinkinase C  $\delta$  und/oder  $\epsilon$  vermittelt wird (Fahimi-Vahid et al. 2002, Gosau et al. 2002; Abbildung 47).

Thrombin, d.h. Stimulation von PAR1-Rezeptor, induzierte dagegen keine Aktivierung der Proteinkinase C-Subtypen  $\alpha$  und  $\epsilon$ . Die Proteinkinase C  $\delta$  wurde nach der Stimulation mit Thrombin nur sehr schwach aktiviert (Fahimi-Vahid et al. 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass die durch PAR1-induzierte Aktivierung der Proteinkinase C  $\delta$  in neonatalen Rattenkardiomyozyten nicht ausreicht, um zu einer Proteinkinase C-abhängigen Aktivierung der PLD zu führen. In Übereinstimmung mit dieser Hypothese verursachte der ebenfalls die Proteinkinase C  $\delta$  inhibierende Proteinkinase C-Hemmstoff Ro 31-8220 keine Hemmung der Thrombin-stimulierten PLD-Aktivität (Fahimi-Vahid et al. 2002).

In Abbildung 47 sind abschließend schematisch die wahrscheinlichsten Wege der PLD-Aktivierung in neonatalen Rattenkardiomyozyten über PAR1-Rezeptoren, ET<sub>A</sub>-Rezeptoren und α<sub>1A</sub>-Adrenozeptoren zusammenfassend dargestellt.

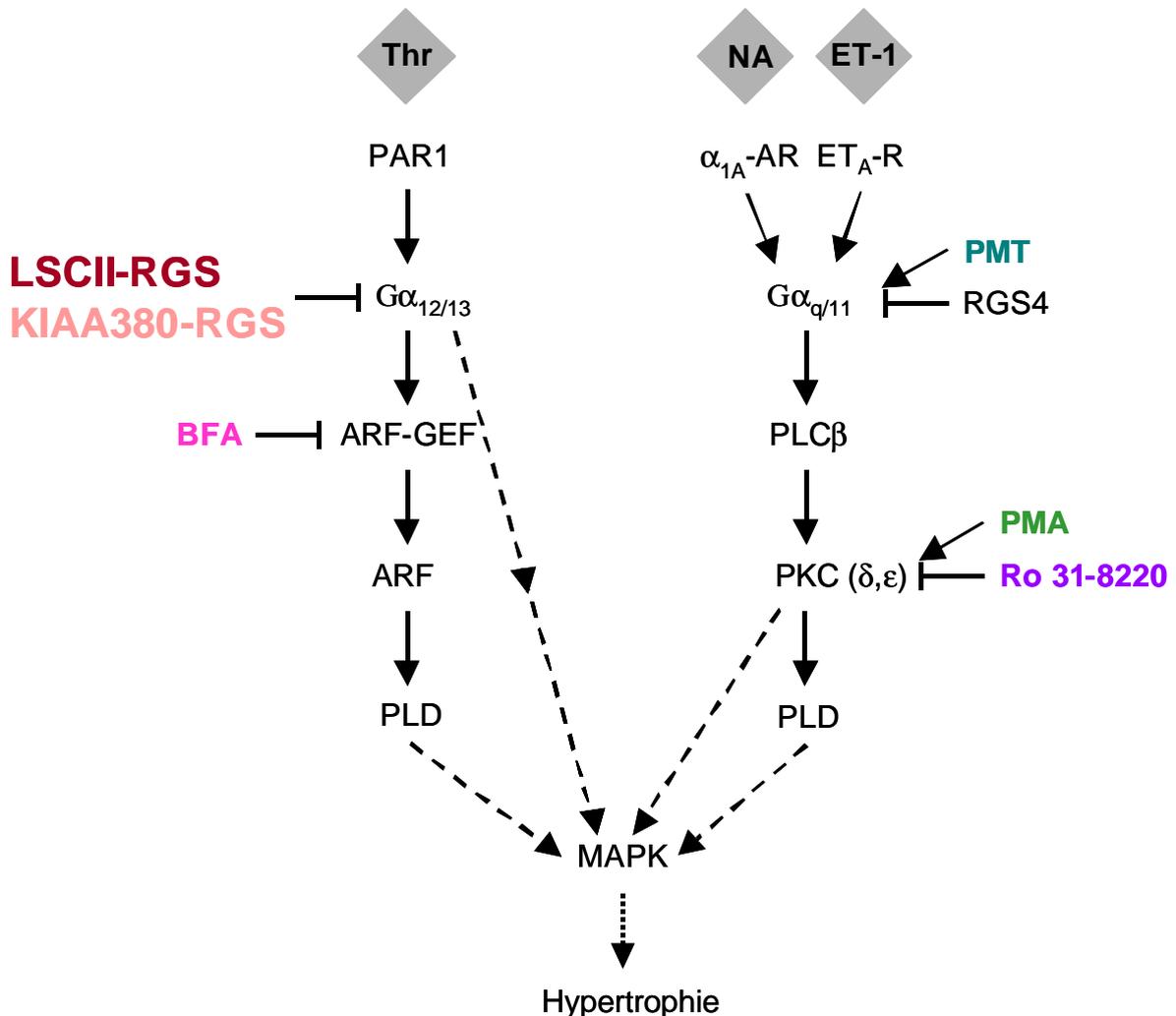


Abbildung 47 **Mögliche Mechanismen der Phospholipase D-Aktivierung über Thrombin, Endothelin-1 und Noradrenalin in neonatalen Rattenkardiomyozyten.** Die von PAR1-Rezeptoren, ET<sub>A</sub>-Rezeptoren und α<sub>1</sub>-Adrenozeptoren hervorgerufene Aktivierung der PLD wird in neonatalen Kardiomyozyten der Ratten über verschiedene Signalwege vermittelt.

Thr: Thrombin; NA: Noradrenalin; ET-1: Endothelin-1; PAR1: Protease-aktivierte Rezeptor; α<sub>1A</sub>-AR: α<sub>1A</sub>-Adrenozeptor; ET<sub>A</sub>-R: Endothelin<sub>A</sub>-Rezeptor; LSCII-RGS, KIAA380-RGS bzw. RGS4: Regulatorproteine der G-Protein-vermittelten Signalübertragung; PLC: Phospholipase C; PLD: Phospholipase D; PKC: Proteinkinase C; BFA: Brefeldin A; ARF-GEF: ADP-Ribosylierungsfaktor-Guaninnukleotid-Austauschfaktor; MAPK: MAP-Kinase; PMT: Pasteurella multocida Toxin; PMA: Phorbol-12-Myristat-13-Acetat; Ro 31-8220: Bisindolylmaleimide IX.

➔ Stimulation, —| Hemmung

## 6 Zusammenfassung

Die Aktivierung der Phospholipase D ist ein möglicher Signalweg, über den Endothelin-1-Rezeptoren ( $ET_A$ -R) und  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren ( $\alpha_1$ -AR) Hypertrophie in Kardiomyozyten induzieren. Es war Ziel der vorliegenden Arbeit zu klären, ob und wenn ja, durch welche Signalwege die Aktivierung der PLD in kultivierten neonatalen Rattenkardiomyozyten durch die Protease Thrombin, im Vergleich zu schon bekannten PLD-Aktivatoren Endothelin-1 und Noradrenalin, vermittelt wird. Die  $ET_A$ -R und  $\alpha_{1A}$ -AR in neonatalen Rattenkardiomyozyten stimulierten gleichzeitig die Phospholipase C (PLC) und die Phospholipase D (PLD). Im Gegensatz zu  $ET_A$ -R und  $\alpha_{1A}$ -AR induzierten durch Thrombin aktivierte Rezeptoren (PAR1) nur eine transiente Aktivierung der PLC. Dagegen war die Pertussis-Toxin (PTX)-insensitive Stimulation der PLD mit der Stimulation durch  $ET_A$ -R und  $\alpha_{1A}$ -AR vergleichbar. Da bis dato molekulare Werkzeuge zur Differenzierung der PTX-insensitiven  $G\alpha_q$ - und  $G\alpha_{12}$ -Familien fehlten, sollte versucht werden, diese Signalwege mit Hilfe Subtyp-spezifischer Regulatorproteine der G-Protein-vermittelten Signalübertragung (RGS-Proteine) zu differenzieren. Es wurden dazu zwei rekombinante Adenoviren, die zur Expression der  $G\alpha_{12/13}$ -spezifischen RGS-Proteine LSCII-RGS und KIAA380-RGS führen, hergestellt. Zur Überprüfung dieser Viren als geeignete molekulare Werkzeuge zur Differenzierung von PTX-insensitiven Signalwegen, wurden HEK 293-Zellen, die stabil M3-muscarinischen Acetylcholinrezeptoren (m3-AChR) exprimieren, mit dem Adenovirus zur Expression von LSCII-RGS infiziert und die  $G\alpha_q$ - und  $G\alpha_{12}$ -vermittelte Kopplung an die PLC und PLD untersucht. Die Analyse der durch die  $G\alpha_q$ -Familie-vermittelten Kopplung des m3-AChR an die PLC bzw. der durch die  $G\alpha_{12}$ -Familie-vermittelten Kopplung des m3-AChR an die PLD in HEK 293-Zellen zeigte, dass die Expression von LSCII-RGS spezifisch die m3-AChR-induzierte Aktivierung der PLD hemmte. In neonatalen Rattenkardiomyozyten wurde die  $ET_A$ -R- und  $\alpha_{1A}$ -AR-stimulierte PLC- und PLD-Aktivität durch Überexpression des  $G\alpha_{q/11}$ -spezifischen RGS4, nicht aber durch die Expression von LSCII-RGS, reduziert. Dagegen wurde die PAR1-induzierte PLD-Stimulation durch die Expression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS gehemmt. Das Ausmaß der Hemmung korrelierte mit der Expression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in neonatalen Rattenkardiomyozyten die Aktivierung der PLD durch verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren über zwei unterschiedliche Signalübertragungswege vermittelt wird. Der erste Signalweg wird durch aktivierte  $ET_A$ -R und  $\alpha_{1A}$ -AR induziert und führt zur Aktivierung der G-Proteine der  $G\alpha_q$ -Familie. Diese stimulieren die PLC und induzieren die Aktivierung der Proteinkinase C-Isoenzyme  $\delta$  und  $\epsilon$ , welche schließlich die PLD-Aktivierung auslösen. Die Stimulation der PLD durch PAR1 wird dagegen über die Aktivierung der  $G\alpha_{12}$ -Familie und ARF-GTPasen vermittelt. Die adenovirale Überexpression von LSCII-RGS und KIAA380-RGS hemmte zudem die PAR1-, nicht aber die  $ET_A$ -R-induzierte Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK). Dies deutet daraufhin, dass die Aktivierung der PLD durch PAR1 an der Aktivierung der MAPK-Signalwege in Kardiomyozyten beteiligt ist. Die Aktivierung der PLD ist deshalb möglicherweise ein wichtiger Zwischenschritt für die Thrombin-induzierte Hypertrophie in Kardiomyozyten.

## 6 Summary

Activation of phospholipase D is assumed to be one pathway by which endothelin-1 receptors (ET<sub>A</sub>-R) and  $\alpha_1$ -adrenoceptors ( $\alpha_1$ -AR) induce hypertrophic responses in cardiac myocytes. Here, we examined whether, and by which mechanisms, protease thrombin mediates PLD activity in cultured neonatal rat cardiomyocytes, in comparison to the established PLD activators endothelin-1 and noradrenaline. Stimulation of ET<sub>A</sub>-R and  $\alpha_{1A}$ -AR in neonatal rat cardiomyocytes increased the phospholipase D (PLD) activity concomitant with the stimulation of phospholipase C (PLC). In contrast to ET<sub>A</sub>-R and  $\alpha_{1A}$ -AR, the thrombin activated receptor (PAR1) induces only a very transient activation of PLC, whereas a pertussis toxin (PTX)-insensitive stimulation of PLD with a similar extent to that evoked by ET<sub>A</sub>-R and  $\alpha_{1A}$ -AR occurred. For the PTX-insensitive G $\alpha_q$ - and G $\alpha_{12}$ -families however, such specific molecular tools are lacking. Theoretically, G protein subtype-specific regulators of G protein signalling (RGS proteins) could be used as tools to dissect the PTX-resistant G protein families. Thus, two recombinant adenoviruses encoding the RGS homology domains of the G $\alpha_{12/13}$ -family specific RGS proteins LSCII-RGS and KIAA380-RGS were constructed. To test the potential of these viruses to dissect PTX-insensitive pathways we infected HEK 293-cells stably expressing the muscarinic m3 acetylcholine receptor (m3-AChR) with Ad5-LSCII and analyzed the G $\alpha_q$ - and G $\alpha_{12}$ -mediated coupling to PLC and PLD, respectively. The data indicate that G $\alpha_q$ -families mediate m3-AChR-PLC coupling and G $\alpha_{12}$ -families mediate m3-AChR-PLD coupling in HEK 293-cells, respectively. The expression of LSCII-RGS selectively inhibited the m3-AChR induced stimulation of PLD. In the neonatal rat cardiomyocytes, ET<sub>A</sub>-R and  $\alpha_{1A}$ -AR stimulated PLC and PLD were blunted by the G $\alpha_{q/11}$ -specific RGS4 but unaltered by LSCII-RGS. In contrast, PLD stimulation by PAR1 was suppressed by the expression of LSCII-RGS and KIAA380-RGS. The extent of inhibition correlated with the expression of LSCII-RGS and KIAA380-RGS.

Therefore, the data provide evidence for two distinct pathways mediating the GPCR-induced PLD stimulation in neonatal rat cardiomyocytes. One pathway is apparently initiated by ET<sub>A</sub>-R and  $\alpha_{1A}$ -AR. Activation of G $\alpha_q$ -type G proteins stimulates PLC and induces activation of protein kinase C  $\delta$  and  $\epsilon$ , which finally results in PLD activation. The second pathway, apparently used by PAR1, mediates PLD stimulation via the activation of G $\alpha_{12}$ -type G proteins and ARF GTPases. In addition, adenoviral expression of LSCII-RGS and KIAA380-RGS blunted PAR1- but not ET<sub>A</sub>-R-induced activation of mitogen activated protein kinases (MAPK). The data therefore indicate that the activation of PLD by PAR1 is required for the activation of the MAPK pathway in cardiac myocytes and thus PLD activation is a major contributor to the thrombin-induced hypertrophy in cardiomyocytes.

## 7 Literaturverzeichnis

- Arthur JF, Matkovich SJ, Mitchell CJ, Biden TJ, Woodcock EA (2001) Evidence for selective coupling of alpha 1-adrenergic receptors to phospholipase C-beta 1 in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem* 276: 37341-37346
- Barrett K, Leptin M, Settleman J (1997) The Rho GTPase and a putative RhoGEF mediate a signaling pathway for the cell shape changes in *Drosophila* gastrulation. *Cell* 91: 905-915
- Berman DM, Wilkie TM, Gilman AG (1996a) GAIP and RGS4 Are GTPase-Activating Proteins for the Gi Subfamily of G Protein  $\alpha$  Subunits. *Cell* 86: 445-452
- Berman DM, Kozasa T, Gilman AG (1996b) The GTPase-activating Protein RGS4 Stabilizes the Transition State for Nucleotide Hydrolysis. *J Biol Chem* 271: 27209-27212
- Berman DM, Gilman AG (1998) Mammalian RGS Proteins: Barbarians at the Gate. *J Biol Chem* 273: 1269-1272
- Berridge MJ (1993) Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* 361: 315-325
- Berstein G, Blank JL, Jhon D-Y, Exton JH, Rhee SG, Ross EM (1992) Phospholipase C- $\beta$ 1 Is a GTPase-Activating Protein for  $G_{\beta/11}$ , Its Physiologic Regulator. *Cell* 70: 411-418
- Bett AJ, Prevec L, Graham FL (1993) Packaging Capacity and Stability of Human Adenovirus Type 5 Vectors. *J Virol* 67: 5911-5921
- Bett AJ, Haddara W, Prevec L, Graham FL (1994) An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 8802-8806
- Billah MM, Anthes JC (1990) The regulation and cellular functions of phosphatidylcholine hydrolysis. *Biochem J* 269: 281-291
- Birnbaumer L, Abramowitz J, Brown AM (1990) Receptor-effector coupling by G proteins. *Biochim Biophys Acta* 1031: 163-224
- Birnbaumer L (1992) Receptor-to-effector signaling through G proteins: roles for beta gamma dimers as well as alpha subunits. *Cell* 71: 1069-1072
- Bishopric NH, Kedes L (1991) Adrenergic regulation of the skeletal  $\alpha$ -actin gene promoter during myocardial cell hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 2132-2136
- Bloch KD, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T (1989) cDNA cloning and chromosomal assignment of the gene encoding endothelin 3. *J Biol Chem* 264: 18156-18161
- Bloch KD, Hong CC, Eddy RL, Shows TB, Quertermous T (1991) cDNA cloning and chromosomal assignment of the endothelin 2 gene: vasoactive intestinal contractor peptide is rat endothelin 2. *Genomics* 1991 10: 236-242
- Blumer KJ, Johnsen GL (1994) Diversity in function and regulation of MAP kinase pathways. *TIBS* 19: 236-240
- Bogoyevitch MA, Glennon PE, Sugden PH (1993a) Endothelin-1, phorbol esters and phenylephrine stimulate MAP kinase activities in ventricular cardiomyocytes. *FEBS Lett* 317: 271-275
- Bogoyevitch MA, Parker PJ, Sugden PH (1993b) Characterization of Protein Kinase C Isotype Expression in Adult Rat Heart. Protein Kinase C- $\epsilon$  Is a Major Isotype Present, and It Is Activated by Phorbol Esters, Epinephrine, and Endothelin. *Circ Re* 72: 757-767

- Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Clerk A, Lazou A, Marshall CJ, Parker PJ, Sugden PH (1994) Endothelin-1 and fibroblast growth factors stimulate the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in cardiac myocytes. The potential role of the cascade in the integration of two signaling pathways leading to myocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 269: 1110-1119
- Bogoyevitch MA, Marshall CJ, Sugden PH (1995) Hypertrophic agonists stimulate the activities of the protein kinases C-Raf and A-Raf in cultured ventricular myocytes. *J Biol Chem* 270: 26303-26310
- Bogoyevitch MA, Andersson MB, Gillespie-Brown J, Clerk A, Glennon PE, Fuller SJ, Sugden PH (1996) Adrenergic receptor stimulation of the mitogen-activated protein kinase cascade and cardiac hypertrophy. *Biochem* 314: 115-121
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254
- Brodde OE, Michel MC, Zerkowski HR (1995) Signal transduction mechanisms controlling cardiac contractility and their alterations in chronic heart failure. *Cardiovasc Res* 30: 570-584
- Buhl AM, Johnson ML, Dhanasekaran N, Johnson GL (1995)  $G\alpha_{12}$  and  $G\alpha_{13}$  Stimulate Rho-dependent Stress Fiber Formation and Focal Adhesion Assembly. *J Biol Chem* 270: 24631-24634
- Cano E, Mahadevan LC (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *TIBS* 20: 117-122
- Challis RAJ (1995) Mass assay of inositol-1,4,5-trisphosphate and phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate. *Inositol signalling - a practical approach*. Oxford University Press
- Chikumi H, Fukuhara S, Gutkind JS (2002) Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem* 277: 12463-12473
- Clerk A, Bogoyevitch MA, Anderson MB, Sugden PH (1994) Differential activation of protein kinase C isoforms by endothelin-1 and phenylephrine and subsequent stimulation of p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in ventricular myocytes cultured from neonatal rat hearts. *J Biol Chem* 269: 32848-32857.
- Clerk A, Sugden PH (1997) Regulation of phospholipases C and D in rat ventricular myocytes: stimulation by endothelin-1, bradykinin and phenylephrine. *J Mol Cell Cardiol* 29: 1593-1604
- Colley WC, Sung TC, Roll R, Jenco J, Hammond SM, Altshuler Y, Bar-Sagi D, Morris AJ, Frohman MA (1997) Phospholipase D2, a distinct phospholipase D isoform with novel regulatory properties that provokes cytoskeletal reorganization. *Curr Biol* 7: 191-201
- Cottrell GS, Coelho AM, Bunnett NW (2002) Protease-activated receptors: the role of cell-surface proteolysis in signalling. *Essays Biochem* 38: 169-183.
- Coughlin SR (1994) Molecular mechanisms of thrombin signaling. *Semin Hematol*. 31: 270-277.
- Coughlin SR (1999) How the protease thrombin talks to cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 11023-11027
- David JS, Lorna AS (1995) Construction and isolation of recombinant adenoviruses with gene replacements. *Methods in molecular genetics*, Academic Press: 31-42

- Davis PE, Hill CE, Keech E, Lawton G, Nixon JS, Sedgwick AD, Wadsworth J, Westmacott D, Wilkinson SE (1989) Potent selective inhibitors of protein kinase C. *FEBS Lett* 259: 61-63
- Davis RJ (1994) MAPKs: new JNK expands the group. *TIBS* 19: 470-473
- Dhalla NS, Xu YJ, Sheu SS, Tappia PS, Panagia V (1997) Phosphatidic acid: a potential signal transducer for cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2865-2871
- Dhanasekaran N, Dermott JM (1996) Signaling by G<sub>12</sub> class of G Proteins. *Cell Signal* 8: 235-245
- Disatnik MH, Buraggi G, Mochly-Rosen D (1994) Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Experimental Cell Res* 210: 287-297
- Dohlman HG, Thorner J (1997) RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem* 272: 3871-3874
- Donaldson JG, Finazzi D, Klausner RD (1992) Brefeldin A inhibits Golgi membrane-catalysed exchange of guanine nucleotide onto ARF protein. *Nature* 360: 350-352
- Druey KM, Blumer KJ, Kang VH, Kehrl JH (1996) Inhibition of Gprotein-mediated MAP kinase activation by a new mammalian gene family. *Nature* 379: 742-746
- Druey KM, Sullivan BM, Brown D, Fischer ER, Watson N, Blumer KJ, Gerfen CR, Scheschonka A, Kehrl JH (1998) Expression of GTPase-deficient Gialpha2 results in translocation of cytoplasmic RGS4 to the plasma membrane. *J Biol Chem* 273: 18405-18410
- Dunmon PM, Iwaki K, Henderson SA, Sen A, Chien KR (1990) Phorbol esters induce immediate-early genes and activate cardiac gene transcription in neonatal rat myocardial cells. *J Mol Cell Cardiol* 22: 901-910
- Ella KM, Qi C, McNair AF, Park JH, Wisheart-Johnson AE, Meier KE (1997) Phospholipase D activity in PC12 cells. Effects of overexpression of alpha2A-adrenergic receptors. *J Biol Chem* 272: 12909-12912
- Eskildsen-Helmond YEG, Bezstarosti K, Dekkers DHW, Van Heugten HAA, Lamers JMJ (1997) Cross-talk between receptor-mediated phospholipase C- $\beta$  and D via protein kinase C as intracellular signal possibly leading to hypertrophy in serum-free cultured cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 29: 2545-2559
- Exton JH (1993) Role of G-proteins in activation of phosphoinositide phospholipase C. *Adv Sec Mess Phospho Res* 28: 65-71
- Exton JH (1994a) Phosphoinositide phospholipases and G proteins in hormone action. *Annu Rev Physiol* 56: 349-369
- Exton JH (1994b) Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. *Biochim Biophys Acta* 1212: 26-42
- Exton JH (1996) Regulation of phosphoinositide phospholipases by hormones, neurotransmitters, and other agonists linked to G proteins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 36: 481-509
- Exton JH (1997) Phospholipase D: enzymology, mechanisms of regulation, and function. *Physiol Rev* 77: 303-320
- Exton JH (1999) Regulation of phospholipase D. *Biochim Biophys Acta* 1439: 121-133
- Fahimi-Vahid M, Gosau N, Michalek C, Han L, Jakobs KH, Schmidt M, Roberts N, Avkiran M, Wieland T (2002) Distinct signaling pathways mediate cardiomyocyte phospholipase D stimulation by endothelin-1 and thrombin. *J Mol Cell Cardiol* 34: 441-453

- Fensome A, Whatmore J, Morgan C, Jones D, Cockcroft S (1998) ADP-ribosylation factor and Rho proteins mediate fMLP-dependent activation of phospholipase D in human neutrophils. *J Biol Chem* 273: 13157-13164
- Fields TA, Casey PJ (1997) Signalling functions and biochemical properties of pertussis toxin-resistant G-proteins. *Biochem J* 321: 561-571
- Finn SG, Plonk SG, Fuller SJ (1999)  $G_{\alpha_{13}}$  stimulates gene expression and increases cell size in cultured neonatal rat ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 42: 140-148
- Frohman MA, Morris AJ (1999) Phospholipase D: structure and regulation. *Chem Phys Lipids* 98: 127-140
- Frohman MA, Sung T-C, Morris AJ (1999) Mammalian Phospholipase D structure and regulation. *Biochim Biophys Acta* 1439: 175-186
- Fromm C, Coso OA, Montaner S, Xu N, Gutkind JS (1997) The small GTP-binding protein Rho links G protein-coupled receptors and  $G_{\alpha_{12}}$  to the serum response element and to cellular transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10098-10103
- Fukuhara S, Murga C, Zohar M, Igishi T, Gutkind JS (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem* 274: 5868-5879
- Fukuhara S, Chikumi H, Gutkind JS (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene* 20: 1661-1668
- Gillespie-Brown J, Fuller SJ, Bogoyevitch MA, Cowley S, Sugden PH (1995) The mitogen-activated protein kinase kinase MEK1 stimulates a pattern of gene expression typical of the hypertrophic phenotype in rat ventricular cardiomyocytes. *J Biol Chem* 270: 28092-28096
- Gilman AG (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-649
- Gilman AG (1995) G proteins and regulation of adenylyl cyclase. *Biosci-Rep* 15: 65-97
- Gilman AG (1997) G proteins: transducers of receptor generated signals. *Annu Rev Biochem* 56: 615-649
- Glembotski CC, Irons CE, Krown KA, Murray SF, Sprenkle AB, Sei CA (1993) Myocardial alpha-thrombin receptor activation induces hypertrophy and increases atrial natriuretic factor gene expression. *J Biol Chem* 268: 20646-20652
- Gohla A, Offermanns S, Wilkie TM, Schultz G (1999) Differential involvement of  $G_{\alpha_{12}}$  and  $G_{\alpha_{13}}$  in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem* 274: 17901-17907
- Gosau N, Fahimi-Vahid M, Michalek C, Schmidt M, Wieland T (2002) Signalling components involved in the coupling of  $\alpha_1$ -adrenoceptors to phospholipase D in neonatal rat cardiac myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365: 468-476
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36: 59-74
- Graham RM, Perez DM, Hwa J, Piascik MT (1996)  $\alpha_1$ -Adrenergic receptor subtypes: molecular structure, function and signaling. *Circ Res* 78: 737-749

- Hammond SM, Altshuler YM, Sung TC, Rudge SA, Rose K, Engebrecht J, Morris AJ, Frohman MA (1995) Human ADP-ribosylation factor-activated phosphatidylcholine-specific phospholipase D defines a new and highly conserved gene family. *J Biol Chem* 270: 29640-29643
- Hammond SM, Jenco JM, Nakashima S, Cadwallader K, Gu Q, Cook S, Nozawa Y, Prestwich GD, Frohman MA (1997) Characterization of two alternately spliced forms of phospholipase D1. Activation of the purified enzymes by phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate, ADP-ribosylation factor, and Rho family monomeric GTP-binding proteins and protein kinase C  $\alpha$ . *J Biol Chem* 272: 3860-3868
- Hart MJ, Jiang X, Kozasa T, Roscoe W, Singer WD, Gilman AG, Sternweis PC, Bollag G (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115RhoGEF by G $\alpha_{13}$ . *Science* 280: 2112-2114
- He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 2509-2514
- Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM, Schaub MC (1997) Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* 29: 2873-2892
- Hepler JR, Gilman AG (1992) G proteins. *TIBS* 17: 383-387
- Hepler JR, Kozasa T, Smrcka AV, Simon MI, Rhee SG, Sternweis PC, Gilman AG (1993) Purification from Sf9 cells and characterization of recombinant Gq alpha and G11 alpha. Activation of purified phospholipase C isozymes by G alpha subunits. *J Biol Chem* 268: 14367-14375
- Hepler JR, Berman DM, Gilman AG, Kozasa T (1997) RGS4 and GAIP are GTPase-activating proteins for G $_{q\alpha}$  and block activation of phospholipase C $\beta$  by  $\gamma$ -thio-GTP-G $_{q\alpha}$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 428-432
- Hines WA, Thorburn A (1998) Ras and Rho are required for G $_{q\alpha}$ -induced hypertrophic gene expression in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 30: 485-494
- Hitt M, BettAJ, Addison CL, Prevec L, Graham FL (1995) Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. *Methods in molecular genetics*, Academic Press: 13-30
- Houle MG, Bourgouin S (1999) Regulation of phospholipase D by phosphorylation-dependent mechanisms. *Biochim Biophys Acta* 1439: 135-150
- Huang C, Hepler JR, Gilman AG, Mumby SM (1997) Attenuation of G $_i$ - and G $_{q}$ -mediated signaling by expression of RGS4 or GAIP in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 6159-6163
- Ibelgaufts H (1993) *Gentechnologie von A bis Z*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim (Bundesrepublik Deutschland)
- Inoue A, Yanagisawa M, Kimura S, Kasuya Y, Miyauchi T, Goto K, Masaki T (1989) The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 2863-2867
- Ishihara H, Connolly AJ, Zeng D, Kahn ML, Zheng YW, Timmons C, Tram T, Coughlin SR (1997) Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* 386: 502-506
- Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F (1991) Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific gene in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ Res* 69: 209-215

- Jiang T, Kuznetsov V, Pak E, Zhang H, Robinson RB, Steinberg SF (1996) Thrombin receptor actions in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 78: 553-563.
- Jones D, Morgan C, Cockcroft S (1999) Phospholipase D and membrane traffic. Potential roles in regulated exocytosis, membrane delivery and vesicle budding. *Biochim Biophys Acta* 1439: 229-244
- Kim Y, Han JM, Han BR, Lee KA, Kim JH, Lee BD, Jang IH, Suh PG, Sung HR (2000) Phospholipase D1 is phosphorylated and activated by protein kinase C in caveolin-enriched microdomains within the plasma membrane. *J Biol Chem* 275: 13621-13627
- Kirshenbaum LA (1997) Adenovirus mediated-gene transfer into cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* 17: 13-21
- Kozasa T, Gilman AG (1995) Purification of recombinant G proteins from Sf9 cells by hexahistidine tagging of associated subunits. Characterization of alpha 12 and inhibition of adenylyl cyclase by alpha z. *J Biol Chem* 270: 1734-1741
- Kozasa T, Jiang XJ, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC (1998) p115RhoGEF, a GTPase activating protein for  $G_{\alpha 12}$  and  $G_{\alpha 13}$ . *Science* 280: 2109-2111
- Kurz T, Schneider I, Tolg R, Richardt G (1999)  $\alpha_1$ -Adrenergic receptor-mediated increase in the mass of phosphatidic acid and 1, 2-diacylglycerol in ischemic rat heart. *Cardiovasc Res* 42: 48-56
- LaMorte VJ, Thorburn J, Absher D, Spiegel A, Brown JH, Chien KR, Feramisco JR, Knowlton KU (1994) Gq- and ras-dependent pathways mediate hypertrophy of neonatal rat ventricular myocytes following alpha 1-adrenergic stimulation. *J Biol Chem* 269: 13490-13496
- Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP (1990) Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham heart study. *N Engl J Med* 322: 1561-1566
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Lavie Y, Tang X (1999) Localization and possible functions of phospholipase D isozymes. *Biochim Biophys Acta* 1439: 245-263
- Liscovitch M, Czarny M, Fiucci G, Tang X (2000) Phospholipase D: molecular and cell biology of a novel gene family. *Biochem J* 345: 401-415
- Mao J, Yuan H, Xie W, Wu D (1998) Guanine nucleotide exchange factor GEF115 specifically mediates activation of Rho and serum response factor by the G protein  $\alpha$  subunit  $G_{\alpha 13}$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12973-12976
- Maruyama Y, Nishida M, Sugimoto Y, Tanabe S, Turner JH, Kozasa T, Wada T, Nagao T, Kurose H (2002)  $G_{\alpha(12/13)}$  mediates alpha(1)-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res* 91: 961-969
- Meier KE, Gibbs TC, Knoepp SM, Ella KM (1999) Expression of phospholipase D isoforms in mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* 1439: 199-213
- Mende U, Kagen A, Cohen A, Aramburu J, Schoen FJ, Neer EJ (1998) Transient cardiac expression of constitutively active  $G_{\alpha q}$  leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 13893-13898
- Mende U, Kagen A, Meister M, Neer EJ (1999) Signal transduction in atria and ventricles of mice with transient cardiac expression of activated G protein alpha(q). *Circ Res* 85: 1085-1091
- Michelotti GA, Price DT, Schwinn DA (2000)  $\alpha_1$ -adrenergic receptor regulation: basic science and clinical implications. *Pharmacol Ther* 88: 288-309

- Milano CA, Dolber PC, Rockman HA, Bond RA, Venable ME, Allen LF, Leftkowitz RJ (1994) Myocardial expression of a constitutively active  $\alpha_{1B}$ -adrenergic receptor in transgenic mice induces cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 10109-10113
- Minamino T, Yujiri T, Terada N, Taffet GE, Michael LH, Johnson GL, Schneider MD (2002) MEKK1 is essential for cardiac hypertrophy and dysfunction induced by  $G_q$ . *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 3866-3871
- Minneman KP, Theroux TL, Hollinger S, Han C, Esbenshade TA (1994) Selectivity of agonists for cloned  $\alpha_1$ -adrenergic receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 49: 929-936
- Mittereder N, March KL, Trapnell BC (1996) Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J Virol* 70: 7498-7509
- Mittmann C, Chung CH, 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
- Modesti PA, Vanni S, Paniccchia R, Bandinelli B, Bertolozzi I, Polidori G, Sani G, Neri Serneri GG (1999) Characterization of endothelin-1 receptor subtypes in isolated human cardiomyocytes. *J Cardiovasc Pharmacol*. 34: 333-339
- Moravec CS, Reynolds EE, Stewart RW, Bond M (1989) Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 159 :14-18
- Morinaga N, Moss J, Vaughan M (1997) Cloning and expression of a cDNA encoding a bovine brain brefeldin A-sensitive guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 12926-12931
- Neer EJ (1995) Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell* 80: 249-257
- Nishizuka Y (1995) Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J* 9: 484-496
- Nystedt S, Emilsson K, Wahlestedt C, Sundelin J (1994) Molecular cloning of a potential proteinase activated receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9208-9212
- Offermanns S, Laugwitz K-L, Spicher K, Schultz G (1994a) G proteins of the  $G_{i2}$  family are activated via thromboxane  $A_2$  and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 504-508
- Offermanns S, Wieland T, Homann D, Sandmann J, Bombien E, Spicher K, Schultz G, Jakobs KH (1994b) Transfected muscarinic acetylcholin receptors selectively couple to  $G_i$ -type G proteins and  $G_{q/11}$ . *Mol Pharmacol* 45: 890-898
- Offermanns S, Simon MI (1996) Organization of transmembrane signalling by heterotrimeric G proteins. *Cancer Surv* 27: 177-198
- Offermanns S (1999) New insights into the in vivo function of heterotrimeric G-proteins through gene deletion studies. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360: 5-13
- Park D, Jhon DY, Kriz R, Knopf J, Rhee SG (1992) Cloning, sequencing, expression, and  $G_q$ -independent activation of phospholipase C-beta 2. *J Biol Chem* 267: 16048-16055
- Park JB, Kim JH, Kim Y, Ha SH, Kim JH, Yoo J-S, Du G, Frohman MA, Suh PG, Ryu SH (2000) Cardiac phospholipase  $D_2$  localizes to sarcolemmal membranes and is inhibited by  $\alpha$ -actinin in an ADP-ribosylation factor-reversible manner. *J Biol Chem* 275: 21295-21301

- Pieske B, Beyermann B, Breu V, Löffler BM, Schlotthauer K, Maier LS, Schmidt-Schweda S, Just H, Hasenfuss G (1999) Functional effects of endothelin and regulation of endothelin receptors in isolated human nonfailing and failing myocardium. *Circulation* 99: 1802-1809
- Plonk SG, Park S-K, Exton JH (1998) The  $\alpha$ -subunit of the heterotrimeric G protein  $G_{13}$  activates a phospholipase D isozyme by a pathway requiring Rho family GTPases. *J Biol Chem* 273: 4823-4826
- Pönicke K, Vogelsang M, Heinroth M, Becker K, Zolk O, Böhm M, Zerkowski HR, Brodde O-E (1998) Endothelin receptors in the failing and nonfailing human heart. *Circulation* 97: 744-751
- Pönicke K, Heinroth-Hoffmann I, Becker K, Osten B, Brodde O-E (1999)  $G_{q/11}$ -coupled receptors and protein synthesis in rat cardiomyocytes: role of G $\beta$ -Proteins and protein kinase C-isozymes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 360: 301-308
- Popov S, Yu K, Kozasa T, Wilkie TM (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
- Prasad MV, Dermott JM, Heasley LE, Johnson GL, Dhanasekaran N (1995) Activation of Jun kinase/stress-activated protein kinase by GTPase-deficient mutants of G alpha 12 and G alpha 13. *J Biol Chem* 270: 18655-18659
- Ramirez MT, Sah VP, Zhao XL, Hunter JJ, Chien KR, Brown JH (1997) The MEKK-JNK pathway is stimulated by alpha1-adrenergic receptor and ras activation and is associated with *in vitro* and *in vivo* cardiac hypertrophy. *J Biol Chem* 272: 14057-14061
- Rhee SG, Bae YS (1997) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C isozymes. *J Biol Chem* 272: 15045-15048
- Rhee SG (2001) Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 70: 281-312
- Robinson MJ, Cobb MH (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9: 180-186
- Rohde S, Sabri A, Kamasamudran R, Steinberg SF (2000) The  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype- and protein kinase C isoform-dependence of norepinephrine's actions in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 32: 1193-1209
- Rümenapp U, Schmidt M, Wahn F, Tapp E, Granass A, Jakobs KH (1997) Characteristics of protein-kinase-C- and ADP-ribosylation-factor-stimulated phospholipase D activities in human embryonic kidney cells. *Eur J Biochem* 248: 407-414
- Rümenapp U, Blomquist A, Schwörer G, Schablowski H, Psoma A, Jakobs KH (1999) Rho-specific binding and guanine nucleotide exchange catalysis by KIAA0380, a Dbl family member. *FEBS Lett* 459: 313-318
- Rümenapp U, Asmus M, Schablowski H, Wozniki M, Han L, Jakobs KH, Fahimi Vahid M, Michalek C, Wieland T, Schmidt M (2001) The  $M_3$  muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via  $G_{12}$  but not  $G_q$ -type G proteins. Regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 276: 2474-2479
- Sabri A, Muske G, Zhang HL, Pak E, Darrow A, Andrade-Gordon P, Steinberg SF (2000) Signaling properties and functions of two distinct cardiomyocyte protease-activated receptors. *Circ Res* 86: 1054-1061

- Sadoshima J-I, Izumo S (1993) Molecular characterization of angiotensin II-induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT<sub>1</sub> receptor subtype. *Circ Res* 73: 413-423
- Sandmann J, Peralta EG, Wurtman RJ (1991) Coupling of transfected muscarinic acetylcholine receptor subtypes to phospholipase D. *J Biol Chem* 266: 6031-6034
- Schaub MC, Hefti MA, Harder BA, Eppenberger HM (1997) Various hypertrophic stimuli induce distinct phenotypes in cardiomyocytes. *J Mol Med* 75: 901-920
- Schmidt M, Hüwe SM, Fasselt B, Homann D, Rümenapp U, Sandmann J, Jakobs KH (1994) Mechanisms of phospholipase D stimulation by m3 muscarinic acetylcholine receptors. Evidence for involvement of tyrosine phosphorylation. *Eur J Biochem* 225: 667-675
- Seeger R, Krebs EG (1995) The MAPK signaling cascade. *FASEB J* 9: 726-735
- Shi CS, Kehrl JH (2001) PYK2 links G(q)alpha and G(13)alpha signaling to NF-kappa B activation. *J Biol Chem* 276: 31845-31850
- Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR (1990) Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. *J Biol Chem* 265: 13809-13817
- Shubeita HE, Martinson EA, Bilsen MV, Chien KR, Brown JH (1992) Transcriptional activation of the cardiac myosin light chain 2 and atrial natriuretic factor genes by protein kinase C in neonatal rat ventricular myocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 1305-1309
- Shuman MA (1986) Thrombin-cellular interactions. *Ann N Y Acad Sci* 485: 228-239
- Simon MI, Strathmann MP, Gautam N (1991) Diversity of G proteins in signal transduction. *Science* 252: 802-808
- Simpson PC (1983) Norepinephrin-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha1 adrenergic response. *J Clin Invest* 72: 732-738
- Simpson PC (1990) Regulation of hypertrophy and gene transcription in cultured heart muscle cells. *Molecular Biology of the Cardiovascular System*: 125-130
- Singer WD, Miller RT, Sternweis PC (1994) Purification and characterization of the alpha subunit of G13. *J Biol Chem* 269: 19796-19802
- Singer WD, Brown HA, Sternweis PC (1997) Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu Rev Biochem* 66: 475-509
- Singer AU, Waldo GL, Harden TK, Sondek J (2002) A unique fold of phospholipase C-beta mediates dimerization and interaction with G alpha q. *Nat Struct Biol* 9: 32-36
- Spicher K, Kalkbrenner F, Zobel A, Harhammer R, Nurnberg B, Soling A, Schultz G (1994) G12 and G13 alpha-subunits are immunochemically detectable in most membranes of various mammalian cells and tissues. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 906-14
- Srinivasa SP, Watson N, Overton MC, Blumer KJ (1998) Mechanism of RGS4, a GTPase-activating protein for G protein  $\alpha$  subunits. *J Biol Chem* 273: 1529-1533
- Steinberg SF, Robinson RB, Lieberman HB, Stern DM, Rosen MR (1991) Thrombin modulates phosphoinositide metabolism, cytosolic calcium, and impulse initiation in the heart. *Circ Res* 68: 1216-1229
- Sternweis PC, Smrcka AV (1992) Regulation of phospholipase C by G proteins. *Trends Biochem Sci* 17: 502-506

- Strathmann MP, Simon MI (1991) G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5582-5586
- Sugden PH, Fuller SJ, Mynett JR, Hatchett RJ IV, Bogoyevitch MA, Sugden MC (1993) Stimulation of adult rat ventricular myocytes protein synthesis and phosphoinositide hydrolysis by the endothelins. *Biochem Biophys Acta* 1175: 327-332
- Sugden PH (2002) Signaling pathways activated by vasoactive peptides in the cardiac myocytes and their role in myocardial pathologies. *J Card Fail* 8: 359-369
- Taguchi K, Yang M, Goepel M, Michel MC (1998) Comparison of human  $\alpha_1$ -adrenoceptor subtype coupling to protein kinase C activation and related signalling pathways. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 357: 100-110
- Takasuka T, Adachi M, Miyamoto C, Furuichi Y, Watanabe T (1992) Characterization of endothelin receptors ETA and ETB expressed in COS cells. *J Biochem* 112: 396-400
- Takeishi Y, Ping P, Bolli R, Kirkpatrick DL, Hoit BD, Walsh RA (2000) Transgenic overexpression of constitutively active protein kinase C  $\epsilon$  causes concentric cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 86: 1218-1223.
- Takigawa M, Sakurai T, Kasuya Y, Abe A, Masaki T, Goto K (1995) Molecular identification of guanine-nucleotide-binding regulatory proteins which couple to endothelin receptors. *Eur J Biochem* 228: 102-108
- Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH (1991) Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G protein. *Nature.* 350: 516-518.
- Tesmer JGG, Berman DM, Gilman AG, Sprang SR (1997) Structure of RGS4 bound to  $\text{AlF}_4^-$ -activated  $G_{\alpha 1}$ : Stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. *Cell* 89: 251-261
- Vu TK, Hung DT, Wheaton VI, Coughlin SR (1991) Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* 1991 64: 1057-1068
- Whitehead IP, Khosravi-Far R, Kirk H, Trigo-Gonzalez G, Der CJ, Kay R (1996) Expression cloning of Isc, a novel oncogene with structural similarities to the Dbl family of guanine nucleotide exchange factors. *J Biol Chem* 271: 18643-18650
- Wieland T, Schulze R, Jakobs KH (1996) Heterotrimeric guanine nucleotide binding proteins: structure and function. In: Wirtz, K.W.A. (ed) *Molecular mechanisms of signalling and targeting*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 1-24
- Wieland T, Chen CK (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
- Wilson BA, Zhu X, Ho M, Lu L (1997) *Pasteurella multocida* toxin activates the inositol triphosphate signaling pathway in *Xenopus* oocytes via G(q)alpha-coupled phospholipase C-beta1. *J Biol Chem* 272: 1268-1275

- Xu WF, Andersen H, Whitmore TE, Presnell SR, Yee DP, Ching A, Gilbert T, Davie EW, Foster DC (1998) Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 6642-6646
- Xu X, Zeng W, Popov S, Berman DM, Davignon I, Yu K, Yowe D, Offermanns S, Muallem S, Wilkie TM (1999) RGS proteins determine signaling specificity of G<sub>q</sub>-coupled receptors. *J Biol Chem* 274: 3549-3556
- Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiroi Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y (1996) Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem* 271: 3221-3228
- Yan Y, Chi PP, Bourne HR (1997) RGS4 inhibits G<sub>q</sub>-mediated activation of mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide synthesis. *J Biol Chem* 272: 11924-11927
- Ye H, Wolf RA, Kurz T, Corr PB (1994) Phosphatidic acid increases in response to noradrenaline and endothelin-1 in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 28: 1828-1834
- Zechner D, Thuerauf DJ, Hanford DS, McDonough PM, Glembotski CC (1997) A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol* 139: 115-127
- Zheng Y (2001) Dbl family guanine nucleotide exchange factors. *Trends Biochim Sci* 26: 724-732
- 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
- Zywietz A, Gohla A, Schmelz M, Schultz G, Offermanns S (2001) Pleiotropic effects of *Pasteurella multocida* toxin are mediated by G<sub>q</sub>-dependent and -independent mechanisms. involvement of G<sub>q</sub> but not G<sub>11</sub>. *J Biol Chem* 276: 3840-3845

## 8 Anhang

### Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AC	Adenylyl-Cyclase
Ad5	Adenovirus Serotyp 5
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat (Ammoniumperoxodisulfat)
Aqua bidest	Aqua bidestillatum
AR	Adrenozeptor
ARF	ADP-Ribosylierungsfaktor
ARF-GEF	ADP-Ribosylierungsfaktor-Guaninnukleotid-Austauschfaktor
ATP	Adenosin-5`-Triphosphat
bav	biologisch aktive Viren
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaare
BQ 123	Cyclo-(D-Asp-Pro-D-Val-Leu-D-Try)
BrdU	5-Bromo-2`-desoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cAMP	zyklisches Adenosin-3´,5´-Monophosphat
CBFHH	Calcium und Bicarbonat-freier Hanks-Puffer mit HEPES
cdNA	<i>englisch</i> : complementary DNA (Bezeichnung für die einzel- bzw. doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls)
cGMP	zyklisches Guanosin-3´,5´-Monophosphat
CHCl <sub>3</sub>	Chloroform
Ci	Curie
CMV	Cytomegalievirus
cpm	<i>englisch</i> : counts per minute (radioaktive Zählimpulse pro Minute)
C-Terminus	Carboxy-Terminus
d	Tag
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DC	Dünnschichtchromatographie
DH	DbI-Homologie-Domäne
DMEM	<i>englisch</i> : Dulbeccos Modified Essential Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EC <sub>50</sub>	Konzentration des halbmaximalen Effektes
ECL	<i>englisch</i> : Enhanced Chemiluminescence
E. coli	Escherichia coli-Grimmdarmstäbchen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>englisch</i> : Epidermal Growth Factor
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
ET-1	Endothelin-1

## Abkürzungsverzeichnis

---

EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	<i>englisch</i> : Fetal Calf Serum (fetales Kälberserum)
g	Gramm
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/sek <sup>2</sup> )
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guaninnukleotiddiphosphat (Guanosin-5'-Diphosphat)
GEF	Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
Glu	L-Glutamin
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GTP	Guaninnukleotidtriphosphat (Guanosin-5'-Triphosphat)
h	Stunde
HBSS	<i>englisch</i> : Hanks Balanced Salt Solution
HEK 293	<i>englisch</i> : Human Embryonic Kidney cells (menschliche embryonale Nierenzellen)
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl) piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
His	Histidin
HRP	Meerrettich-Peroxidase
i.a.	inaktiviert
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Triphosphat
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactosid
Jun-Kinase	c-Jun N-terminale Kinase (JNK)
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
Ktr	Kontrolle
LB-Medium	Luria Bertoni Medium
LMW	<i>englisch</i> : Low Molecular Weight
M	Mol/Liter
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
max.	maximal
MCS	<i>englisch</i> : Multi Cloning Site (multiple Klonierungsstelle)
MEM	<i>englisch</i> : Minimum Essential Medium
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimol/Liter
MOI	<i>englisch</i> : Multiplicity of Infection (Infektionsmultiplizität)
MW	Molekulargewicht
μCi	Mikrocurie
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
n	Anzahl der Versuche
NA	Noradrenalin
Nad	Nadolol
ng	Nanogramm

OD	optische Dichte
p	<i>englisch</i> : probability (Wahrscheinlichkeit)
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAR	<i>englisch</i> : Protease Activated Receptor
PBS	<i>englisch</i> : Phosphate Buffered Saline (Phosphat gepufferte Salzlösung)
PCR	<i>englisch</i> : Polymerase Chain Reaction (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phenylephrin
pfu	<i>englisch</i> : plaque forming units
pH	negativer, dekadischer Logarithmus der H <sup>+</sup> -Ionenkonzentration
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PLD	Phospholipase D
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMT	Pasteurella multocida Toxin
P/S	Penicillin/Streptomycin
PTX	Pertussis-Toxin
PYK2	Prolinreiche Tyrosin-Kinase 2
R	Rezeptor
rek.	rekombinant
RGS	<i>englisch</i> : Regulators of G protein Signalling
RhoGEF	<i>englisch</i> : Rho Guanine nucleotide Exchange Factor
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAP	<i>englisch</i> : Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
TBS	<i>englisch</i> : Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
Thr	Thrombin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
TTBS	<i>englisch</i> : Tween Tris Buffered Saline
Tween	Polyoxyethylen (20)-sorbitanmonolaurat
U	Unit (Enzymeinheit)
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
Vol.	Volumen
vs.	versus
VSB	<i>englisch</i> : Virus Stocking Buffer
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

## R- und S-Sätze

### Hinweise auf die besonderen Gefahren (R-Sätze)

R 1	In trockenem Zustand explosionsgefährlich
R 2	Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen explosionsgefährlich
R 3	Durch Schlag, Reibung, Feuer oder andere Zündquellen besonders explosionsgefährlich
R 4	Bildet hochempfindliche explosionsgefährliche Metallverbindungen
R 5	Beim Erwärmen explosionsfähig
R 6	Mit und ohne Luft explosionsfähig
R 7	Kann Brand verursachen
R 8	Feuergefahr bei Berührung mit brennbaren Stoffen
R 9	Explosionsgefahr bei Mischung mit brennbaren Stoffen
R 10	Entzündlich
R 11	Leichtentzündlich
R 12	Hochentzündlich
R 13	Hochentzündliches Flüssiggas
R 14	Reagiert heftig mit Wasser
R 15	Reagiert mit Wasser unter Bildung leichtentzündlicher Gase
R 16	Explosionsgefährlich in Mischung mit brandfördernden Stoffen
R 17	Selbstentzündlich an der Luft
R 18	Bei Gebrauch Bildung explosionsfähiger / leichtentzündlicher Dampf-Luftgemische möglich
R 19	Kann explosionsfähige Peroxide bilden
R 20	Gesundheitsschädlich beim Einatmen
R 21	Gesundheitsschädlich bei Berührung mit der Haut
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 23	Giftig beim Einatmen
R 24	Giftig bei Berührung mit der Haut
R 25	Giftig beim Verschlucken
R 26	Sehr giftig beim Einatmen
R 27	Sehr giftig bei Berührung mit der Haut
R 28	Sehr giftig beim Verschlucken
R 29	Entwickelt bei Berührung mit Wasser giftige Gase
R 30	Kann bei Gebrauch leicht entzündlich werden
R 31	Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase
R 32	Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase
R 33	Gefahr kumulativer Wirkungen
R 34	Verursacht Verätzungen
R 35	Verursacht schwere Verätzungen
R 36	Reizt die Augen
R 37	Reizt die Atmungsorgane
R 38	Reizt die Haut
R 39	Ernste Gefahr irreversiblen Schadens
R 40	Irreversibler Schaden möglich
R 41	Gefahr ernster Augenschäden
R 42	Sensibilisierung durch Einatmen möglich
R 43	Sensibilisierung durch Hautkontakt möglich

R 44	Explosionsgefahr bei Erhitzen unter Einschluß
R 45	Kann Krebs erzeugen
R 46	Kann vererbare Schäden verursachen
R 47	Kann Missbildungen verursachen
R 48	Gefahr ernster Gesundheitsschäden bei längerer Exposition

### **Sicherheitsratschläge (S-Sätze)**

S 1	Unter Verschluss aufbewahren
S 2	Darf nicht in die Hände von Kindern gelangen
S 3	Kühl aufbewahren
S 4	Von Wohnplätzen fernhalten
S 5	Unter ... aufbewahren (geeignete Flüssigkeit vom Hersteller anzugeben)
S 6	Unter ... aufbewahren (inertes Gas vom Hersteller anzugeben)
S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 8	Behälter trocken halten
S 9	Behälter an einem gut gelüfteten Ort aufbewahren
S 12	Behälter nicht gasdicht verschließen
S 13	Von Nahrungsmitteln, Getränken und Futtermitteln fernhalten
S 14	Von ... fernhalten (inkompatible Substanzen vom Hersteller anzugeben)
S 15	Vor Hitze schützen
S 16	Von Zündquellen fernhalten – nicht rauchen
S 17	Von brennbaren Stoffen fernhalten
S 18	Behälter mit Vorsicht öffnen und handhaben
S 20	Bei der Arbeit nicht essen und trinken
S 21	Bei der Arbeit nicht rauchen
S 22	Staub nicht einatmen
S 23	Gas/Rauch/Dampf/Aerosol nicht einatmen (geeignete Bezeichnung(en) vom Hersteller anzugeben)
S 24	Berührung mit der Haut vermeiden
S 25	Berührung mit den Augen vermeiden
S 26	Bei Berührung mit den Augen gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 27	Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen
S 28	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ... (vom Hersteller anzugeben)
S 29	Nicht in die Kanalisation gelangen lassen
S 30	Niemals Wasser hinzugießen
S 33	Maßnahmen gegen elektrostatische Aufladungen treffen
S 34	Schlag und Reibung vermeiden
R 35	Abfälle und Behälter müssen in gesicherter Weise beseitigt werden
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen
S 37	Geeignete Schutzhandschuhe tragen
S 38	Bei unzureichender Belüftung Atemschutzgerät anlegen
S 39	Schutzbrille / Gesichtsschutz tragen
S 40	Fußboden und verunreinigte Gegenstände mit ... reinigen (vom Hersteller anzugeben)

- S 41 Explosions- und Brandgase nicht einatmen
- S 42 Beim Räuchern/Versprühen geeignetes Atemschutzgerät anlegen  
(geeignete Bezeichnung(en) vom Hersteller anzugeben)
- S 43 Zum Löschen ... (vom Hersteller anzugeben) verwenden  
(wenn Wasser die Gefahr erhöht, anfügen: Kein Wasser verwenden)
- S 44 Bei Unwohlsein ärztlichen Rat einholen  
(wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt zuziehen  
(wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
- S 46 Bei Verschlucken sofort ärztlichen Rat einholen und Verpackung oder  
Etikett vorzeigen
- S 47 Nicht bei Temperaturen über ... °C aufbewahren  
(vom Hersteller anzugeben)
- S 48 Feucht halten mit ... (geeignetes Mittel vom Hersteller anzugeben)
- S 49 Nur im Originalbehälter aufbewahren
- S 50 Nicht mischen mit ... (vom Hersteller anzugeben)
- S 51 Nur in gut gelüfteten Bereichen verwenden
- S 52 Nicht großflächig für Wohn- und Aufenthaltsräume zu verwenden
- S 53 Exposition bemerken. – Vor Gebrauch besondere Anweisung  
einholen

## Lebenslauf

### Zur Person

Geburt 18.08.1970 in Teheran als Tochter von Malihe Salehi, geb. Salehi, und Rassol Fahimi-Vahid  
Familienstand verheiratet seit dem 03.01.2001 mit Farzad Khalkhali

### Schulbildung

1976 – 1981 Grundschule in Teheran  
1981 – 1984 Gymnasium in Teheran  
  
Oktober 1984 Einreise nach Deutschland  
  
1985 – 1986 Gymnasium Klosterschule  
1986 – 1990 Gymnasium Eppendorf (Abitur)

### Studium

1992 – 1993 Studium der Pharmazie an der Freien Universität Berlin  
Oktober 1993 Wechsel an die Universität Hamburg  
1993/94 – 1996/97 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg  
1997 – 1998 Pharmazeutisches Praktikum, Forum Apotheke, Hamburg  
Juni 1998 Approbation als *Apothekerin*  
  
August 1998 Beginn der Promotion in der Abteilung für Pharmakologie, am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf, unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland und der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Detlef Geffken zum Thema:  
„Untersuchungen zur Beteiligung von  $G\alpha_{12}$  /  $G\alpha_{13}$ -Proteinen an der Aktivierung der Phospholipase D in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten“  
  
1999 – 2001 Aufbaustudium Molekularbiologie an der Universität Hamburg (Zentrum für Molekulare Neurobiologie Hamburg)

---

1998 – 2001 Beschäftigung als wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie  
  
März 2000 Vorstellung der Ergebnisse dieser Dissertation auf der 41. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für Pharmakologie und Toxikologie in Mainz  
  
April 2001 Vorstellung der Ergebnisse dieser Dissertation auf der 67. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie-Herz- und Kreislaufforschung in Mannheim

## Verzeichnis der wissenschaftlichen Arbeiten

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits wie folgt publiziert:

### I. Originalarbeiten

**Fahimi-Vahid M**, Gosau N, Michalek C, Han L, Jakobs KH, Schmidt M, Roberts N, Avkiran M, Wieland T (2002) Distinct signaling pathways mediate cardiomyocyte phospholipase D stimulation by endothelin-1 and thrombin. *J Mol Cell Cardiol* 34: 441-453

Gosau N, **Fahimi-Vahid M**, Michalek C, Schmidt M, Wieland T (2002) Signalling components involved in the coupling of  $\alpha_1$ -adrenoceptors to phospholipase D in neonatal rat cardiac myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365: 468-476

Rümenapp U, Asmus M, Schablowski H, Woznicki M, Han L, Jakobs KH, **Fahimi-Vahid M**, Michalek C, Wieland T, Schmidt M (2001) The  $M_3$  muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via  $G_{12}$  but not  $G_q$ -type G proteins. Regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling. *J Biol Chem* 276: 2474-2479

### II. Vorträge und Poster mit publiziertem Abstrakt

**Fahimi-Vahid M**, Michalek C, Mittmann C, Weil J, Höppner G, Schmidt M, Wieland T (2000) Adenoviral overexpression of RGS proteins to analyze pertussis toxin-insensitive pathways of G protein coupled receptors. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 361 Suppl: R 56

Michalek C, **Fahimi-Vahid M**, Mittmann C, Weil J, Höppner G, Schmidt M, Wieland T (2000) Adenoviral overexpression of RGS proteins to analyze pertussis toxin-insensitive pathways of G protein coupled receptors. *Circulation* 102 Suppl 2: II-207

Gosau N, **Fahimi-Vahid M**, Michalek C, Mittmann C, Höppner G, Schmidt M, Wieland T (2001) Differential coupling of  $\alpha$ -thrombin and endothelin-1 receptors to phospholipase D in neonatal rat cardiac myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 Suppl: R 57

**Fahimi-Vahid M**, Gosau N, Mittmann C, Höppner G, Wieland T (2001) Stimulation of phospholipase D activity by  $\alpha$ -thrombin receptors is mediated by  $G_{\alpha_{12/13}}$  proteins in neonatal rat cardiomyocytes. *Z Kardiol* 90 Suppl 2: II-164

Kasperkiewicz M, **Fahimi-Vahid M**, Wieland T (2003) Phospholipase D mediates activation of Erk1/2 by thrombin in neonatal rat cardiac myocytes. *Z Kardiol* 92 Suppl 1: I-110

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die der Universität Hamburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel:

### **Untersuchungen zur Beteiligung von Ga<sub>12</sub> / Ga<sub>13</sub>-Proteinen an der Aktivierung der Phospholipase D in Kardiomyozyten der neonatalen Ratten**

in der Abteilung für Pharmakologie, im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf unter der Leitung von Herrn Professor Dr. Thomas Wieland ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

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

Hamburg

Mercedeh Fahimi-Vahid

### Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 1998 bis Juli 2001 im Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie, Abteilung für Pharmakologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland durchgeführt.

Bei Herrn Prof. Dr. Hasso Scholz möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit anfertigen zu dürfen, sowie für die Förderung meiner Arbeit und meiner Weiterbildung, herzlich danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Thomas Wieland für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und den Einblick in die molekularbiologische Forschung, für seine Förderung meiner Arbeit durch hilfreiche fachliche Diskussionen und wissenschaftliche Ratschläge, für seine engagierte und freundschaftliche Betreuung und Motivation während der Erstellung dieser Arbeit, für seine stete Bereitschaft zu helfen und die kritische Korrektur dieser Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Detlef Geffken möchte ich mich sehr herzlich für die Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich Chemie und für seine Unterstützung bedanken.

Bei Frau PD Dr. Martina Schmidt vom Universitätsklinikum Essen möchte ich mich für die Einführung in die Methoden der PLC- und PLD-Messungen bedanken.

Bei den Mitgliedern unseres Arbeitskreises Frau Grit Höppner und Frau Cornelia Woermann möchte ich mich herzlich für die wissenschaftliche und freundschaftliche Unterstützung bedanken. Des Weiteren möchte ich allen nicht namentlich aufgeführten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Pharmakologie für die gute Zusammenarbeit danken.

Frau Elfi Dilmaghani, Frau Irene Rupprecht und Frau Cornelia Woermann danke ich für die aufmerksame Durchsicht der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mir immer in allen Lebensphasen zur Seite standen. Bei Ihnen, bei meinen Großeltern, meiner Schwester und meinem Mann Farzad bedanke ich mich ganz herzlich für die uneingeschränkte Hilfe und Zuwendung während „der ganzen Zeit“ und für ihre Geduld und ihr Verständnis.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) gilt mein Dank für die finanzielle Unterstützung der Arbeit.