Aus der Abteilung für Kardiologie und Angiologie des
Universitären Herzzentrums Hamburg

Direktor: Prof. Dr. Thomas Meinertz

Induktionsverhalten der Proteinexpression von RGS16 unter Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) und proinflammatorischen Zytokinen

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Bryan Robert Thoma

aus Los Angeles, USA

Hamburg 2008

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 04.03.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende Prof. Dr. T. Meinertz

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. R. Böger

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. S. Baldus

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
A	Ampère
ANOVA	Univariate Varianzanalyse (analysis of variance)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
BrdU	5-Bromo-2'-Desoxyuridin
CBFHH	Calcium- und Bicarbonat freies Hanks mit HEPES
cm	Zentimeter
cm^2	Quadratzentimeter
CM-MEM	Kardiomyozyten Minimal Essential Medium
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNase	Desoxyribonuclease
dP/dt	Mass für die Kontraktilität des linken Herzventrikels
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
G-Protein	Guanin-Nukleotid-bindendes Protein

GTP	Guanosin-5‘-triphosphat
Gαi	α-Untereinheit des inhibitorischen G-Proteins
Gαq	α-Untereinheit des G-Proteins
Gαs	α-Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins
h	Stunde
HCl	Wasserstoffchlorid, Salzsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N’-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
IFN-γ	Interferon-γ
IL-1β	Interleukin-1β
IL-6	Interleukin-6
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
$KHCO_3$	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
LMW	Proteinmolekulargewichtsmarker
LPS	Lipopolysaccharid, Endotoxin
LPS/Fib	Medium von LPS stimulierten Fibroblasten
M	Molarität (mol/l)
mA	Milliampère
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4(H_2O)_7$	Magnesiumsulfat-Hexahydrat

min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	mmol/l
mol	SI-Basiseinheit der Stoffmenge
MOPS	Morpholinpropansulfat
MQ-Wasser	Millipore-Wasser
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
Na_2HPO_4	Natriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaH_2PO_4	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NCM-MEM	Nicht-Kardiomyozyten Minimal Essential Medium
ng	Nanogramm
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
P/S	Penicillin/Streptomycin
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pH	Negativ dekadischer Logarithmus der H^+-Ionenkonzentration
Pi/mol	Mass für die intrinsische Aktivität
p-Wert	Überschreitungswahrscheinlichkeit
RGS	Regulator of G-Protein Signalling
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde

SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Std	Stunde
TBS	Tris-Kochsalzpuffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TNFα	Tumornekrosefaktor α
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
T-TBS	Tris-Kochsalzpuffer unter Zusatz von Tween®-20
Tween®	Polysorbat
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
x g	Schleuderziffer

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	G-Protein vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion	9
1.2	RGS-Proteine	11
1.3	Aufgabenstellung	13
2	Material und Methoden	15
2.1	Isolation, Kultivierung und Stimulation von Zellen neonataler Rattenherzen	15
2.1.1	Tiere zur Organentnahme	15
2.1.2	Isolation der Kardiomyozyten	15
2.1.3	Kultivierung von Kardiomyozyten	18
2.1.4	Kultivierung von Nicht-Kardiomyozyten	19
2.1.5	Stimulation von Kardiomyozyten	20
2.1.6	Stimulation von Nicht-Kardiomyozyten	20
2.1.7	Kollektion der Kardiomyozyten	21
2.1.8	Membranpräparation	21
2.1.9	Photometrische Konzentrationsbestimmung	21
2.1.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	22
2.1.11	Westernblot	23
2.1.12	Immunoblot	24
2.2	Versuchsablauf am Ganzherzmodel adulter Ratten	25
2.2.1	Verwendete Versuchstiere	25
2.2.2	*In vivo* Behandlung mit LPS	25
2.2.3	Entnahme der Herzen	26
2.2.4	Membranpräparation	26

2.2.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung	26
2.2.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.2.7	Westernblot Analyse	27
2.2.8	Immunoblot	27
2.3	Auswertung	28
2.3.1	Statistik	28
2.4	Lösungen	29
2.5	Substanzen und Verbrauchsmittel	33
2.6	Laborgeräte	36
3	Ergebnisse	38
3.1	Transiente Induktion von RGS16 unter Stimulation mit LPS in neonatalen Kardiomyozytenkulturen	38
3.2	Rekombinantes IL-1β und TNFα induzieren die RGS16-Proteinexpression neonataler Kardiomyozytenkulturen	39
3.3	Induktion von RGS16 nach 24 h und 72 h unter Stimulation mit LPS behandeltem Medium von kultivierten, kardialen Nicht-Kardiomyozyten	43
3.4	Einfluss von LPS nach *in vivo* Applikation auf die Proteinexpression von $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ im adulten Rattenherzen	44
4	Diskussion	48
5	Zusammenfassung	54
6	Literaturverzeichnis	55

1 Einleitung

Die Freisetzung bakteriellen Endotoxins (LPS) spielt eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der akut entzündlichen Herzinsuffizienz bei Patienten mit gramnegativer, bakterieller Sepsis (Müller-Werdan et al. 1998). Ebenso konnte eine Beteiligung von LPS bei der Entwicklung des chronischen Herzversagens nachgewiesen werden. Hierbei kommt der Translokation intestinaler Bakterien und einer damit einhergehenden LPS-Freisetzung eine entscheidende pathophysiologische Rolle zu (Anker et al. 1997, Niebauer et al. 1999). Bei septischen Patienten wird durch Freisetzung von LPS eine schwere Hypotension sowie eine kardiogene Schocksymptomatik induziert, welche mit einem myokardialen Pumpversagen einhergeht (Parker et al. 1985). Dies ist gekennzeichnet durch einen erhöhten enddiastolischen Druck und einen Abfall der dP/dt als Mass für die Myokardkontraktilität (Adams et al. 1984, Archer et al. 1982, Hess et al. 1981, Hung et al. 1993, Rubin et al. 1994, Shepherd et al. 1986, Tao et al. 1994). Diese Effekte werden vermutlich durch verschiedene proinflammatorische Zytokine, wie z.B. IL-1β, IL-6, TNFα und IFNγ vermittelt, welche durch LPS-Stimulation aus Makrophagen und anderen Zellen freigesetzt werden. Diesen Zytokinen werden ebenso wie LPS kardiodepressive Effekte zugeschrieben (Cain et al. 1999, Finkel et al. 1992, Granton et al. 1997, Kumar et al. 1996, Müller-Werdan et al. 1998, Natanson et al. 1989, Sun et al. 1998), wobei bislang unklar ist, ob LPS selbst oder erst über eine Aktivierung dieser Zytokine auf die Herzmuskelzellen wirkt.

1.1 G-Protein vermittelte intrazelluläre Signaltransduktion

Die Störungen in der intrazellulären Signalkaskade während einer Endotoxinämie können vielfältig sein. Viele Hormone, Neurotransmitter und sensorische Stimuli benutzen Oberflächenrezeptoren, die mit heterotrimeren (αβγ) Guanin-Nukleotid-bindenden Proteinen, den sogenannten G-Proteinen, gekoppelt sind und mit diesen interagieren. Bislang sind hunderte solcher Oberflächenrezeptoren identifiziert worden. Diese Rezeptoren sind Proteine, welche aus sieben Membranelementen bestehen. Sie benutzen intrazelluläre Loops und das C-terminale Ende, um mit den G-Proteinen zu interagieren. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren finden sich in grosser Anzahl im gesamten Körper und sind prinzipiell an allen physiologischen Prozessen beteiligt. Die Zellen des kardiovaskulären Systems besitzen mehr als hundert verschiedener solcher Rezeptoren (Tang et al. 2004). Nach Stimulation des Rezeptors durch einen Liganden erfolgt der Austausch von GTP mit GDP an der α-Untereinheit mittels GTP-Hydrolyse durch die α-Untereinheit. Daraufhin dissoziiert die α-Untereinheit, gebunden an GTP, vom heterotrimeren Komplex. Sowohl die GTP-α-Untereinheit sowie das βγ-Dimer agieren als Signalproteine und regulieren die Aktivität weiterer Signaleffektoren wie z.B. „Second Messenger“-produzierende Enzyme und Ionenkanäle (Gilman et al. 1995, Neer et al. 1995). Um die jeweils gewünschte zelluläre Antwort zu erreichen, muss die Stärke und Dauer des intrazellulären Signals streng reguliert werden. Die Signalkaskade wird zum einen durch die Rezeptor-G-Protein-Interaktion gesteuert, wobei aktivierte Rezeptoren entweder durch Phosporylierung und/oder durch die Bindung kompetitiver Proteine, den Arrestinen, abgeschaltet werden. Zum anderen wird die Dauer der G-Protein-Effektor-Interaktion durch die intrinsische GTPase-Aktivität der α-Untereinheit gesteuert. Durch GTP-Hydrolyse wandelt sich die aktive α-GTP-Untereinheit in eine inaktive α-GDP-Untereinheit um, welche sich wieder mit der βγ-Untereinheit zusammenschliesst und sich als ganzer heterotrimerer Komplex an den Rezeptor fügt (Lohse et al. 1993, Lohse et al. 1996, Premont et al. 1995). Die

Stärke und Dauer der G-Protein-vermittelten Signalübertragung wird demnach stark durch die Halbwertszeit der GTP-Gα-Untereinheit bestimmt. Aufgereinigte Gα-Untereinheiten in Lösung sind ineffiziente GTPasen. Die intrinsische Aktivität der GTP-Hydrolyse beträgt zwischen 0,1 und 0,3 Pi/mol Gα/min für die meisten Gα-Untereinheiten (Gilman et al. 1987). In der Abwesenheit eines Rezeptors wird die GTP-Hydrolyse limitiert durch die Rate des GDP-Release von der Gα-Untereinheit nach Hydrolyse. In Anwesenheit eines Rezeptors (GPCR) und eines gekoppelten Liganden ist die Aktivität der GTP-Hydrolyse um ein 10-faches gesteigert (Gilman et al. 1987, Ross et al. 2000). In vielen G-Protein-vermittelten Signalantworten ist im zellulären Kontext *in vivo* die Rate der Inaktivierung jedoch wesentlich höher (100-300-fach) als erwartet. Die G-Protein-vermittelte Signalübertragung in der Retina, im Gehirn und im Herzen ist wesentlich höher als in nicht-elektrisch erregten Geweben (Arshavsky et al. 1998). Diese Beobachtung zeigt, dass es noch andere Faktoren geben muss, welche die Gα-GTP-Hydrolyse beeinflussen und die Signalantwort steuern.

1.2 RGS-Proteine

Ein initialer Nachweis für zelluläre Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signaltransduktion stammen aus Studien an niederen Eukaryonten (Dohlman et al. 1997). Studien mit Hefepilzen identifizierten ein Genprodukt (Sst2p), welches mutiert einen Phänotyp aufwies, der supersensitiv gegen eine G-Protein-vermittelte Pheromon-Antwort war (Chan et al. 1982, Dohlman et al. 1995, Weiner et al. 1993). Ein ähnliches Gen (flbA) wurde als negativer Regulator der G-Protein-vermittelten Signalübertragung in *Aspergillus nidulans* identifiziert (Lee et al. 1994). Analog erbrachten Studien an Säugetieren ebenfalls neue Gene, deren Phänotyp mit der G-

Protein Signalkaskade interagieren. Diese Proteine werden als RGS-Proteine bezeichnet, als „Regulators of G-Protein Signalling“. RGS-Proteine sind multifunktionale Signalproteine, denen eine 120 Aminosäurendomäne gemeinsam ist. Insgesamt wurden bislang über 30 Proteine identifiziert, die diese RGS- bzw. RGS-ähnliche Domäne aufweisen. RGS-Proteine fungieren als GTPase-aktivierende Proteine, indem sie direkt an aktivierte Gα-Untereinheiten binden und die durch Rezeptor-G-Protein-initiierte intrazelluläre Signaltransduktion, vermittelt durch Gα-GTP und Gβγ, modulieren bzw. sistieren (Abbildung 1). Als GAPs erhöhen RGS-Proteine die Rate der Gα-GTP-Hydrolyse bis auf ein 1000-faches und limitieren die Wirkungsspanne der Gα-GTP-Einheit. Andere Studien zeigen, dass RGS-Proteine fest an aktives Gα binden und auf diesem Weg die Effektoraktivierung unabhängig von der GAP-Aktivität blockieren können (Carman et al. 1999). RGS-Proteine sind deshalb potente G-Protein-mediierende Signalinhibitoren. Die meisten RGS-Proteine interagieren mit Gαi- und Gαq-Untereinheiten, jedoch nicht mit Gαs-Untereinheiten (Dohlman et al. 1997, Neer et al. 1997, Wieland et al. 1999).

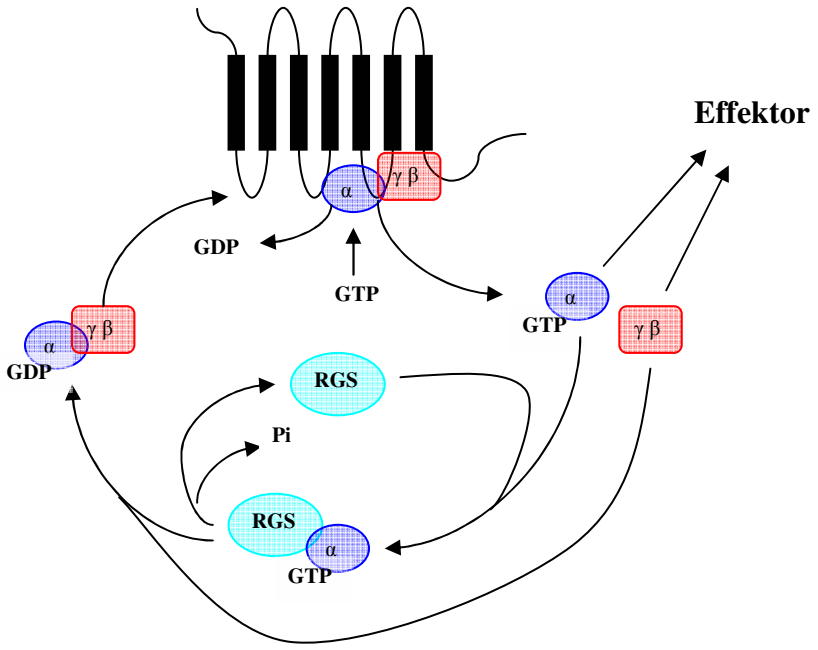


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der G-Protein-/RGS-Protein-vermittelten Signalübertragung.

Im Herzen werden mindestens 10 verschiedene RGS-Proteine exprimiert (Kardestuncer et al. 1998). Darunter wird z.B. RGS16 im Verlauf der Isolierung von Kardiomyozyten aus intaktem Ventrikelmyokard stark induziert. Andere Studien haben gezeigt, dass das verwandte RGS4 bei Patienten mit chronischem Herzversagen, sowohl auf mRNA-Ebene als auch auf Proteinebene hochreguliert wird (Mittmann et al. 1999, Mittmann et al. 2000).

In einem Ganzherzmodell adulter Ratten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass eine *in vivo* Applikation von LPS zu einem transienten Anstieg der mRNA-Expression von RGS16 6 h nach Applikation führt (Patten et al. 2002). Nach 24 h und 72 h war kein signifikanter Anstieg mehr erkennbar. Um zu zeigen, dass diese transiente Veränderung der mRNA-Expression von biologischer Relevanz ist, wurde die RGS16-Proteinexpression gemessen. Das Induktionsmaximum der RGS16-Proteinexpression war nach 24 h zu beobachten und auch noch nach 72 h signifikant induziert. Ähnliche Ergebnisse wurden auch mit RGS4 erzielt. Im Gegensatz dazu konnte keine Veränderung der RGS1- und RGS5-Proteinexpression *in vivo* nachgewiesen werden.

1.3 Aufgabenstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, in einem Kardiomyozytenkulturmodell neonataler Ratten zu zeigen: 1. ob LPS die Proteinexpression von RGS16 in ähnlicher Weise wie am Ganzherzmodell induziert, 2. ob proinflammatorische Zytokine, welche nachweislich durch LPS-Stimulation im Myokard exprimiert werden (Patten et al. 2001), ebenfalls die Proteinexpression von RGS16 induzieren, 3. wo proinflammatorische Zyztokine

am Herzen freigesetzt werden. Ferner wurde an adulten Rattenherzen untersucht, welche G-Protein-Untereinheiten durch LPS induziert werden.

2 Material und Methoden

Die genaue Zusammensetzung der verwendeten Lösungen, die für die Versuche benötigten Substanzen und die benutzten Laborgeräte sind in den Kapiteln 2.4, 2.5 und 2.6 aufgeführt.

2.1 Isolation, Kultivierung und Stimulation von Zellen neonataler Rattenherzen

2.1.1 Tiere zur Organentnahme

Verwendet wurden ausschliesslich Ratten der Gattung Wistar, welche von der Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Hamburg, gezüchtet wurden und beiderlei Geschlechts waren. Das Alter betrug zwischen null (Tag der Geburt) und drei Tagen. Die Muttertiere wurden bei Standard-Ratten-Erhaltungsfutter und Leitungswasser *ad libitum* gehalten.

2.1.2 Isolation der Kardiomyozyten

Die Präparation der Kardiomyozyten erfolgte unter sterilen Bedingungen. Es wurden ausschliesslich autoklavierte Instrumente und autoklavierte bzw. sterilfiltrierte Lösungen benutzt, welche für jedes Experiment neu angesetzt wurden. Die nachfolgende Beschreibung des Trypsinverdaus bezieht sich auf den Verdau von 50-60 Rattenherzen. Um die Zellausbeute zu optimieren, konnten die Volumina der Lösungen bei Abweichung der Anzahl der Rattenherzen entsprechend variiert werden.

Nach erfolgter Dekapitation der neonatalen Ratten wurde der Thorax mit einer feinen Schere eröffnet und das Herz nach Durchschneiden der Gefässe und des anliegenden Gewebes mit einer Pinzette entnommen. Das Herz wurde sofort in eine bereitgestellte 100 mm Petrischale mit 10 ml sterilem PBS gegeben. Nach der Entnahme der Herzen aller Versuchstiere wurden die Vorhöfe und Gefässreste vorsichtig mit einer Schere vom ventrikulären Myokard entfernt und in eine Petrischale mit sterilem CBFHH überführt. Um noch vorhandene Erythrozyten zu entfernen, wurden die Herzen noch zweimal mit CBFHH nachgespült. Anschliessend wurde 1,5 ml CBFHH hinzugegeben und die Herzen mit einer gebogenen Schere fein zerkleinert. Die Gewebesuspension wurde mit einer angefeuchteten Pipette mit weiter Öffnung, einer sogenannten „wide bored“-Pipette, in ein 50 ml Röhrchen überführt. Die verwendete Petrischale wurde zweimal mit 5 ml CBFHH nachgespült, welches ebenfalls dem Röhrchen zugefügt wurde. Nach Absetzen der Gewebesuspension im Röhrchen wurde der Überstand verworfen. Um den Vorverdau einzuleiten, wurde 10 ml Trypsinlösung zur Gewebesuspension gegeben und das Röhrchen für 20 min auf einen Schwenktisch bei 4°C gelegt. Durch den Vorverdau wurden die ventrikulären Zellen aus ihrem Gewebeverband gelöst, was zu einer sichtbaren Trübung der Zellsuspension führte. Nach der abgelaufenen Zeit wurde der Überstand, der vorwiegend Zelldetritus und Erythrozyten enthielt, abpipettiert und verworfen. Danach wurde der Suspension wieder 10 ml Trypsinlösung zugefügt und diese für 12 min, diesmal bei Raumtemperatur, auf dem Schwenktisch gemischt. Der Überstand wurde danach in ein Sammelröhrchen mit 2,5 ml aktivem FCS gegeben und dieses auf Eis gelagert. Das aktivierte FCS dient zur Inaktivierung des Trypsins und somit zum Schutz der Kardiomyozyten vor Verdau. Auf das zurückbleibende Pellet des ersteren Röhrchens wurde nun 9 ml DNase II-Lösung gegeben und die Suspension durch 25x Auf- und Abpipettieren mit einer „wide bored“-Pipette gemischt. Die DNase II-Lösung verhindert

ein Verkleben der Zellen, was durch austretende DNA aus den lysierten Zellen verursacht werden kann. Der Überstand wurde in das Sammelröhrchen überführt. Anschliessend wurde erneut 10 ml Trypsinlösung hinzugefügt und das Röhrchen für 5 min bei Raumtemperatur geschwenkt und der Überstand ebenfalls dem Sammelröhrchen beigefügt. Das weitere Prozedere beinhaltete ein ständiges Zugeben von Trypsinlösung bzw. DNase II-Lösung, das Schwenken des Röhrchens bei Raumtemperatur und das Überführen in ein Sammelröhrchen mit 2,5 ml aktivem FCS. Die hinzugefügten Volumina und die Schwenkzeit wurden langsam verringert, wobei das Volumen der DNase II-Lösung prinzipiell um 1 ml vom Volumen der Trypsinlösung differierte. Die Anzahl der Wiederholungen bzw. die Dauer des Gesamtverdaus zeigte eine starke Variation hinsichtlich folgender Faktoren: Tierzahl, Zerkleinerungsgrad des Herzgewebes, Aktivität des Trypsins und Umgebungsfaktoren, wie z.B. die Raumtemperatur. Der Abbruch der Verdauvorgänge stützte sich auf die wiederholte mikroskopische Kontrolle der Zellen während des Vorgangs. Kriterium des Abbruchs war eine sichtbare starke Reduktion der Kardiomyozytenzahl mit verbleibendem Zelldetritus. Es folgte eine 15-minütige Zentrifugation der auf Eis gelagerten Sammelröhrchen bei 610 rpm in einer auf 4°C vorgekühlten „Swing-Out“-Zentrifuge. Die Überstände wurden mit einer Pipette abgenommen und verworfen, wobei besondere Vorsicht geboten war. Die als Pellet im unteren Teil des Röhrchens vorliegenden Zellen durften nicht abgesaugt werden. Das Zellpellet wurden in 2 ml MEM resuspendiert, welches 10% FCS (inaktiv) und 1% P/S beinhaltete (NCM-MEM). Die Inhalte aller Röhrchen wurden mit einer befeuchteten Pipette in einem separaten Röhrchen vereinigt. Der gesammelten Zellsuspension wurde 1/100 einer DNase II-Lösung beigefügt, diese durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vermischt und erneut bei 610 rpm und 4°C für 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 32 ml NCM-MEM gelöst und die Zellsuspension durch ein mit MEM

befeuchtetes Zellsieb zu gleichen Teilen auf vier 100 mm Petrischalen verteilt. Die Petrischalen wurden 1,5 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert („Preplating“). Dies bewirkte eine Trennung der Kardiomyozyten von den Nicht-Kardiomyozyten. In dieser Zeit haften die Nicht-Kardiomyozyten (kardiale Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen) wesentlich stärker am Boden der Petrischale an als die Kardiomyozyten. Das die Kardiomyozyten enthaltene Nährmedium wurde abgesaugt und in ein Sammelflakon überführt. Anschliessend wurden die noch am Boden der Petrischale haftenden Kardiomyozyten durch mehrmaliges Schlagen abgeklopft und durch Zugabe von 2 ml MEM ebenfalls in das Sammelflakon gegeben. Ein deutliches Überverhältnis der Nicht-Kardiomyozyten in der mikroskopischen Kontrolle limitierte den Abschlagevorgang. Bei Bedarf wurden die Nicht-Kardiomyozyten mit 10 ml NCM-MEM versetzt und bei 37°C im Brutschrank gehalten.

Hiernach wurde die Zellsuspension im Sammelflakon gut gemischt und von dieser je ein Tropfen auf eine Neubauer Zählkammer überführt. Die Zellen wurden ausgezählt, wobei der Mittelwert mehrerer Eckquadrate (je 16 Felder) als endgültiger Auszählwert in die nachfolgende Rechnung einging. Der Mittelwert wurde mit dem Faktor 10^6 multipliziert, wodurch man die Zellzahl pro ml Zellsuspension erhielt. Der Gesamtzellsuspension wurde eine entsprechende Menge CM-MEM zugefügt, so dass sich in den verwendeten Petrischalen mit 60 mm Durchmesser 3×10^6 Zellen auf 3 ml Zellsuspension befanden. Dies entspricht einer Zelldichte von 100.000/cm^2. Die Kontamination mit Nicht-Kardiomyozyten betrug weniger als 10%.

2.1.3 Kultivierung von Kardiomyozyten

Die Kultivierung der Kardiomyozyten erfolgte ebenfalls unter strengen sterilen Bedingungen. Alle verwendeten Medien bzw. Lösungen waren autoklaviert oder steril

filtriert. Die Zellen wurden in MEM gehalten, welches mit 10% FCS (inaktiv), 1% P/S zur Antibiose und 1% BrdU angereichert war (CM-MEM). Das FCS wurde durch Erwärmung auf 56°C für 30 min inaktiviert. Der Mitosehemmstoff BrdU verhindert das Wachstum der unerwünschten Fibroblasten. BrdU führt zu einer Replikationshemmung der Zellen, lässt allerdings die Proteinbiosynthese unbeeinflusst. Die Inkubation der Zellen im Brutschrank sorgte für konstante Bedingungen. Im Brutschrank herrschte eine Umgebungstemperatur von 37°C und ein CO_2-Gehalt von 5%. Bereits nach einem Tag in Kultur waren die meisten Kardiomyozyten am Boden der Petrischale angewachsen und bildeten bei gleichmässiger Verteilung einen dichten Zellrasen (Monolayer). Vereinzelte rhythmische Kontraktionen einzelner Zellen oder Zellverbände waren zu beobachten. Jeweils 2 Tage nach der Präparation wurde ein Mediumwechsel mit CM-MEM durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt die Zellen fest am Boden anhafteten und sich beim Mediumwechsel nicht mehr lösen konnten. Das verbrauchte Medium wurde über eine Pasteur-Pipette, die an einer Wasserstrahlpumpe angeschlossen war, vorsichtig abgesaugt und durch auf 37°C vorgewärmtes frisches Medium ersetzt. Dieser Vorgang wurde am vierten Tag wiederholt.

2.1.4 Kultivierung von Nicht-Kardiomyozyten

Als Nicht-Kardiomyozyten werden alle Zellen bezeichnet, die nicht der Gruppe der Herzmuskelzellen zugerechnet werden können. Es handelt sich dabei im Wesentlichen um kardiale Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen. Im neonatalen Herz der Ratte machen sie 70% der Zellzahl, aber nur 30% der Zellmasse aus (Eghbali et al. 1988). Im Unterschied zur Kultivierung der Kardiomyozyten wurde

bei der Kultivierung der Nicht-Kardiomyozyten MEM benutzt, welches mit 10% FCS (inaktiv) und 1% P/S angereichert war (NCM-MEM). Die Inkubation erfolgte ohne den Mitosehemmstoff BrdU. Zwei Tage nach der Präparation erfolgte mit dem Mediumwechsel gleichzeitig die Stimulation der Nicht-Kardiomyozyten mit verschiedenen Substanzen.

2.1.5 Stimulation von Kardiomyozyten

Die Stimulation der Kardiomyozyten erfolgte nach 4 Tagen in Kultur mit dem zweiten Mediumwechsel. Die Zellkulturen wurden mit folgenden Substanzen behandelt: 4 µg/ml *E. coli* LPS, 2 ng/ml recombinant mouse IL-1β, 10 ng/ml recombinant mouse TNFα, 2 ng/ml recombinant mouse IFNγ, 2 ng/ml recombinant mouse IL-6 und isotoner Kochsalzlösung (0.9%-NaCl). In unterschiedlichen Versuchen wurden die Kardiomyozyten mit diesen Substanzen für 24 h bzw. 72 h bei 37°C inkubiert, wobei eine tägliche Vitalitätskontrolle der Zellen erfolgte. Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurden die Kardiomyozytenkulturen „geerntet“. Analog erfolgte in weiteren Versuchen eine Behandlung der Kardiomyozyten mit unter 2.1.6 beschriebenem Inkubationsmedium oder isotoner Kochsalzlösung (0,9%-NaCl).

2.1.6 Stimulation von Nicht-Kardiomyozyten

Die Behandlung der Nicht-Kardiomyozyten erfolgte 48 h nach der Präparation mit isotoner Kochsalzlösung (0,9%-NaCl) als Kontrolllösung bzw. mit LPS in einer Endkonzentration von 10 µg/ml Medium. Das Inkubationsmedium wurde nach 48 h abgezogen und auf die Kardiomyozyten gegeben.

2.1.7 Kollektion der Kardiomyozyten

Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurden die Kardiomyozytenkulturen „geerntet“. Dazu wurde das Behandlungsmedium vorsichtig abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS-Puffer zweimal für je 3 min gewaschen. Danach wurde 1 ml $KHCO_3$ (1 mM) + Aprotinin (0.01%) zugefügt. Aprotinin ist ein Proteasehemmer und verhindert den Proteinverdau. Die Zellen wurden vorsichtig mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Sarstedt Röhrchen (15 ml) überführt. Um eventuell noch vorhandene Zellreste aufzunehmen, wurden die Petrischalen erneut mit 1 ml $KHCO_3$ nachgespült.

2.1.8 Membranpräparation

Um die Zellmembranen zu gewinnen, wurden je 2 ml Zellsuspension für 2 x 15 sek bei mittlerer Stufe polytronisiert, wodurch die Zellen in ihre einzelnen Bestandteile aufgespalten wurden. Anschliessend wurden die aufgespaltenen Zellen für 10 min bei 11.500 rpm und 4°C zentrifugiert. Um eine angemessene Konzentration an Zellmembranen zu erreichen, wurden immer 2 bzw. 3 Zellchargen gepoolt. Durch das Zentrifugieren bei 11.500 rpm wurde erreicht, dass die Zellmembranen sich im Sarstedt Röhrchen als Pellet absetzen. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 200 µl $KHCO_3$ + Aprotinin (0.01%) resuspendiert und in ein Eppendorftube (1,5 ml) überführt. Die Lagerung der Membranen erfolgte fortan bei -80°C.

2.1.9 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt der Membranen wurde durch die photometrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford ermittelt.

2.1.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Membranproteine erfolgte durch Elektrophorese auf einem ca. 16 x 13 cm grossem Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid (15 %) Gel (SDS-PAGE). Die Gelkammer (Fa. Hoefer) setzt sich insgesamt aus 4 Glasplatten, 4 Spacern, Giessfuss, 4 Feststellriegeln und Silikonfett zusammen. Die Glasplatten wurden zuvor mit Wasser und anschliessend mit Ethanol gereinigt und mit einem Papiertuch trockengerieben. Der Giessfuss wurde, dort wo die Platten eingespannt werden, dünn mit Silikonfett eingestrichen. Danach wurden die Glasplatten und Spacer zusammengesetzt und in den Giessfuss eingesetzt. Mit den Feststellriegeln wurden die Glasplatten auf dem zuvor eingefetteten Giessfussgummi fixiert. Die Dichtigkeit des Systems wurde dadurch getestet, dass man Wasser in den Spalt zwischen den Glasplatten gab und auf Leckagen achtete. Der Gelansatz unterteilt sich in zwei Phasen: einem Trenngel (15%) und einem Sammelgel (4%). Zunächst wurde das Trenngel angesetzt. Die sorgfältig gemischte Trenngellösung wurde in eine vorbereitete und gereinigte Gelkammer mittels Perfusorspritze blasenfrei gegossen, wobei mit dem Trennkamm die Höhe des Trenngels festgelegt wurde (bis ca. 1-2 cm unter dem Kamm). Da sich Isopropanol nicht mit der Trenngellösung vermischt, sondern aufgrund der geringeren Dichte obenauf schwimmt, wurde ca. 1 ml Isopropanol zugefügt, um einen waagerechten Gelspiegel zu erhalten. Nach ca. 1 h war das Trenngel auspolymerisiert. Das Isopropanol wurde vollständig abgegossen und die zuvor angesetzte Sammelgellösung auf das gehärtete Trenngel gegossen. Der Kamm wurde so eingesetzt, dass sich keine Luftblasen um die Slots bilden

konnten. Nach Aushärtung (ca. 30 min) konnte man den Probekamm entfernen. Die zur Auftrennung bestimmten Membranproteine wurden auf je 50 µl Probenpuffer (Lämmli) in ein Eppendorftube aufgefüllt und bei 95°C im Heizblock 5 min denaturiert und anschliessend auf Eis abgekühlt. Der Trennkamm wurde vorsichtig herausgezogen und die obere Pufferkammer aufgesetzt. Hierzu wurden die Feststellklammern unten entfernt und an der oberen Pufferkammer eingesetzt und festgezogen. Die Proben konnten nun mittels Mikroliterspritze (Hamilton) in die Geltaschen überführt werden, wobei die obere Pufferkammer zuvor mit ca. 600 ml Laufpuffer aufgefüllt worden war. Zusätzlich wurden je ein Molekulargewichtsstandard, sowie rekombinantes RGS16 mitgeführt. Das beladene Gel wurde anschliessend in die mit ca. 3 l Laufpuffer versetzte und auf 10°C heruntergekühlte untere Pufferkammer überführt. Der Deckel wurde dann auf die obere Pufferkammer aufgelegt und die Kabel angeschlossen. Die denaturierten Proteine in SDS sind negativ geladen und wandern daher von der Kathode zur Anode. Die Membranproteine konnten nun bei konstanter Spannung und 70 mA in ca. 3 h aufgetrennt werden.

2.1.11 Westernblot

Zur Vorbereitung des Gelblots wurden 4 Lagen Whatmann Papier und 1 Lage Nitrocellulose je Gel zurechtgeschnitten (ca. 16 x 13 cm). Vier Liter Transferpuffer wurden angesetzt und in eine Wanne gefüllt. Die Träger für Blot und Schwämme wurden darin eingeweicht und Luftblasen sorgfältig aus dem Schwamm gedrückt. Danach wurden die Gelplatten dem Elektrophoresesystem entnommen und das Gel vorsichtig abgelöst. Das Gel wurde in folgender Ordnung zwischen die Blotträger

gelegt: Träger (-), Schwamm, 2x Whatmann Papier, Gel, Nitrocellulose, 2x Whatmann Papier, Schwamm, Träger (+). Die Träger wurden anschliessend in die Transferkammer gesetzt, welche danach mit Puffer gefüllt wurde. Zwei Gele wurden parallel bei 4°C und 5 A ca. 2,5 h laufengelassen. Nach dem Lauf wurde das Nitrocellulosepapier kurz in einer Wanne mit Ponceaurot angefärbt, um die Proteinbanden sichtbar zu machen. Das Papier wurde mit Aqua bidest. nachgewaschen, zwischen Papier getrocknet und bei 4°C gelagert.

2.1.12 Immunoblot

Um Antikörper zu sparen, wurden die gewünschten Proteinbanden auf minimale Grösse ausgeschnitten. Der Proteinstreifen wurde anschliessend 2x10 min in T-TBS in einem Schwenker gespült. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wurde der Proteinstreifen in 3% Milchpulver T-TBS über Nacht bei 4°C geschwenkt. Der Streifen wurde danach erneut 2x 10 min in T-TBS bei Raumtemperatur auf dem Schwenker gespült. Die 1. Antikörperlösung wurde wie folgt vorbereitet: anti-β-Tubulin IgG 1:750 in T-TBS und anti-RGS16 IgG 1:1000 in T-TBS. Die jeweiligen Blotstreifen wurden mit der 1. Antikörperlösung in einer Folie eingeschweisst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde 3x10 min bei RT mit T-TBS auf dem Schwenktisch nachgewaschen. Analog wurde die 2. Antikörperlösung (Sekundärantikörper) vorbereitet: anti-mouse IgG HRP-conjugated 1:2000 in T-TBS und anti-rabbit IgG HRP conjugated 1:2000 in T-TBS. Die jeweiligen Blotstreifen wurden bei RT für 2 h mit der 2. Antikörperlösung inkubiert. Anschliessend wurde 3x10 min mit T-TBS nachgewaschen. Die Detektion der Antikörperbindung konnte mittels ECL-Reagenz sichtbar gemacht werden. Dazu wurde in der Dunkelkammer ca. 1 ml ECL-Lösung auf

den Proteinstreifen aufgetragen und mit einer Transparenzfolie überdeckt. Mit einem Tuch wurde das ECL sorgfältig unterhalb der Folie auf dem Proteinstreifen verstrichen. Danach wurde ein Röntgenfilm auf den entsprechenden Proteinstreifen gelegt. Dieser wurde 3 sek bis zu 15 min exponiert und anschliessend entwickelt.

2.2 Versuchsablauf am Ganzherzmodel adulter Ratten

2.2.1 Verwendete Versuchstiere

Verwendet wurden ausschliesslich Ratten der Gattung Wistar, welche von der Tierhaltung des Universitätskrankenhauses Eppendorf gezüchtet wurden und beiderlei Geschlechts waren. Das Gewicht der Tiere betrug zwischen 300 und 350 g.

2.2.2 *In vivo* Behandlung mit LPS

Die Versuchstiere wurden mit 600 µg *E.coli*-LPS pro Tag behandelt. Hierzu wurden die Substanzen mittels einer Insulinspritze in die Schwanzvene der Tiere appliziert. Anstatt der Injektion von LPS erhielten die Kontrolltiere dieselbe Menge 0.9%-iger NaCl-Lösung. Die Ratten wurden in Makrolonkäfigen in Gruppen zu jeweils drei Tieren mit entstaubtem Holzgranulat gehalten. Sie erhielten Standard-Ratten-Erhaltungsfutter und Wasser *ad libitum*. Die Temperatur in den klimatisierten Räumen betrug 20 bis 22°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 30 bis 40%. Die Beleuchtung war in einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus geschaltet. Die Kontrolltiere wurden genauso gehalten wie die Tiere, denen LPS injiziert wurde.

2.2.3 Entnahme der Herzen

Die Entnahme der Herzen erfolgte nach 6 h, 24 h bzw. 72 h. Die Tiere wurden mittels Ether in einem dafür vorgesehenen Topf betäubt. Danach wurde das Abdomen über einen Unterbauch-Medianschnitt eröffnet. Von kaudal wurde eine Thorakotomie bis zum Hals durchgeführt. Es zeigte sich eine freie Sicht ins Mediastinum und auf das noch schlagende Herz. Anschliessend wurde das Herz im Gesamten entnommen und eine Herzspülung mit DEPC-Wasser durchgeführt. Hierzu wurde die Vena cava inferior und die Vena cava superior, sowie der Aortenbogen mit dem Herzbeutel abpräpariert. Die Aorta und die Herzvorhöfe wurden sauber abgetrennt und die Ventrikel bei -80°C in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

2.2.4 Membranpräparation

Die Membranpräparation erfolgte durchweg unter gekühlten Bedingungen. Ca. 500 mg gefrorenes Ventrikelgewebe wurde mittels Polytron-Homogenisator in 5 ml eiskalter Homogenisatorlösung insgesamt fünfmal je 20 sek homogenisiert. Anschliessend wurde das Homogenisat bei 3000 x g und 4°C in einer Beckman JA-20 Zentrifuge 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde im Folgenden 1:2 mit 160 mM KCl- und 20 mM MOPS (pH 7.4)-Lösung vermischt und bei 100.000 x g und 4°C insgesamt 1 h in einem Kontron TFT 28.38 Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in 300 µl Membranpuffer mit 2 µg/ml Aprotinin resuspendiert und bei -80°C gelagert.

2.2.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Der Proteingehalt der Membranen wurde durch die photometrische Konzentrationsbestimmung nach Bradford ermittelt.

2.2.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der Membranproteine erfolgte durch Elektrophorese auf einem ca. 16 x 13 cm grossem Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid (15 %) Gel (SDS-PAGE) wie unter 2.1.10 beschrieben.

2.2.7 Westernblot Analyse

Die Westernblot Analyse erfolgte analog 2.1.11

2.2.8 Immunoblot

Um Antikörper zu sparen, wurden die gewünschten Proteinbanden auf minimale Grösse ausgeschnitten. Der Proteinstreifen wurde anschliessend 2x10 min in T-TBS in einem Schwenker gespült. Zur Blockierung unspezifischer Antikörperbindungen wurde der Proteinstreifen in 3% Milchpulver T-TBS über Nacht bei 4°C geschwenkt. Der Streifen wurde danach erneut 2x10 min in T-TBS bei RT auf dem Schwenker gespült. Die 1. Antikörperlösung wurde vorbereitet: anti-β-Tubulin IgG 1:750 in T-TBS, anti-$G\alpha_i$, -$G\alpha_s$ und -$G\alpha_q$ IgG 1:1000 in T-TBS. Die jeweiligen Blotstreifen wurden mit der 1. Antikörperlösung in einer Folie eingeschweisst und über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde 3x10 min bei RT mit T-TBS auf dem Schwenktisch nachgewaschen. Analog wurde die 2. Antikörperlösung (Sekundärantikörper) vorbereitet: anti-mouse

IgG HRP conjugated 1:2000 in T-TBS, anti-rabbit IgG HRP conjugated 1:2000 in T-TBS. Die jeweiligen Blotstreifen wurden bei RT für 2 h mit der 2. Antikörperlösung inkubiert. Anschliessend wurde 3x10 min mit T-TBS nachgewaschen. Die Detektion der Antikörperbindung konnte mittels ECL-Reagenz sichtbar gemacht werden. Dazu wurde in der Dunkelkammer ca. 1 ml ECL-Lösung auf den Proteinstreifen aufgetragen und mit einer Transparenzfolie überdeckt. Mit einem Tuch wurde das ECL sorgfältig unterhalb der Folie auf dem Proteinstreifen verstrichen. Danach wurde ein Röntgenfilm auf den entsprechenden Proteinstreifen gelegt. Dieser wurde 3 sek bis zu 15 min exponiert und anschliessend entwickelt.

2.3 Auswertung

Die unter 2.1 und 2.2 beschriebenen Ergebnisse wurden wie folgt analysiert:

Die auf dem Röntgenbild enthaltenen Signale der einzelnen Proteinbanden wurden mittels eines Durchlicht-Scan-Verfahrens und einer anschliessenden Auswertung durch das Softwaretool Zero-Dscan analysiert. Die RGS16-Proteinexpressionswerte bzw. $G\alpha_i$-, $G\alpha_s$- und $G\alpha_q$-Proteinexpressionswerte wurden jeweils auf die β-Tubulin-Werte in der gleichen Probe bezogen. Die ermittelten optischen Dichtewerte wurden zum unbehandelten Kontrollansatz (NaCl =“1“) ins Verhältnis gesetzt.

2.3.1 Statistik

Die ermittelten Daten sind Mittelwerte ±SEM aus voneinander unabhängigen Experimenten. Die Signifikanz der Mittelwerte wurde mittels ANOVA bestimmt und

durch einen post hoc Student-Newman-Keuls-Test verifiziert. Ein p-Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angenommen.

2.4 Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
CBFHH	NaCl 136,9 mM
	KCl 5,36 mM
	$MgSO_4(H_2O)_7$ 0,81 mM
	Dextrose 5,55 mM
	KH_2PO_4 0,44 mM
	$Na_2HPO_4(H_2O)_7$ 0,34 mM
	HEPES 20,0 mM pH 7,4
	pH mit NaOH auf 7,5 eingestellt
	Lagerung bei 4 °C
CM-MEM-Medium	500 ml Minimum Essential Medium (MEM)
	10% = 54 ml Fetales Kälber Serum (FCS)
	1% = 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S) Gemisch
	1% = 5 ml BrdU Stamm
	Lagerung bei 4 °C
DNase II-Lösung	0,5 ml Stock DNase Stamm (71x)
	0,5 ml Penicillin/Streptomycin
	1,3 ml FCS

	ad 50 ml CBFHH
DNase Stamm 71x	100 mg DNase I in 50 ml 0,15 M NaCl sterilfiltriert
	Lagerung bei -20 °C
Homogenisatorlösung	Imidazol-HCl 10 mM
	Sucrose 600 mM
	pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt
Membranpuffer	Tris-Base 50 mM
	$MgCl_2$ 5 mM
	EDTA 5 mM
	EGTA 5 mM
MOPS-Lösung	MOPS 20 mM
	Natriumacetat 5 mM
	EDTA 1 mM
	pH mit NaOH auf 7,0 eingestellt
NCM-MEM-Medium	500 ml Minimum Essential Medium (MEM)
	10% = 54 ml Fetales Kälber Serum (FCS)
	1% = 5 ml Penicillin/Streptomycin (P/S) Gemisch
	Lagerung bei 4 °C
PBS 10x	NaH_2PO_4 0,15 M

	Na_2HPO_4 0,8 M
Ponceau-Färbelösung	0,1% (w/v) Ponceau S
	5% (v/v) Essigsäure
Probenpuffer (Lämmli)	12,5 ml 0,5 M Tris-HCl
	10 ml Glycerol
	10 ml SDS 20%
	5 ml Mercaptoethanol
	2,5 ml Bromphenolblau 0,05% pH 6.8
	ad 100 ml Aqua bidest.
Sammelgel 4 % (SDS-Page)	5 ml Tris-HCl 0,5 M pH 6,8
	2 ml 40% Acrylamid
	12,9 ml Aqua bidest.
	100 µl 20% SDS
	100 µl 10% APS
	10 µl TEMED
SDS 20%	Sodium-Dodecyl-Sulfat 100 g ad 500 g Aqua bidest.
SDS Laufpuffer 5x	15 g Tris-Base
	72 g Glycin
	25 ml SDS 20%

	ad 1000 ml Aqua bidest.
T-TBS	NaCl 137 mM
	Tris-Base 20 mM
	0,05% (v/v) Tween®-20
	pH mit NaOH auf 7,6 eingestellt
Transferpuffer (Blot)	29,91 g $Na_2HPO_4(H_2O)_2$
	4,08 g $NaH_2PO_4(H_2O)$
	ad 4 l Aqua bidest.
Trenngel 15 % (SDS-Page)	9,4 ml Tris-Base 2 M pH 8,8
	18,75 ml 40% Acrylamid
	21,20 ml Aqua bidest.
	250 µl 20% SDS
	250 µl 10% APS
	25 µl TEMED
Trypsin-Lösung	1,5 ml Stock Trypsin (100x)
	0,5 ml Penicillin-Streptomycin
	0,5 ml DNase II
	ad 50 ml CBFHH
Trypsinstamm 100x	3,074 mg Trypsin/ml MQ-Wasser für 10 mM Stock
	Lagerung bei -20 °C

2.5 Substanzen und Verbrauchsmittel

Bezeichnung	Hersteller
α-D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
0,9% NaCl (isot. Kochsalzlösung)	Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen
2-Mercaptoethanol	Sigma Chemical Co, USA
Acrylamide-Bis-Acrylamide 40%	Appligene Quantum, USA
Ammoniumperoxodisulfat	Sigma Chemical Co, USA
Anti-β-tubulin IgG monoclonal mouse, clone TUB 2.1	Sigma Chemical Co, USA
Anti-G-alpha-i IgG monoclonal rabbit	Sigma Chemical Co, USA
Anti-G-alpha-q IgG monoclonal rabbit	Sigma Chemical Co, USA
Anti-G-alpha-s IgG monoclonal rabbit	Sigma Chemical Co, USA
Anti-mouse IgG HRP conjugated	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-rabbit IgG HRP conjugated	Santa Cruz Biotechnology, USA
Anti-RGS16 IgG polyclonal rabbit	C.-K. Chen, Pasadena, CA, USA
Aprotinin	Sigma Chemical Co, USA
Aqua ad iniectabilia	Baxter Deutschland GmbH, Unterschleissheim
Ether	Merck, Darmstadt
Bio-Rad Dc Protein Assay	(Reagent A,B,S) Bio-Rad Laboratories, USA
BrdU (97%)	Sigma Chemical Co, USA
Bromphenolblau	Sigma Chemical Co, USA

DEPC	Sigma Chemical Co, USA
DNase I	Sigma Chemical Co, USA
ECL	Amersham Pharmacia Biotech, USA
EDTA	Merck, Darmstadt
EGTA	Sigma Chemical Co, USA
Einwegpipetten (1/10/25 ml), steril	Becton Dickinson Labware, USA
Entwickler (Röntgenfilm)	Agfa-Gevaert N.V., Belgium
Eppendorftubes (1,5/ 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Essigsäure (100%)	Merck, Darmstadt
Ethanol (100%)	UKE-Apotheke, Hamburg
Fetal Calf Serum (FCS)	Gibco BRL, USA
Fixierer (Superfix)	Tetenal Photowerk, Norderstedt
Glycerin	Sigma Chemical Co, USA
Glycin	Sigma Chemical Co, USA
HCl (0,01-1 M)	Merck, Darmstadt
HEPES	Sigma Chemical Co, USA
Holzgranulat	Altromin, Lage/Lippe
Imidazol	Sigma Chemical Co, USA
Interferon γ, rec. Mouse	R&D Systems, USA
Interleukin-1β, rec. Mouse	Boehringer, Mannheim
Interleukin-6, rec. Mouse	Boehringer, Mannheim
Isopropanol (99+%)	Sigma Chemical Co, USA
KCl	Merck, Darmstadt
KH_2PO_4	Merck, Darmstadt
$KHCO_3$	Merck, Darmstadt

Lipopolysaccharide B *E. Coli* (O26:B6)	Difco Laboratories, USA
$MgCl_2$	Merck, Darmstadt
$MgSO_4(H_2O)_7$	Merck, Darmstadt
Minimum Essentials Medium mit Earl's Salts und Glutamin (MEM)	Gibco BRL, USA
MOPS	Sigma Chemical Co, USA
Na_2HPO_4	Merck, Darmstadt
Na-Acetat	Merck, Darmstadt
NaCl „Baker Analyzed“	Mallinckrodt Baker B.v., Holland
NaH_2PO_4	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Nitrocellulose Transfer Membran	Schleicher & Schnell GmbH, Dassel
Parafilm	American National, USA
Pasteur-Pipetten	Brand GmbH, Wertheim
PBS DULBECCO	Biochrom KG, Berlin
Penicillin-Streptomycin (P/S) 10.000 IU/ml-10mg/ml	Gibco BRL, USA
Petrischale	Falcon, Becton Dickinson, USA
Pipettenspitzen (10,200,1000 µl)	Treff AG, Schweiz
Ponceau S-Reagenz	Sigma Chemical Co, USA
Proteinmolekulargewichtsmarker (LMW)	Amersham Pharmacia Biotech Inc, USA
Röntgenfilm X-Omat AR	Eastman Kodak Company, USA
Sarstedt-Röhrchen (15 ml)	Sarstedt, Heidelberg
Skimmed milk 3%	Nonfat + Drymilk, Kroger, USA
Sodium-Dodecyl-Sulfat	Sigma Chemical Co, USA

Standard-Ratten-Erhaltungsfutter	Altromin, Lage/Lippe
Sterilfilter (0,2 µm)	Schleicher und Schüll, Dassel
Sucrose	Sigma Chemical Co, USA
Temed	Merck, Darmstadt
Tumornekrosefaktor-α rec. Mouse	Boehringer, Mannheim
Tris-Base	Gibco, BRL, Life-Technologies, USA
Trypsin 250	Difco Laboratories, USA
Whatman Chromatography Paper	Whatman International Ltd, UK
Zellschaber steril	Greiner Labortechnik, Österreich

2.6 Laborgeräte

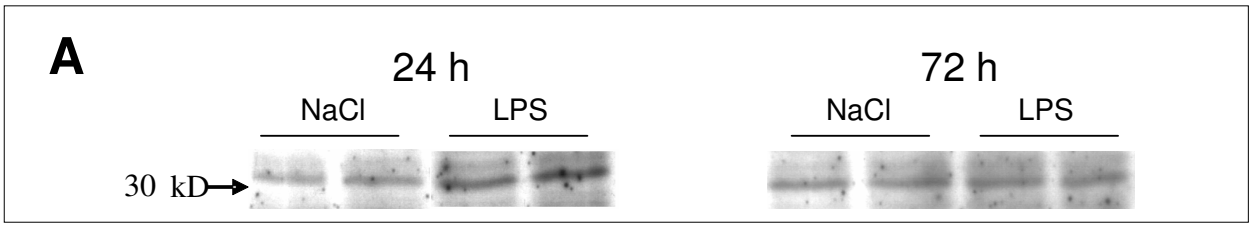
Bezeichnung	**Hersteller**
Analysenwaage	Mettler, Greifensee, Schweiz
Beckmann-Kühlzentrifuge (J2-21) mit	
Rotor JA 20	Beckmann, Paolo Alto, USA
Brutschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hannover
CO_2-Water-Jacketed Incubator	Nuaire, UK
Counter	Beckmann, Paolo Alto, USA
Digitalwaage	Mettler, Greifensee, Schweiz
Electrophoresis Power Supply	Gibco BRL, USA
Elektrophoresekammer (SDS)	Eigenbau Pharmakologie UKE
Glass Plates for Vert. Slab Gel Unit	Pharmacia Biotech Inc., USA
Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Homogenisator-Polytron PT 10/35	Kinematica Ag, Littau/Luzern, Schweiz

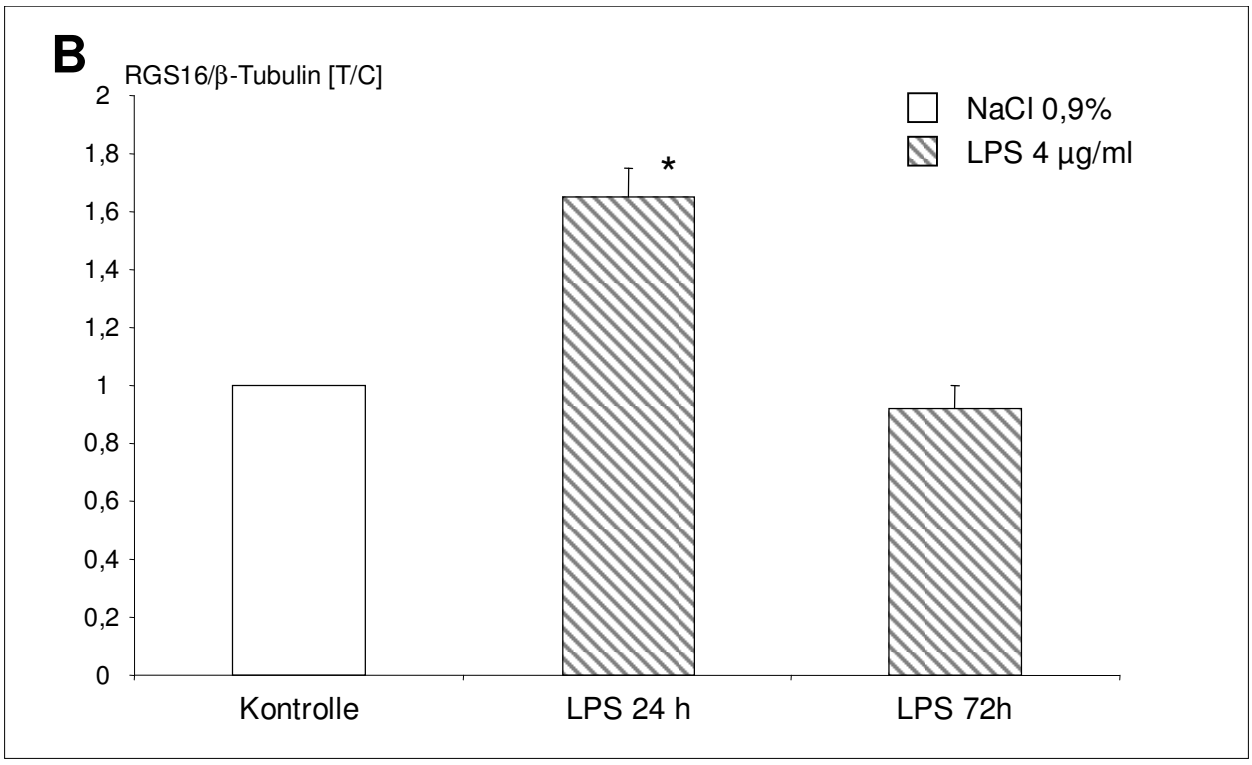
IKAMAG RCT	IKA-Werk, Staufen i. Br.
Kontron-Ultrazentrifuge TFT 28.38 Rotor	Kontron, Eching
Kühlbad Haake F3 digital	Haake, Berlin
Kühlzentrifuge	Hettich, Tutlingen
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Microliter Syringe (50 µl)	Hamilton Bonaduz AG, Schweiz
Mikroskop (Televal 31)	Zeiss, Dresden
Neubauer Zählkammer	Assistent, Sondheim
pH-Meter	Knick, Berlin
Sicherheitswerkbank	Heraeus Instruments, Hannover
Spacer-Mate	Hoefer Scientific Instruments, USA
Spektrophotometer	Perkin Elmer, Paolo Alto, USA
Vacupack2plus	Krups, Offenbach a. Main
Vertical Slab Gel Unit	Hoefer Scientific Instruments, USA
Vortexer (REAX 1D)	Heidolph, Kelheim
Wasserbad	GFL, Burgwedel
Wasserdeionisierungsanlage	Millipore, Eschborn

3 Ergebnisse

3.1 Transiente Induktion von RGS16 unter Stimulation mit LPS in neonatalen Kardiomyozytenkulturen

An adulten Rattenherzen wurde die Induktion von RGS16 durch intravenöse Gabe von LPS *in vivo* nachgewiesen (Patten et al. 2002). Um zu untersuchen, ob LPS auch die Proteinexpression von RGS16 in isolierten Kardiomyozyten induziert, wurden kultivierte und isolierte neonatale Rattenkardiomyozyten für 24 h bzw. 72 h mit 4 µg/ml LPS stimuliert und die RGS16-Proteinexpression mittels Westernblot bestimmt. Als Kontrolle wurden mit NaCl behandelte Kardiomyozyten verwendet. Unter LPS-Stimulation zeigte sich im Vergleich zur NaCl-Applikation eine signifikante transiente Induktion von RGS16-Protein in den Kardiomyozyten nach 24 h Stimulation ($p < 0,05$ versus NaCl) (Abbildung 2). Diese Daten beziehen sich auf fünf unabhängige Präparationen. Nach 72 h Stimulation waren diese Veränderungen der Proteinexpression unter LPS im Vergleich zur Kontrolle bereits nicht mehr nachweisbar.





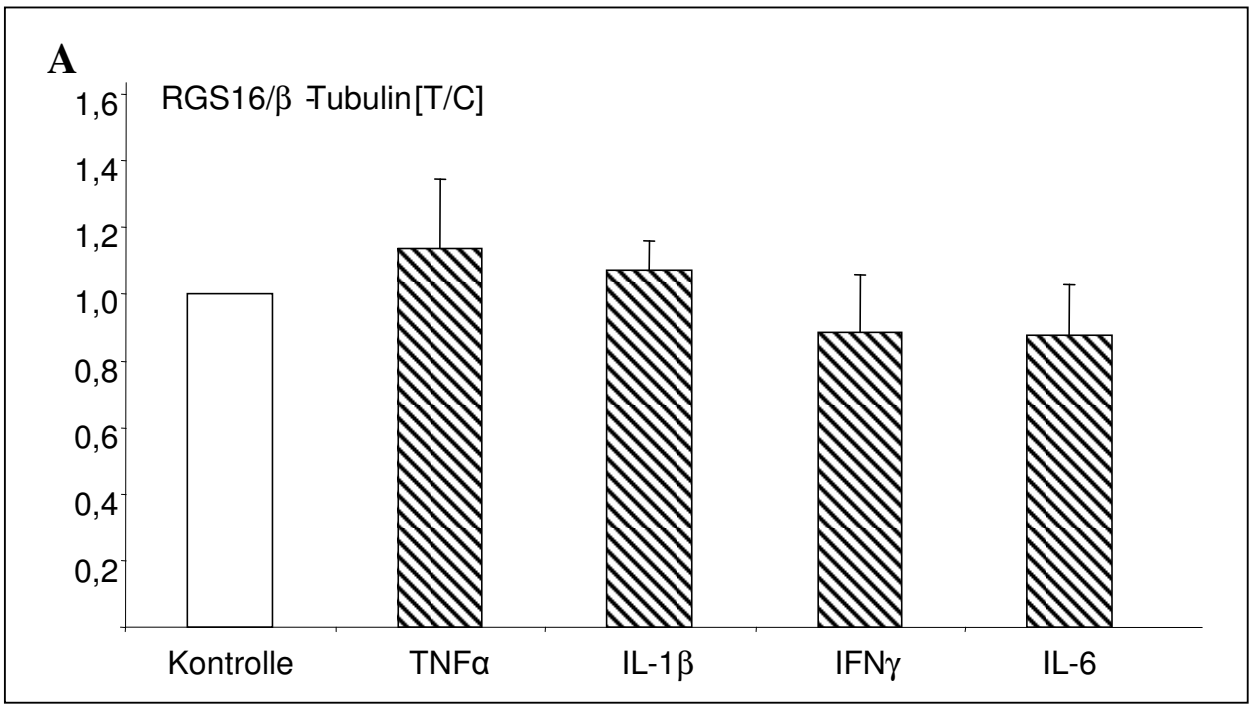
C	Kontrolle	LPS (24 h)	LPS (72 h)
MW	**1,00**	**1,65**	**0,92**
SEM		0,10	0,08

Abbildung 2: RGS16-Protein wird in Kardiomyozytenkulturen neonataler Ratten durch LPS induziert (nach 24 h Stimulation). Die neonatalen Rattenkardiomyozyten wurden mit 4 µg/ml LPS (je 24 h bzw. 72 h) stimuliert. Die Membranproteine wurden isoliert und die RGS16-Proteinexpression mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung eines RGS16 spezifischen Antikörpers ermittelt (A). Aufgereinigtes rekombinantes RGS16 (50 ng) diente als Positivkontrolle. Die Proteinexpression wurde per Densitometrie quantifiziert und mit der β-Tubulin Expression abgeglichen (B). Die Daten werden als Ratio RGS16-Proteinexpression über β-Tubulin-Expression ausgedrückt ±SEM (C). Die Daten stammen aus fünf unabhängigen Präparationen (* $p < 0,05$ vs. NaCl).

3.2 Rekombinantes IL-1β und TNFα induzieren die RGS16-Proteinexpression neonataler Kardiomyozytenkulturen

In adulten Rattenherzen, welche *in vivo* mit LPS stimuliert wurden, konnte die Expression verschiedener Zytokine induziert werden, darunter IL-1β, TNFα, IL-6 und IFNγ (Patten et al. 2001). Da für diese proinflammatorischen Zytokine negativ inotrope Wirkungen am Herzen beschrieben sind (Baumgarten et al. 2001, Kinugawa et al. 1994, Mittmann et al. 2000, Stein et al. 1996), wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit diese Zytokine eine Aktivierung der RGS16-Proteinexpression bewirken. Der Effekt dieser Zytokine auf die Proteinexpression von RGS16 wurde nach 24 h bzw. 72 h Stimulation in isolierten neonatalen Rattenkardiomyozytenkulturen untersucht. NaCl diente wiederum als Kontrollstandard. Es zeigt sich, dass es zu einer signifikanten Induktion von RGS16-Protein unter Stimulation mit rekombinantem IL-1β (2,02-fach ±0,22, $p < 0,05$ vs. NaCl) und TNFα (1,72-fach ±0,2, $p < 0,05$ vs. NaCl) nach 72 h kommt, während IL-6 (0,92-fach ±0,12) und IFNγ (1,32-fach ±0,22) keine Induktion von RGS16 bewirken (Abbildung 4). Im Gegensatz zur Stimulation mit LPS konnte nach 24 h kein wesentlicher Unterschied der RGS16-Expression im Vergleich zur NaCl-Kontrolle nachgewiesen werden (Abbildung 3).

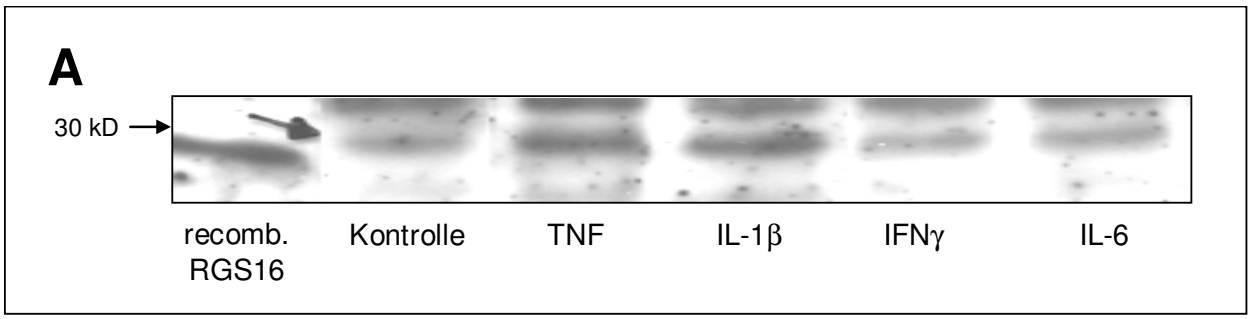
RGS16-Expression nach 24 h

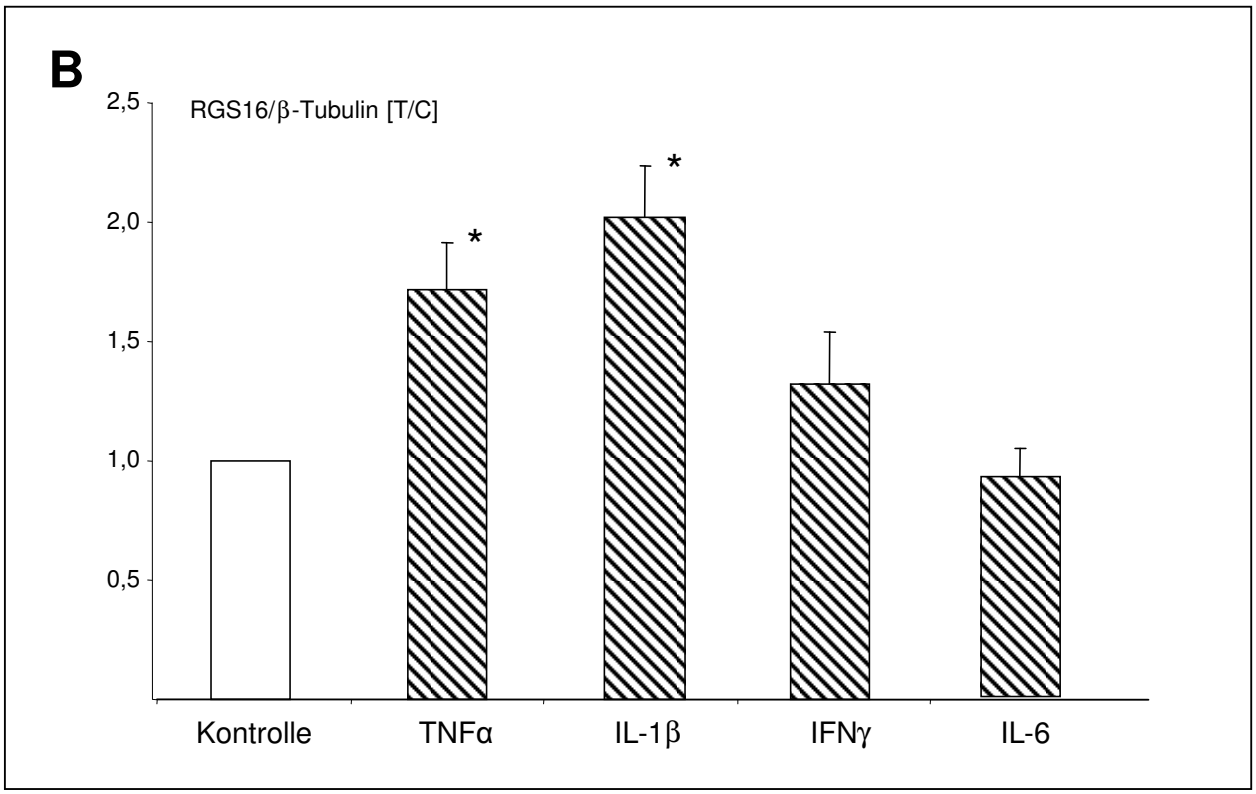


B	Kontrolle	TNFα	Il-1β	IFNγ	IL-6
MW	**1,00**	**1,13**	**1,07**	**0,89**	**0,88**
SEM		0,21	0,09	0,17	0,15

Abbildung 3: Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden mit rekombinantem IL-1β (2 ng/ml), IL-6 (2 ng/ml), TNFα (10 ng/ml), IFNγ (2 ng/ml) oder 0,9% NaCl stimuliert. Nach Stimulation über 24 h zeigt sich kein signifikanter Anstieg der Proteinexpression von RGS16. Die Membranproteine wurden isoliert und die Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung eines RGS16 spezifischen Antikörpers ermittelt. Aufgereinigtes rekombinantes RGS16 (50 ng) diente als Positivkontrolle. Die Proteinexpression wurde per Densitometrie quantifiziert und mit der β-Tubulin-Expression abgeglichen (A). Die Daten werden als Ratio RGS16-Proteinexpression über β-Tubulin-Expression ausgedrückt ±SEM (B). Die Daten stammen aus fünf unabhängigen Präparationen.

RGS16-Expression nach 72 h



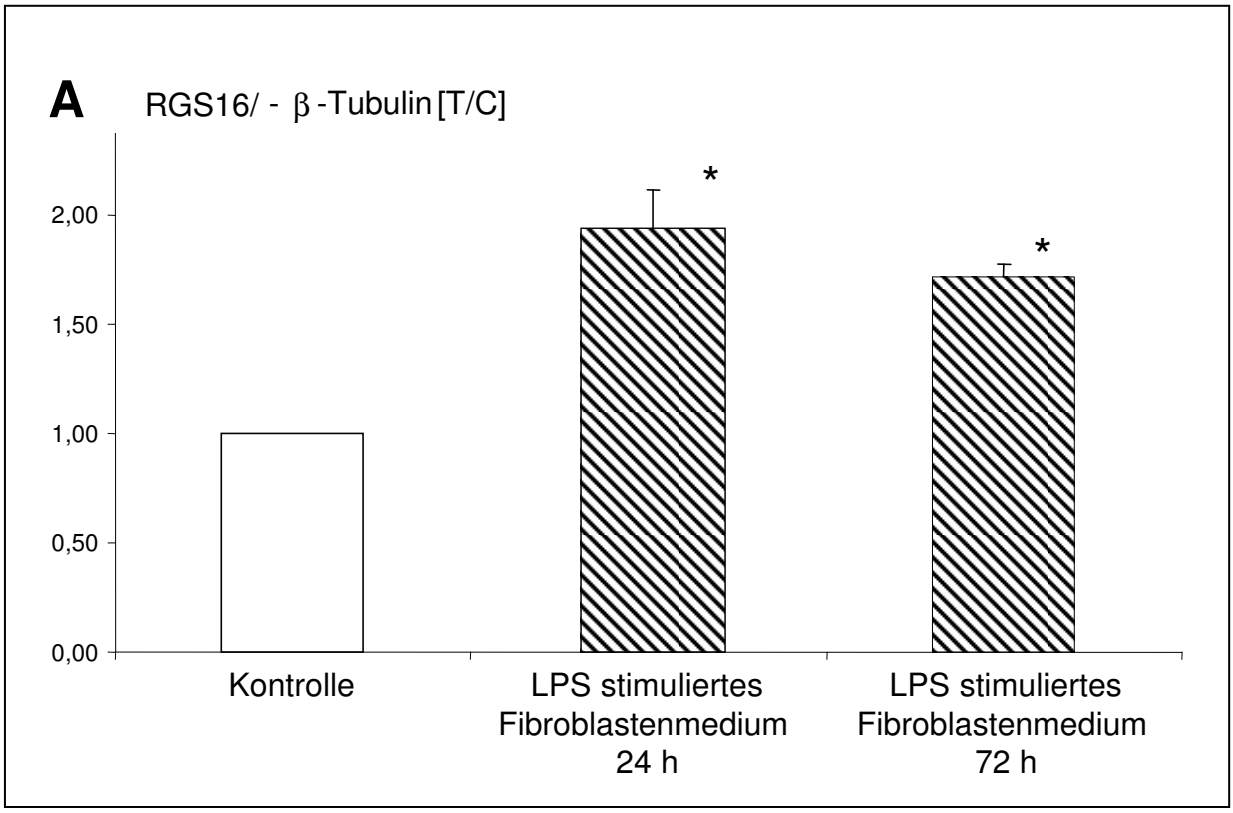


C	Kontrolle	TNFα	Il-1β	IFNγ	IL-6
MW	**1,00**	**1,72**	**2,02**	**1,32**	**0,92**
SEM		0,20	0,22	0,22	0,12

Abbildung 4: Interleukin 1β (IL-1β) und Tumornekrosefaktor α (TNFα), jedoch nicht Interleukin 6 (IL-6) oder Interferon γ (IFNγ), induzieren die Proteinexpression von RGS16 in neonatalen Rattenkardiomyozyten. Stimuliert wurde mit rekombinantem IL-1β (2 ng/ml), IL-6 (2 ng/ml), TNFα (10 ng/ml), IFNγ (2 ng/ml) oder 0.9% NaCl über 72 h. Die Membranproteine wurden isoliert und die Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung eines RGS16 spezifischen Antikörpers ermittelt (A). Aufgereinigtes rekombinantes RGS16 (50 ng) diente als Positivkontrolle. Die Proteinexpression wurde per Densitometrie quantifiziert und mit der β-Tubulin-Expression abgeglichen (B). Die Daten werden als Ratio RGS16-Proteinexpression über β-Tubulin-Expression ausgedrückt ±SEM (C). Die Daten stammen aus fünf unabhängigen Präparationen (* $p < 0,05$ vs. NaCl).

3.3 Induktion von RGS16 nach 24 h und 72 h unter Stimulation mit LPS behandeltem Medium von kultivierten, kardialen Nicht-Kardiomyozyten

Im Weiteren wurde untersucht, ob die LPS induzierte Veränderung der myokardialen RGS16-Proteinexpression möglicherweise über eine intrakardiale Zytokinsynthese bzw. Zytokinfreisetzung aus z.B. Fibroblasten oder Endothelzellen vermittelt wird. Hierzu wurden Nicht-Kardiomyozyten (siehe 2.1.6), für 48 h mit rekombinantem LPS bzw. NaCl (Kontrolle) inkubiert. Das Medium wurde abgezogen, um damit anschliessend die neonatalen Rattenkardiomyozyten aus der gleichen Präparation zu inkubieren. Es ergab sich eine signifikante Induktion der RGS16-Proteinexpression sowohl nach 24 h, als auch nach 72 h im Vergleich zum Kontrollwert mit NaCl. Die Proteininduktion war nach 72 h in etwa gleicher Höhe wie nach 24 h nachweisbar (Abbildung 5).

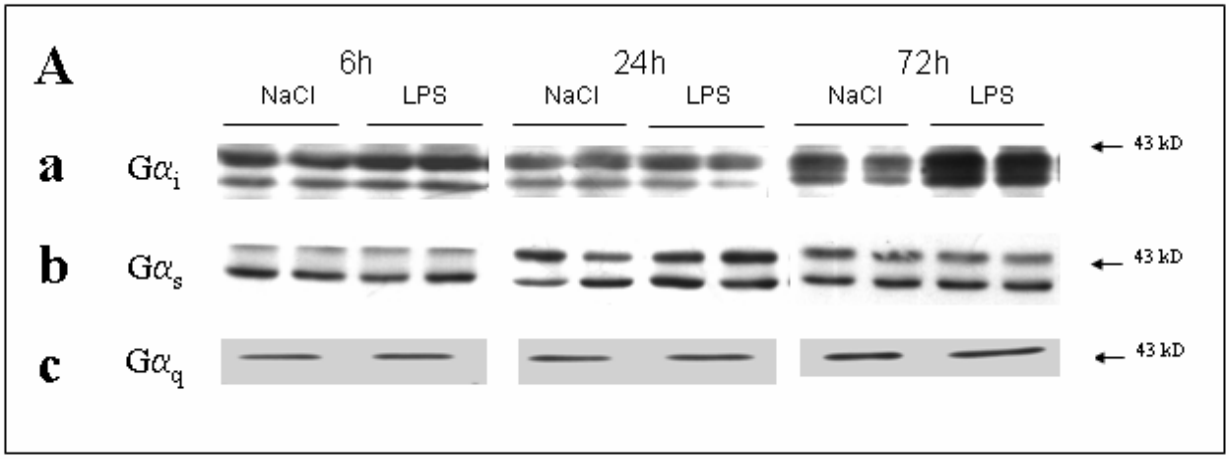


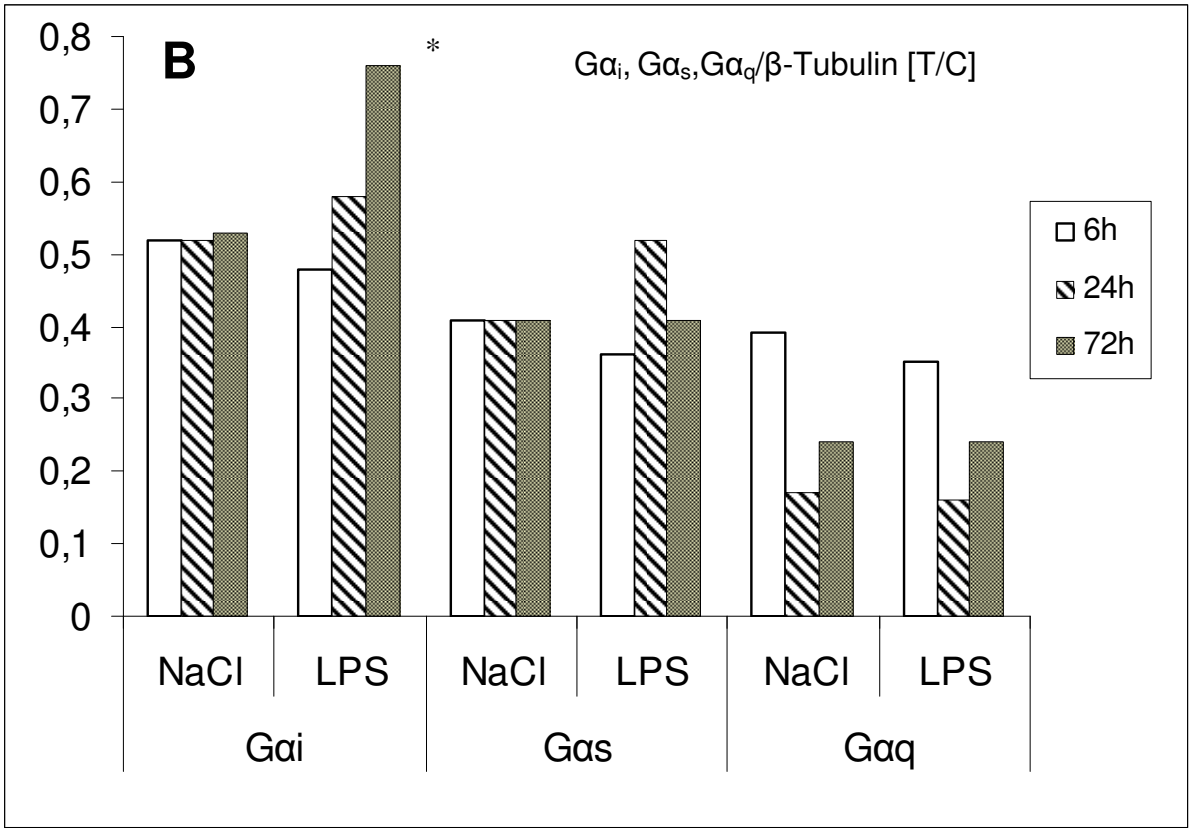
B	**Kontrolle**	**LPS/Fib 24 h**	**LPS/Fib 72 h**
MW	**1,00**	**1,99**	**1,72**
SEM		0,16	0,05

Abbildung 5: Medium von LPS stimulierten Fibroblasten induziert die Proteinexpression von RGS16 in neonatalen Rattenkardiomyozyten sowohl nach 24 h als auch nach 72 h. Die Membranproteine wurden isoliert und die RGS16-Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Verfahren ermittelt. Aufgereinigtes rekombinantes RGS16 (50 ng) diente als Positivkontrolle. Die Proteinexpression wurde per Densitometrie ermittelt und mit der β-Tubulin-Expression abgeglichen. Die Daten werden als Ratio RGS16-Proteinexpression über β-Tubulin-Expression ausgedrückt ±SEM (B). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Präparationen in Doppelbestimmung (* $p < 0,05$ vs. NaCl).

3.4 Einfluss von LPS nach *in vivo* Applikation auf die Proteinexpression von $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ im adulten Rattenherzen

Die chronische Herzinsuffizienz ist mit einer erhöhten Expression der $G\alpha_i$-Untereinheit assoziiert. Die Expression der $G\alpha_s$-Untereinheit bleibt hiervon unbeeinflusst (Feldman et al. 1988, Kompa et al. 1999, Neumann et al. 1988). Bei einer Sepsis geht das akute Herzversagen ebenfalls mit einer Erhöhung der $G\alpha_i$-Untereinheit einher (Böhm et al. 1995). Um den Einfluss von LPS auf die G-Proteinexpression am Rattenherzen zu untersuchen, wurden die Proteinexpressionen von $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ nach *in vivo* Applikation von LPS untersucht. Die $G\alpha_i$-Expression wurde unter LPS *in vivo* nach 72 h induziert (Abbildung 6). Nach 6 h bzw. 24 h Behandlung mit LPS zeigte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied in der $G\alpha_i$-Expression. Im Gegensatz dazu ergab sich nach 6 h, 24 h bzw. 72 h kein Unterschied der $G\alpha_s$- und $G\alpha_q$- Expression in den mit LPS behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.





C

	Kontrolle	**6 h**	**24 h**	**72 h**
Gαi	NaCl	0,52±0,04 (4)	0,52±0,11 (4)	0,53±0,02 (4)
	LPS	0,48±0,06 (4)	0,58±0,08 (5)	0,76±0,01 (5)
Gαs	NaCl	0,41±0,03 (4)	0,41±0,11 (4)	0,41±0,04 (4)
	LPS	0,36±0,03 (4)	0,52±0,08 (5)	0,41±0,04 (5)
Gαq	NaCl	0,39±0,18 (4)	0,17±0,02 (4)	0,24±0,04 (4)
	LPS	0,35±0,13 (4)	0,16±0,08 (4)	0,24±0,12 (4)

Abbildung 6: G-Proteinexpression in adulten Rattenherzen nach 6 h, 24 h bzw. 72 h Behandlung mit LPS. Die Membranproteine wurden isoliert und die Proteinexpression wurde mittels Westernblot-Analyse unter Verwendung eines spezifischen $G\alpha_i$, $G\alpha_s$ und $G\alpha_q$ ermittelt (A). Die Proteinexpression wurde per Densitometrie quantifiziert und mit der β-Tubulin-Expression abgeglichen. Die $G\alpha_i$-Proteinexpression wird unter LPS *in vivo* nach 72 h induziert. Nach 6 h bzw. 24 h Behandlung mit LPS zeigt sich im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Unterschied in der $G\alpha_i$-Expression. Die $G\alpha_s$- und $G\alpha_q$-Proteinexpression zeigt nach 6 h, 24 h bzw. 72 h im Vergleich keinen Unterschied zur Kontrollgruppe (B). Die Daten werden als Ratio $G\alpha_i$-, $G\alpha_s$- und $G\alpha_q$-Proteinexpression über β-Tubulin-Expression ausgedrückt ±SEM (C). Die Daten stammen, wie in Klammern angegeben, aus vier bzw. fünf unabhängigen Präparationen (*$p < 0.05$ vs. NaCl).

4 Diskussion

Primäre Zellkulturen mit neonatalen Rattenkardiomyozyten stellen ein etabliertes Modellsystem dar, um physiologische sowie pathologische Prozesse in Kardiomyozyten zu untersuchen (Thandroyen et al. 1991). Obwohl neonatale Kardiomyozyten sich aufgrund ihres embryonalen Genexpressionsmusters von adulten und ausdifferenzierten Zellen unterscheiden, besitzen sie zum einen eine vergleichbare Übertragung des glykolytischen und oxidativen Metabolismus, zum anderen enthalten sie normal funktionierende Komponenten des kontraktilen und sarkoplasmatischen Retikularapparates (Colquhoun et al. 1981, McMillin et al. 1994). Somit erfüllt dieses Modell die relevanten, physiologischen Voraussetzungen, um den Einfluss von Zytokinen bzw. Endotoxin auf die Signaltransduktion zu untersuchen. Eine Kultivierung adulter Kardiomyozyten ist aufgrund ihres hohen Differenzierungsgrades methodisch deutlich schwieriger.

Die Veränderung der Expression von RGS16-Protein sowie anderen RGS-Proteinen wurde in adulten Wistar Ratten analysiert. Die Versuche erfolgten *in vivo* nach Applikation von Endotoxin (LPS) und dienten als Modell des septischen Schocks. Dieses Modell beschreibt eine Veränderung der RGS16-Proteinexpression nach Stimulation mit LPS. Beobachtet wurde ein transienter Anstieg der RGS16 mRNA nach 6 h und ein nachfolgender Anstieg der RGS16-Proteinexpression nach 24 h (Patten et al. 2002). Ein Anstieg der RGS16 mRNA nach Applikation mit LPS zeigte sich auch in Studien an Schweineherzen (Panetta et al. 1999).

Ähnlich wie bei Patienten mit Katecholamin-refraktärem Schocksyndrom, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Expression von $G\alpha_i$ 72 h nach Applikation von LPS induziert wird (Böhm et al. 1995). In Übereinstimmung mit anderen

Herzinsuffizienzmodellen der Ratte (Kompa et al. 1993) war keine Veränderung der Proteinexpression von $G\alpha_s$ festzustellen.

In dieser Arbeit wurde an isolierten, neonatalen Rattenkardiomyozyten exemplarisch der direkte Effekt von LPS auf die RGS16-Proteinexpression in Myozyten untersucht. Die RGS16-Proteinexpression wird innerhalb von 24 h durch LPS transient induziert. Diese Ergebnisse decken sich mit der Beobachtung, dass im Herzgewebe adulter, *in vivo* stimulierter Ratten mit LPS RGS4 und RGS16 transient innerhalb von 24 h induziert werden. Nach 72 h ist die Expression unter LPS-Behandlung *in vivo* zwar noch signifikant erhöht, jedoch insgesamt rückläufig (Patten et al. 2002). Die Versuche in dieser Arbeit erfolgten in einem Kardiomyozytenmodell neonataler Ratten. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann vermutet werden, dass die Veränderung der RGS16-Expression in den Kardiomyozyten stattfinden muss.

Aber auch andere durch LPS induzierte Faktoren scheinen bei der Induktion von RGS16 eine Rolle zu spielen, da RGS16-Protein in neonatalen Kardiomyozyten auch durch Inkubation mit LPS behandeltem Fibroblasten- und Endothelzellenmedium (Überstand aus Myozytenpräparation nach Abtrennung der Myozyten) induziert werden kann. Die Ergebnisse zeigen einen erhöhten Anstieg der RGS16-Proteinexpression auch noch 72 h nach Inkubation.

LPS ist einer der wichtigsten Faktoren, die zum klinischen Bild eines septischen Schocks beitragen. LPS aktivierte Zellen können ihre pathogene Wirkung durch Freisetzung sekundärer Mediatoren, wie proinflammatorische Zytokine und reaktive Sauerstoffradikale, bewirken. Viele systemische Wirkungen von LPS werden erst durch die Freisetzung von Zytokinen vermittelt. In der Progression einer Sepsis in einen septischen Schock zeigt sich zum Beispiel ein schneller Anstieg frei flottierender Zytokine wie IL-1β, TNFα, IL-6 und IFNγ. Die Induktion der iNOS ist zumindest teilweise verantwortlich für die kardiovaskuläre Dysfunktion, welche einen septischen

Schock charakterisiert (Ganster et al. 2001, Gao et al. 1997, Samardzic et al. 2001, Tanimoto et al. 2005). Es ist bereits beschrieben worden, dass kardiale Fibroblasten und Endothelzellen Zytokine freisetzen können (Ibelgaufts et al. 1992, Müller et al. 1994). Somit ist anzunehmen, dass LPS im Herzen die Freisetzung von Zytokinen und anderen Faktoren induziert und auf diese Weise auch indirekt die RGS-Expression in den Myozyten beeinflusst. Die Daten dieser Arbeit weisen daraufhin, dass die sekundäre Freisetzung der Zytokine vermutlich über Endotoxin aus Fibroblasten und Endothelzellen des Herzgewebes erfolgt. Dies konnte auch in einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe bestätigt werden, welche gezeigt hat, dass IL-1β und TNFα direkt durch LPS-Stimulation im Herzgewebe sezerniert werden (Patten et al. 2002).

Zuvor konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, dass LPS im Herzgewebe adulter Ratten u.a. die mRNA-Expression der Zytokine IL-1β, TNFα, IL-6 und IFNγ induziert (Patten et al. 2001). Für diese proinflammatorischen Zytokine wurden bereits in der Literatur negativ inotrope Effekte am Herzen beschrieben (Finkel et al. 1992, Granton et al. 1997, Kinugawa et al. 1994, Kumar et al. 1996, Müller-Werdan et al. 1996, Müller-Werdan et al. 1998, Natanson et al. 1989, Stein et al. 1996, Sun et al. 1998). Deshalb wurde die Wirkung dieser Zytokine auf die RGS16-Proteinexpression untersucht.

Sowohl rekombinantes IL-1β als auch TNFα konnten die Proteinexpression von RGS16 induzieren, während IL-6 und IFNγ keinen Einfluss auf die RGS16-Expression hatten. Nach Stimulation mit IL-1β bzw. TNFα zeigte sich nach 72 h eine gesteigerte RGS16-Proteinexpression. Bei einer Stimulation mit LPS zeigte sich schon nach 24 h ein Anstieg der RGS16-Proteinexpression, nach 72 h war allerdings kein signifikanter Effekt mehr nachweisbar.

Mittlerweile liegen weitere Untersuchungsergebnisse unserer Arbeitsgruppe vor, die zeigen, dass die LPS induzierte RGS16-Expression durch einen spezifischen IL-1β

Rezeptor-Antagonist unterbunden werden kann. Im Unterschied dazu, zeigte eine Blockierung des TNFα keine Wirkung. Die TNFα-mediierte RGS16-Expression konnte auch durch IL-1ra blockiert werden, was daraufhin deutet, dass TNFα-Effekte durch IL-1β gesteuert werden (Patten et al. 2003). Wie bereits auch in anderen biologischen Systemen beschrieben (Danis et al. 1991, Libby et al. 1986), scheint IL-1β durch TNFα induziert zu werden und nimmt somit eine regulatorische Schlüsselfunktion ein. Eine herausragende Rolle von IL-1 wurde auch in Arbeiten demonstriert, die zeigten, dass eine *in vivo* Behandlung mit IL-1ra Hypotension und Gewebeschäden während eines septischen Schocks in einem Tiermodell blockiert (Wakabayashi et al. 1991). Deshalb scheint es wahrscheinlich, dass IL-1β einer der Hauptmediatoren im LPS induziertem Herzversagen bei Patienten mit septischem Schocksyndrom ist.

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit kann angenommen werden, dass LPS einerseits direkt innerhalb von 24 h in den Kardiomyozyten die RGS16-Expression aktiviert, andererseits eine indirekte, später einsetzende LPS induzierte Aktivierung von RGS16 durch die Freisetzung von Zytokinen auslöst. Dies kann ein Erklärungsansatz dafür sein, dass nach 72 h sowohl mit LPS stimuliertem Fibroblastenmedium, als auch durch direkte Zugabe von Zytokinen eine gesteigerte RGS16-Expression in isolierten Kardiomyozyten nachweisbar ist. Auch im Ganzherzmodell ist nach *in vivo* LPS-Behandlung sowohl eine kurzfristige, als auch eine bis 72 h anhaltende gesteigerte RGS16-Expression nachweisbar (Patten et al. 2002). Hingegen konnte durch Gabe von LPS in den isolierten Myozyten nur ein kurzzeitiger Anstieg von RGS16 beobachtet werden, welcher vermutlich durch die geringe Halbwertzeit des verwendeten LPS (16 h) begründet ist.

Im Kontext eines septischen Herzversagens werden hier exemplarisch mehrere Wirkmechanismen aufgezeigt. Der negativ inotrope Effekt im Rahmen einer Sepsis scheint durch eine Induktion der RGS-Proteine im Herzen angetrieben zu werden, die

sich alternierend auf die G-Protein-vermittelte Signalkaskade auswirken. Die Genexpression von nahezu allen RGS-Proteinen kann im Säugetierherz nachgewiesen werden (Kardestuncer et al. 1998, Mittmann et al. 2002). Aus der Familie der RGS-Proteine wurde das RGS16-Protein als bedeutender Vertreter ausgewählt. Die Untersuchungen in dieser Arbeit finden in einem Kardiomyozytenmodell neonataler Ratten statt, um die Vorgänge speziell in den Kardiomyozyten untersuchen zu können.

Die Regulation der Herzaktivität hängt von der Fähigkeit extrazellulärer Signale ab, intrazelluläre Ereignisse in Myozyten zu stimulieren und somit die mechanische Funktion zu steuern. Die Fähigkeit der Zelle Antworten auf endogene Hormone oder exogene Effektoren zu modulieren, ist im Rahmen pathophysiologischer Krankheitsstadien wichtig (Sun et al. 1998).

Unter den verschiedenen Toxinen, welche von pathogenen Bakterien erzeugt werden, wurde das Endotoxin gramnegativer Bakterien als zentrales Toxin in der Entstehung einer Sepsis und eines septischen Schocks identifiziert. Das Endotoxin ist primärer Mediator der septischen Kardiomyopathie (Müller-Werdan et al. 1998). Es wurde nachgewiesen, dass Endotoxin Verursacher systemischer Entzündungsprozesse nach kardiopulmonärer Bypass-Operation während einer Herzoperation ist (Menasche et al. 1995). Zusätzlich wird Endotoxin als pathogener Faktor des chronischen Herzversagens diskutiert (Anker et al. 1997). Die kürzlich entdeckten RGS-Proteine als Regulatoren der G-Protein-vermittelten Signalübertragung, bieten neue Erklärungsversuche der Signalvermittlung während eines septischen Geschehens. Die G-Proteine, die durch RGS-Proteine reguliert werden, erzeugen schnelle, physiologische Antworten, wie vagale Senkung der Herzfrequenz (Gi) und Kontraktion der vaskulären, glatten Muskulatur (Gq). RGS-Proteine können die intrazellulären Signalkaskaden, welche diese physiologischen Antworten erzeugen, terminieren und

besitzen deshalb höchstwahrscheinlich ein entscheidende Schlüsselrolle in der kardiovaskulären Regulation (Farfel et al. 1999). In dieser Studie werden die in der Literatur bekannten direkten und indirekten Effekte von LPS, hier exemplarisch auf die Expression von RGS16, als ein beschriebenes RGS-Protein im Herzen, im Rahmen eines septischen Geschehens analysiert und diskutiert. Dies bietet neue Erklärungsansätze für die negativ inotropen Effekte in Kardiomyozyten, die als Verusacher des kardiodepressiven Effektes während eines septischen Schocks vermutet werden (Stein et al. 1996). Circa 50% aller Pharmazeutika wirken auf G-Protein vermittelte Rezeptoren (GCPRs). RGS-Proteine als Regulatoren der G-Protein vermittelten Signalübertragung stellen somit potente pharmazeutische Eingriffsmöglichkeiten dar, um die Signalkaskade im Rahmen einer Sepsis beeinflussen zu können (Gudermann et al. 1995, Johnson et al. 2003).

5 Zusammenfassung

Im Verlauf eines septischen Schocks wird häufig ein Herzversagen beobachtet, das mit einer Dysfunktion der Myokardkontraktilität einhergeht. G-Protein vermittelte Signaltransduktionswege, insbesondere die Aktivierung von RGS-Proteinen, scheinen bei diesem Pathomechanismus eine entscheidende Rolle zu spielen. Unsere Arbeitsgruppe konnte an einem *in vivo* Rattenmodell zeigen, dass LPS RGS4 und RGS16 am Herzen induziert. Diese Arbeit zeigt in neonatalen Rattenkardiomyozyten, dass RGS16 rasch durch Endotoxin induziert wird. Hierbei scheint Endotoxin sowohl direkt in Kardiomyozyten die RGS16-Expression zu induzieren, als auch indirekt durch Freisetzung von Mediatoren aus Endothelzellen und Fibroblasten. Insbesondere proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1β und TNFα scheinen hier wichtige Mediatorenfunktionen zuzukommen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass IL-1β und TNFα, jedoch nicht IL-6 und IFNγ, in neonatalen Rattenkardiomyozyten ebenfalls direkt die Expression von RGS16 induzieren. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen dazu bei, die inflammatorischen Induktionswege besser zu verstehen, welche bei der Entstehung des myokardialen Pumpversagens eine Rolle spielen könnten.

6 Literaturverzeichnis

Adams HR, Baxter CR, Parker JL, Watts NB. Contractile function and rhythmicity of cardiac preparations from *E. coli* endotoxin-shocked guinea pigs. Circ Shock. 1984;13:241-254.

Anker SD, Clark AL, Kemp M, Salsbury C, Teixeira MM, Hellewell PG et al. Tumor necrosis factor and steroid metabolism in chronic heart failure: possible relation to muscle wasting. J Am Coll Cardiol. 1997;30:997-1001.

Archer LT, Benjamin BA, Beller-Todd BK, Bracket DJ, Wilson MF, Hinshaw LB. Does LD100 *E. coli* shock cause myocardial failure? Circ Shock. 1982;9:7-16.

Arshavsky VY, Pugh EN, Jr. Lifetime regulation of G protein-effector complex: emerging importance of RGS proteins. Neuron. 1998;20:11-14.

Baumgarten G, Knuefermann P, Nozaki N, Sivasubramanian N, Mann DL, Vallejo JG. *In vivo* expression of proinflammatory mediators in the adult heart after endotoxin administration: the role of toll-like receptor-4. J Infect Dis. 2001;183:1617-24.

Böhm M, Kirchmayr R, Gierschik P, Erdmann E. Increase of myocardial inhibitory G-proteins in catecholamine-refractory septic shock or in septic multiorgan failure. Am J Med. 1995;98:183-86.

Cain BS, Meldrum DR, Dinarello CA, Meng X, Joo KS, Banerjee A, Harken AH. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta synergistically depress human myocardial function. Crit Care Med. 1999;27(7):1309-18.

Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB et al. Selective regulation of G-alpha (q/11) by an RGS domain in the G-protein-coupled receptor kinase, GRK2. J Biol Chem. 1999;274:34483-92.

Chan RK, Otte CA. Physiological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants supersensitiv to G1 arrest by a factor and alpha factor pheromones. Moll Cell Biol. 1982;2:21-29.

Colquhoun D, Neher E, Reuter H, Stevens CF. Inward current channels activated by intracellular Ca in cultured cardiac cells. Nature. 1981;294:7522-54.

Danis VA, Franic GM, Rathjen DA, Brooks PM. Effects of granulocyte-macrophage colony- stimulating factor (GM-CSF), IL-2, IFN-gamma, TNF-alpha and IL-6 on the production of immunoreactive IL-1 and TNF-alpha by human monocytes. Clin Exp Immunol. 1991;85:143-150.

Dohlman HG, Apaniesk D, Chen Y, Song J, Nusskern D. Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. 1995;15:3635-43.

Dohlman HG, Thorner J. RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. J Biol Chem. 1997;272:3871-74.

Eghbali M, Czaja MJ, Zeydel M, Weiner FR, Zern MA, Seifert S et al. Collagen chain mRNAs in isolated heart cells from young and adult rats. J Moll Cell Cardiol. 1988;20:267-76.

Farfel Z., Bourne H. R., Iiri T. The expanding spectrum of G protein diseases. N Engl J Med. 1999; 340:1012-1020.

Finkel MS, Oddis CV, Jacob TD, Watkins SC, Hattler BG, Simmons RL. Negative inotropic effects of cytokines on the heart mediated by nitric oxide. Science. 1992;257:387-89.

Feldman AM, Cates AE, Veazey WB, Hershberger RE, Bristow MR, Baughman KL. Increase of the 40,000-mol wt pertussis toxin substrate (G protein) in the failing human heart. J Clin Invest. 1988;82:189-97.

Ganster RW, Taylor BS, Shao L, Geller DA. Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat 1 and NF-kappa B. Proc Natl Acad Sci USA. 2001;98:8638-43.

Gao J, Morrison DC, Parmely TJ, Russell SW, Murphy WJ. An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. J Biol Chem. 1997;272:1226-30.

Gilman AG. G proteins: transducers of receptor-generated signals. Annu Rev Biochem. 1987;56:615-49.

Gilman AG. Nobel Lecture. G proteins and regulation of adenylyl cyclase. Biosci Rep. 1995;15:65-97.

Gudermann T, Nurnberg B, Schultz G. Receptors and G-proteins as primary components of transmembrane signal transduction. Part 1. G-protein-coupled receptors: structure and function. J Mol Med. 1995;73:51-63.

Granton JT, Goddard CM, Allard MF, van Eeden S, Walley KR. Leukocytes and decreased left-ventricular contractility during endotoxemia in rabbits. Am J Respir Crit Care Med. 1997;155:1977-83.

Hess MLA, Hastillo A, Greenfield LJ. Spectrum of cardiovascular function during gramnegative sepsis. Prog Cardiovasc Dis. 1981;23:279-298.

Hung J, Lew WY. Cellular mechanisms of endotoxin-induced myocardial depression in rabbits. Circ Res. 1993;73:125-134.

Ibelgaufts H (1992). Lexikon der Zytokine. Medikon Verlag, München.

Johnson JA, Lima JJ. Drug receptor/effector polymorphisms and pharmacogenetics: current status and challenges. Pharmacogenetics. 2003;13:525-534.

Kardestuncer T, Wu H, Lim AL, Neer EJ. Cardiac myocytes express mRNA for ten RGS proteins: changes in RGS mRNA expression in ventricular myocytes and cultured atria. FEBS Lett. 1998;438:285-88.

Kinugawa K, Takahashi T, Kohmoto O, Yao A, Aoyagi T, Momomura S et al. Nitric oxide-mediated effects of interleukin-6 on [Ca2+]i and cell contraction in cultured chick ventricular myocytes. Circ Res. 1994;75:285-95.

Kompa AR, Gu XH, Evans BA, Summers RJ. Desensitization of cardiac beta-adrenoceptor signaling with heart failure produced by myocardial infarction in the rat. Evidence for the role of Gi but not Gs or phosphorylating proteins. J Mol Cell Cardiol. 1999;31(6):1185-201.

Kumar A, Thota V, Dee L, Olson J, Uretz E, Parrillo JE. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1beta are responsinle for *in vitro* myocardial cell depression induced by human septic shock serum. J Exp Med. 1996;183:949-958.

Lee BN, Adams TH. Overexpression of flbA, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of brlA and premature initiation of development. Mol Microbiol. 1994;14:323-34.

Libby P, Ordovas JM, Auger KR, Robbins AH, Birinyi LK, Dinarello CA. Endotoxin and tumor necrosis factor induce interleukin-1 gene expression in adult human vascular endothelial cells. Am J Pathol. 1986;124:179-185.

Lohse MJ. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. Biochim Biophys Acta. 1993;1179:171-88.

Lohse MJ, Krasel C, Winstel R, Mayor F, Jr. G-protein-coupled receptor kinases. Kidney Int. 1996;49:1047-52.

McMillin JB, Wang D, Witters LA, Buja LM. Kinetic properties of carnitine palmitoyltransferase I in cultured neonatal rat cardiac myocytes. Arch Biochem Biophys. 1994;312:375-84.

Mittmann C, Chung CH, Eschenhagen T et al. Subtype specific upregulation of RGS proteins in failing human ventricular myocardium. Z Kardiol. 2000;89(Suppl.5):108.

Mittmann C, Chung CH, Hoppner G, Michalek C, Nose M, Schuler C, Schuh A, Eschenhagen T, Weil J, Pieske B, Hirt S, Wieland T. Expression of ten RGS proteins in human myocardium: functional characterization of an upregulation of RGS4 in heart failure. Cardiovasc Res. 2002;55:778-786.

Menasche P. The inflammatory response to cardiopulmonary bypass and its impact on postoperative myocardial function. Curr Opin Cardiol. 1995;10(6):597-604.

Mittmann C, Eschenhagen T, Kaspareit G et al. Expression of proteins involved in Gq/G11 mediated signalling inhuman myocardium. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1999;359(Suppl.5):R105.

Müller M, Ibelgaufts H, Kerr IM. Interferon response pathways-a paradigm for cytokine signalling? J Viral Hepat. 1994;1:87-103.

Müller-Werdan U, Reithmann C, Werdan K. Cytokines and the heart-molecular mechanisms of septic cardiomoypathy. Springer, Berlin Heidelberg New York. 1996.

Müller-Werdan U, Schuhmann H, Loppnow H, Fuchs R, Darmer D, Stadler J et al. Endotoxin and tumor necrosis factor alpha exert a similar proinflammatory effect in neonatal rat cardiomyocytes, but have different cardiodepressant profiles. J Mol Cell Cardiol. 1998;30:1027-36.

Natanson C, Eichenholz PW, Danner RL, Eichacker PQ, Hoffman WD, Kuo GC et al. Endotoxin and tumor necrosis factor challenges in dogs stimulate the cardiovascular profile of human septic shock. J Exp Med. 1989;169:823-32.

Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. Cell. 1995;80:249-57.

Neer EJ. Intracellular signalling: turning down G protein signals. Curr Biol. 1997;7:R31-R33.

Neumann J, Schmitz W, Scholz H, von Meyerinck L, Doring V, Kalmar P. Increase in myocardial Gi-proteins in heart failure. Lancet. 1988;2:936-37.

Niebauer J, Volk HD, Kemp M, Dominguez M, Schumann RR, Rauchhaus M et al. Endotoxin and immun activation in chronic heart failure: a prospective cohort study. Lancet. 1999;353:1838-42.

Panetta R, Guo Y, Magdr S, Greenwood MT. Regulators of G protein signaling (RGS) 1 and 16 are induced in response to bacterial lipopolysaccharide and stimulate c-fos promoter expression. Biochem Biophys Res Commun. 1999;259:550-556.

Parker JL, Adams HR. Development of myocardial dysfunction in endotoxin shock. Am J Physiol. 1985;248:H818-H826.

Patten M, Bünemann J, Thoma B, Kramer E, Thoenes M, Stube S. Endotoxin induces desensitization of cardiac endothelin-1 receptor signaling by increased expression of RGS4 and RGS16. Cardiovasc Res. 2002;53:156-64.

Patten M, Krämer E, Bünemann J, Wenck C, Thoenes M, Wieland T et al. Endotoxin and cytokines alter contractile protein expression in cardiac myocytes *in vivo*. Pflugers Arch. 2001;442:920-927.

Patten M, Stübe S, Thoma B, Wieland T. Interleukin-1β mediates endotoxin- and tumor necrosis factor α-induced RGS16 protein expression in cultured cardiac myocytes. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2003;368:360-365.

Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. FASEB J. 1995;9:175-82.

Riddle EL, Schwartzmann RA, Bond M, Insel PA. Multi-tasking RGS proteins in the heart: the next therapeutic target? Circ Res. 2005;96:101-111.

Ross EM, Wilkie TM. GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. Annu Rev Biochem. 2000;69:795-827.

Rubin LJ, Keller RS, Parker JL, Adams HR. Contractile dysfunction of ventricular myocytes isolated from endotoxemic guinea pigs. Shock. 1994;2:113-120.

Samardzic T, Jankovic V, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. STAT1 is required for iNOS activation, but not IL-6 production in murine fibroblasts. Cytokine. 2001;13:179-82.

Shepherd RE, McDonough KH, Burns AH. Mechansim of cardiac dysfunction in hearts from endotoxin-treated rats. Circulatory shock. 1986;19:371-384.

Stein B, Frank P, Schmitz W, Scholz H, Thoenes M. Endotoxin and cytokines induce direct cardiodepressive effects in mammalian cardiomyocytes via induction of nitric oxide synthase. J Mol Cell Cardiol. 1996;28:1631-39.

Sun X, Delbridge LM, Dusting GJ. Cardiodepressant effects of interferon-gamma and endotoxin reversed by inhibition of NO synthase 2 in rat myocardium. J Mol Cell Cardiol. 1998;30:989-97.

Tanimoto K, Saito Y, Hamanaka I, Kuwahara K, Harada M, Takahashi N et al. SOCS1/JAB likely mediates the protective effect of cardiotropin-1 against

lipopolysaccharide-induced left ventricular dysfunction *in vivo*. Circ J. 2005;69:1412-17.

Tang CM, Insel PA. GPCR expression in the heart; “new” receptors in myocytes and fibroblasts. Trends Cardiovasc Med. 2004;14:94-99.

Tao S, McKenna TM. *In vitro* endotoxin exposure induces contractile dysfunction in adult rat cardiac myocytes. Am J Physiol. 1994;267:H1745-H1752.

Thandroyen FT, Morris AC, Hagler HK, Ziman B, Pai L, Willerson JT et al. Intracellular calcium transients and arrhythmia in isolated heart cells. Circ Res. 1991;69:810-819.

Wakabayashi G, Gelfand JA, Burke JF, Thompson RC, Dinarello CA. A specific receptor antagonist for interleukin 1 prevents *Escherichia coli*-induced shock in rabbits. FASEB J. 1991;5:338-343.

Weiner JL, Guttierez-Steil C, Blumer KJ. Disruption of receptor-G protein coupling in yeast promotes the function of an SST2-dependent adaptation pathway. J Biol Chem. 1993;268:8070-8077.

Wieland T, Chen CK. Regulators of G protein signalling: a novel protein family involved in timely deactivation and desensitization of signalling via heterotrimeric G proteins. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1999;360:14-26.

Danksagung

Herrn Professor Dr. med. T. Meinertz und Frau Dr. med. M. Patten danke ich für die Vergabe der Promotionsarbeit sowie die vorbildliche Anleitung und stets hilfreiche Unterstützung bei der Ausarbeitung der Promotion. Insbesondere Frau Dr. med. M. Patten möchte ich auf diesem Wege für Ihre Mühen und Anregungen im Bereich der experimentellen Forschung danken. Sie hat meinen weiteren beruflichen Werdegang stark beeinflusst.

Ganz besonders herzlich bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. med. T. Wieland für die vorbildliche Betreuung und wissenschaftliche Unterstützung während der experimentellen Phase.

Herrn Prof. Dr. med Dr. h.c. H. Scholz möchte ich herzlich danken für die Möglichkeit, den Laborbereich des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätskinikums Hamburg-Eppendorf für meine experimentellen Arbeiten zu nutzen.

Bei Elisabeth Krämer und Anna Steenpaß bedanke ich mich für die Einführung und Einarbeitung in die diversen Labortechniken und ihre mentale Unterstüzung.

Den gesamten Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätskinikums Hamburg-Eppendorf möchte ich für die stete Unterstützung und wissenschaftliche Anregung danken.

Ein besonderes Dankeschön geht an meine Familie und meine Oma, die mich immer unterstützt haben.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht an einen Fachvertreter einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um eine Zulassung zur Promotion beworben habe.

…….

Bryan R. Thoma