6 Zusammenfassung

Die Aktivierung der Phospholipase D ist ein möglicher Signalweg, über den Endothelin-1-Rezeptoren (ET_A-R) und α_1-Adrenozeptoren (α_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 α_{1A}-AR in neonatalen Rattenkardiomyozyten stimulierten gleichzeitig die Phospholipase C (PLC) und die Phospholipase D (PLD). Im Gegensatz zu ET_A-R und α_{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 α_{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 α_{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 α_{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 δ und ε, 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_A-R) and α_1-adrenoceptors (α_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_A-R and α_{1A}-AR in neonatal rat cardiomyocytes increased the phospholipase D (PLD) activity concomitant with the stimulation of phospholipase C (PLC). In contrast to ET_A-R and α_{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_A-R and α_{1A}-AR occurred. For the PTX-insensitive $G\alpha_q$- and $G\alpha_{12}$-families however, such specifc 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_A-R and α_{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_A-R and α_{1A}-AR. Activation of $G\alpha_q$-type G proteins stimulates PLC and induces activation of protein kinase C δ and ε, 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_A-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.