

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie  
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Professor Dr. med. T. Eschenhagen

**Bedeutung des Organischen-Anionen-Transport-Polypeptides  
2B1 für die Wirkung von Atorvastatin auf Herzmuskelzellen**

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
im Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Wojciech Piotr Palinkiewicz

aus Bielitz (Polen)

Hamburg, 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät  
der Universität Hamburg am 9.11.2010

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Prüfungsausschuss 2. Gutachter: Prof. Dr. S. Baldus

Prüfungsausschuss 3. Gutachter: Prof. Dr. H. Ehmke

Diese Arbeit ist meiner Familie gewidmet.



<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Koronare Herzerkrankung	1
1.2	Therapeutische Bedeutung und Wirkmechanismus von Statinen	2
1.3	Heterotrimere G-Proteine	5
1.4	Heterotrimere G-Proteine im Herzen	6
1.5	Transportmechanismen der Statine	8
1.5.1	Die OATP – Familie	8
1.5.2	Organisches Anionen-Transport-Polypeptid 2B1 (OATP2B1)	10
1.5.3	Die ABC – Familie	12
1.6	Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit	13
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1	Klonierung	14
2.1.1	Plasmid Vektoren	14
2.1.2	Insert	14
2.1.3	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	14
2.1.4	Agarosegelelektrophorese	14
2.1.5	Gelaufreinigung von DNA	15
2.1.6	Fällen von DNA	15
2.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten	15
2.1.8	Herstellung von LB-Medium und LB-Agarplatten	15
2.1.9	Transformation	16
2.1.10	Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation	16
2.1.11	Elektroporation	16
2.1.12	Mini-Plasmidpräparation	17
2.1.13	Maxi-Plasmidpräparation	17

2.2	Zellkultur	17
2.2.1	Zelllinien und Nährmedien	17
2.2.2	Passagierung	18
2.2.3	Kultivierung von Herzmuskelzellen	18
2.2.4	Kryokultur	19
2.2.5	Transfektion	19
2.2.6	Stabile Transfektion	19
2.2.7	Behandlung von Zellen mit Atorvastatin	19
2.3	Herstellung eines rekombinanten Adenovirus	20
2.3.1	Adenovirale Expressionssysteme	20
2.3.2	Homologe Rekombination	21
2.3.3	Transfektion von HEK293A Zellen	22
2.3.4	Ernte virusinfizierter Zellen	22
2.3.5	Präparation eines hochtitrigen Virus-Stocks	22
2.3.6	CsCl Gradient zur Adenovirusaufreinigung und -konzentration	23
2.3.7	Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren	24
2.4	Proteinbiochemie	24
2.4.1	Herstellung von Zelllysaten	24
2.4.2	Proteinbestimmung nach Bradford	25
2.4.3	Diskontinuierliche SDS Polyacrylamidgelelektrophorese	26
2.4.4	Western Blot	27
2.5	Transportassay	28
2.5.1	Aufnahme von <sup>3</sup> H-Estronsulfat unter Atorvastatin in immortalen Zelllinien	28

2.5.2	Aufnahme von <sup>3</sup> H-Estronsulfat unter Atorvastatin in humanem Herzgewebe und im Rattengewebe	29
2.5.3	Szintillationszählung	29
2.6	Zellfixierung, konfokale Lasermikroskopie	29
2.6.1	Fixierung adhärenter Zellen	29
2.7	Statistik	30
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>31</b>
3.1	Herstellung des Adenovirus-AdGFP/OATP2B1	31
3.1.1	Klonierung der Plasmide	31
3.1.2	Transfektion des AdGFP/OATP2B1 in HEK293A Zellen	35
3.1.3	OATP2B1 Virusherstellung und –gewinnung	36
3.1.4	Titerbestimmung des OATP2B1 Adenovirus	37
3.2	Etablierung einer transfizierten MDCK II Zelllinie	39
3.2.1	Transfektion der MDCK II WT Zellen	39
3.2.2	Selektion	40
3.2.3	Expressionskontrolle der stabilen Zelllinie	40
3.3	Lokalisation von OATP2B1	41
3.3.1	Immunfluoreszenz von MDCK II Zellen	41
3.3.2	Immunfluoreszenz von Herzmuskelzellen neonataler Ratten	43
3.4	Behandlung von Zellen mit Atorvastatin	44
3.4.1	Veränderung der Zellmorphologie in MDCK II Zellen nach Atorvastatinzugabe	44
3.4.2	Veränderung der OATP2B1 Expression in Herzmuskelzellen und der Zellmorphologie nach Atorvastatinzugabe	48
3.5	Wirkung von Atorvastatin auf die $\beta$ -adrenerge Signalkaskade	52

3.5.1	Lokalisation heterotrimerer G-Proteine unter Atorvastatin	52
3.6	Funktionelle Untersuchungen des OATP2B1	54
3.6.1	Transportassay in MDCK II Zellen	54
3.6.2	Transportassay in OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen neonataler Ratten	55
3.6.3	Transportassay im humanen Herzgewebe	56
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>58</b>
4.1	Generierung einer stabilen Zelllinie als Grundlage für weitere Untersuchungen von OATP2B1	58
4.2	Auswahl des adenoviralen Expressionssystems als Methode	59
4.3	Auswirkungen von Atorvastatin auf MDCK II Zellen und Herzmuskelzellen	60
4.4	Bedeutung des OATP2B1 für die Wirkung von Atorvastatin	66
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>70</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>72</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>80</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>81</b>
<b>9.</b>	<b>Eidesstattliche Erklärung</b>	<b>82</b>

## Abkürzungsverzeichnis

---

$^3\text{H}$	Tritium
A	Ampere
ABC	ATP-Binding Cassette
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
Ator	Atorvastatin
AV	Adenovirus
bp	Basenpaar
BSA	Bovine Serum Albumin
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Ci	Curie
CMV	Zytomegalie Virus
DHEAS	Dehydroepiandrosteronsulfat (5-Androsten-3 $\beta$ -ol-17-on Sulfat)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
E3S	Estron-3-Sulfat (1,3,5(10)- Estratrien-3-ol-17-on Sulfat)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FPP	Farnesylpyrophosphat
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GGPP	Geranylgeranylpyrophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HDL	High Density Lipoprotein
HMG-CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzym A
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
KHK	Koronare Herzerkrankung
LB	Lurie Broth Medium
LDH	Laktatdehydrogenase

## Abkürzungsverzeichnis

---

LDL	Low Density Lipoprotein
min	Minute
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger RNA
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
n	Anzahl
ng	Nanogramm
OATP	Organisches Anionen-Transport-Polypeptid
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA	Proteinkinase A
PLB	Phospholamban
PP	Pyrophosphat
rpm	Rounds per minute
SDS	Natriumdodecanylsulfat
SDS PAGE	SDS Polyacrylamidgelelektrophorese
SREBP	Sterol Regulatory Element Binding Protein
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
IU	Internationale Einheit
UTR	Untranslatierte Region
WT	Wildtyp
v/v	Volumen/Volumen

# 1. Einleitung

## 1.1 Koronare Herzerkrankung

In der Todesursachenstatistik der Industrienationen sind Herzerkrankungen führend auf Platz eins. In der Bundesrepublik war im Jahr 2007 eine Erkrankung des Herzkreislaufsystems bei ca. 359.000 Menschen todesursächlich, was ca. 44% aller Todesfälle in Deutschland ausmachte. Betrachtet man die Statistiken bezogen auf alle Herzerkrankungen, nehmen chronische ischämische Myokarderkrankungen (9,5% aller Verstorbenen), gefolgt vom akuten Myokardinfarkt (7,3% aller Verstorbenen), von der Herzinsuffizienz (5,8% aller Verstorbenen) und Arteriosklerose (1,3% aller Verstorbenen) den Spitzenplatz ein (Statistisches Bundesamt, 2007).

Die koronare Herzerkrankung ist die Manifestation der Arteriosklerose an den Herzkranzarterien, die zu einem Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffversorgung führt. Die Frühstadien der Erkrankung sind in der Regel mit keinen klinischen Symptomen vergesellschaftet, obwohl bereits Störungen der endothelialen Funktion und Lipideinlagerungen in die Gefäßwand vorliegen (Stary et al. 1995; Guyton et al. 2002). Im fortgeschrittenen Stadium tritt mit zunehmender Gefäßstenose eine Unterversorgung des abhängigen Herzmuskelgewebes auf, die sich klinisch meist als stabile Angina pectoris äußert. Bei älteren Patienten oder Diabetikern kann die myokardiale Ischämie klinisch stumm bleiben (Davies et al. 2001). Krisenhafte akute Myokardischämien in Ruhe sind in der Regel Folge einer Plaqueruptur bzw. Plaqueeosion mit nachfolgender Bildung eines Thrombus, der das betroffene Gefäß ganz verschließt, sowie zu einem akuten Myokardinfarkt, oder zu einer hochgradigen Reduktion des Blutflusses, der instabilen Angina pectoris führen kann (Davies et al. 2000). Neben der Plaqueruptur können Vasospasmen (Tousoulis et al. 2002) und koronare Entzündungsvorgänge (Libby et al. 2002 und 2003) eine myokardiale Ischämie triggern. Klinisch äußern sich diese pathophysiologischen Vorgänge als so genanntes akutes Koronarsyndrom (Braunwald et al. 1998), welches einen Myokardschaden nach sich ziehen kann. In 54 - 70% der Fälle führt die koronare Herzerkrankung zu einer Herzinsuffizienz, der Unfähigkeit des Herzens ein genügendes Herzzeitvolumen für den Bedarf des Organismus aufrecht zu erhalten. (McMurray et al. 2000).

Man unterscheidet zwischen nicht beeinflussbaren und beeinflussbaren Risikofaktoren. Zu den nicht beeinflussbaren Risikofaktoren gehören zum Beispiel Alter, Geschlecht und genetische Prädispositionen. Zu den beeinflussbaren Faktoren gehören die Hyperlipidämie, arterielle Hypertonie, Nikotinabusus, Diabetes mellitus, Adipositas,

Bewegungsmangel und psychosoziale Faktoren. Dabei wirken die einzelnen Risikofaktoren nicht nur additiv, sondern erhöhen das kardiovaskuläre Risikopotential überproportional.

Die leitliniengerechte Therapie der koronaren Herzerkrankung besteht aus einer nicht medikamentösen und einer medikamentösen Therapie. Die nicht medikamentöse Therapie besteht aus einer Änderung des Lebensstils, d.h. aus einer kaloriengerechten, ballaststoffreichen und fettarmen Diät, regelmäßigem körperlichem Training, sowie einem Verzicht auf Nikotin. Das koronare Risiko sowie die Letalität und Morbidität können sowohl durch eine zielgerichtete Ernährungsumstellung als auch durch ein regelmäßiges körperliches Training signifikant gesenkt werden (Schuler et al. 1992; De Lorgeril et al. 1999; Wannamethee et al. 2000). Die medikamentöse Therapie besteht aus der Gabe von Statinen, Betablockern, Nitraten, Kalziumkanalblockern, ACE-Hemmern sowie Thrombozytenaggregationshemmern. Aufgrund der positiven Effekte, wie Stabilisierung arteriosklerotischer Plaques und Reduktion endothelialer Dysfunktionen nehmen die Statine in der Therapie der koronaren Herzkrankheit (KHK) eine wichtige Rolle ein (LaRosa et al. 1999).

### **1.2 Therapeutische Bedeutung und Wirkmechanismus von Statinen**

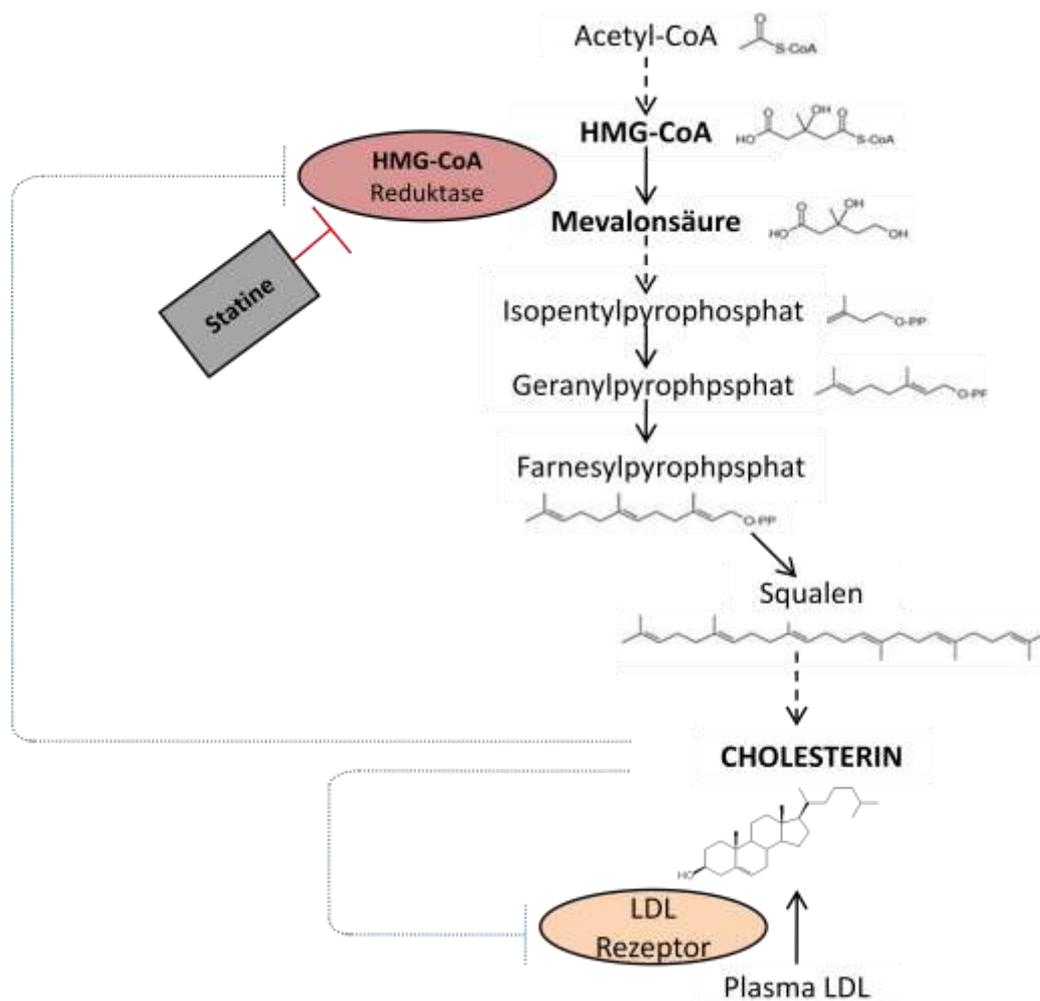
Als erster Wirkstoff aus der Substanzklasse der 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA Reduktase Inhibitoren (HMG-CoA Reduktase Inhibitoren; Statine) war Mevastatin in den 70er Jahren aus *Penicillium*-Pilzen isoliert worden (Endo et al. 1976). Im Jahr 1987 wurde Lovastatin aus *Aspergillus*-Pilzen, strukturell mit dem Mevastatin verwandt, entdeckt (Henwood et al. 1988). Weiterhin folgten semisynthetische Derivate wie Simvastatin, Pravastatin und vollsynthetische Substanzen wie Fluvastatin und Atorvastatin. Ihren Einsatzort fanden Statine primär in der Behandlung von Dyslipidämien, da sie effektiv zur Senkung von LDL-Cholesterin- und Triglycerid-Plasmaspiegel führten. Als in klinischen Studien ein enger Zusammenhang zwischen Hypercholesterinämie und koronarer Herzerkrankung festgestellt wurde (Stamler et al. 1986), konnte in der 4S-Studie (Scandinavian-Simvastatin-Survival-Study-Group 1994) das Potential einer LDL-Senkung durch Statine in der Sekundärprävention der KHK nach aufgetretenem Herzinfarkt gezeigt werden. Unter Simvastatin konnte die Gesamtmortalität signifikant um 30%, beruhend auf dem Rückgang des Risikos um 42% einen Koronarherztod zu erleiden, gesenkt werden. Auch in der Primärprävention der KHK beweisen Statine im Rahmen der WOSCOP Studie (West of Scotland Coronary Prevention) ihre Wirksamkeit. Bei an Hypercholesterinämie leidenden Männern ohne bestehenden KHK senkte Pravastatin sowohl die Ereignisrate für

schwerwiegende Koronarereignisse um 33% als auch die Gesamtsterblichkeit um 22%. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass statinbehandelte Patienten im Vergleich zu mit Placebo behandelten Patienten ein deutlich geringeres Risiko für die Entstehung der KHK aufwiesen (Shepherd et al. 1995). Diese überzeugenden klinischen Ergebnisse führten dazu, dass sich in den letzten zwölf Jahren in Deutschland die Verordnungen von Statinen auf 1737 Mio. definierte Tagesdosen im Jahre 2006 nahezu verdreizehnfacht haben (Arzneiverordnungs-Report 2007).

Der Wirkmechanismus von Statinen beruht auf der Hemmung der HMG-CoA Reduktase, einem Schlüsselenzym der Cholesterinsynthese, welches die Reduktion von HMG-CoA zu Mevalonsäure katalysiert (Abbildung 1). Am Hauptwirkort, den Hepatozyten, kommt es zur Reduktion des Cholesterinspiegels und zur verstärkten Low Density Lipoprotein (LDL)-Rezeptorexpression. Somit können mehr LDL-Vorstufen und LDL, Transportvehikel für Cholesterin im Blut, aus dem Kreislauf in die Hepatozyten aufgenommen werden und zur Senkung des LDL-Cholesterins führen. Statine tragen außerdem zur Senkung der Triglycerid-Spiegel sowie zur Erhöhung des High Density Lipoprotein (HDL)-Plasmaspiegel bei (Igel et al. 2002).

Durch die Hemmung der Cholesterinsynthese haben Statine eine Wirkung auf die Transkriptionsfaktoren SREBP 1 und SREBP 2 (Sterol-Regulatory-Element-Binding-Proteins), welche an der Regulation der Cholesterinhomöostase beteiligt sind (Roglans et al. 2002). SREB-Proteine sind bei Anwesenheit von Cholesterin an das endoplasmatische Retikulum gebunden. Kommt es in den Zellen zu einem Abfall des Cholesterinspiegels, werden SREB-Proteine proteolytisch gespalten und das N-terminale Fragment wird in den Zellkern transloziert. Es kommt zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die an der vermehrten Expression von LDL-Rezeptoren beteiligt sind (Brown et al. 1997).

HMG-CoA Reduktase Inhibitoren haben nicht nur eine hemmende Wirkung auf die Cholesterinsynthese, sondern auch auf isoprenoide Zwischenstufen wie Isopentenylpyrophosphat (Isopentenyl-PP) und Farnesylpyrophosphat (FPP) bzw. Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP). FPP und GGPP sind bei der Lipidmodifikation von verschiedenen Proteinen essenziell. Die Verankerung der heterotrimeren G-Proteine (heterotrimere GTP-bindende Proteine) an der Zellmembran beruht auf der Verknüpfung mit einem Isoprenoidrest, welcher die  $\gamma$ -Untereinheit lipophiler macht und so die Bindung ermöglicht.



**Abbildung 1: Cholesterin-Biosyntheseweg.** HMG-CoA: 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzym A; Gestrichelte Pfeile kennzeichnen nicht gezeigte Zwischenschritte. Modifiziert übernommen aus Goldstein und Brown 1990.

Die Ergebnisse der WOSCOP Studie gaben Grund zu der Annahme, dass Statine neben bereits erwähnten Hauptwirkungen auch weitere Wirkungen haben könnten, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Hemmung der Cholesterinbiosynthese stehen. Da die bei der Enzymreaktion entstehende Mevalonsäure nicht nur eine Vorläuferform des Cholesterins, sondern auch von zahlreichen nicht-steroidalen Isoprenoidverbindungen ist, könnte die Hemmung der HMG-CoA Reduktase zu vielfältigen (pleiotropen) Effekten führen. In der Tat wurden im Laufe der Jahre zahlreiche pleiotrope Effekte, die sich günstig auf die Entstehung und Progredienz der Arteriosklerose auswirken könnten, diskutiert. Zu den pleiotropen Effekten gehören die Verbesserung der Endothelfunktion durch vermehrte Expression der endothelialen NO-Synthetase (Laufs et al. 1998), verminderte Hypertrophie, die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen (Laufs et al. 1999), verbesserte Plaquestabilität und verminderte vaskuläre Entzündung durch Hemmung der Immigration von Entzündungszellen (Takemoto et al. 2001), sowie Hochregulation von Tumor Suppressor Protein 53 in

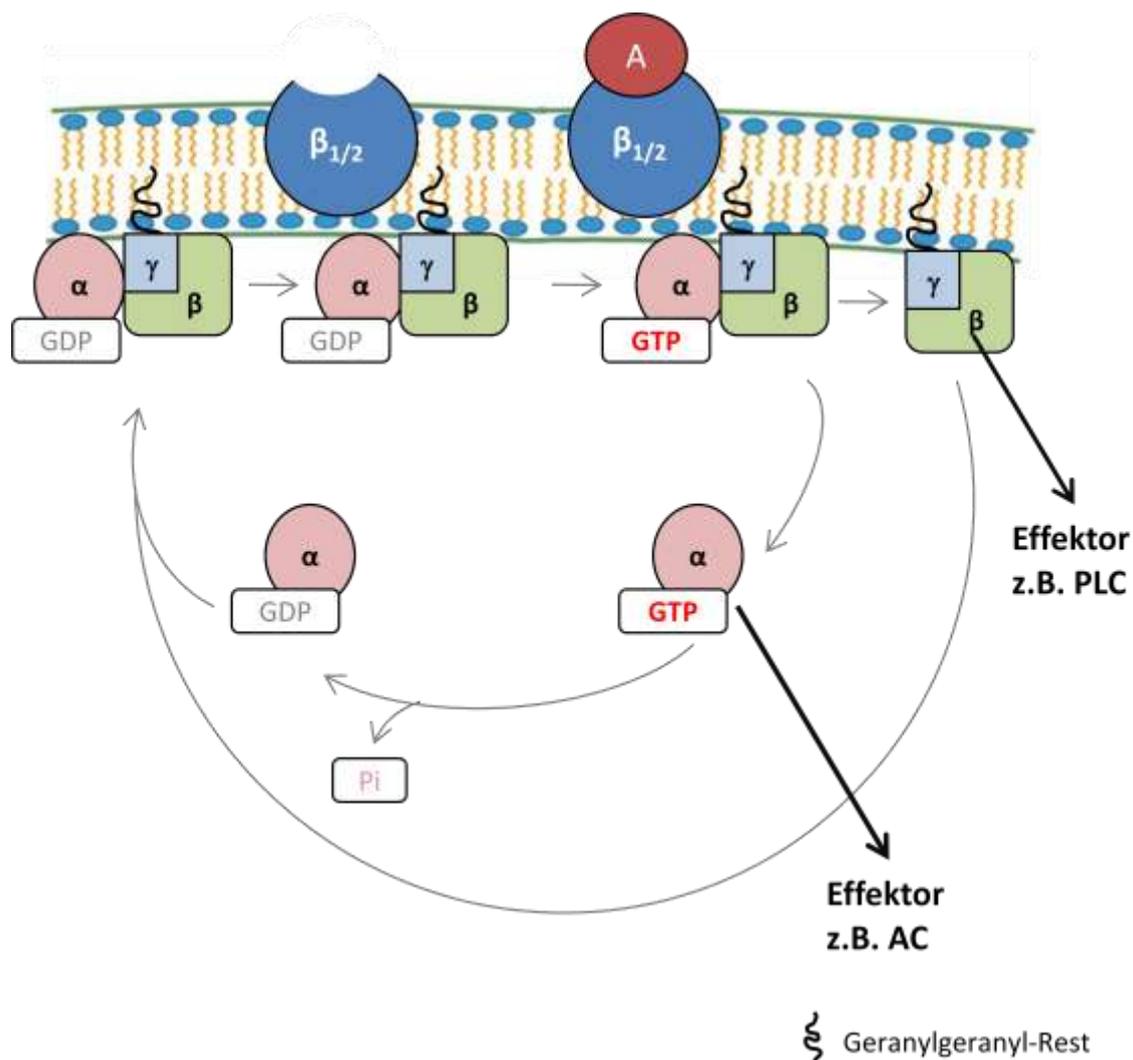
Monozyten/Makophagen, was zum programmierten Zelltod führt (Wang et al. 2009). Ein weiterer Effekt ist die Bindung von Statinen an das Integrin LFA-1 (Lymphocyte Function Associated Antigen-1) auf Leukozyten, wodurch die Hemmung der Leukozyten-Adhäsion und Extravasation in Entzündungsgebiete erklärt werden kann (Weitz-Schmidt et al. 2001). Zweifellos haben Statine hochfaszinierende Effekte, die durch *in vitro* Studien und Tiermodelle gut dokumentiert sind. Daten, die die klinische Bedeutung der pleiotropen Effekte beim Menschen beweisen, gibt es jedoch bis jetzt nicht.

Aufgrund der Beeinflussung der Produktion von Isoprenoiden könnten Statine auch zu verminderter Aktivität oder falscher Lokalisation der von der Isoprenylierung abhängigen Proteine, wie zum Beispiel der heterotrimeren G-Proteine, die in der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade eine entscheidende Rolle spielen, führen.

### 1.3 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Die  $\alpha$ -Untereinheiten der G-Proteine besitzen eine Bindungsstelle für Guanosintriphosphat (GTP) bzw. Guanosindiphosphat (GDP) und haben eine GTPase-Aktivität, was für den Aktivierungszyklus der heterotrimeren G-Proteine entscheidend ist (Abbildung 2). Die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit sind zu einem stabilen  $\beta\gamma$ -Komplex zusammengefasst. Durch die  $\alpha$ -Untereinheit und den  $\beta\gamma$ -Komplex werden verschiedene Effektorproteine reguliert. (Ross et al. 2001). Im inaktiven Zustand ist die  $\alpha$ -Untereinheit mit dem  $\beta\gamma$ -Komplex assoziiert und über diesen an der Zellmembran gebunden (Evanko et al. 2000).

Die Bindung des Liganden z.B. Adrenalin an den Rezeptor führt zunächst zum Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit, wodurch diese aktiviert wird. Es folgt die Dissoziation von der  $\alpha$ -Untereinheit und dem  $\beta\gamma$ -Komplex, welche mit ihren Effektoren interagieren. Die Inaktivierung des G-Proteins erfolgt durch die GTPase, welche das gebundene GTP zu GDP dephosphoryliert. Anschließend kommt es zur Reassoziaton der Untereinheiten und sie stehen somit zur erneuten Aktivierung bereit, wobei die Membranlokalisierung der heterotrimeren G-Proteine durch die Isoprenylierung der  $\gamma$ -Untereinheit gewährleistet wird (Simonds et al. 1991; Muntz et al. 1992).



**Abbildung 2: Regulation und Aktivierungszyklus heterotrimerer G-Proteine.**

$\alpha$ :  $\alpha$ -Untereinheit;  $\beta$ :  $\beta$ -Untereinheit;  $\gamma$ :  $\gamma$ -Untereinheit; GDP: Guanosindiphosphat; GTP: Guanosintriphosphat;  $\beta_{1/2}$ :  $\beta$ -Adrenozeptor;  $P_i$ : Phosphat; AC: Adenylylzyklase; PLC: Phospholipase C; A: Adrenalin.

#### 1.4 Heterotrimere G-Proteine im Herzen

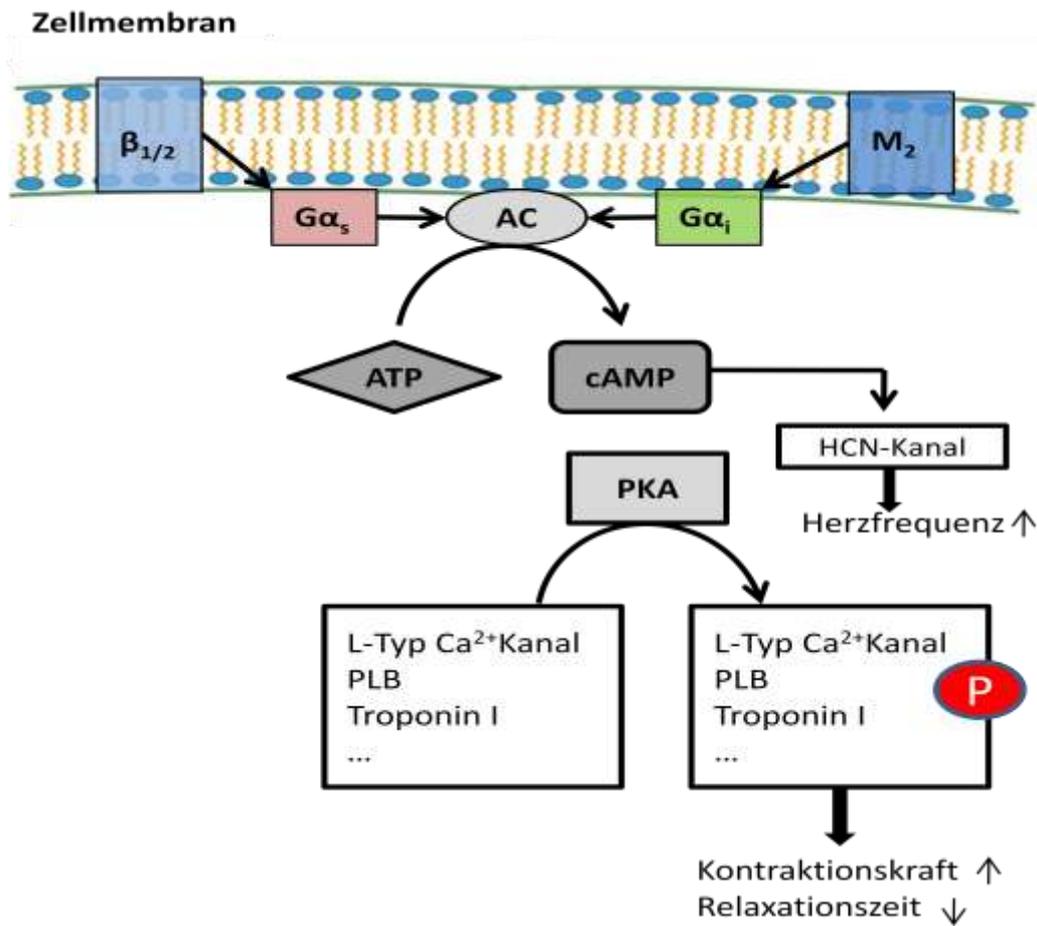
Im Herzen sind die G-Proteine  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  von besonderer Bedeutung, denn sie sind an der Regulation der Kontraktion beteiligt und vermitteln Effekte, die zur Herzhypertrophie führen. Der Sympathikus führt über das stimulatorische G-Protein  $G\alpha_s$  zu einer Steigerung der Kontraktionsleistung am Herzen. Katecholamine binden an den  $\beta_1$ -Adrenozeptor, der das an ihn in der Membran gekoppelte stimulatorische G-Protein  $G\alpha_s$  aktiviert. Für die Membranassoziation des heterotrimeren G-Proteins ist die isoprenylierte  $G\gamma_3$  Untereinheit verantwortlich. Dabei handelt es sich um eine Isoform der  $G\gamma$  Untereinheiten, welche hauptsächlich in Herzmuskelzellen neonataler Ratten exprimiert wird (Hansen et al. 1995). Das stimulatorische G-Protein  $G\alpha_s$  führt zur

Aktivierung der Adenylylzyklase, die den zyklischen Adenosinmonophosphat (cAMP) Spiegel in der Zelle erhöht. Dies führt zur Aktivierung der Proteinkinase (PKA). Es kommt zur Phosphorylierung von Proteinen, die einen positiv chronotropen, inotropen und lusitropen Effekt auf Herzmuskelzellen haben (Lohse et al. 2003). Der Ryanodin-Rezeptor, L-Typ-Kalzium-Kanäle, HCN-Kanäle, Phospholamban, Troponin I, das Myosin-bindendes-Protein-C und der Proteinphosphatase-inhibitor-1 sind daran beteiligt (Lohse et al. 2003). Die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade ist in Abbildung 3 vereinfacht dargestellt.

Das inhibitorische G-Protein  $G\alpha_i$ , welches durch Bindung von Azetylcholin an den muskarinergen  $M_2$ -Rezeptor aktiviert wird, hat einen hemmenden Einfluss auf die Adenylylzyklase.

Der  $\alpha_1$ -Rezeptor und der Rezeptor für Angiotensin II sind  $G\alpha_q$ -gekoppelt. Eine Stimulation dieser Rezeptoren bewirkt eine hypertrophe Antwort im Herzen. Es kommt zur Zunahme der Zellgröße, zur Neubildung von kontraktilen Elementen und zu veränderter Genexpression (Molkentin et al. 2001).

*In vitro* Untersuchungen an Herzmuskelzellen neonataler Ratten und am Modell des „engineered heart tissue“, d.h. in eine dreidimensionale Kollagenmatrix eingebetteten Herzmuskelzellen (Zimmermann et al. 2002), zeigten, dass Atorvastatin eine Wirkung auf die Lokalisation der heterotrimeren G-Proteine hat. Unter der Statintherapie kam es zu einer verminderten Isoprenylierung von  $G\gamma_3$  Einheiten, die nicht nur eine Minderung von  $G\alpha_s$  in der Membranfraktion, sondern auch eine Minderung der gesamten Proteinexpression bewirkte, da kein Anstieg von  $G\alpha_s$  im Zytosol zu verzeichnen war (Mühlhäuser et al. 2006). Im Gegensatz dazu konnte bei dem inhibitorischen G-Protein  $G\alpha_i$  keine Veränderung bezogen auf die Lokalisation und die Gesamtproteinmenge gezeigt werden. *In vivo* Untersuchungen an Wistar Ratten belegten zum einen eine Abnahme der  $G\gamma_3$  Einheiten in der Membranfraktion und zum anderen eine Translokation von  $G\alpha_s$  Einheiten aus der Membran- in die Zytosolfraktion. Die Effekte des Atorvastatins auf die Translokation der heterotrimeren G-Proteine, wenn auch unter hohen Konzentrationen, weisen auf eine Desensitivierung des  $\beta$ -adrenergen Systems hin. Neben der bereits bewährten und erfolgreichen Herzinsuffizienztherapie mit u.a. Betablockern könnte hier ein weiterer pharmakotherapeutischer Angriffsort in der Modulation des  $\beta$ -adrenergen Systems gefunden worden sein, was weiterer Untersuchungen bedarf.



**Abbildung 3:  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade im Herzen.**  $\beta_{1/2}$ :  $\beta$ -Adrenozeptor;  $M_2$ : muskarinischer Azetylcholinrezeptor;  $G\alpha_s$ : stimulatorisches G-Protein,  $G\alpha_i$ : inhibitorisches G-Protein; AC: Adenylylzyklase; cAMP: zyklisches Adenosinmonophosphat; PKA: Proteinkinase A; PLB: Phospholamban.

## 1.5 Transportmechanismen der Statine

Statine wie Pravastatin und Cerivastatin werden aus dem Portalkreislauf über Organische-Anionen-Transport-Polypeptide (OATP), wie zum Beispiel das OATP1B1 in die Leber aufgenommen, über das Zytochrom P-450 Enzym metabolisiert und mit Hilfe von Transportern wie dem Multidrug-Resistance-Protein-2 über die Galle eliminiert (Matsushima et al. 2005).

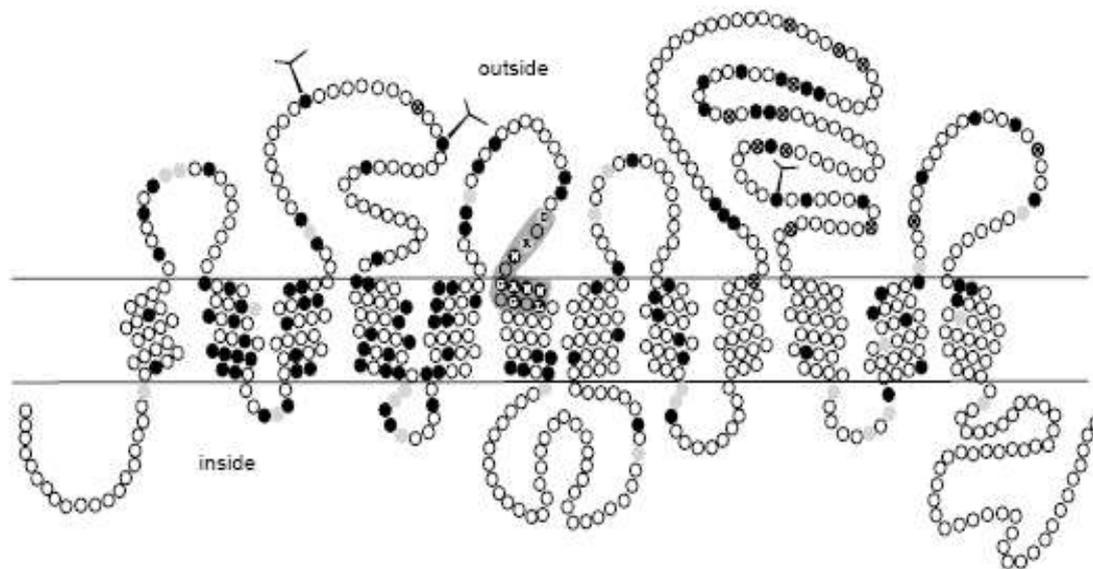
### 1.5.1 Die OATP – Familie

Die Organischen-Anionen-Transport-Polypeptide (OATP) bilden eine Gruppe Natrium-unabhängiger Aufnahmetransporter für amphipatische organische Anionen. Bisher sind 36 unterschiedliche OATPs in Säugetieren, davon 11 beim Menschen, identifiziert worden. Die OATPs werden anhand ihrer Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz in Familien und Subfamilien klassifiziert. Um eine Zugehörigkeit zu einer Familie oder

Subfamilie zu gewährleisten, muss die Aminosäuresequenz eine Übereinstimmung von 40% bzw. 60% aufweisen.

Betreffend der Nomenklatur werden die Familien mit arabischen Ziffern (z.B.: OATP1, OATP2, usw.) und Subfamilien mit Buchstaben (OATP1A, OATP2B) gekennzeichnet. Bei individuellen Vertretern einer Subfamilie wird an den Buchstaben eine arabische Ziffer angegliedert (OATP1A1, OATP2B1). Des Weiteren werden menschliche OATPs mit Großbuchstaben (z.B.: OATP2B1) beschrieben, während die OATPs von Nagetieren mit kleinen Buchstaben (z.B.: Oatp1a1) benannt werden (Hagenbuch et al. 2004).

Der genaue Transportmechanismus ist bis jetzt nicht bekannt, aber es wird vermutet, dass der Transport elektroneutral und pH-abhängig stattfindet (Kobayashi et al. 2003). Die OATPs sind am Transport vieler endogener Substanzen wie zum Beispiel Steroidhormonkonjugaten, Gallensalzen, Prostaglandinen und Schilddrüsenhormonen sowie einer Vielzahl von exogenen Stoffen wie zum Beispiel Medikamenten beteiligt. Zu den Medikamenten gehören unter anderem Atorvastatin und Pravastatin (Lau et al. 2006), Enalapril (Abu-Zahra et al. 2000), Rifampicin, Benzylpenicillin, sowie andere  $\beta$ -Lactam-Antibiotika (Vavricka et al. 2002; Nakakariya et al. 2008). Es wird vermutet, dass die Proteine aller OATPs aus 12 Transmembrandomänen bestehen und dass das carboxy- und das aminoternale Ende auf der zytosolischen Seite zu liegen kommen (Hagenbuch et al. 2003). Alle OATPs zeigen einige Gemeinsamkeiten auf. Dazu zählt eine große extrazelluläre Schleife zwischen der 9. und 10. Transmembrandomäne mit vielen konservierten Cysteinresten, welche den Zinkfingermotiven DNA-bindender Proteine ähneln. Darüber hinaus verfügen die OATPs über einige N-Glykosylierungsstellen in der 2. und 5. extrazellulären Schleife sowie über eine Superfamilien-Signatur aus hochkonservierten Sequenzen zwischen der 3. extrazellulären Schleife und der 6. Transmembrandomäne.



**Abbildung 4: Das 12-Transmembranmodell des Oatp1 der Ratte.** Konservierte Aminosäuren sind schwarz und konservierte geladene Aminosäuren sind grau dargestellt. Cysteinreste sind mit einem \* und Glykosylierungsstellen mit einem Y markiert. Die Superfamilien-Signatur ist an der Grenze zwischen der 3. extrazellulären Schleife und der 6. Transmembrandomäne (Abbildung aus Hagenbuch et al. 2003) lokalisiert.

Untersuchungen haben gezeigt, dass viele OATPs ubiquitär im menschlichen Organismus vorkommen und ein relativ breites und teilweise überlappendes Substratspektrum aufweisen. Andere wiederum werden spezifisch in bestimmten Organen exprimiert und verfügen über ein schmales Substratspektrum (Hagenbuch et al. 2003).

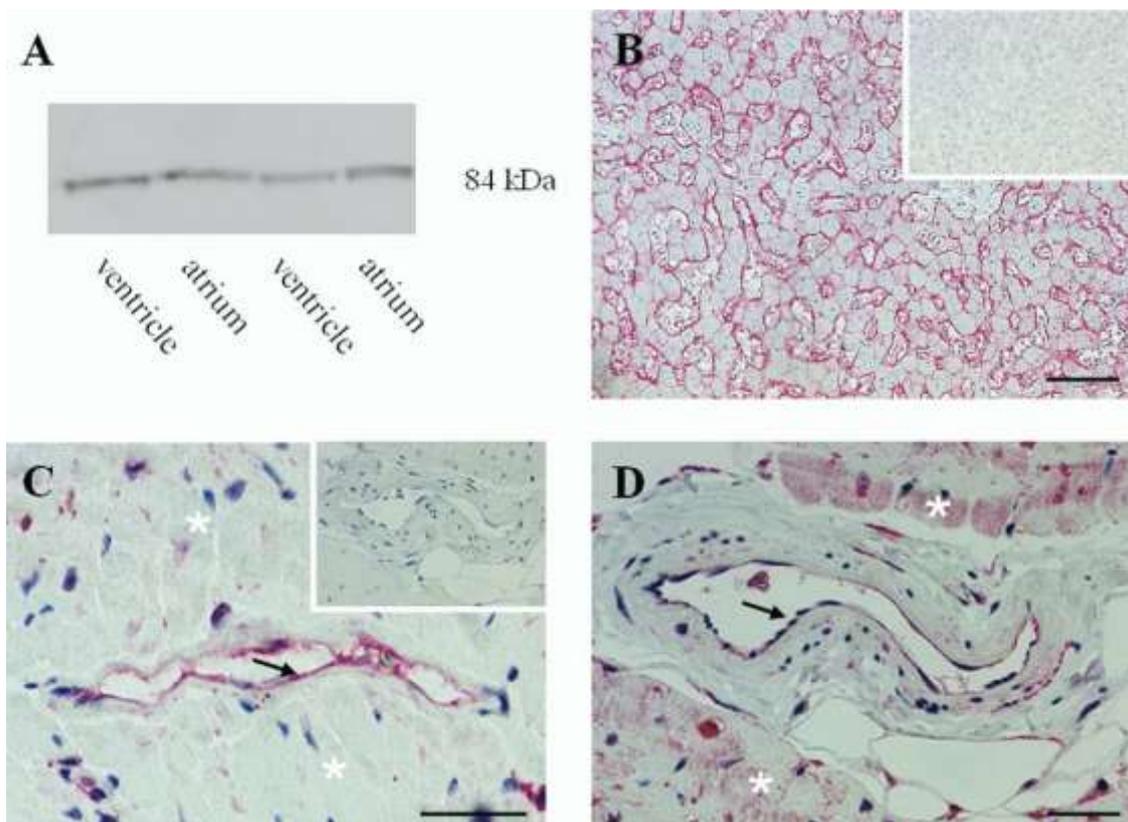
### 1.5.2 Organisches-Anionen-Transport-Polypeptid 2B1 (OATP2B1)

Das Organische-Anionen-Transport-Polypeptid 2B1 ist im menschlichen Genom auf Chromosom 11q13 lokalisiert (Nagase et al. 1998). Das Protein hat eine Größe von ca. 84 Kilodalton (kDA) und besteht aus 709 Aminosäuren (Kullak-Ublick et al. 2001). Im Gegensatz zu anderen Vertretern kommt das OATP2B1 im menschlichen Organismus ubiquitär vor. Eine starke mRNA-Expression konnte mittels Northern-Blot Analysen in der Plazenta, Lunge, Milz und Leber nachgewiesen werden. Eine schwächere Expression fand sich im Herzen, Dünndarm, Gehirn, in den Nieren, in den Eierstöcken, Hoden und gesundem Brustgewebe. Dagegen zeigte sich eine verstärkte OATP2B1-Expression in karzinomatösem Brustgewebe (Tamai et al. 2000; Maliepaard et al. 2001; Pizzagalli et al. 2003). Auf Proteinebene konnte eine Expression von OATP2B1 in der Plazenta (St-Pierre et al. 2002; Ugele et al. 2003), Leber (Kullak-Ublick et al. 2001), im Darm (Kobayashi et al. 2003), sowie im Herzen (Grube et al. 2006) nachgewiesen werden (Abbildung 5). Das Expressionsmuster des OATP2B1 im

menschlichen Organismus weist auf viele mögliche Funktionen hin, wobei die Rolle des OATP2B1 bis jetzt nicht eindeutig geklärt ist.

Durch die Expression des OATP2B1 im menschlichen Herzen und im Gefäßendothel könnte der Transporter die Entstehung pleiotroper Effekte unter Statintherapie begünstigen. Im Gastrointestinaltrakt wird OATP2B1 in der Enterozytenmembran darmlumenseitig exprimiert. Hier könnte der Transporter an der Aufnahme organischer Anionen und Medikamente in den menschlichen Organismus beteiligt sein (Kobayashi et al. 2003). Gemeinsam mit anderen OATP-Transportern wie OATP1B1 und OATP1B3, welche an der basolateralen Hepatozytenmembran den Einwärtstransport organischer Anion regulieren, könnte OATP2B1 in der Leber zur Elimination von unterschiedlichen exogenen Stoffen wie Medikamenten führen (Kopplow et al. 2005). Durch die Expression in der Plazenta auf der fetalen (basalen) Seite des Synzytiotrophoblasten könnte das OATP2B1 am Transport von Steroidhormonvorstufen vom mütterlichen zum fetalen Kreislauf beteiligt sein (St-Pierre et al. 2002). Weitere Expressionsorte des OATP2B1 stellen sowohl gesundes als auch karzinomatös verändertes Brustgewebe, z.B. duktales Mammakarzinom, dar. Es könnte zusammen mit dem Multi-Drug-Related-Protein-1 am Wachstum östrogenabhängiger Karzinome beteiligt sein (Pizzagalli et al. 2003).

Funktionelle Untersuchungen konnten bis jetzt für das OATP2B1 einen hochaffinen Transport der Steroidhormonkonjugate wie Estron-3-Sulfat (E3S) (Satoh et al. 2005), Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS), Pregnenolonsulfat (Grube et al 2006) und des organischen Farbstoffes Bromosulphophthalein (Kullak-Ublick et al. 2001) nachweisen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das OATP2B1 auch ein hochaffiner Transporter für Atorvastatin ist (Grube et al. 2006). Weitere Substrate des OATP2B1 sind andere HMG-CoA Reduktase Inhibitoren wie Pravastatin (Nozawa et al. 2004), Fluvastatin (Kopplow et al. 2005), jedoch nicht Simvastatin (Grube et al 2006).



**Abbildung 5: OATP2B1 Expression im humanen Herzgewebe und der Leber.** (A) Dargestellt sind Membranfraktionen von je zwei Proben aus dem Vorhof und der Kammer des Herzens, bei denen mittels Western Blot die OATP2B1 Expression gezeigt werden konnte. (B-D) Konfokale Aufnahmen der OATP2B1 Expression in unterschiedlichen Geweben. (B) OATP2B1 Expression in der Leber. (C) Nachweis der OATP2B1 Expression im humanen Herzen. (D) Detailaufnahme eines Gefäßanschnitts im humanen Herzen. Mit einem Pfeil sind Gefäßendothelien markiert und der Stern markiert Herzmuskelzellen. Maßstabsbalken 50  $\mu\text{m}$  (Abbildung aus Grube et al. 2006).

### 1.5.3 Die ABC – Familie

Funktionelle Untersuchungen haben gezeigt, dass der HMG-CoA-Reduktase Inhibitor Atorvastatin nicht nur ein Substrat für OATP2B1, sondern auch ein Substrat bzw. Co-Substrat für das P-Glykoprotein und das Multidrug-Resistance-Protein-2 darstellt (Boyd et al. 2000; Chen et al. 2005; Lau et al. 2006). Diese Transporter werden physiologisch in gesunden Geweben wie zum Beispiel sezernierenden Epithelien, Darm und Leber exprimiert. Dadurch kann sich das Gewebe physiologisch vor Fremdstoffen wie Medikamenten oder endogen gebildeten toxischen Metaboliten schützen, in dem diese nach außen transportiert werden. Somit sind die Expression und die Interaktion der beiden Transportsysteme, der OATP-Familie und der ABC-Familie, entscheidend für die Bioverfügbarkeit von Medikamenten wie dem Atorvastatin.

## 1.6 Zielsetzung und Fragestellung dieser Arbeit

Die vorliegende Arbeit basiert auf zwei Hauptbefunden. Erstens wurde gezeigt, dass der Transporter OATP2B1 im menschlichen, nicht aber im Rattenherzen exprimiert wird und u.a. Atorvastatin in die Zelle transportiert.

Zweitens konnte an Herzmuskelzellen gezeigt werden, dass Atorvastatin einen hemmenden Einfluss auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade hat. Unter Atorvastatin kommt es aufgrund der fehlenden posttranslationalen Lipidmodifikation zu einer Umverteilung der Untereinheiten von G-Proteinen ( $G\alpha_s$ ,  $G\gamma$ ) aus der Zellmembran in das Zytosol, sodass diese nicht mehr funktionell aktiv sind. Damit hätte Atorvastatin Betablocker-ähnliche Wirkungen. Diese Effekte lassen sich an Herzmuskelzellen der neonatalen Ratte nur unter hohen Atorvastatinkonzentrationen nachweisen. Die dieser Arbeit zugrunde liegende Hypothese war, dass dies Folge der bei der Ratte fehlenden Expression von OATP2B1 ist und umgekehrt eine Überexpression von OATP2B1 zu einer Sensitivierung der Ratten-Herzmuskelzellen gegenüber Atorvastatin führt. Als Parameter der Atorvastatinwirkung sollten die aus den Vorarbeiten bekannten Effekte auf die G-Protein Lokalisation herangezogen werden.

Im Einzelnen stellten sich folgende Aufgaben:

1. Generierung eines Adenovirus mit dem OATP2B1 Insert
2. Kultivierung und Infektion von Herzmuskelzellen der neugeborenen (neonatalen) Ratte in der klassischen Monolayer-Zellkultur
3. Überprüfung der adenoviralen Expression von OATP2B1 mittels Western Blot
4. Überprüfung der korrekten Lokalisation von OATP2B1 in der Zellmembran mittels Immunfluoreszenz und anschließender konfokaler Lasermikroskopie
5. Klärung mittels Transportassay, ob eine adenovirale Überexpression von OATP2B1 in Herzmuskelzellen, sowie in überexprimierenden MDCK-Zellen zur Aufnahme des physiologischen Substrates E3S führt. Lässt sich die Aufnahme von E3S durch Atorvastatin kompetitiv hemmen?
6. Klärung über Transportassays, welche Bedeutung die endogene Expression des OATP2B1 im humanen Herzen hat.
7. Lässt sich durch die OATP2B1 Überexpression die Wirkung von Atorvastatin auf die G-Proteine, d.h. die Translokation von der Membran ins Zytosol verstärken?

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Klonierung

#### 2.1.1 Plasmid Vektoren

**pcDNA3.1(-)Hygro:** Expressionsvektor mit einem CMV-Promotor; Ampicillin- und Hygromycinresistenz; Größe: 5,4 kb (Invitrogen, Carlsbad, USA).

**pAdTrack-CMV:** adenoviraler Shuttle Vektor mit einem bizystronischen Promotor; Reporter gen EGFP; Kanamycinresistenz; Größe 9,2 kb (Vogelstein, Baltimore, USA)

**pAdEasy1:** Plasmid aus Ad5 Genom; Größe: 33,4 kb (Stratagene, Kalifornien, USA).

#### 2.1.2 Insert

Das Konstrukt OATP2B1 im pcDNA3.1(-)Hygro, kloniert über Not I, wurde uns von Herrn Dr. Markus Grube, Universität Greifswald zur Verfügung gestellt.

#### 2.1.3 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Ein Standardreaktionsansatz in Wasser beinhaltete 2 IU Restriktionsenzym (New England Biolabs, Ipswich, USA) pro  $\mu\text{g}$  DNA, 10% Reaktionspuffer und 10% BSA falls notwendig. Die Inkubation erfolgte bei einer für das jeweilige Enzym optimalen Inkubationszeit und Temperatur. Die Reaktion wurde bei 65 °C für 10 min gestoppt. Anschließend wurden die Proben mit 6x Probenpuffer (30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25%, Xylen Cyanol FF) versetzt und die DNA-Fragmente im Agarosegel aufgetrennt.

#### 2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Trennung und Analyse von linearisierten DNA-Fragmenten superhelikaler Plasmid-DNA sowie zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten wurden 1% TBE Agarosegele mit 0,002% Ethidiumbromid verwendet, wobei die Geltaschen mit jeweils 1-2  $\mu\text{g}$  DNA und einem Größenmarker (1 kb DNA Ladder, New England Biolabs, Ipswich, USA) beladen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Spannung von 80-120 Volt ( $2.5 \text{ V/cm}^2$ ) in TBE-Puffer (900 mM Tris, 900 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8,0) bei Raumtemperatur. DNA-Fragmente wurden anschließend unter UV-Licht (254 nm) dargestellt.

### **2.1.5 Gelaufreinigung von DNA**

Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden unter UV-Licht auf die korrekte Größe überprüft, ausgeschnitten und mittels „NucleoSpin Extract II“ (Macherey-Nagel, Düren) aus dem Gel extrahiert. Dabei wurde der Gelblock bei 50 °C aufgelöst, die DNA an eine Silica-Säule gebunden und anschließend in MilliQ™-Wasser eluiert.

### **2.1.6 Fällen von DNA**

Für die Konzentrierung und Reinigung von DNA ist die Präzipitation mit Ethanol gebräuchlich. In Gegenwart monovalenter Kationen bildet DNA in Ethanol einen unlöslichen Niederschlag, der durch Zentrifugation isoliert wird. Monovalente Kationen wurden durch die Zugabe von 10% Volumen Ammoniumacetat bereitgestellt. Ammoniumacetat verringerte dabei die Kopräzipitation von freien Nukleotiden.

Zur wässrigen Nukleinsäurelösung wurde das dreifache Volumen absoluten Ethanols und 0,5 fache Volumen Ammoniumacetat zugegeben, die Nukleinsäuren zunächst bei -70 °C für 10 min und anschließend durch Zentrifugation (30 min, 4 °C, 13500 rpm) präzipitiert. Das farblose Nukleinsäuresediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und getrocknet. Das luftgetrocknete Nukleinsäurepellet wurde in MilliQ™-Wasser aufgenommen.

### **2.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten**

Mittels T4-Ligase (New England Biolabs, Ipswich, USA) wurden DNA-Fragmente ligiert. Dem Enzym lag ein Reaktionspuffer bei, der das für die Reaktion benötigte ATP enthielt. Ein Ligationsansatz bestand aus 10% Ligase, 10% Puffer, Backbone und Insert in insgesamt 10 µl MilliQ™-Wasser. Das molare Verhältnis von Backbone zu Insert betrug drei zu eins. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 14 °C.

### **2.1.8 Herstellung von LB-Medium und LB-Agarplatten**

LB-Medium (Trypton 1,0% (w/v), Hefeextrakt 0,5% (w/v), NaCl 170 mM) wurde in wässriger Lösung mit 1 N Natronlauge auf pH 7,4 eingestellt und anschließend autoklaviert.

Für LB-Agarplatten (15 g Agar ad 1000 ml LB-Medium) wurde die Lösung autoklaviert und nach Abkühlen auf 37 °C mit 50 mg/l Kanamycin oder 100 mg/l Ampicillin versetzt.

### 2.1.9 Transformation

Für die Transformation wurden thermokompetente *E. coli* Bakterien vom Typ DH10B oder Top10F verwendet. Hierzu wurden 100 µl Bakteriensuspension auf Eis aufgetaut und 5 µl Ligationsansatz vorsichtig hinzugegeben. Nach 30 min Inkubationszeit wurden die Bakterien für 30 sec auf 42 °C erhitzt und anschließend 2 min auf Eis abgekühlt. Zum Transformationsansatz wurden 300 µl LB-Medium hinzugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert.

Nach Ausplattieren von 150 µl Zellsuspension auf Selektions-LB-Agarplatten (Ampicillin oder Kanamycin) und Kultivierung bei 37 °C über Nacht, konnten die Kolonien am nächsten Tag auf erfolgte DNA-Aufnahme überprüft werden.

**DH10B** (Invitrogen, Carlsbad) F<sup>-</sup>, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, recA1, endA1, araD139, Δ(ara, leu) 7697, galU, galK, λ, rpsL, nupG

**Top10F** (Invitrogen, Carlsbad) F<sup>-</sup>, mcrA, Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15, ΔlacX74, deoR, araD139, Δ(ara, leu) 7697, galU, galK, rpsL (STr<sup>R</sup>), endA1, nupG

### 2.1.10 Animpfen einer Schüttelkultur für eine Mini-Plasmidpräparation

Mit einer sterilen Pipettenspitze wurde jeweils eine Bakterienkolonie aufgenommen und in 10 ml LB-Selektionsmedium überführt. Die Bakterienkultur wurde über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert.

### 2.1.11 Elektroporation

Für die Elektroporation wurden elektrokompetente *E. coli* Bakterien vom TYP BJ5183-AdEasy-1 verwendet. 1-100 ng Plasmid-DNA wurden mit 40 µl auf Eis aufgetauter Bakteriensuspension versetzt, in die vorgekühlte Elektroporationsküvette „Gene Pulser-Küvette“ (Biorad, München) überführt und in einer Elektroporationskammer „Gene Pulser“ (Biorad, München) elektroporiert (200 µΩ, 25 µF, 2,5 kV). Anschließend wurden 500 µl LB-Medium zu dem Elektroporationsansatz gegeben, die Bakterien 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend auf Agarplatten ausplattiert.

**BJ5183-AdEasy-1** (Stratagene, Kalifornien, USA) andA, sbcBC, recBC, galK, met, thi-1, bioT, hsdR

### 2.1.12 Mini-Plasmidpräparation

Die analytische Mini-Plasmidpräparation erfolgte durch alkalische Lyse (Birnboim et al. 1979) und diente der schnellen Durchmusterung mehrerer Bakterienkulturen auf positive Klone. Dabei wurden 2 ml der Bakteriensuspension pelletiert, das LB-Medium abgesaugt und anschließend in 200 µl Puffer „P1“ (50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, pH 8,0) resuspendiert. Die Zellen wurden mit 200 µl Puffer „P2“ (200 mM NaOH, 3,5 mM SDS) lysiert und die Lyse anschließend mit 200 µl Puffer „P3“ (3 M Kaliumacetat) gestoppt. Nach Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig abgenommen, mit der gleichen Menge an reinem Isopropanol versetzt und bei 4 °C wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und verworfen. Das DNA-haltige Pellet wurde mit Ethanol 70% v/v gewaschen, wiederholt zentrifugiert, getrocknet und in 30 µl MilliQ™-Wasser resuspendiert. Positive Klone wurden mittels Restriktionsanalyse verifiziert.

War zur weiteren Verarbeitung besonders reine DNA notwendig, erfolgte die Präparation mittels Säulenaufreinigung „NucleoSpin-Plasmid-Kit“ (Macherey-Nagel, Düren).

### 2.1.13 Maxi-Plasmidpräparation

Am Vortag wurde eine Schüttelkultur 250 ml aus LB-Medium und 1 ml einer kleinen Vorkultur angeimpft. Dem Ansatz wurde ein entsprechendes Selektionsantibiotikum (Ampicillin 100 mg/l oder Kanamycin 50 mg/l) zugesetzt. Die Bakterien wurden zentrifugiert und aus dem Pellet mit dem „Nucleo Bond PC 500-Kit“ (Macherey-Nagel, Düren) isoliert.

## 2.2 Zellkultur

### 2.2.1 Zelllinien und Nährmedien

HEK293A: HEK293A-Zellen sind modifizierte menschliche embryonale Nierenzellen, welche gegenüber HEK293-Zellen über bessere Adhäsionseigenschaften verfügen, sowie genetisch für die Generierung von Adenoviren optimiert sind.

Nährmedium für HEK293A :

Dulbeccos MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)

10% inaktiviertes fetales Kälberserum (Biowest, Essen)

1% nicht essentielle Aminosäuren (Invitrogen, Carlsbad, USA)

100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Carlsbad, USA)

100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA)

MDCK II: Epithelzellen aus der Hundeniere.

Nährmedium für MDCK II:

Dulbeccos MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)  
10% inaktiviertes fetales Kälberserum (Biowest, Essen)  
1% nicht essentielle Aminosäuren (Invitrogen, Carlsbad, USA)  
100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Carlsbad, USA)  
100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA)

Herzmuskelzellen: Primäre, sich nicht mehr teilende Zellen aus Herzen neonataler Ratten.

Nährmedium für Herzmuskelzellen:

MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA)  
10% inaktiviertes fetales Kälberserum (Biowest, Essen)  
1% 5-bromo-2'-deoxyuridin (BrdU) (Sigma, München)  
100 U/ml Penicillin (Invitrogen, Carlsbad, USA)  
100 µg/ml Streptomycin (Invitrogen, Carlsbad, USA)

### **2.2.2 Passagierung**

Bei einer Zelldichte von 80% bis 90% wurden die adhärennten Zellen passagiert. Nach Waschen der Zellen mit sterilem 1x PBS (NaCl 136 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6,5 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,4 mM, KCl 2,7 mM) wurden sie mit einer 0,05% Trypsinlösung (Invitrogen, Carlsbad, USA) 5 min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Medium aufgenommen und bei 800 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in neuem Nährmedium resuspendiert und wieder auf Kulturschalen ausplattiert.

### **2.2.3 Kultivierung von Herzmuskelzellen**

Herzmuskelzellen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Bijoy Chandapillali Karikkineth präpariert und uns stets als Zellsuspension zur Verfügung gestellt. Um in der Kultur möglichst wenige Fibroblasten oder Endothelzellen zu züchten, wurden die Zellen in eine Kulturschale überführt und 1 h bei 37 °C präinkubiert. Dabei wuchsen Fibroblasten bereits an. Dieser Prozess dauert bei Herzmuskelzellen erheblich länger, sodass die Zellsuspension mit deutlich reduzierter Fibroblastenzahl vorsichtig wieder von der Kulturschale abgesaugt wurde. Um die Adhäsion der Herzmuskelzellen zu verbessern, wurden die Kulturschalen vor dem Ausplattieren der Herzmuskelzellen für 30 min mit 3 ml Kollagen (21,7 mg/ml; Upstate Group, Milton Keynes, GB) beschichtet.

Nach 3 – 4 tägiger Kultivierung in MEM Medium waren die Herzmuskelzellen bereit für die Verwendung in weiteren Experimenten.

### **2.2.4 Kryokultur**

Zur Konservierung von Zellen wurden Kryokulturen angelegt. Hierzu wurden die Zellen von einer Kulturschale ( $\varnothing$  15 cm), wie unter 2.2.1 beschrieben, pelletiert und in 1 ml aktivem fetalen Kälberserum resuspendiert. Nach Zugabe von 10% DMSO (Sigma, München) wurden die Zellen in einem Styroporkasten langsam auf  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gekühlt und ein Tag später in flüssigen Stickstoff überführt.

### **2.2.5 Transfektion**

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion in antibiotikafreiem Medium in Kulturschalen ( $\varnothing$  3,5 cm) ausplattiert. Die Transfektion wurde gemäß Herstellerangaben mit „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen, Carlsbad, USA) durchgeführt. 4,0  $\mu\text{g}$  Plasmid-DNA wurden in 250  $\mu\text{l}$  Opti MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) verdünnt. In einem zweiten Ansatz wurden 10  $\mu\text{l}$  „Lipofectamine 2000“ in 250  $\mu\text{l}$  Opti MEM verdünnt. Nach 5 min wurden die Lösungen vermischt und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz direkt auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert.

### **2.2.6 Stabile Transfektion**

Für die Generierung einer stabilen Zelllinie erfolgte die Selektion der Zellen mittels Hygromycin B (Invitrogen, Carlsbad, USA) in einer Endkonzentration von 270  $\mu\text{g}/\text{ml}$  im Medium. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen 1:5 gesplittet und nach weiteren 24 h wurde das Selektionsmedium zugegeben. Stabile Zelllinien wurden weiterhin in Selektionsmedium gehalten.

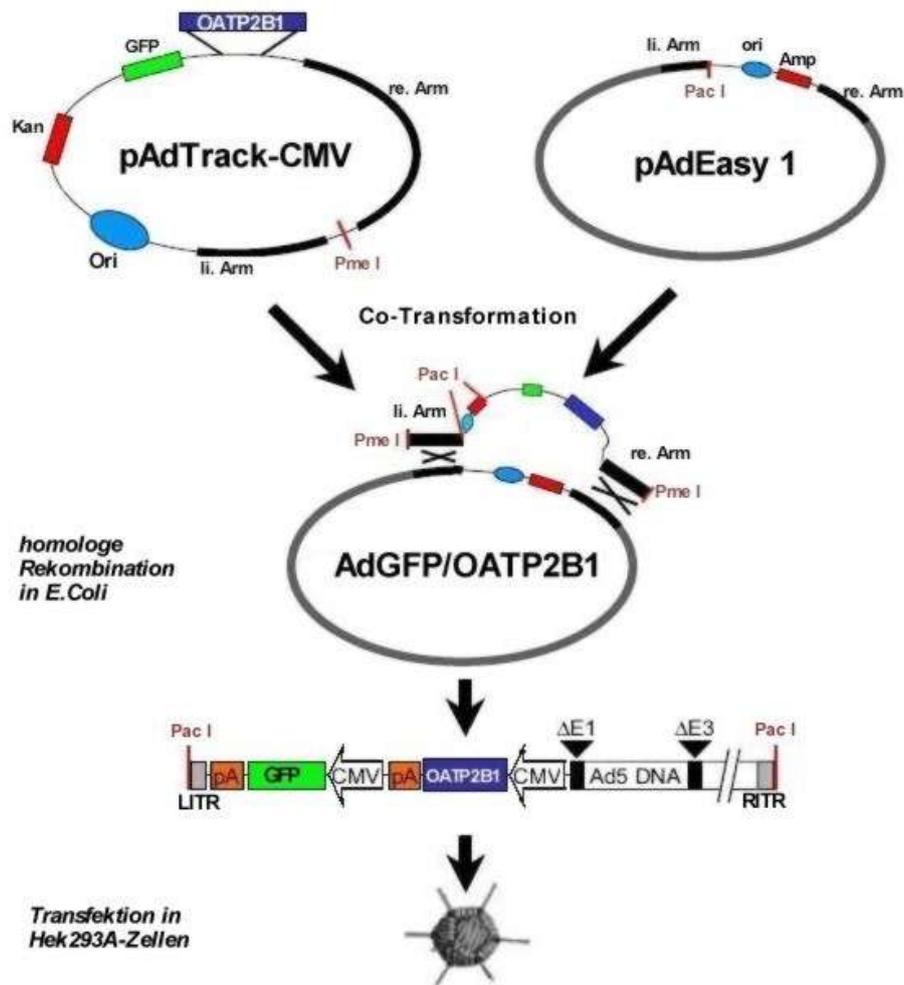
### **2.2.7 Behandlung der Zellen mit Atorvastatin**

Atorvastatin Reinsubstanz (Pfizer, New York, USA) wurde dem Medium in einer Endkonzentration zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  zugesetzt und die Inkubationszeit betrug zwischen 48 h und 120 h. Bei der Intervention wurde das Medium mit Atorvastatin alle 24 h erneuert.

## 2.3 Herstellung eines rekombinanten Adenovirus

### 2.3.1 Adenovirale Expressionssysteme

Replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren stellen ein vielseitiges und schnelles virales Gentransportsystem für die funktionelle und therapeutische Genanalyse dar. Mit Adenoviren können unabhängig von der Zellteilung nahezu alle Arten von Säugetierzellen infiziert werden. Gleichzeitig sind sie jedoch von geringer Pathogenität für den Menschen. Mehr als 40 verschiedene Serotypen der Adenoviren sind bisher bekannt. Das in dieser Arbeit generierte rekombinante und nicht onkogene Adenovirus ist vom Serotyp 5 (Ad5) und wurde nach der Methode von He (He et al. 1998) hergestellt. Das verwendete adenovirale Genom enthielt Deletionen in den Regionen E1 ( $\Delta$ E1, Ad5 Nukleotide 1 - 3533) und E3 ( $\Delta$ E3, Ad5 Nukleotide 28130 - 30820). Der produktive Infektionszyklus wird mit der Transkription des E1A-Gens eingeleitet, dessen Genprodukt transaktivierend auf die Expression der anderen frühen viralen Gene E1B, E2A, E3 und E4 wirkt (E = early gene). Darauf folgt die DNA-Replikation und mit der Aktivierung der späten viralen Gene die Bildung neuer Virionen. Die E3-Region kodiert für Proteine, die für die Umgehung der Immunantwort des Wirtsorganismus wichtig sind. Sie ist für die Virusreplikation in der Zellkultur nicht essentiell. Durch die beiden Deletionen wurde somit einerseits erreicht, dass der rekombinante Adenovirus replikationsdefizient war und andererseits das Virusgenom bis zu 7,5 kb an fremden DNA-Fragmenten aufnehmen konnte, ohne die Enkapsidation der Virus-DNA zu stören (Bett et al. 1993; Benihoud et al. 1999). Die Fremd-DNA wurde, wie unter 2.1 beschrieben, in den pAdTrack-CMV Transfektor kloniert, da eine direkte Klonierung in das Virusgenom aufgrund der Größe der DNA (33,4 kb) und dem Mangel an singulären Schnittstellen nicht möglich war. Anschließend wurde durch homologe Rekombination mit dem viralen Genom (pAdEasy-1), das in den BJ5183-Bakterien schon enthalten war, das rekombinante adenovirale Genom erzeugt. Die exogene Expressionskassette wurde dabei in die E1-Region integriert. Die Generierung der Adenoviren erfolgte durch Transfektion der rekombinanten Plasmid-DNA in HEK293-Zellen. Die HEK293-Zelllinie ist eine kontinuierlich wachsende Zelllinie humaner, embryonaler Nierenzellen, die mit gescherter humaner Ad5-DNA transformiert wurde. Diese Zelllinie enthält die viralen Gene E1A und E1B (Ad5 Nukleotide 1 - 4344), welche die Deletionen im rekombinanten Virusgenom komplementieren können und so die Generierung rekombinanter, selbst replikationsdefizienter Adenoviren ermöglichen (Graham et al. 1977; Louis et al. 1997; Luo et al. 2007). Die Abbildung 6 gibt einen schematischen Überblick über die einzelnen Schritte der Virusherstellung.



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Herstellung eines rekombinanten Adenovirus mit Hilfe des AdEasy-Systems.** OATP2B1 wurde in den Transfervektor pAdTrack-CMV einkloniert. Das erhaltene Plasmid wurde mit der Restriktionsendonuklease *Pme I* linearisiert und mit dem Virusgenom (pAdEasy 1) durch Co-Transformation in *E. coli* BJ5183 zur homologen Rekombination gebracht. Über das Kanamycinresistenzgen (Kan) wurde auf rekombinante Plasmide selektioniert. Das mit der Restriktionsendonuklease *Pac I* linearisierte rekombinante Virusgenom wurde in HEK293A-Zellen transfiziert, welche die Fähigkeit besitzen, die Deletionen ( $\Delta E1$ ,  $\Delta E3$ ) im Virusgenom zu komplementieren und somit infektiöse, replikationsdefiziente, rekombinante Adenoviren zu bilden. Ad5 DNA: genomische DNA des humanen Adenovirus Serotyp 5, Amp: Ampicillinresistenzgen, CMV: Zytomegalievirus-Promotor,  $\Delta E1$ ,  $\Delta E3$ : Deletionen in den frühen Genen E1 und E3 der adenoviralen Replikation, GFP: grün fluoreszierendes Protein, LITR/RITR: linke und rechte invertierte terminale Wiederholungssequenz, pA: Polyadenylierungssignal. Modifiziert übernommen aus He et al. 1998.

### 2.3.2 Homologe Rekombination

Bei der homologen Rekombination kommt es aufgrund identischer DNA-Sequenzen, hier bezeichnet als linker und rechter Arm (Abbildung 6), zum Austausch bzw. zur Integration von DNA-Abschnitten in ein Plasmid. Im vorliegenden Fall wurde der OATP2B1-Insert tragende Transfervektor pAdTrack-CMV in das adenovirale Plasmid

pAd-Easy-1 kloniert. Dazu wurden 400 µg DNA des mit *Pme I* linearisierten und gereinigten Transfervektors pAdTrack-OATP2B1 in mit pAd-Easy-1 vortransformierte *E.coli* BJ5183 mittels Elektroporation eingebracht. Die DNA der einzelnen Bakterienklone wurde im anschließenden Restriktionsverdau auf Positivität überprüft und in *E. coli* vom Typ DH10B amplifiziert.

### **2.3.3 Transfektion von HEK293A-Zellen**

Damit sich das Virus in den HEK293A-Zellen vermehren konnte, wurden die Zellen mit dem Viruskonstrukt transfiziert. Die Transfektion erfolgte in einer Kulturschale (Ø 3,5 cm) gemäß Herstellerangaben mit „Lipofectamine 2000“ (Invitrogen, Carlsbad, USA). 3,0 µg Plasmid-DNA wurden in 250 µl Opti MEM (Invitrogen, Carlsbad, USA) verdünnt. In einem zweiten Ansatz wurden 10 µl „Lipofectamine 2000“ in 250 µl Opti MEM verdünnt. Nach 5 min wurden die Lösungen vermischt und 25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz direkt auf die zu transfizierenden Zellen pipettiert. Nach drei Tagen wurde das Medium noch einmal gewechselt, dann bis zur Ernte nicht mehr, um die sich langsam abrundenden Zellen nicht zu stören. Nach 10 bis 11 Tagen erfolgte die erste Ernte.

### **2.3.4 Ernte virusinfizierter Zellen**

Zur Ernte sollten bereits 30-50% der transfizierten HEK293A-Zellen abgelöst sein. Die noch anhaftenden Zellen wurden mit einer weitlumigen Pipette abgespült oder mit einem Zellschaber vorsichtig abgenommen, um die Zellen nicht zu zerstören. Die Zellen wurden bei 4 °C und 600 rpm 7 min pelletiert und anschließend in 2 ml 1x PBS resuspendiert. Um die Zellen aufzubrechen und das Virus freizusetzen, wurde die Zellsuspension dreimal in flüssigem Stickstoff vollständig eingefroren, bei 37 °C wieder aufgetaut und gevortext. Die Zellfragmente wurden abzentrifugiert und der virushaltige Überstand für die erste Infektion verwendet bzw. bei -80 °C gelagert.

### **2.3.5 Präparation eines hochtitrigen Virus-Stocks**

Die Zellen der ersten Infektion wurden analog dem Verfahren nach der Transfektion geerntet. Das Virus wurde in drei weiteren Infektionszyklen mit steigenden Zellzahlen amplifiziert. Ein Infektionszyklus dauerte zwei bis drei Tage. Der vierte Infektionszyklus diente zur Generierung einer Virusstammlösung. Hierzu wurden HEK293A-Zellen in 30 Kulturschalen (Ø 15 cm) mit je 20 µl des virushaltigen Überstandes des vierten Infektionszyklusses infiziert. Mit wachsender Viruslast wurden die Zellen zunehmend instabil. Um die Zellen nicht schon beim nachfolgenden Zentrifugationsschritt zu

zerstören, erfolgte die Ernte bereits nachdem sich etwa die Hälfte des Zellrasens abgelöst hatte. Die infizierten Zellen wurden mit 1x PBS pH 7,4 gewaschen und resuspendiert. Die Freisetzung der Viren erfolgte durch dreimaliges Frieren und Tauen. Nach der Zentrifugation wurde die VirusstammLösung zur Titerbestimmung verwendet und bei -80°C gelagert.

### **2.3.6 CsCl Gradient zur Adenovirusaufreinigung und –konzentration**

Die infizierten HEK293A-Zellen der 30 Kulturschalen (Ø 15 cm) wurden bei 2000 rpm und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde dreimal mit vorgekühltem 1,1,2-Trichlortrifluorethan zur Entfernung von überschüssigen Lipiden und Proteinen extrahiert. Dazu wurde zum Pellet jeweils die gleiche Menge gekühltes 1,2-Trichlortrifluorethan zugegeben und anschließend bei 2000 rpm und bei 4 °C für 10 min zentrifugiert. Dadurch wurden die Zellen aufgebrochen und der Virus freigesetzt. Der virushaltige Überstand wurde wieder mit derselben Menge 1,2-Trichlortrifluorethan vermischt und wie oben zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde noch ein drittes Mal wiederholt.

Der CsCl-Gradient bestand aus einer schweren unteren (42,2% w/w) und einer leichten oberen (22,4% w/w) Phase. Jeweils 4,5 ml beider Phasen wurden in ein Ultrazentrifugationsröhrchen übereinander geschichtet. Der nach der Trichlortrifluorethan-Extraktion gewonnene Überstand wurde vorsichtig in äquivalenter Menge bis zu 2,5 ml auf die Gradienten geschichtet. Gewichtsunterschiede wurden mit PBS ausgeglichen. Nach 18 h Zentrifugation bei 27000 rpm und 4 °C in der Ultrazentrifuge Optima L-90K, SW40 Ti Rotator (Beckman Coulter, Krefeld) waren zwei weiße Banden an der Interphase zwischen schwerer und leichter Phase sichtbar. In der schwachen oberen Bande befanden sich die Viruskapseln und in der dicken unteren Bande komplette Viren (Abbildung 17, S. 37). Die untere Bande wurde mit einer Heparinspritze und G27 Kanülen abgenommen und in eine Dialysekassette überführt. Die Kassette wurde bei 4 °C für 18 h gegen zweifachen Virus Storage Buffer (VSB) auf einem Magnetrührer rotierend dialysiert. Anschließend wurde der zweifach VSB (NaCl 136 mM, KCl 5 mM, MgCl 2 mM, Tris pH 7,4 1M) durch frischen zweifach VSB ersetzt und wiederholt bei 4 °C für 6 h dialysiert. Danach wurde das Dialysat mit einer Heparinspritze und G27 Kanülen aus der Kassette entnommen und mit zweifach Glycerol-VSB 1:1 verdünnt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 2.3.7 Titerbestimmung rekombinanter Adenoviren

HEK293A-Zellen wurden auf 12 Well Platten mit einer Zellzahl von  $5 \times 10^5$  ausplattiert. Zur Infektion wurde die Virusstammlösung zu 1:5 bis 1:100.000 in HEK-Medium hergestellt. Dabei wurden die Zellen in einer Doppelbestimmung infiziert. Als Negativkontrolle und zur Überprüfung der Zellvitalität dienten nicht infizierte Zellen. Der Infektionsverlauf wurde nach 24 h ausgewertet und die Zahl der GFP exprimierenden Zellen je Kammer und Virusverdünnung ermittelt. In der höchsten Verdünnung, in der noch GFP-Expression auftrat, wurden die GFP positiven Zellen mikroskopisch mit einer 20-fachen Vergrößerung ermittelt. Für eine repräsentative Aussage wurden mindestens zehn Gesichtsfelder ausgewertet und die infektiösen Viruseinheiten (IU) mit der folgenden Formel berechnet:

$$\frac{IU}{ml} = \frac{\frac{Zellen}{Feld} \times \frac{Felder}{Well}}{(Volumen\ der\ Viruslösung) \times (Verdünnungsfaktor)}$$

Die infektiösen Viruseinheiten sind analog zur Bezeichnung: efu = expression forming unit (He et al. 1998). Ein gängiges Maß für die Quantifizierung einer Virusinfektion in Zellkulturen ist die Multiplizität der Infektion pro Zelle (MOI). Sie beschreibt die Anzahl der infektiösen Viruspartikel pro ausplattierte Zielzelle. Die MOI lässt sich aus der Prozentzahl der positiven Zellen wie folgt berechnen:

$$MOI = -2x \ln \left( \frac{1 - \%pos.}{100} \right)$$

Diese Gleichung ist gültig für alle Zellen, die eine Zellteilung für eine erfolgreiche Infektion benötigen. Die in dieser Arbeit verwendete MOI lag zwischen 1 und 5.

## 2.4 Proteinbiochemie

### 2.4.1 Herstellung von Zelllysaten

Die Zellen wurden vor der Ernte in sterilem 1x PBS (NaCl 136 mM,  $Na_2HPO_4$  6,5 mM,  $KH_2PO_4$  1,4 mM, KCL 2,7 mM) gewaschen und mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst und pelletiert.

Zur Herstellung von Gesamtproteinlysaten wurde das Pellet in Ripa-Puffer (Tris pH 7,4 50 mM, EDTA pH 8,0 1 mM, NaCl 150 mM, Triton X 100 1%) resuspendiert und 15 min bei mehrmaligen Vortexen auf Eis inkubiert. Anschließend wurden unlösliche

Bestandteile wie Zytoskelett oder Zellkerne durch Zentrifugation bei 2500 rpm und 4 °C abgetrennt. Das Gesamtproteinlysate wurde bei -20 °C gelagert.

Waren zur weiteren Verarbeitung Zytosol- und Membranproteinlysate notwendig, so wurde das Pellet in hypotonem Lysepuffer (Tris pH 8,0 5 mM, EDTA pH 8,0 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 5 mM) resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Homogenisierung der Zellsuspension in einem 1 ml Pottergefäß. Mittels Zentrifugation bei 2500 rpm wurden unlöslich Bestandteile wie Zytoskelett und Zellkerne abgetrennt. Der Überstand wurde zur Erlangung der Zytosol- und Membranfraktion einer Ultrazentrifugation bei 34000 rpm unterzogen. Der Überstand entsprach der Zytosolfraktion. Das Membranpellet wurde in Ripa-Puffer mittels einer 1 ml Spritze mit einer 26 G Kanüle durch 15-maliges Aufziehen resuspendiert.

#### 2.4.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford beruht auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums von Coomassie brilliant blue G-250 von 465 nm zu 595 nm bei der Anwesenheit von Protein. Dabei verhält sich die Zunahme der Absorption bei 595 nm linear zu der Proteinkonzentration der Lösung. Das Bradfordreagenz (Biorad, München) wurde 1:3 in 0,1 M Natronlauge verdünnt. Eine Eichkurve wurde mit IgG aus Rinderserum (Sigma, München) erstellt. Die Stammlösung wurde in einer Konzentration von 1 mg/ml angesetzt, woraus die anderen Standardwerte verdünnt wurden. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen.

Standard 1:10 verdünnt (µl)	0	20	40	60	80	100
MilliQ™-Wasser (µl)	100	80	60	40	20	0
Bradfordreagenz (µl)	400	400	400	400	400	400
Konzentration (µg/ml)	0	20	40	60	80	100

Tabelle 1: Bradford Standardkurve

Die Messung der Absorption erfolgte in Einmalküvetten (Sarstedt, Nümbrecht) in einem Spektrometer „Smart Spec 3000“ (Biorad, München) bei 595 nm. Die Proteinkonzentration ließ sich aus der Absorption nach dem Lambert-Beer-Gesetz errechnen. Die zu vermessenden Proteinproben wurden 1:100 oder 1:50 verdünnt. Ein Reaktionsansatz enthielt dabei meist 1-2 µl Proteinprobe in 100 µl MilliQ™-Wasser und 400 µl Bradfordreagenz, sodass die gemessenen Absorptionen im mittleren Bereich der Standardkurve lagen.

### 2.4.3 Diskontinuierliche SDS Polyacrylamidgelelektrophorese

Das Ziel der Elektrophorese war die Auftrennung der Proteine nach ihrer Größe. Im Prinzip erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrer Ladung. Vor Beladung wurden die Proben mit SDS zur Reaktion gebracht, wodurch die Proteine von außen gleichmäßig mit negativ geladenen Dodecanylsulfatresten überzogen wurden und sich dadurch ihre Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur Molekülmasse ergab. Alle Proben wurden mit sechsfach Ladepuffer (SDS 0,4 M, Bromphenolblau 1 mM, Glycerol 6,5 M, TRIS 0,6 mM, DTT 0,6 M) versetzt und 5 min bei 95 °C gekocht.

Das Prinzip der diskontinuierlichen Gelelektrophorese beruht auf den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden Gele. Aufgrund des niedrigen pH-Werts ist das Glycinion des Laufpuffers im Sammelgel ein Zwitterion und läuft im Gel langsamer als die Proteine. Dagegen laufen die Chloridionen des Laufpuffers (TRIS 125 mM, Glycin 192 mM, SDS 10 mM) aufgrund ihrer geringen Größe und negativen Ladung viel schneller als die Proteine. Als Konsequenz ergeben sich zwei Lauffronten zwischen denen sich eine Potentialdifferenz ausbildet, welche zur Folge hat, dass die Proteine zwischen den beiden Fronten gehalten und verdichtet werden. Im Sammelgel laufen alle Proteine mit der gleichen Geschwindigkeit. Im Trenngel dagegen befindet sich das Glycin aufgrund des höheren pH-Werts negativ geladen vor, sodass es viel schneller als die Proteine läuft, was zur Folge hat, dass es keine Potentialdifferenz mehr gibt und alle Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt werden.

Beide Gele wurden jeweils nacheinander gegossen, wobei im Sammelgel durch die Einlage eines Kamms Taschen zur Beladung freigehalten wurden.

Die Beladung des Gels mit den Proben erfolgte gemäß Proteinbestimmung in gleicher Proteinmenge. Zur späteren Einschätzung der Größe der detektierten Proteine wurde der Standard „Precision Plus“ (Biorad, München) mitgeführt. Somit war später eine Einschätzung der Größe des detektierten Proteins möglich. Die Gelelektrophorese erfolgte im Laufpuffer (TRIS 125 mM, Glycin, 192 mM, SDS 10 mM) bei einer Spannung von 80 V für 10 min und anschließend 120 V für 2 h.

	Sammelgel	8%Trenngel	10%Trenngel	12%Trenngel
Tris pH 6,8	1,25 M	-	-	-
Tris pH 8,8	-	0,375 M	0,375 M	0,375 M
Acrylamid	0,73 M	1,1 M	1,4 M	1,7 M
SDS	3,5 mM	3,5 mM	3,5 mM	3,5 mM
Ammoniumpersulfat	4,4 mM	4,4 mM	4,4 mM	4,4 mM
Temed	6 µM	2,4 µM	2,4 µM	2,4 µM

Tabelle 2: Zusammensetzung von Sammelgel und der Trenngel

#### 2.4.4 Western Blot

Mittels Nassblot-Verfahren wurden die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran „Protran 0,45 µm Porengröße“ (Schleicher & Schüll, Dassel) übertragen. Das Gel muss hierbei kathodenseitig und die Membran anodenseitig liegen. Die Blotkammer wurde mit eiskaltem Transferpuffer (TRIS 25 mM, Glycin 192 mM, Methanol 12,5 M), der zusätzlich durch einen Eisblock in einer Kunststoffform gekühlt wurde, gefüllt. Der Transfer erfolgte bei einer Stromstärke von 0,4 A für 90 min. Für die Darstellung der übertragenen Proteine wurde die Membran für 5 min mit Ponceau S (Ponceau S 26 mM, Trichloressigsäure 30 mM) gefärbt. Durch zweimaliges Waschen mit MilliQ<sup>TM</sup>-Wasser löste sich überschüssiger, nicht an Proteine gebundener Farbstoff ab, während die Proteinbanden deutlich zu erkennen blieben. Im Anschluss wurde die Membran fotografiert. Zur vollständigen Entfärbung wurde die Membran mit 0,1% TBST (TRIS 0,1 M, NaCl 0,15 M, Tween 20 0,9 mM, pH 7,5) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran unter stetigem Schwenken in einer Lösung von 5% Milchpulver (Roth, Karlsruhe) in 0,1% TBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal fünf Minuten mit 0,1% TBST gewaschen.

Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper, der spezifisch gegen das jeweilige Protein gerichtet war, erfolgte entweder über Nacht unter leichtem Schütteln bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur. Die Verdünnungen und Lösungsmittel der einzelnen Antikörper sind der Tabelle 3 zu entnehmen. Nach dreimaligem Waschen mit 0,1% TBST für je 10 min folgte die Inkubation für 1 h mit dem sekundären Antikörper in 5% Milchpulver in 0,1% TBST, der gegen den ersten Antikörper gerichtet und an die Peroxidase des Meerrettichs gekoppelt war. Anschließend wurde dreimal für je 10 min

in 0,1% TBST gewaschen und die Membran für 5 min mit dem „SuperSignal West Pico Substrate“ oder „SuperSignal West Dura Substrate“ (Pierce, Rockford, USA) inkubiert, das ein Substrat der Peroxidase enthielt, welches nach Umsetzung eine Chemolumineszenz zeigte. Zur Visualisierung wurden Filme „Fujifilm Super RX“ (Fujifilm Europe, Düsseldorf), je nach Stärke der Lumineszenz, für 2 bis 30 min belichtet und anschließend entwickelt. Eine quantitative Erfassung und Auswertung der Banden erfolgte mit der „Gene Snap“ Apparatur (Syngene, Cambridge, England).

	Verdünnung	Erwartete Proteingröße	2. Antikörper
Anti-β-Aktin (Sigma, München)	1:5000 TBST 0,1%	45 kDa	Anti-Mouse 1:5000
Anti-Gas (Santa Cruz, Kalifornien, USA)	1: 2000 TBST 0,1%	42 kDa	Anti-Rabbit 1:5000
Anti- Gγ3 (Santa Cruz, Kalifornien, USA)	1:300 5% Milchpulver	7 kDa	Anti-Rabbit 1:5000
Anti-OATP2B1 Universität Greifswald	1:2000 TBST 0,1%	84 kDa	Anti-Rabbit 1:5000

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

## 2.5 Transportassay

Die funktionelle Analyse des überexprimierten OATP2B1 erfolgte mittels kompetitiver Aufnahme zwischen dem radioaktiv markierten physiologischen Substrat Estronsulfat und Atorvastatin in verschiedenen Zelllinien.

### 2.5.1 Aufnahme von <sup>3</sup>H-Estronsulfat unter Atorvastatin in MDCK- und Herzmuskelzellen von Ratten

Als Radioligand wurde <sup>3</sup>H-markiertes Estronsulfat (Biotrend, Köln) verwendet. Seine spezifische Aktivität lag bei 50 Ci/mmol, die Lösung hatte die Aktivität von 1 µCi/µl und damit eine Konzentration des Radioliganden von 20 µM in Ethanol.

Adhärente MDCK II Zellen und Herzmuskelzellen wurden in Kulturschalen (Ø 6 cm) ausplattiert. Bei einer Konfluenz von 90% wurden die Zellen in sterilem 1x PBS gewaschen, in 2 ml Inkubationspuffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1,2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 12,5 mM HEPES, 5 mM Glukose), in wässriger Lösung aufgenommen und 10 min im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Atorvastatin in einer Endkonzentration von 50 µM. Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 5 µl des Radioliganden, verdünnt 1:10 im Inkubationspuffer in einer Konzentration von 2 µM. Nach weiteren 5 Minuten wurde der Inkubationspuffer

mit dem Radioliganden abgesaugt, der Zellrasen in eiskaltem 1x PBS gewaschen und anschließend in 700 µl 0,2%iger SDS-Lösung lysiert.

### **2.5.2 Aufnahme von <sup>3</sup>H-Estronsulfat unter Atorvastatin im humanen Herzgewebe und Rattengewebe**

Das Herzgewebe wurde mit einem Skalpell in etwa gleich große Stückchen zerkleinert und im Inkubationspuffer in einer 48 Well Platte 10 min im Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von Atorvastatin in einer Endkonzentration von 0,001 µM, 0,01 µM, 0,1 µM, 1 µM, 3 µM, 10 µM, 30 µM und 50 µM. Nach 5 Minuten erfolgte die Zugabe von 5 µl Radioliganden, der zuvor 1:10 im Inkubationspuffer verdünnt wurde. Nach weiteren 5 Minuten wurde das Herzgewebe in eiskaltem 1x PBS gewaschen und in 700 µl 0,2%iger SDS-Lösung lysiert.

### **2.5.3 Szintillationszählung**

Die Auswertung erfolgte mit der Szintillationsflüssigkeit „Ultima Gold“ (Perkin/Elmer, Massachusetts, USA). Dabei wurden 5 ml Szintillationsflüssigkeit zu dem Lysat pipettiert und 24 h unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Szintillation im „Wallac 1409 Liquid Scintillation Counter“ (Perkin/Elmer, Massachusetts, USA).

## **2.6 Zellfixierung, konfokale Lasermikroskopie**

### **2.6.1 Fixierung adhärenter Zellen**

Für die Betrachtung von adhärenter Zellen in konfokaler Lasermikroskopie wurden die Zellen auf Glasplättchen ausplattiert. Nach 24 h bis 48 h wurden die Zellen vorsichtig mit 1x PBS gewaschen und zur Fixierung mit 4% Paraformaldehyd in 1x PBS für 15 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 10 min mit einer Blocklösung (5% BSA in PBS) behandelt. Nachdem die Zellen in 1x PBS gewaschen wurden, folgte eine 30-minütige Inkubation mit dem primären Antikörper in Antikörperverdünnungslösung (TBS 0,05 M pH 7,2-7,4, 1% BSA, 0,5% Triton X-100, 0,05% Thimerosal, 0,01% NaN<sub>3</sub>). Die Negativkontrolle wurde mit 1x PBS mit dem primären Antikörper inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift in 1x PBS folgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper in PBS-Puffer. Der sekundäre Antikörper war gegen die IgG-Spezies des primären Antikörpers gerichtet und mit einem Fluorochrom konjugiert. Nach 30-minütiger Inkubation wurden die Glasplättchen in 1x PBS gewaschen, getrocknet und mit dem Eindeckelmedium „Fluoromount-G“ (Southern Biotech, Alabama, USA) auf Objektträger gebracht.

1. Antikörper	Verdünnung	2. Antikörper	Verdünnung
Anti-OATP2B1 Universität Greifswald	1:400	rabbit Alexa 546 (Sigma, München)	1:800
TOPRO3 Zellkernanfärbung (Sigma, München)	1:1000		

Tabelle 4: Für Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

Die konfokale Lasermikroskopie wurde mit dem „Axiovert 200M“ (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt.

## 2.7 Statistik

Alle Werte sind, sofern nicht anders angegeben, als arithmetisches Mittel +/- der Standardabweichung des Mittelwertes dargestellt, berechnet aus den Einzelwerten (n). Die statistische Signifikanz wurde mittels T-Test beim Vergleich zweier Gruppen ermittelt. Ein p-Wert kleiner 0,05 wurde als statistisch signifikanter Unterschied bewertet und als solcher gekennzeichnet.

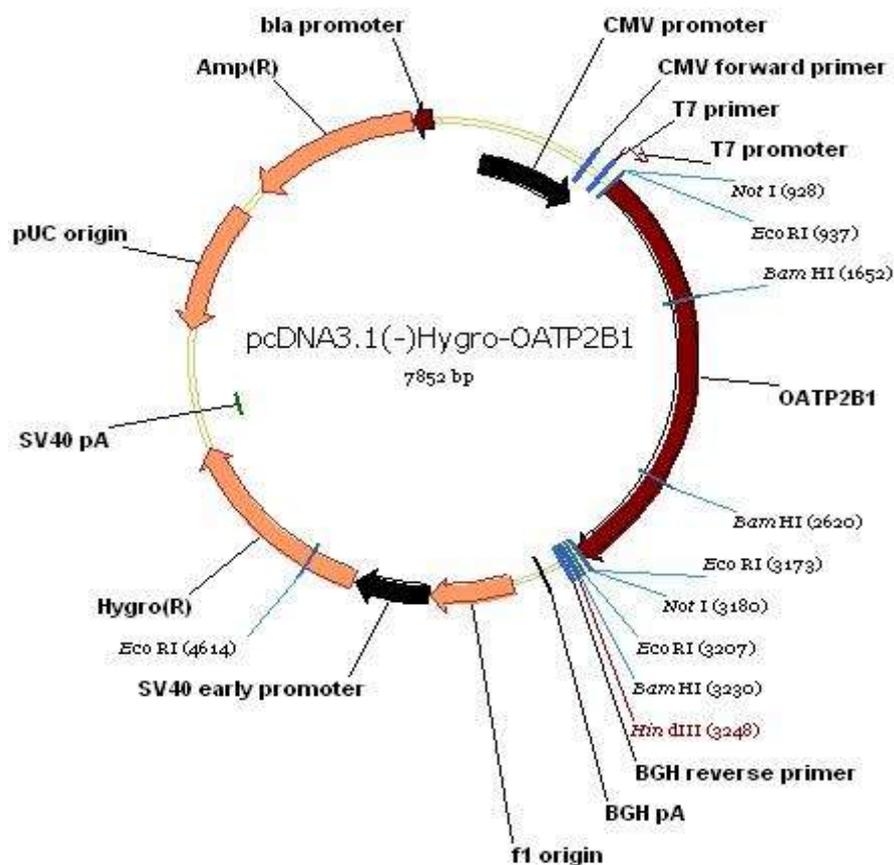
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Herstellung des Adenovirus-AdGFP/OATP2B1

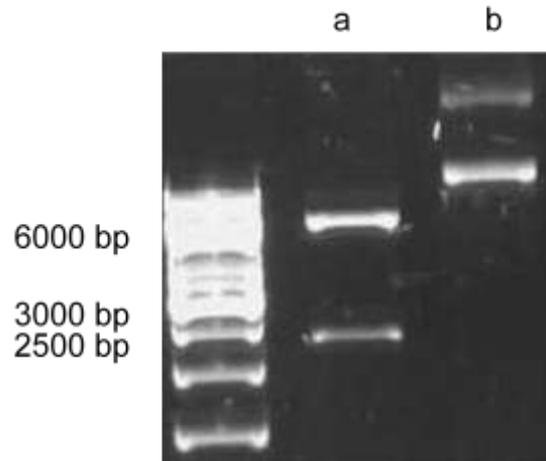
Um die Bedeutung des Organischen-Anionen-Transport-Polypeptides 2B1 in Herzmuskelzellen der neonatalen Ratte untersuchen zu können, wurde der adenovirale Gentransfer zur Proteinüberexpression gewählt. Hierzu wurde zunächst ein Adenovirus generiert, durch welches sich Primärzellen infizieren lassen.

##### 3.1.1 Klonierung der Plasmide

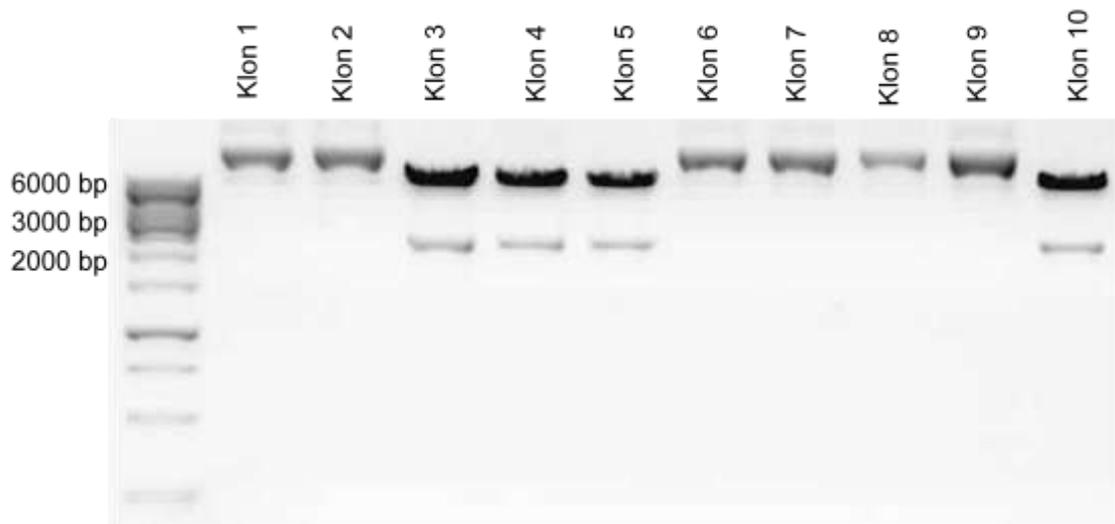
Aus dem pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 Vektor, den uns freundlicherweise Herr Dr. Markus Grube, Universität Greifswald zur Verfügung stellte, wurde die OATP2B1 Sequenz mit NotI ausgeschnitten und in den pAdTrack-CMV über NotI einkloniert. Das erhaltene Konstrukt ist in Abbildung 7 schematisch dargestellt.



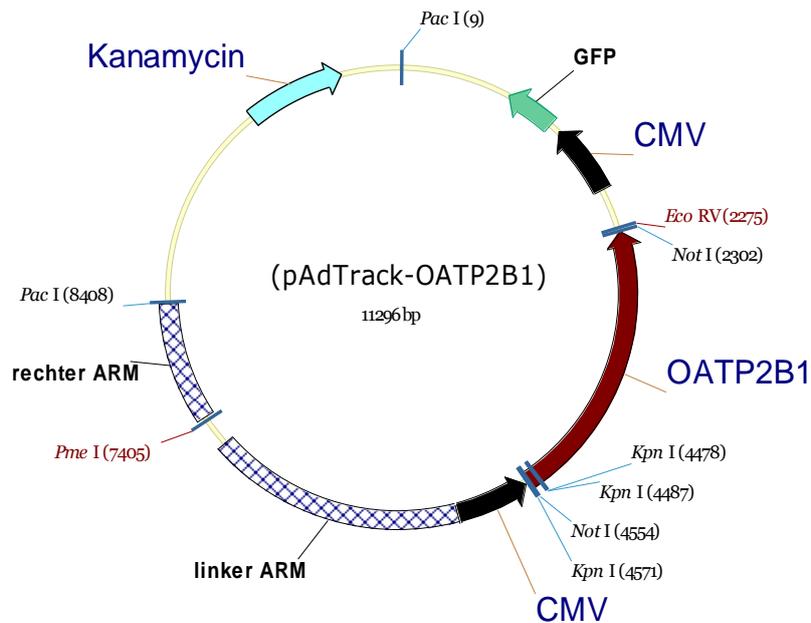
**Abbildung 7: Skizze des pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 Plasmids zur Isolierung der OATP2B1 Sequenz.**



**Abbildung 8: Agarosegel vom Verdau des pcDNA3.1/Hygro(-)OATP2B1 Plasmids.** (a) Die OATP2B1 cDNA mit der Größe von ca. 2200 Basenpaaren wurde mit NotI aus dem Plasmid herausgeschnitten. (b) Unverdautes Plasmid von ca. 8000 Basenpaaren Größe zwecks Kontrolle.

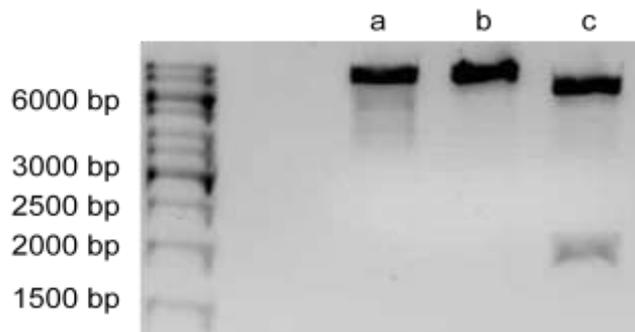


**Abbildung 9: Agarosegel vom Verdau ausgewählter Klone mit dem ligierten pAdTrack-OATP2B1.** Der Verdau der Klone 1 – 10 mit NotI zeigt vier positive Klone (Klon 3, 4, 5, 10). Im Falle einer erfolgreichen Ligation entstehen zwei DNA-Fragmente von 9200 und 2200 Basenpaaren Größe.



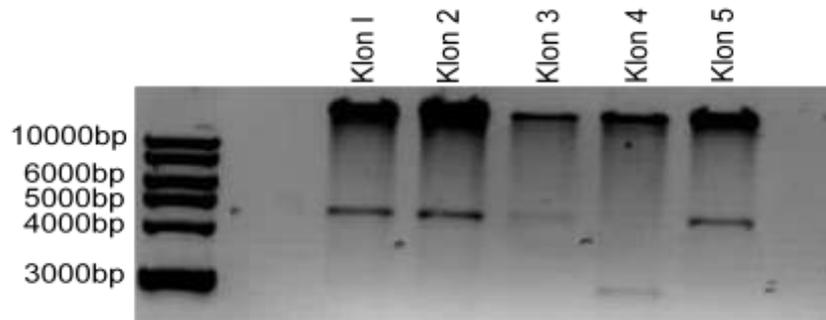
**Abbildung 10: Skizze des pAdTrack-OATP2B1 Plasmids** nach erfolgreicher Ligation über die NotI Schnittstelle.

Die korrekte Orientierung von OATP2B1 im pAdTrack-CMV wurde mit Hilfe der Restriktionsendonukleasen KpnI und EcoRV überprüft.



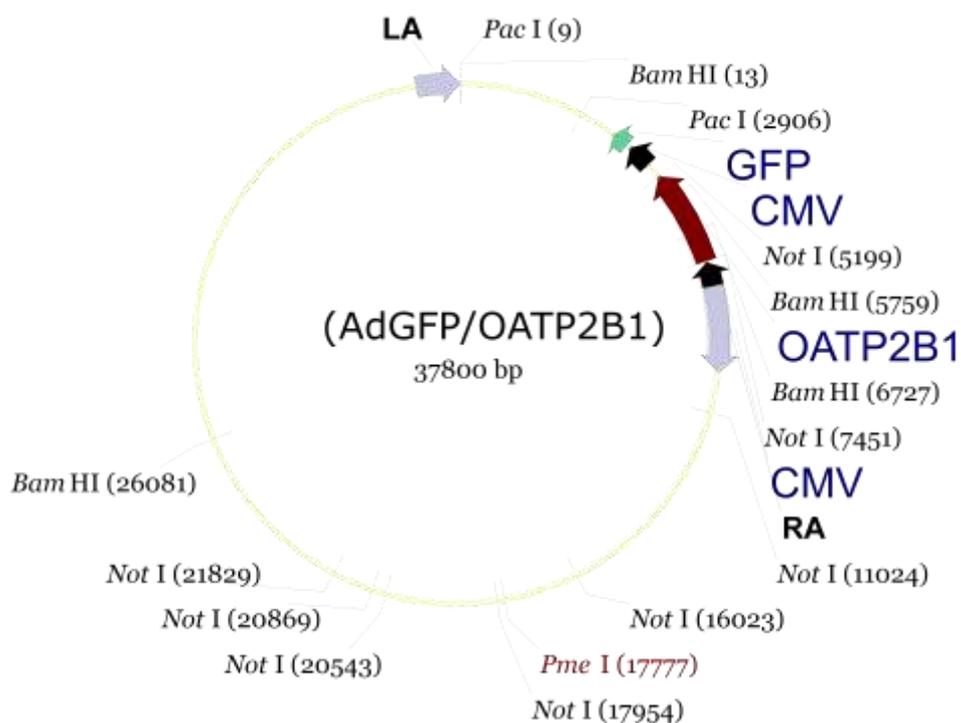
**Abbildung 11: Überprüfung der korrekten Orientierung der OATP2B1 cDNA in einem positiven Klon** (a) Einzelverdau mit KpnI, (b) Einzelverdau mit EcoRV, (c) Asymmetrischer Doppelverdau mit KpnI und EcoRV ergibt nur bei korrekter Orientierung von OATP2B1 ein DNA-Fragment von 2000 Basenpaaren Größe.

Dieses Konstrukt wurde nach Linearisierung mit PmeI in *E. coli* BJ5183 mit dem Virusgenom pAdEasy-1 zur homologen Rekombination gebracht.

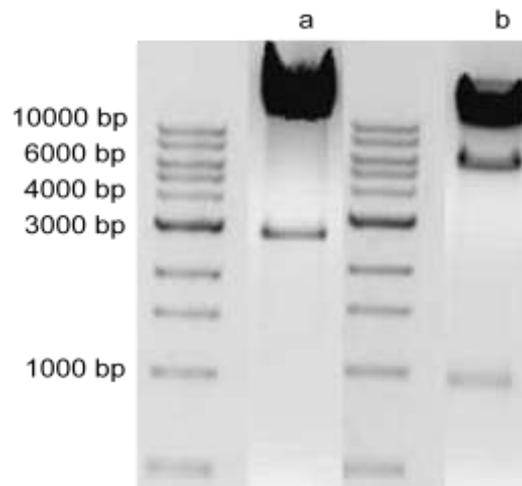


**Abbildung 12: Rekombination von pAdEasy und pAdTrack-OATP2B1.** Die erfolgreiche homologe Rekombination der Plasmide zeigt nach dem Verdau mit *PacI* ein DNA-Fragment von >33400 Basenpaaren Größe sowie ein kleineres DNA-Fragment von ca. 3000 Basenpaaren (bp) Größe (Klon 4). Bei der alternativen homologen Rekombination des Replikationsursprungs an Stelle des linken Arms, tritt in einigen Fällen ein DNA-Fragment von 4500 Basenpaaren (bp) auf, weil durch die Rekombinationsvariante eine zweite *PacI*-Erkennungssequenz eingebracht wird (Klone 1, 2, 3, 5).

Für die Retransformation in *E. coli* DH10B wurde Klon 4 gewählt. Nach erfolgter Transformation, Amplifikation und Aufreinigung wurde das Konstrukt AdGFP/OATP2B1 mit den Enzymen *PacI* und *BamHI* geschnitten, um den korrekten Einbau der OATP2B1 cDNA zu überprüfen (Abbildungen 14a, b).



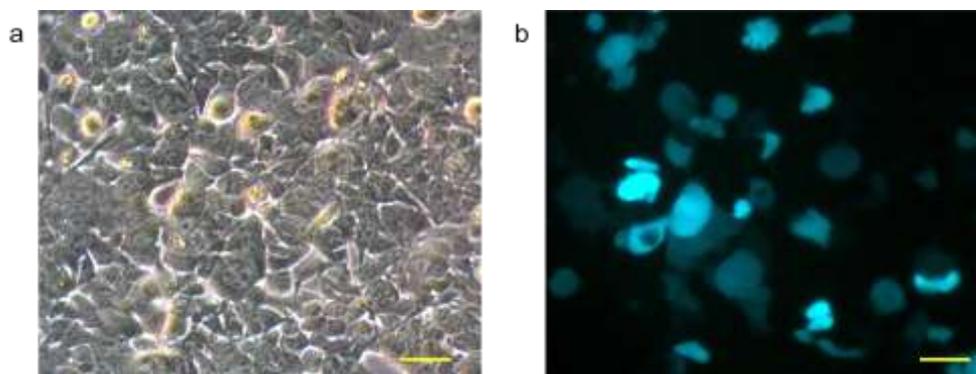
**Abbildung 13: Skizze des AdGFP/OATP2B1 Plasmids** nach erfolgter Rekombination in *E. coli* BJ5183.



**Abbildung 14: Agarosegel vom Verdau des AdGFP/OATP2B1 nach erfolgter Retransformation in E. coli DH10B.** (a) Retransformation des AdGFP/OATP2B1 in E. coli DH10B zeigt nach Verdau mit PacI ein DNA-Fragment von >33400 Basenpaaren sowie ein kleineres DNA-Fragment von ca. 3000 Basenpaaren. (b) Verdau des AdGFP/OATP2B1 mit BamHI. Das entstandene DNA-Fragment von 1000 Basenpaaren ist aus der OATP2B1 Sequenz herausgeschnitten. Weitere DNA-Fragmente entstehen mit ca. 6000 Basenpaaren, sowie 10000 Basenpaaren und 20000 Basenpaaren.

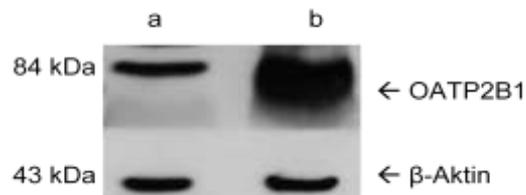
### 3.1.2 Transfektion des AdGFP/OATP2B1 in HEK293A-Zellen

Das Konstrukt wurde mit PacI linearisiert und in HEK293A-Zellen transfiziert, in denen sich das Virus vermehrt. Bereits zwei bis drei Tage nach der Transfektion in HEK293A-Zellen zeigten die transfizierten Zellen eine grüne Fluoreszenz (Abbildung 15b). Im ersten Infektionszyklus war der Infektionsverlauf mit sechs bis sieben Tagen Dauer sehr langsam und nicht alle Zellen zeigten eine grüne Fluoreszenz auf. Mit wachsender Anzahl von Infektionszyklen nahmen sowohl die Infektionsgeschwindigkeit als auch die Anzahl infizierter Zellen stetig zu.



**Abbildung 15: Transfektion von HEK293A-Zellen mit AdGFP/OATP2B1.**  
 (a) Phasenkontrastaufnahme der Zelldichte 72 h nach Transfektion, Maßstabsbalken 500 µm.  
 (b) GFP Fluoreszenz 72 h nach Transfektion, Maßstabsbalken 500 µm.

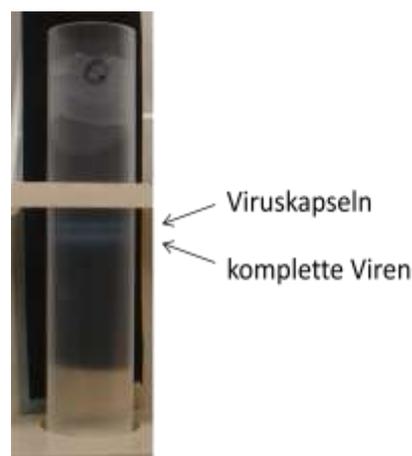
Um die Funktionalität des Virus zu überprüfen, wurde die Expression von OATP2B1 in infizierten HEK293A-Zellen mittels Western Blot Analyse mit Wildtyp Zelllysaten verglichen (Abbildung 16b). Dabei war bei den virusinfizierten HEK293A-Zellen eine deutlich stärkere Proteinbande als bei den Wildtyp Zellen zu erkennen. Die gleichmäßige Beladung wurde mit  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle sichergestellt.



**Abbildung 16: Western Blot von adenoviraler Überexpression von OATP2B1 in HEK293A-Zellen.** Die Membran wurden bei 60 kDa geschnitten (a) HEK293A Wildtyp Zellüberstand. (b) Virusinfizierter HEK293A Zellüberstand. OATP2B1 hat ein Molekulargewicht von etwa 84 kDa.

### 3.1.3 OATP2B1 Virusherstellung und -gewinnung

Nachdem die Funktionalität des OATP2B1 Virus in den primär infizierten HEK293A-Zellen nachgewiesen wurde (Abbildung 16), erfolgte die Infektion einer viel größeren Zahl von HEK293A-Zellen in mehreren Schritten zur besseren Virusausbeute. Die infizierten HEK293A-Zellen wurden lysiert und das Zelllysate mit einem CsCl-Gradienten aufgereinigt. Im Ultrazentrifugationsröhrchen zeigten sich eine obere Bande bestehend nur aus Viruskapseln und eine untere Bande bestehend aus dem intakten OATP2B1 Adenovirus.

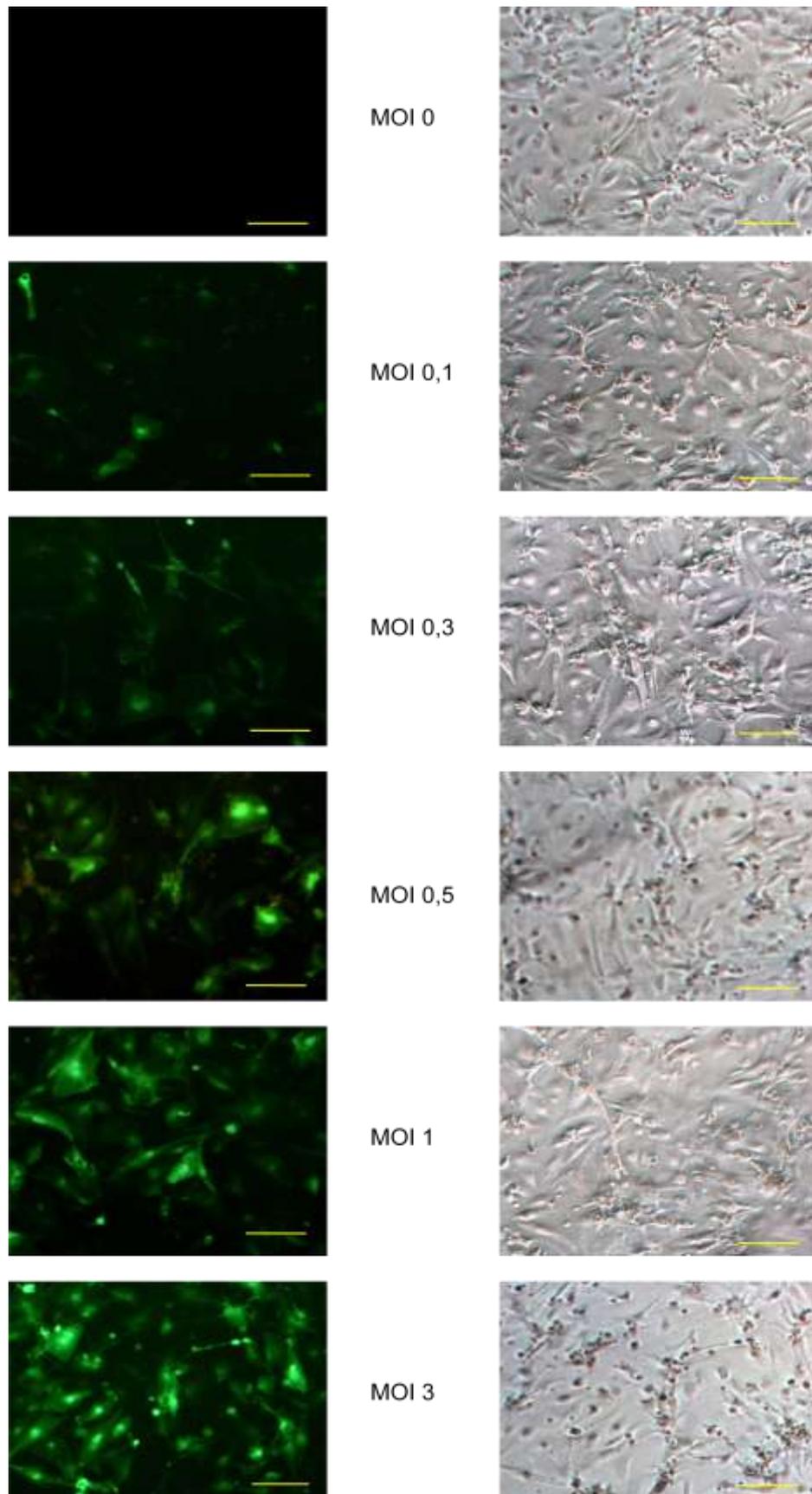


**Abbildung 17: Ultrazentrifugationsröhrchen nach 24 h Zentrifugation mit zwei Banden.** Die untere Bande enthält die kompletten Viren und die obere Bande enthält Viruskapseln.

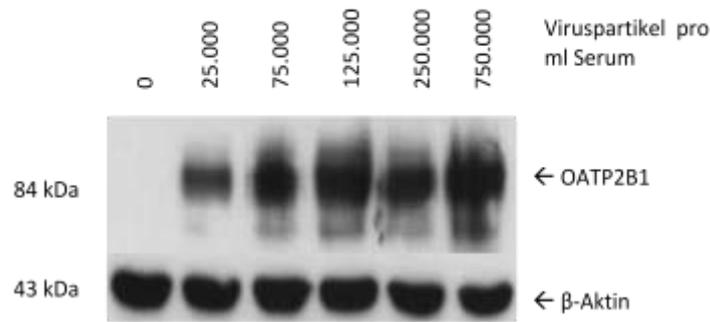
### 3.1.4 Titerbestimmung des OATP2B1 Adenovirus

Um die Effizienz der adenoviralen Infektion in Herzmuskelzellen zu überprüfen, wurden Herzmuskelzellen mit unterschiedlichen Viruskonzentrationen infiziert und der Infektionsverlauf nach 48 h ausgewertet. Es wurde die geringste Verdünnung je Zellkulturschale (Ø 6 cm, 1 Mio. Zellen) ermittelt, welche noch 100% aller Zellen GFP exprimieren ließ (Abbildung 18). Dies war bei einer MOI von 3 annähernd der Fall. Bereits bei einer MOI von 0,1 konnte eine GFP Expression im Phasenkontrastmikroskop nachgewiesen werden. Die Darstellung der Virustitration im Western Blot mit einem OATP2B1 Antikörper und  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle zeigte die MOI-abhängige Steigerung der OATP2B1-überexpression in Herzmuskelzellen (Abbildung 19).

Für das OATP2B1 Virus konnte ein Titer von  $5 \times 10^6$  Viruspartikel pro  $\mu\text{l}$  ermittelt werden (Siehe 2.3.6).



**Abbildung 18: Titration von OATP2B1 Virus in Herzmuskelzellen.** Dargestellt sind Fluoreszenz- und Phasenkontrastaufnahmen von infizierten Herzmuskelzellen mit einer MOI von 0 bis 3. Maßstabsbalken: 200 μm.



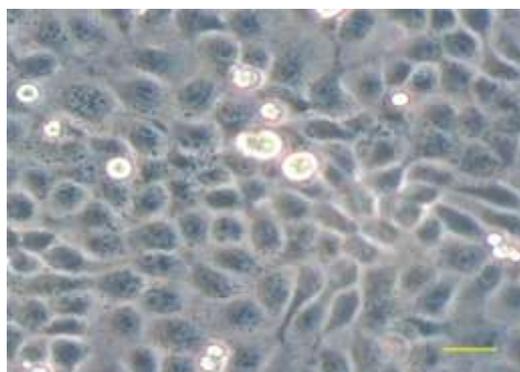
**Abbildung 19: Western Blot mit der OATP2B1 Virustitration.** Die Membran wurde bei 60 kDa geschnitten. Kultivierte Herzmuskelzellen wurden mit steigenden Viruskonzentrationen infiziert, 48 h nach Infektion geerntet und die OATP2B1 Expression im Western Blot ermittelt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

### 3.2. Etablierung einer transfizierten MDCK Zelllinie

Um die Bedeutung und Funktion des Organischen-Anionen-Transport-Polypeptids 2B1 besser charakterisieren zu können, wurden in dieser Arbeit verschiedene Zellkulturmodelle verwendet. Hierunter befand sich auch eine stabil transfizierte Zelllinie, die mit Hilfe des pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 Plasmids generiert wurde. Der Vektor verfügte über eine Hygromycinresistenz, um später die Zellen, die das Plasmid nicht in ihr Genom integriert hatten, mit dem Selektionsmedium zu eliminieren. Des Weiteren wurden Zellen mit Hilfe des pAdTrack-OATP2B1 Plasmids transient transfiziert.

#### 3.2.1 Transfektion der MDCK II WT Zellen

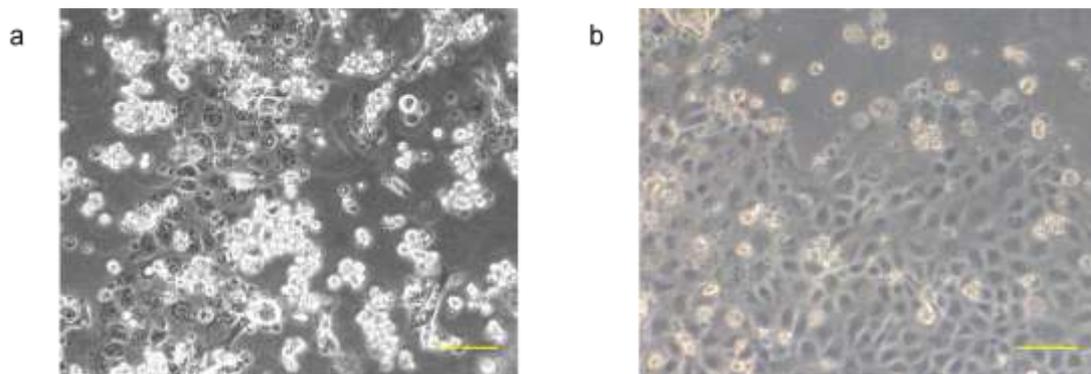
MDCK II WT Zellen wurden am Vortag der Transfektion ausplattiert. Vor der Transfektion betrug die Zelldichte 95%.



**Abbildung 20: MDCK II WT Zellen zur Generierung einer stabil transfizierten Zelllinie.** Darstellung der Zelldichte. Maßstabsbalken: 200  $\mu$ m.

### 3.2.2 Selektion

Zellen, die das Plasmid pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 aufgenommen und stabil ins Genom integriert hatten, konnten unter Selektion mit Hygromycin (270 µg/ml) kultiviert werden. Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion 1:5 gesplittet, da sehr dichte Zellen sich schlecht selektionieren lassen. Bereits nach drei Tagen war eine deutliche Minderung der Zellzahl zu erkennen (Abbildung 21a), sodass nur einzelne Zellinseln überlebten. Innerhalb der nächsten Woche sah man einen stetigen Anstieg der Zelldichte, bis sich wieder ein Zellrasen ausgebildet hatte (Abbildung 21b).



**Abbildung 21: Zellwachstum der MDCK II Zellen, stabil transfiziert mit pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1.** (a) Zellen nach dreitägiger Selektion mit Hygromycin B 270 µg/ml. (b) Zellrasenbildung nach ca. zehntägiger Selektion mit Hygromycin B 270 µg/ml. Maßstabsbalken: 500 µm.

### 3.2.3 Expressionskontrolle der stabilen Zelllinie

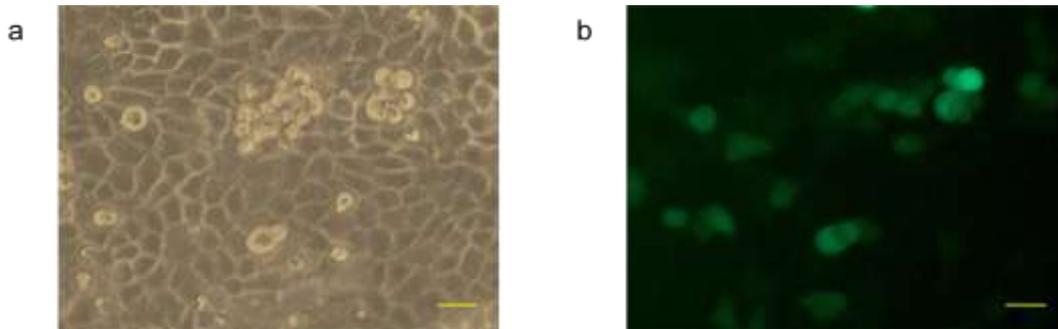
Da das Plasmid pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 kein GFP zur optischen Überprüfung der Transfektion exprimiert, wurde die stabile Transfektion mittels Expressionskontrolle von OATP2B1 überprüft. Dabei war eine deutliche Proteinbande im Western Blot bei ca. 84 kDa detektierbar, die OATP2B1 darstellt.



**Abbildung 22: Expressionskontrolle stabiler und transients Expression des OATP2B1 mittels Western Blot.** (a) MDCK II WT Zellen, (b) Transient transfizierte MDCK II Zellen mit pAdTrack-CMV, (c) Stabil transfizierte MDCK II Zellen mit pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 und (d) Transient transfizierte MDCK II Zellen mit pAdTrack-OATP2B1

Zusätzlich wurde die Transfektionseffizienz transient transfizierter MDCK II Zellen mit pAdTrack-OATP2B1 über die GFP Fluoreszenzintensität überprüft. Vor der Transfektion betrug die Zelldichte zwischen 70 und 90%. Bereits 72 h nach der

Transfektion war ein schwaches GFP Signal unter dem UV Licht im Mikroskop zu erkennen. (Abbildung 23).



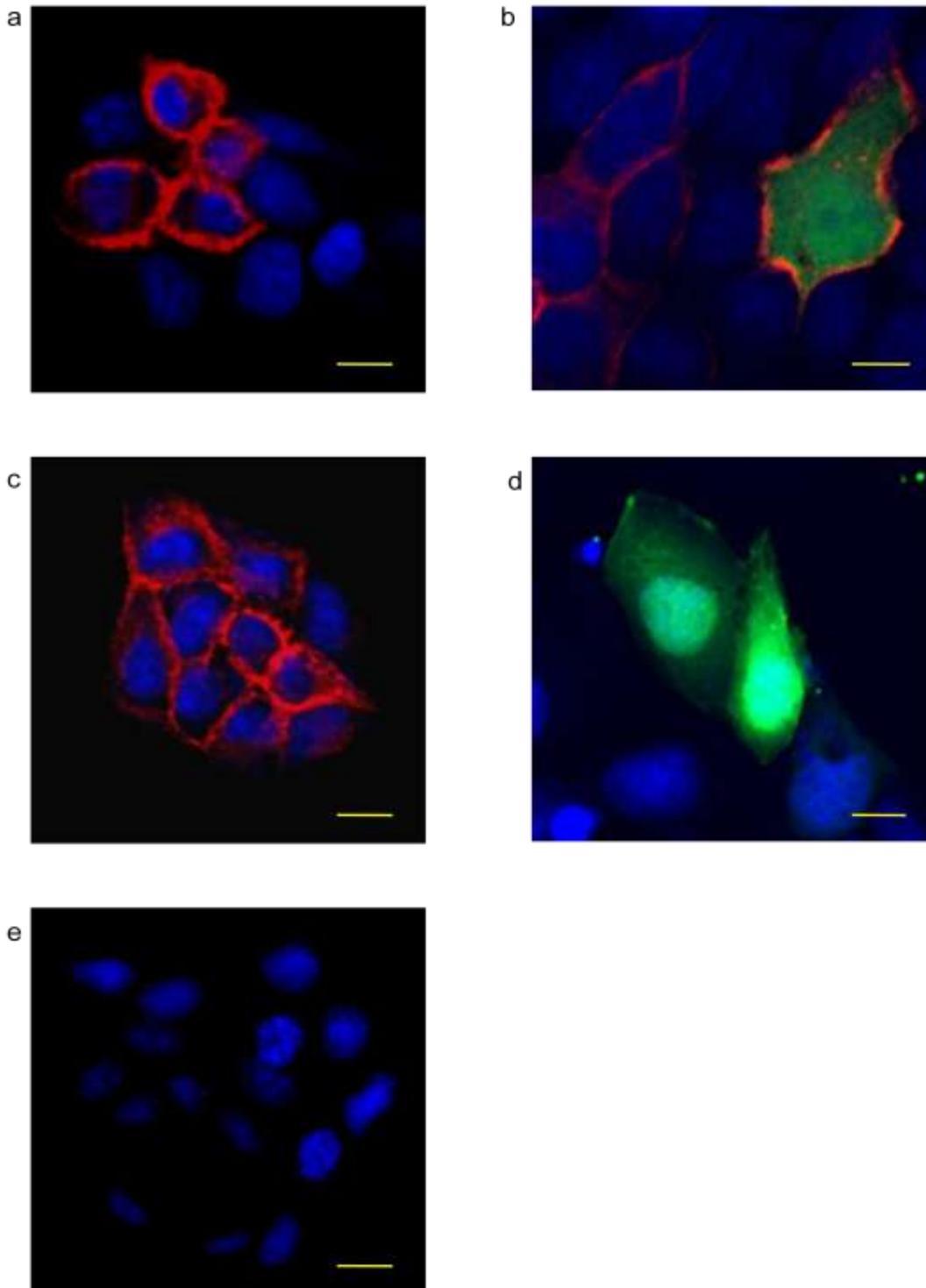
**Abbildung 23: Transfektionseffizienz transient transfizierter MDCK II Zellen mit pAdTrack-OATP2B1.** (a) Phasenkontrast- und (b) Fluoreszenzaufnahme OATP2B1 transient transfizierter MDCK II Zellen. Maßstabsbalken: 200 µm.

### 3.3 Lokalisation von OATP2B1

Nachdem es möglich war das OATP2B1 sowohl über einen adenoviralen als auch liposomenvermittelten Gentransfer in HEK293A-, MDCK II- und Herzmuskelzellen zu exprimieren, sollte die korrekte intrazelluläre Lokalisation des Transporters überprüft werden.

#### 3.3.1 Immunfloreszenz von MDCK II Zellen

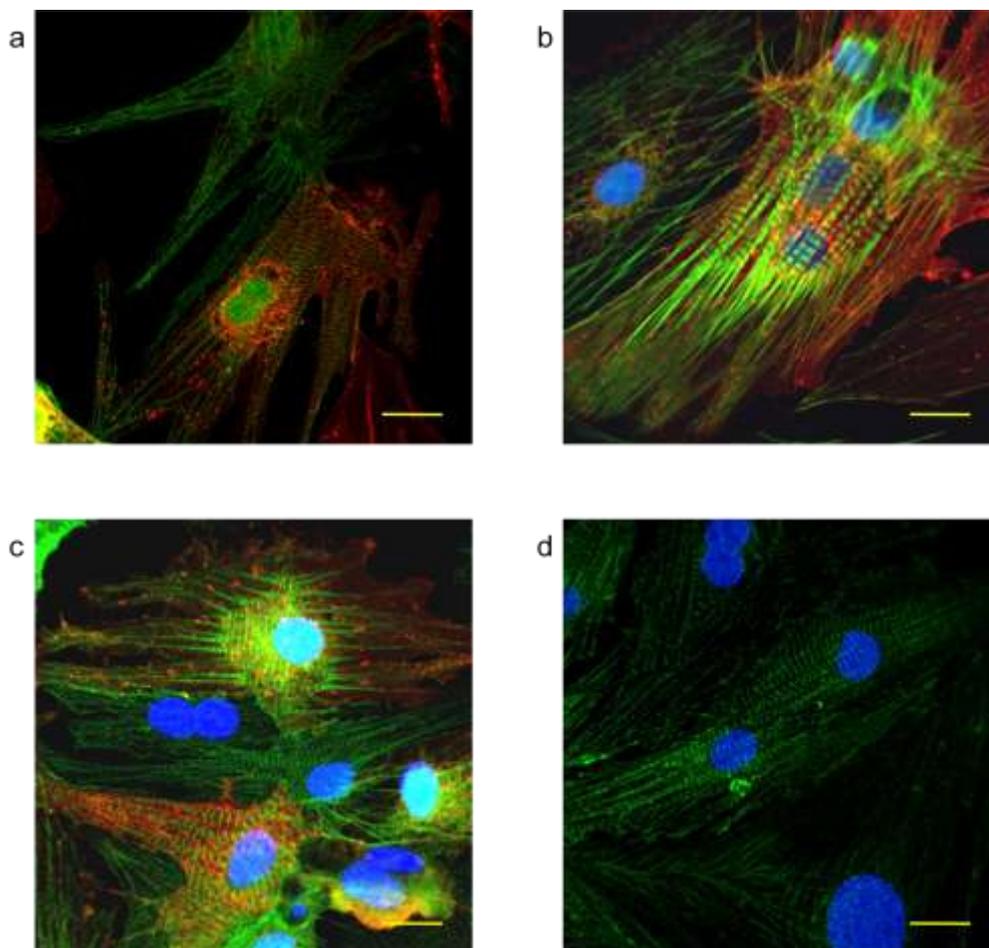
Stabil transfizierte MDCK II Zellen mit pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 wurden auf Deckgläschen (500.000 Zellen, 50% Konfluenz) ausplattiert, nach 24 h mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit einem Primärantikörper gegen OATP2B1 und dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert und auf Objektträger gebracht. Die Auswertung erfolgte mittels konfokaler Lasermikroskopie (Abbildung 24a, b). Die Aufnahmen zeigten die Lokalisation von OATP2B1 an der Zellmembran sowohl in stabil als auch in transient transfizierten MDCK II Zellen. Bei den transient transfizierten MDCK II Zellen mit pAdTrack-OATP2B1 wurde in einigen Zellen GFP koexprimiert. Jedoch nicht alle Zellen, die OATP2B1 exprimierten, waren GFP-Fluoreszenz positiv. Als Negativkontrolle dienten zum einen MDCK II Wildtyp Zellen sowie transient transfizierte MDCK II Zellen mit pAdTrack-CMV (Abbildungen 24d, e). Als Positivkontrolle dienten stabil transfizierte MDCK II OATP Zellen, die wir freundlicherweise zu Kontrollzwecken von Herrn Dr. Markus Grube, Universität Greifswald zur Verfügung gestellt bekommen haben (Abbildung 24c).



**Abbildung 24: Immunfluoreszenzaufnahme mittels konfokaler Lasermikroskopie von OATP2B1 in MDCK II Zellen.** a) Stabil transfizierte MDCK II mit pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1. (b) Transient transfizierte MDCK II Zellen mit pAdTrack-OATP2B1. (c) Stabil transfizierte MDCK II OATP Zellen. (d) Transient transfizierte MDCK II Zellen mit pAdTrack-CMV und (e) MDCK II Wildtyp Zellen als Negativkontrolle. Rot = OATP2B1; blau = Zellkerne, grün = GFP des adenoviralen Expressionsvektors. Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

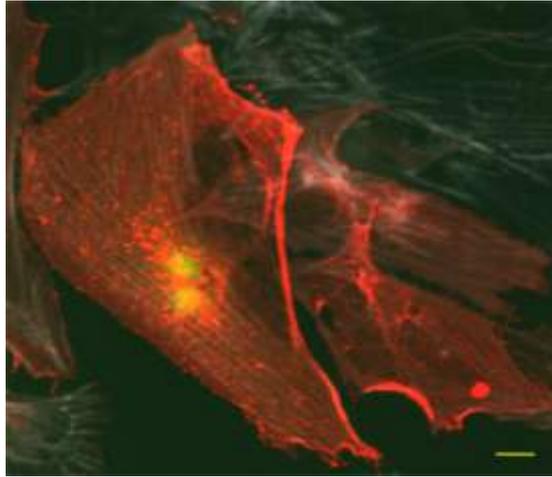
### 3.3.2 Immunfluoreszenz von Herzmuskelzellen neonataler Ratten

Herzmuskelzellen wurden auf Deckgläschen ausplattiert (500.000 Zellen, Konfluenz 50%) und nach drei Tagen Kultivierung mit dem OATP2B1 Adenovirus (MOI 3) infiziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd fixiert, mit einem Primärantikörper gegen OATP2B1 und dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert und auf Objektträger gebracht sowie mittels konfokaler Lasermikroskopie analysiert. Die Aufnahmen zeigten die Expression von OATP2B1 in infizierten Herzmuskelzellen. Das OATP2B1 Signal war im Zytosol detektierbar und nicht an der Zellmembran (Abbildungen 25a-d). Zur besseren Strukturunterscheidung wurde zusätzlich das kardiomyozytenspezifische Protein Aktinin (grün) und die Zellkerne (blau) sichtbar gemacht.



**Abbildung 25: Immunfluoreszenzaufnahme mittels konfokaler Lasermikroskopie von OATP2B1 in Herzmuskelzellen.** (a-c) OATP2B1-infizierte Herzmuskelzellen mit zytosolischer OATP2B1 Expression. (d) Nicht-infizierte Herzmuskelzellen. Rot = OATP2B1; blau = Zellkerne, grün = GFP des adenoviralen Expressionsvektors und Aktinin. Maßstabsbalken: 10 µm.

Im Gegensatz zu den Herzmuskelzellen konnte OATP2B1 in infizierten Fibroblasten an der Zellmembran sowie im Zytosol detektiert werden (Abbildung 26).

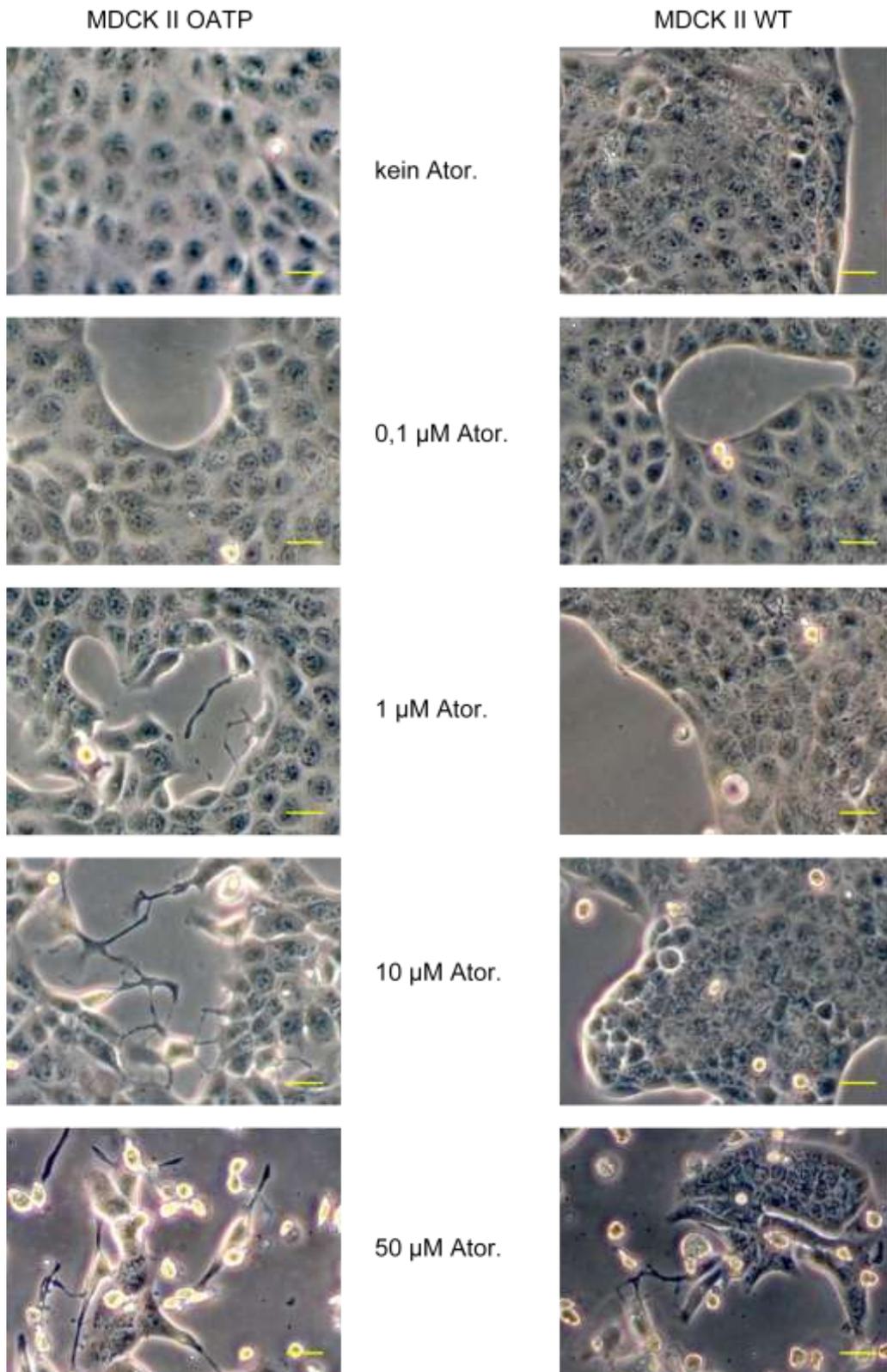


**Abbildung 26: Immunfluoreszenzaufnahme mittels konfokaler Lasermikroskopie von OATP2B1 in Fibroblasten.** OATP2B1-infizierte Fibroblasten mit membranständiger und zytosolischer Lokalisation des OATP2B1. Rot = OATP2B1; grau = Aktinin; grün = GFP des adenoviralen Expressionsvektors. Maßstabsbalken: 10  $\mu\text{m}$

### 3.4 Behandlung von Zellen mit Atorvastatin

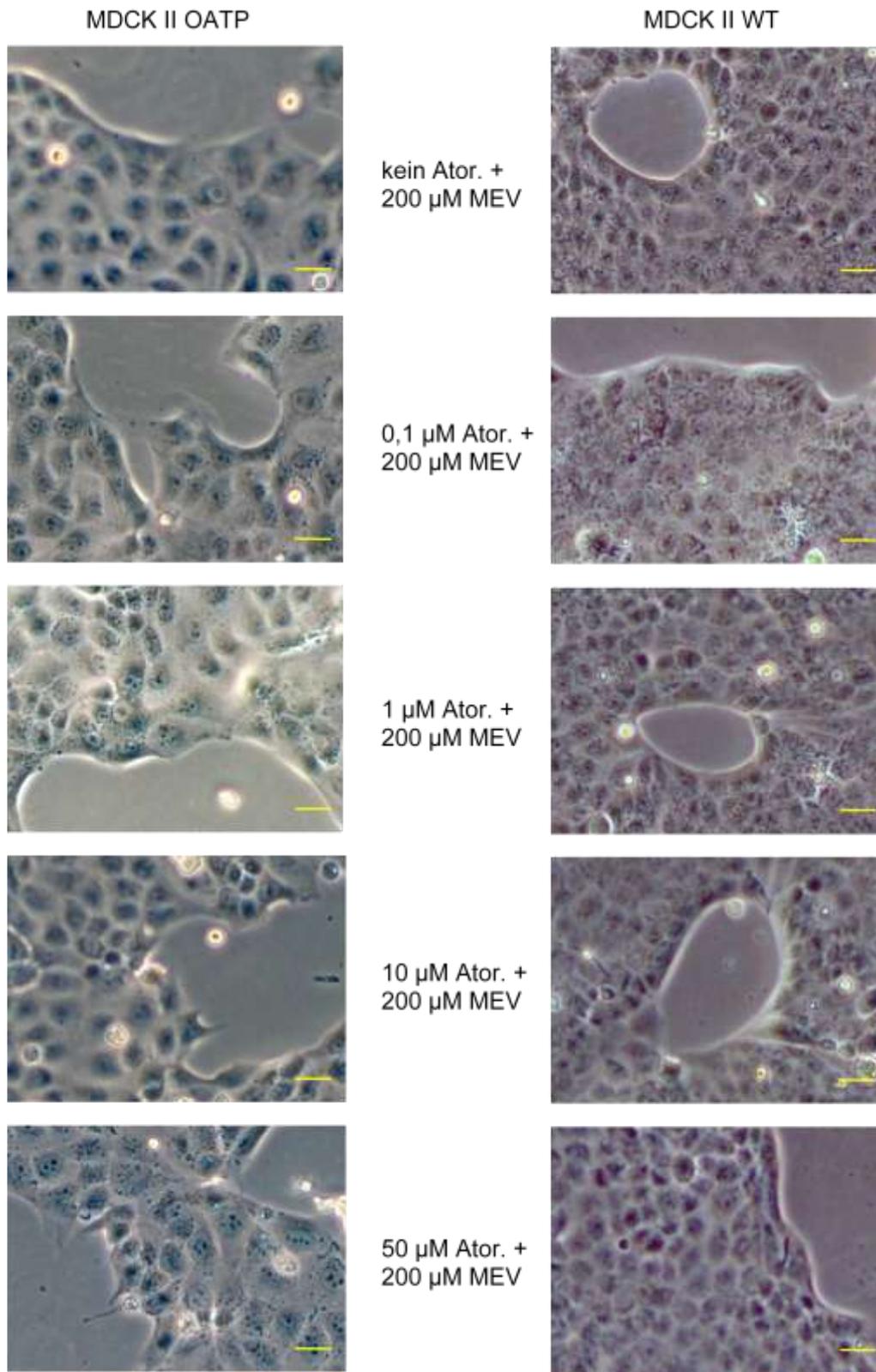
#### 3.4.1 Veränderung der OATP2B1 Expression in MDCK II Zellen und der Zellmorphologie nach Atorvastatinzugabe

Um den Zusammenhang von Atorvastatin, OATP-Expression und Zellmorphologie weiter zu untersuchen, wurde zunächst die Atorvastatinwirkung auf MDCK II Zellen überprüft. Hierzu wurden MDCK II OATP und MDCK II Wildtyp Zellen bis zu einer Konfluenz von ca. 90% kultiviert und anschließend für 48 h mit Atorvastatin in verschiedenen Konzentrationen (0  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ ) im Medium behandelt. Bei der Intervention wurde das Medium mit dem Atorvastatin alle 24 h erneuert. 48 h nach der Atorvastatinintervention wurden die Zellen lichtmikroskopisch begutachtet. Bei den MDCK II OATP Zellen zeigten sich ab einer Atorvastatinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  bereits vereinzelt morphologische Zellveränderungen, wie das Ausbilden von langen dünnen Ausläufern und Verschmälerung der Zellkörper. Proportional zur steigenden Atorvastatinkonzentration nahmen diese Effekte zu. Eine deutliche Zellzahlabnahme zeigte sich bei der Atorvastatinkonzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Im Vergleich dazu zeigten die MDCK II Wildtyp Zellen vereinzelt morphologische Zellveränderungen erst bei einer Atorvastatinkonzentration von 50  $\mu\text{M}$ . Bei den niedrigeren Konzentrationen waren diese kaum zu verzeichnen. Im Vergleich zu den MDCK II OATP war bei den MDCK II Wildtyp Zellen eine deutlich geringere Toxizität von Atorvastatin zu sehen (Abbildung 30).



**Abbildung 30: Phasenkontrastaufnahme der morphologischen Zellveränderungen unter Atorvastatin.** Vergleichende Darstellung der konzentrationsabhängigen Atorvastatinwirkung auf MDCK II OATP und MDCK II Wildtyp Zellen (MDCK WT). Maßstabsbalken: 200 μm.

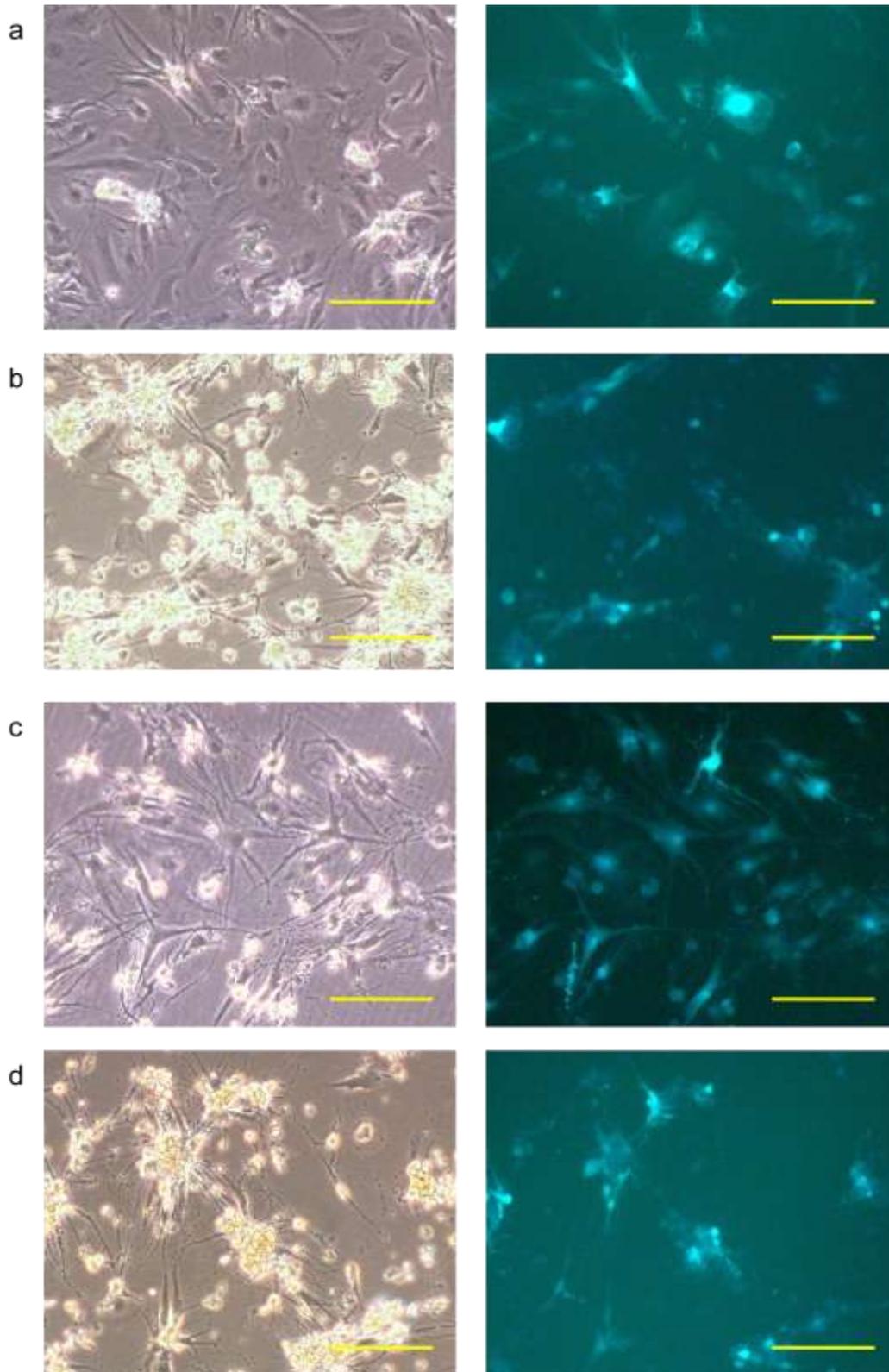
Um die Frage zu klären, ob die morphologischen Zellveränderungen, sowie die Zellzahlabnahme durch das Atorvastatin, d.h. durch die Hemmung der HMG-CoA Reduktase, bedingt waren, wurden in einem Parallelversuch MDCK II OATP und MDCK II Wildtyp Zellen gleichzeitig mit den oben genannten Atorvastatinkonzentrationen und zusätzlich mit Mevalonsäure in einer Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  im Medium behandelt. Hierunter blieben morphologische Zellveränderungen aus (Abbildung 31).



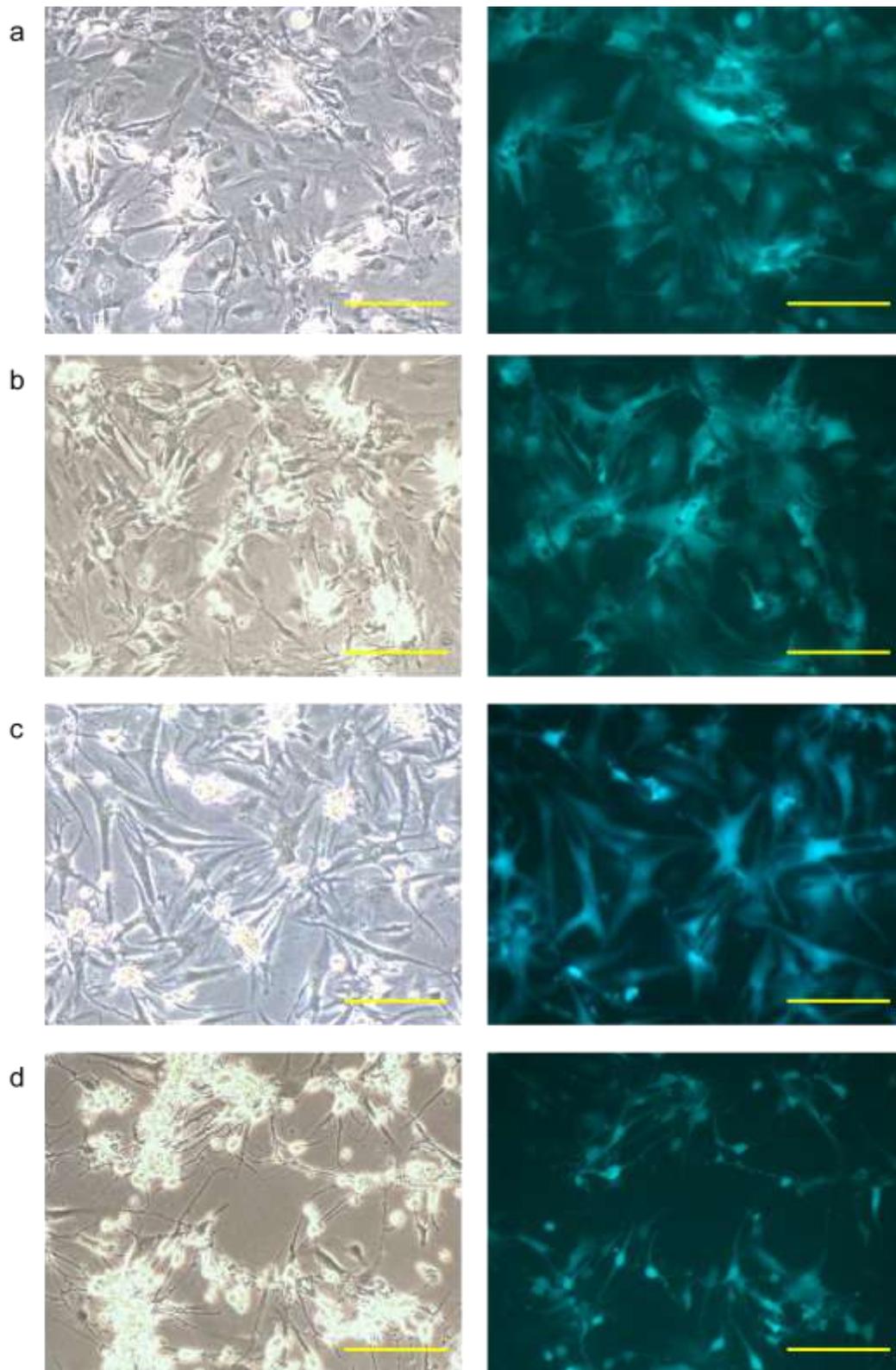
**Abbildung 31: Phasenkontrastaufnahme: Aufhebung der morphologischen Zellveränderungen durch Mevalonsäure.** Durch gleichzeitige Zugabe von Mevalonsäure in einer Endkonzentration von 200 μM konnte die Atorvastatinwirkung neutralisiert werden. Maßstabsbalken links: 100 μm Maßstabsbalken rechts 200 μm.

### **3.4.2 Veränderung der OATP2B1 Expression in Herzmuskelzellen und der Zellmorphologie nach Atorvastatinzugabe**

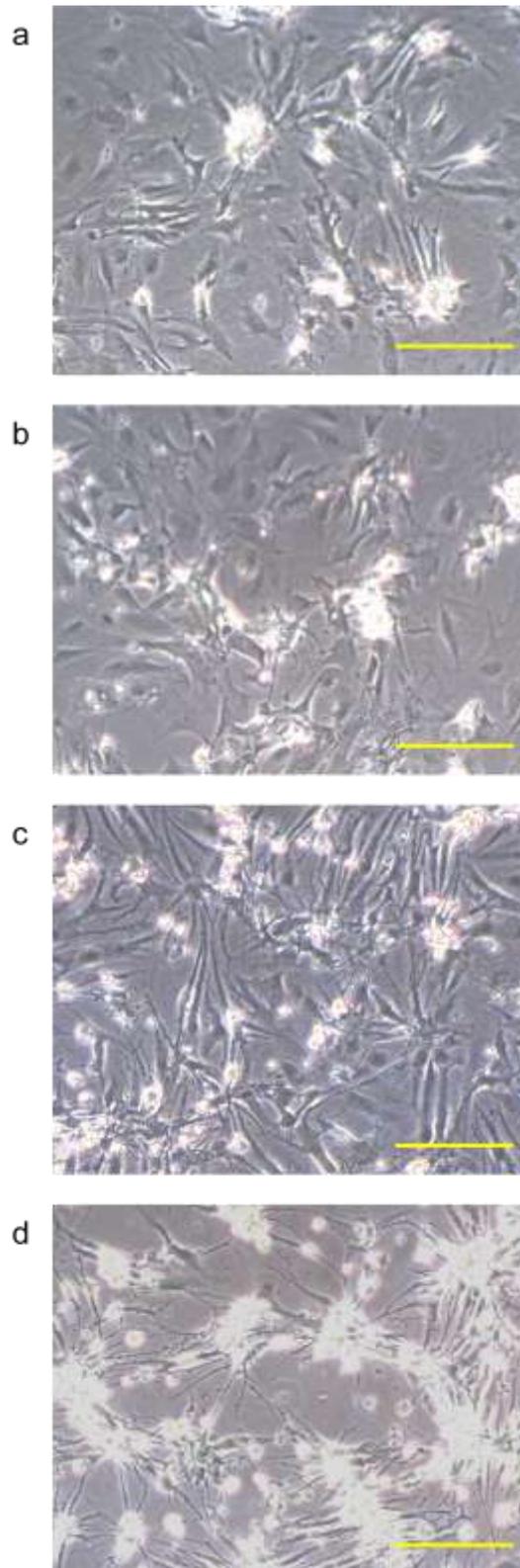
Herzmuskelzellen wurden drei Tage nach dem Ausplattieren mit dem OATP2B1 Adenovirus und dem Kontroll-Adenovirus AV44, der nur für GFP kodiert, infiziert. Zur Kontrolle wurden zusätzlich nicht-infizierte Herzmuskelzellen kultiviert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen mit Atorvastatin in verschiedenen Endkonzentrationen (0  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ ) behandelt. Bei der Intervention wurde das Medium mit dem Atorvastatin alle 24 h erneuert. Die nicht-infizierten Herzmuskelzellen wurden analog zu den infizierten Herzmuskelzellen behandelt. Bereits 48 h nach der adenoviralen Infektion der Zellen war ein deutliches GFP Signal im Fluoreszenzmikroskop zu erkennen. 48 h nach der Atorvastatinintervention wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf morphologische Veränderungen begutachtet. Bei den OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen konnten bereits ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin sowohl eine deutliche Zellzahlabnahme als auch deutliche morphologische Veränderungen, wie das Ausbilden von langen dünnen Ausläufern und Verschmälerung der Zellkörper gesehen werden. Proportional zur steigenden Atorvastatinkonzentration nahmen diese Effekte zu (Abbildung 32a-d). Bei den AV44-infizierten Herzmuskelzellen konnte ein Zellsterben bei einer Atorvastatinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  beobachtet werden. Das Ausbilden von langen dünnen Ausläufern und die Verschmälerung der Zellkörper begannen diskret ab einer Atorvastatinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  und nahmen bei der Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  deutlich zu (Abbildung 33a-d). Analog zu den AV44-infizierten Herzmuskelzellen konnte dieser Effekt bei den nicht-infizierten Herzmuskelzellen ebenfalls beobachtet werden (Abbildung 34a-d). Es konnte gezeigt werden, dass die OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen im Gegensatz zu den AV44-infizierten und nicht-infizierten Herzmuskelzellen deutlich sensibler auf die Atorvastatininterventionen reagierten, was sich sowohl in der Zellzahlminderung als auch in den morphologischen Zellveränderungen widerspiegelte. Nach erfolgter Atorvastatinintervention wurden die Herzmuskelzellen geerntet und es folgte die Kontrolle der OATP2B1 Expression unter Atorvastatin im Western Blot. Aufgrund der starken Zellzahlabnahme unter 10  $\mu\text{M}$  Atorvastatin wurden diese Proben nicht verwendet.  $\beta$ -Aktin diente als Ladungskontrolle. Bei den OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen konnte nachgewiesen werden, dass mit steigender Atorvastatinkonzentration die OATP2B1 Proteinexpression ebenfalls zunahm. Bei den AV44-infizierten und den nicht-infizierten Herzmuskelzellen konnte keine Proteinbande detektiert werden (Abbildung 35).



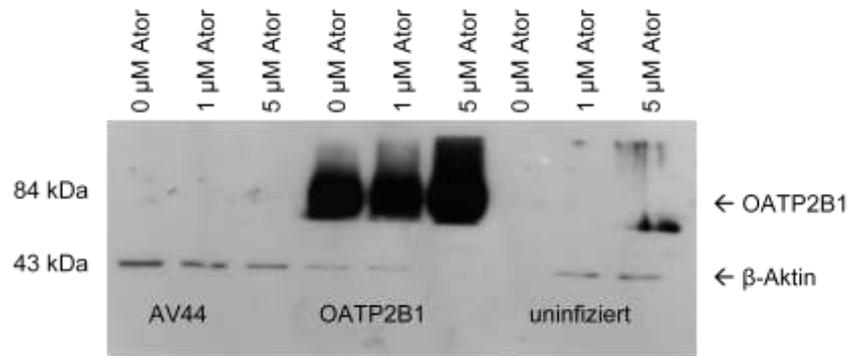
**Abbildung 32: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme der OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen zur Darstellung der morphologischen Zellveränderungen.** (a) Dargestellt sind unbehandelte Herzmuskelzellen als Kontrolle. (b) Herzmuskelzellen, die mit 1 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. (c) Herzmuskelzellen, die mit 5 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. (d) Herzmuskelzellen, die mit 10 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. Maßstabsbalken: 500 µm.



**Abbildung 33: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme der AV44-inifizierten Herzmuskelzellen zur Darstellung der morphologischen Zellveränderungen.** (a) Dargestellt sind unbehandelte Herzmuskelzellen als Kontrolle. (b) Herzmuskelzellen, die mit 1 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. (c) Herzmuskelzellen, die mit 5 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. (d) Herzmuskelzellen, die mit 10 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. Maßstabsbalken: 500 µm.



**Abbildung 34: Phasenkontrastaufnahme von nicht-infizierten Herzmuskelzellen zur Darstellung der morphologischen Zellveränderungen.** (a) Dargestellt sind unbehandelte Herzmuskelzellen als Kontrolle. (b) Herzmuskelzellen, die mit 1 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. (c) Herzmuskelzellen, die mit 5 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. (d) Herzmuskelzellen, die mit 10 µM Atorvastatin 48 h behandelt wurden. Maßstabsbalken: 500 µm.



**Abbildung 35: Detektion von zunehmender OATP2B1 Expression unter steigender Atorvastatinendkonzentration mittels Western Blot.** Die Membran wurde bei 60 kDa geschnitten. Nach 48 stündiger Atorvastatinintervention wurden die Herzmuskelzellen geerntet und die OATP2B1 Expression wurde im Western Blot ermittelt. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin verwendet.

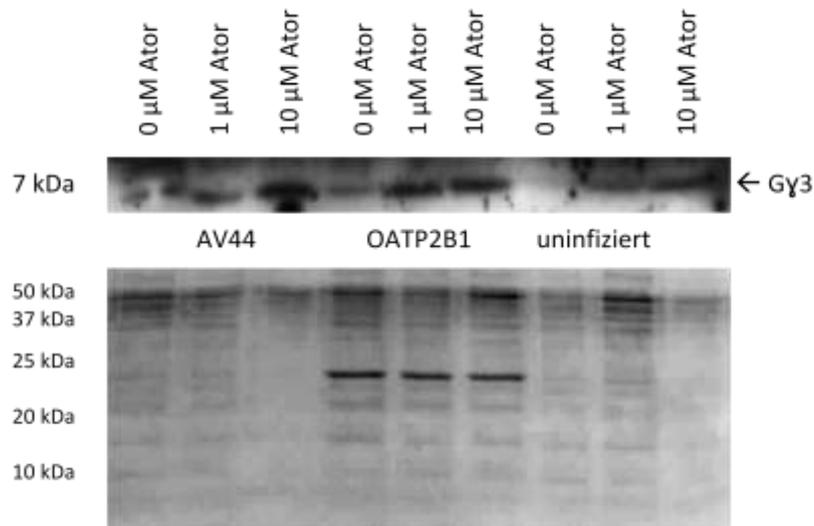
### 3.5 Wirkung von Atorvastatin auf die $\beta$ -adrenerge Signalkaskade

Nach erfolgreichem Nachweis der OATP2B1 Expression in neonatalen Herzmuskelzellen wurde die Rolle des OATP2B1 in Bezug auf die Wirksamkeit von Atorvastatin auf die Lokalisation heterotrimerer G-Proteine untersucht.

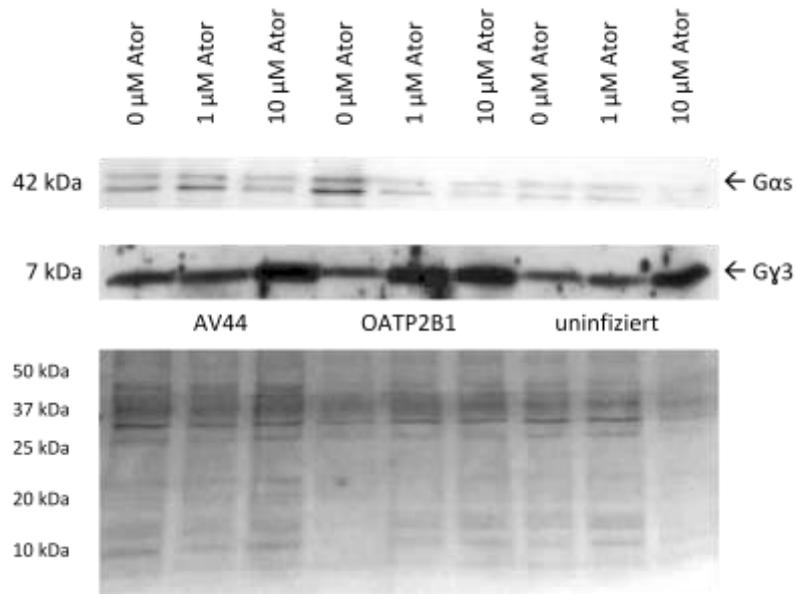
#### 3.5.1 Lokalisation heterotrimerer G-Proteine unter Atorvastatin

48 h nach erfolgter Infektion der Herzmuskelzellen mit dem OATP2B1 Adenovirus und dem Kontroll-Adenovirus AV44 wurden die Zellen mit Atorvastatin in verschiedenen Endkonzentrationen (0  $\mu$ M, 1  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) für weitere 48 h behandelt. Zur Kontrolle wurden ebenfalls nicht infizierte Herzmuskelzellen kultiviert und behandelt. Nach erfolgter Atorvastatinintervention wurden die Herzmuskelzellen geerntet. Mittels Western Blot wurde die Expression der  $G_{\gamma_3}$  und  $G_{\alpha_s}$  Untereinheiten in der Zytosol- und Membranfraktion bestimmt. Unter der Intervention mit Atorvastatin wurde eine Translokation von  $G_{\gamma_3}$  und  $G_{\alpha_s}$  Untereinheiten aus der Membran ins Zytosol erwartet und dieser Effekt sollte bei OATP2B1-überexprimierenden Zellen verstärkt sein. In dieser Arbeit konnten die erwarteten Ergebnisse nur teilweise gezeigt werden. Passend zu der Hypothese konnte in den OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen im Zytosol bereits ein Anstieg von  $G_{\gamma_3}$  Untereinheiten unter einer Konzentration von 1  $\mu$ M Atorvastatin gezeigt werden, während bei den nicht-infizierten und den AV44-infizierten Herzmuskelzellen ein Anstieg von  $G_{\gamma_3}$  Untereinheiten erst ab einer Konzentration von 10  $\mu$ M Atorvastatin zu verzeichnen war.  $G_{\alpha_s}$  war im Zytosol nicht nachweisbar (Abbildung 36). Unerwarteterweise war aber unter der Behandlung mit Atorvastatin auch eine Zunahme von  $G_{\gamma_3}$  Untereinheiten in der Membranfraktion zu beobachten.

Diese war wiederum in den OATP2B1-exprimierenden Herzmuskelzellen bereits bei 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin, bei den anderen Zellen erst ab 10  $\mu\text{M}$  sichtbar (Abbildung 37). Veränderungen von  $G\alpha_s$  unter Atorvastatin waren in den hier durchgeführten Versuchen nicht sicher beurteilbar. In den OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen zeigte sich im Ponceaubild eine deutliche Bande von ca. 25 kDa Größe, welche dem GFP entspricht und damit die erfolgreiche Virustransduktion beweist.



**Abbildung 36: Detektion von zunehmender  $G\gamma_3$  Konzentration im Zytosol unter steigender Atorvastatinendkonzentration mittels Western Blot.** Nach 48-stündiger Atorvastatinintervention wurden die Herzmuskelzellen geerntet und die  $G\gamma_3$  Konzentration im Zytosol im Western Blot ermittelt. Als Ladekontrolle ist das Ponceaubild des Western Blots abgebildet.



**Abbildung 37: Detektion von  $G\alpha_s$  und  $G\gamma_3$  Konzentration in der Membranfraktion unter steigender Atorvastatinendkonzentration mittels Western Blot.** Nach 48-stündiger Atorvastatinintervention wurden die Herzmuskelzellen geerntet und die  $G\alpha_s$  und  $G\gamma_3$  Konzentration im Zytosol im Western Blot ermittelt. Als Ladekontrolle ist das Ponceaubild des Western Blots abgebildet.

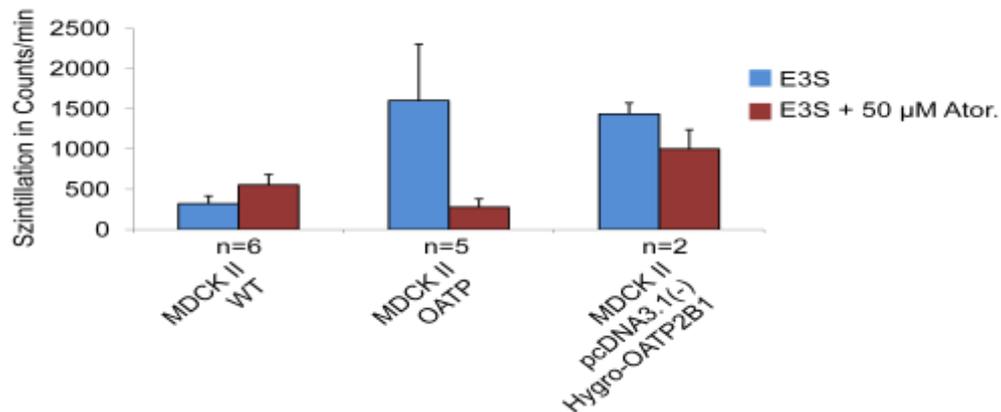
### 3.6 Funktionelle Untersuchungen des OATP2B1

Nach erbrachtem Nachweis der OATP2B1 Expression im Western Blot und Überprüfung der Lokalisation mittels Immunfluoreszenz in verschiedenen Zellkulturmodellen und im humanen Herzgewebe folgten funktionelle Untersuchungen des OATP2B1. Um die Funktionalität von OATP2B1 direkt am menschlichen Herzen nachzuweisen, wurde die Aufnahme von  $^3\text{H}$ -markiertem Estronsulfat unter Atorvastatin gemessen.

#### 3.6.1 Transportassay in MDCK II Zellen

Zunächst wurde die Funktionalität von OATP2B1 in MDCK II Zellen, in denen bereits eine kompetitive Hemmung der Aufnahme des  $^3\text{H}$ -markierten Estronsulfats durch Atorvastatin gezeigt werden konnte (Grube et al. 2006), betrachtet. Im Vergleich zu den MDCK Zellen, die den OATP2B1 nicht exprimieren, zeigten die MDCK II OATP Zellen und die stabil transfizierten MDCK II Zellen mit pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 eine fünffach höhere Aufnahme des  $^3\text{H}$ -markierten Estronsulfats. Bei der Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Atorvastatin konnte die  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme in MDCK OATP Zellen wie erwartet um 80%.

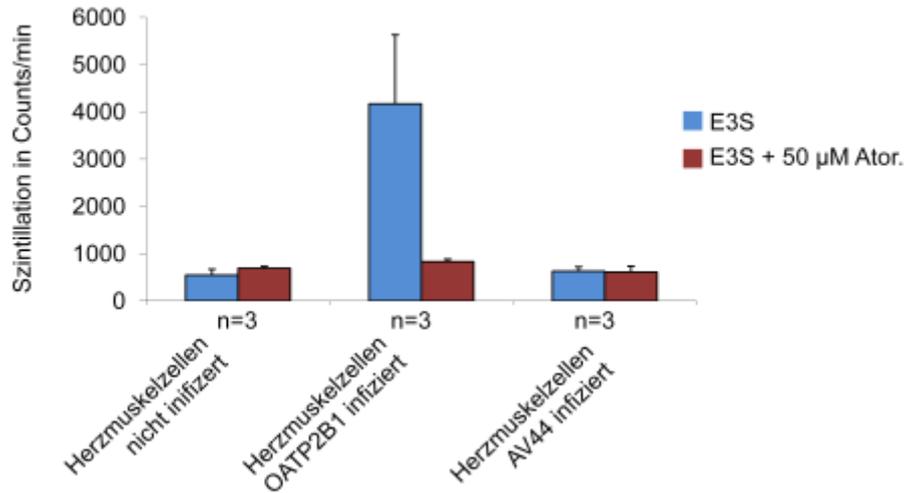
In den stabil transfizierten MDCK II WT mit pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1 gelang dies bei den nur zweimal durchgeführten Versuchen aber nur zu 30%.



**Abbildung 38:**  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme in OATP2B1 exprimierenden MDCK II Zellen. Gezeigt ist die kompetitive Hemmung der  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme unter 50  $\mu\text{M}$  Atorvastatin in OATP2B1 exprimierenden MDCK OATP Zellen und in stabil transfizierten MDCK II Zellen mit pcDNA3.1(-)Hygro-OATP2B1.

### 3.6.2 Transportassay in OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen neonataler Ratten

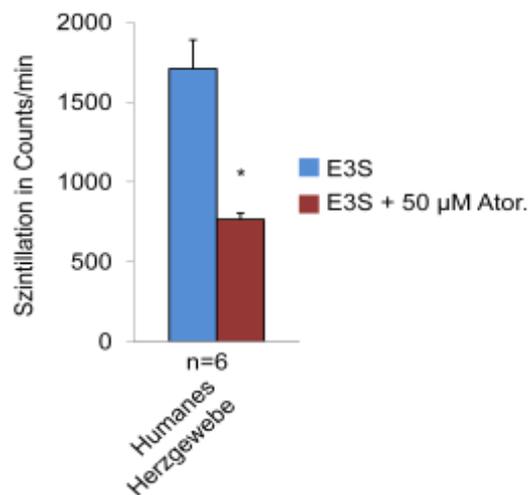
Herzmuskelzellen wurden mit dem OATP2B1 Adenovirus und dem Kontrolladenovirus AV44 infiziert. Anschließend wurde die Funktionalität des OATP2B1 in Ab- und Anwesenheit von 50  $\mu\text{M}$  Atorvastatin untersucht. Im Vergleich zu nicht-infizierten und AV44-infizierten Herzmuskelzellen zeigten OATP2B1-infizierte Herzmuskelzellen eine siebenfach höhere Aufnahme des  $^3\text{H}$ -markierten Estronsulfats. Bei Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  Atorvastatin konnte die  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme vollständig auf Kontrollniveau reduziert werden.



**Abbildung 39:  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme in Herzmuskelzellen neonataler Ratten.** Gezeigt ist die kompetitive Hemmung der  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme unter 50  $\mu\text{M}$  Atorvastatin in OATP2B1-, AV44- und nicht-infizierten Herzmuskelzellen.

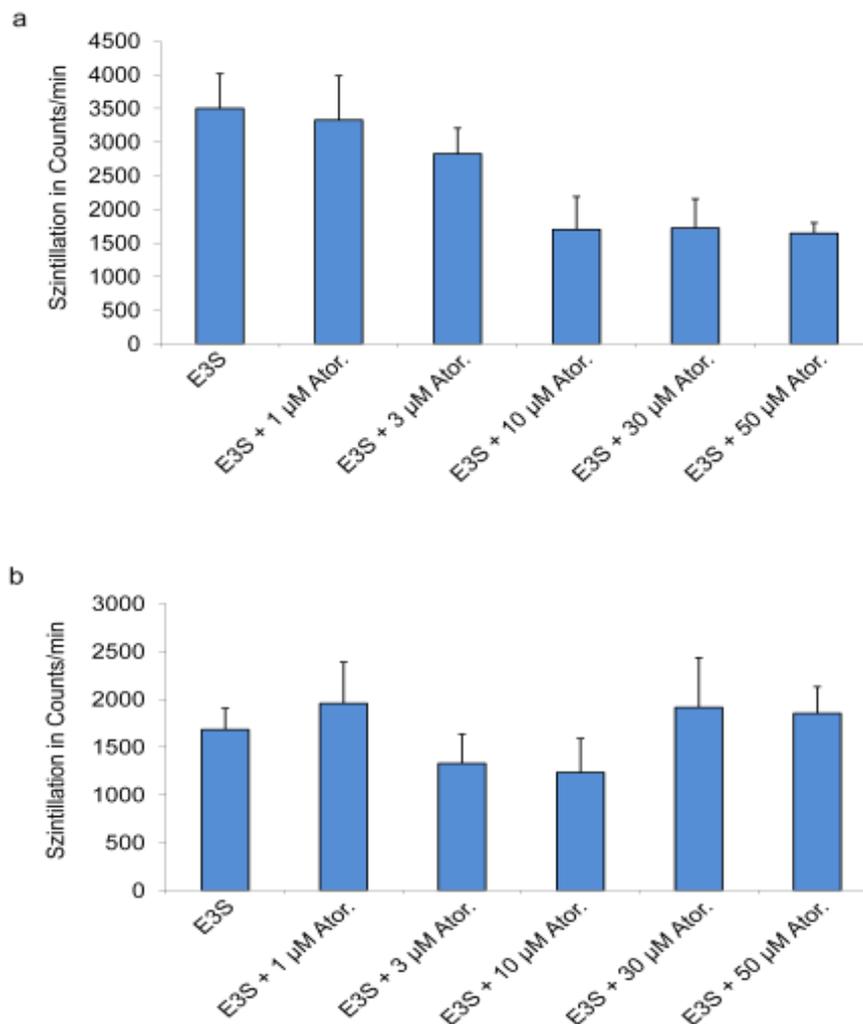
### 3.6.3 Transportassay im humanen Herzgewebe

Bei nachgewiesener endogener OATP2B1 Expression im humanen Herzgewebe wurde die Funktionalität des OATP2B1 im Transportassay näher untersucht. Hierzu wurde das humane Herzgewebe mit einem Skalpell in gleich große Proben ( $\sim 1\text{ mm}$ ) zerkleinert und es wurde wie unter 2.5.2 beschrieben weiter verfahren. Die Untersuchung zeigte eine signifikante Abnahme der  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme unter 50  $\mu\text{M}$  Atorvastatin um 55% (Abbildung 40).



**Abbildung 40:  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme in humanes Herzgewebe.** Gezeigt ist die kompetitive Hemmung der  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme unter 50  $\mu\text{M}$  Atorvastatin in  $\sim 1\text{ mm}$  großen Stücken von humanem Herzgewebe. \* $p < 0,0005$  versus E3S Aufnahme.

In einem weiteren Versuch wurde die  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme ins humane Herzgewebe sowie ins Herzgewebe neonataler Ratten parallel unter unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen von 1  $\mu\text{M}$ , 3  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  untersucht. Im menschlichen Herzgewebe ließ sich die  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme durch hohe Konzentrationen hemmen. Die Abnahme betrug unter 1  $\mu\text{M}$  Atorvastatin 5%, unter 3  $\mu\text{M}$  Atorvastatin 20%, unter 10  $\mu\text{M}$  und 30  $\mu\text{M}$  Atorvastatin 51% und unter 50  $\mu\text{M}$  ließ sich eine Abnahme um 53% verzeichnen. Im Herzgewebe der neonatalen Ratte, das kein OATP2B1 exprimiert, ließ sich kein durch Atorvastatin hemmbarer Transport von  $^3\text{H}$ -markiertem Estronsulfat nachweisen (Abbildung 41a, b).



**Abbildung 41: Vergleich der  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme in humanes Herzgewebe und Herzgewebe neonataler Ratten unter unterschiedlichen Atorvastatinkonzentrationen.** (a) Konzentrationsabhängige kompetitive Hemmung der  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme durch Atorvastatin im humanen Herzgewebe. (b) Keine kompetitive Hemmung der  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme in Ab- und Anwesenheit von Atorvastatin in Herzgewebe neonataler Ratten, n=3.

## 4. Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Bedeutung und die Funktionalität des OATP2B1 für die Wirkung von Atorvastatin auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade im kardiovaskulären System zu evaluieren. Dazu wurde zunächst die Funktionalität und Überexpression des OATP2B1 in transient und stabil transfizierten Zellsystemen getestet. Um sich der *in vivo* Situation anzunähern, wurde ein für OATP2B1 kodierendes Adenovirus generiert, um zu überprüfen, ob die Überexpression von OATP2B1 in Herzmuskelzellen neonataler Ratten die pharmakodynamischen Eigenschaften von Atorvastatin und die Effekte auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade beeinflusst und diese für den Menschen relevant sein könnten.

### 4.1 Generierung einer stabilen Zelllinie als Grundlage für weitere Untersuchungen von OATP2B1

Um die Rolle des OATP2B1 für die Wirkung von Atorvastatin auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade in Herzmuskelzellen untersuchen zu können, war es notwendig, Untersuchungen in Bezug auf die Lokalisation und die Funktionalität des OATP2B1 in einem transient und stabil transfizierten Zellsystem durchzuführen, bevor eine aufwendige Virusgenerierung und Untersuchungen an Herzmuskelzellen neonataler Ratten durchgeführt wurden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde OATP2B1 in immortalen MDCK II Zellen transient und stabil transfiziert exprimiert. Ein Vorteil des transienten Transfektionssystems ist die einfache und schnell zu erzeugende Überexpression, es hat aber den Nachteil, dass die Proteinexpression nicht stabil und die Transfektionseffizienz unterschiedlich sein kann, was auf eine schwankende Zelldichte zum Transfektionszeitpunkt, sowie auf Pipettierfehler bei der Lipofektion zurückgeführt werden kann. Ein besonderer Vorteil eines stabilen Transfektionssystems sind eine „konstante“ und hohe Proteinexpression und die Generierung eines reproduzierbaren Phänotyps einer Zelllinie, die sich für längerfristige Experimente eignet. Vorteile einer stabilen Zelllinie gegenüber Primärzellen wie den Herzmuskelzellen sind zum einen eine einfachere Handhabung, die keiner aufwendigen und zeitintensiven Isolierschritte bedarf, und zum anderen eine einfachere Manipulierbarkeit des Zellgenoms. Ein wesentlicher Nachteil ist die zeitaufwendigere Generierung einer stabilen Zelllinie, sowie eine dauerhafte Kultivierung der Zelllinien unter Selektionsdruck, was eine zusätzliche Mutationsgefahr darstellt.

## 4.2 Auswahl des adenoviralen Expressionssystems als Methode

Für die Überexpression von OATP2B1 in Herzmuskelzellen neonataler Ratten wurde in dieser Arbeit der adenovirale Gentransfer gewählt, da dieser gegenüber anderen konventionellen Methoden wie Elektroporation, Liposomen-, Calciumphosphat-Transfektion, retroviralem Transfer oder direkter DNA Injektion eine sehr hohe Effizienz aufweist. Weitere Vorteile des adenoviralen Transduktionssystems im Vergleich zu den nicht-adenoviralen Transfektionssystemen sind die Fähigkeiten des Vektors große Fremd-DNA-Fragmente aufzunehmen und die Induktion hoher Expression der kodierten Gene und dadurch eine höhere Proteinüberexpression in den Herzmuskelzellen (Garnier et al. 1994). Herzmuskelzellen zeigen bei anderen Transfektionsverfahren eine sensible Reaktion mit einer erheblichen Zellzahlminderung durch Apoptose, wie zum Beispiel der Liposomentransfektionsmethode, obwohl diese die geringste Toxizität unter den oben erwähnten aufweist (Kirshenbaum et al. 1997). Die Liposomentransfektionsmethode beruht auf dem Einbringen des gewünschten genetischen Materials mittels Liposomen, welche sehr leicht mit der Membran der Zelle fusionieren können in das Zellinnere. Durch die einfachere Handhabung und eine weniger komplizierte Biologie der Adenoviren im Vergleich zu Lentiviren lassen sich in kürzerer Zeit höhere Virustiter erreichen.

Nach erfolgreicher adenoviraler Infektion der Herzmuskelzellen konnte die Infektionseffizienz mit Hilfe des koexprimierten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) im Mikroskop gut abgeschätzt werden (Abbildung 18). Da der GFP Sequenz und der OATP2B1 Sequenz jeweils ein eigenständiger Promotor vorangestellt ist, werden diese Proteine unabhängig von einander in den Zellen exprimiert, sodass die Stärke der GFP Epifluoreszenz nicht unbedingt mit der Proteinexpression des OATP2B1 korreliert. Die Proteinexpression ist bereits nach 2-4 h nachweisbar und erreicht ihr Maximum nach etwa 48 h (Kass-Eisler et al. 1993; Dumasius et al. 2003). Die Kontrolle der Proteinexpression des OATP2B1 erfolgte in dieser Arbeit mittels Western Blot, indem ein Antikörper die OATP2B1 Banden spezifisch sichtbar machte (Abbildung 19).

Immunfluoreszenzaufnahmen von transient transfizierten MDCK II OATP Zellen zeigten sowohl eine Expression von OATP2B1 als auch von GFP. Bei einigen Zellen zeigte sich zwar eine OATP2B1 Expression, aber keine GFP Expression, was vermuten lässt, dass einige Zellen nicht in der Lage waren beide Proteine zu exprimieren (Abbildung 24a-c). Möglicherweise beruht dieser Effekt auf der Tatsache, dass in dem Plasmid pAdTrack-OATP2B1 das OATP2B1 Gen vor dem GFP Gen lokalisiert ist.

Um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch die adenovirale Infektion oder die GFP Expression abschätzen zu können, wurden als Kontrollen sowohl nicht infizierte Herzmuskelzellen als auch AV44 infizierte Herzmuskelzellen, die mit einem Kontroll-Adenovirus infiziert wurden, mitgeführt.

### **4.3 Auswirkungen von Atorvastatin auf MDCK II Zellen und Herzmuskelzellen**

Als Wirkstoff aus der Gruppe der Statine wurde in dieser Arbeit Atorvastatin verwendet, da es sich als ein hochaffines Substrat für das OATP2B1 gezeigt hat (Grube et al. 2006) und in unserer Arbeitsgruppe die relevanten Vorbefunde bereits mit Atorvastatin gewonnen wurden. Außerdem ist Atorvastatin in der Therapie der koronaren Herzerkrankung das am häufigsten verordnete Statin. Für *in vitro* und *in vivo* Anwendungen zeichnet sich Atorvastatin gegenüber anderen Statinen durch eine lange Halbwertszeit (11-30 h) im humanen Organismus aus, was annehmen lässt, dass Atorvastatin auch in der Zellkultur über einen Zeitraum von 24 h stabil bleibt. Ein weiterer Vorteil ist das Vorliegen als eine aktive Substanz, sodass keine Aktivierung der Substanz durch hydrolytische Enzyme notwendig ist. Ein Nachteil von Atorvastatin ist die Lipophilie, da Atorvastatin durch die Zellmembran nach intrazellulär diffundieren könnte (Igel et al. 2002).

Die verwendeten Atorvastatinkonzentrationen in dieser Arbeit lagen zwischen 0,1  $\mu\text{M}$  und 50  $\mu\text{M}$  in Anlehnung an pharmakokinetische Studien mit Ratten, Mäusen und gesunden Probanden. In der Literatur sind bei Ratten maximale Plasmakonzentrationen von 30 nM bei einer oralen Applikation von 1 mg/kg, bei Mäusen maximale Plasmakonzentrationen von 50  $\mu\text{M}$  bei einer oralen Applikation von 200 mg/kg, beschrieben (Black et al. 1998; Reinoso et al. 2002). Bei gesunden Probanden konnte ein Plasmaspiegel von 0,2  $\mu\text{M}$  bei täglicher Einnahme von 80 mg Atorvastatin erreicht werden (Cilla et al. 1996). Für die halbmaximale Inhibition der HMG-CoA Reduktase in Lebermikrosomen der Ratte und des Menschen, dem Schlüsselenzym der Cholesterinbiosynthese, wurden mittlere inhibitorische Konzentrationen ( $\text{IC}_{50}$ ) von 6 nM beziehungsweise 40 nM benötigt (Dansette et al. 2000).

#### Welche Auswirkung hat Atorvastatin auf die Zellmorphologie?

Unter der Intervention mit Atorvastatin konnten konzentrationsabhängige zytotoxische Effekte auf die Zellmorphologie von MDCK II Zellen und Herzmuskelzellen beobachtet werden. Die dichte Zellstruktur war aufgelöst und es kam zur Ausbildung von langen dünnen Ausläufern und zur Verschmälerung der Zellkörper. Proportional zur

steigenden Atorvastatinkonzentration nahmen diese Effekte zu, wobei eine deutliche Abnahme der Zellzahl bei einer Atorvastatinkonzentration von 50  $\mu\text{M}$  zu verzeichnen war. In dieser Arbeit konnte nachvollzogen werden, dass der zytotoxische Effekt auf der Hemmung der HMG-CoA Reduktase beruhte, da dieser nach Zugabe von 200  $\mu\text{M}$  Mevalonsäure nicht nachweisbar war (Abbildung 31). Dieses Ergebnis stimmt mit der gängigen wissenschaftlichen Einschätzung der Wirkung von Statinen überein (Takemoto et al. 2001; Nishikimi et al. 2002).

Die Atorvastatinintervention hatte eine wesentlich drastischere Auswirkung auf die Zellmorphologie und die Zellzahl in OATP2B1-überexprimierenden MDCK II Zellen und Herzmuskelzellen, als in den mitgeführten Kontrollen. Bereits ab einer Atorvastatinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  zeigten sich in den OATP2B1-überexprimierenden Zellreihen deutliche Zellveränderungen, während bei den nicht OATP2B1 exprimierenden Zellreihen höhere Atorvastatinkonzentrationen nötig waren (Abbildungen 30 und 32-34). Dies spricht dafür, dass – wie erwartet – das OATP2B1 zu einer vermehrten Atorvastatinaufnahme in die Zellen führt und so die Toxizität dadurch erhöht. Als Indikator für den Zelluntergang kann die Laktatdehydrogenase (LDH) herangezogen werden (Toraason et al. 1989; Abou-El-Hassan et al. 2003). Die Toxizität von Statinen ist bereits in einigen anderen Arbeiten untersucht worden. Beweisend für einen erhöhten Zelluntergang unter der Statinintervention sind steigende Gesamt-LDH-Werte ab einer Atorvastatinkonzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Bereits ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  war eine erhöhte Freisetzung von LDH aus Herzmuskelzellen zu verzeichnen (Mühlhäuser et al. 2006). Weiterhin finden sich in der Literatur Hinweise darauf, dass lipophile Statine in Herzmuskelzellen neonataler und adulter Ratten den programmierten Zelltod induzieren können. Der proapoptotische Effekt von Fluvastatin beruht vermutlich auf der Hemmung von isoprenoiden Zwischenstufen und nachfolgend der Hemmung von monomeren G-Proteinen, wie dem RhoA. Es konnte gezeigt werden, dass unter Fluvastatin die Proteinkonzentration von RhoA in der Membranfraktion von Herzmuskelzellen abnahm, während es in der Zytosolfraktion zu keiner Änderung der Proteinkonzentration kam. Der apoptotische Effekt war in der Anwesenheit von Mevalonsäure und Geranylgeranylpyrophosphat (GGPP) nicht nachweisbar (Ogata et al. 2002). Weiterhin wird angenommen, dass der proapoptotische Effekt von Atorvastatin, Simvastatin und Fluvastatin auf einer verminderten Expression von MCL-1 mRNA, und nachfolgend des MCL-1 Proteins, einem antiapoptotisch wirkenden Protein, beruht und Statine auch auf diesem Wege in Herzmuskelzellen einen programmierten Zelltod induzieren können (Ogata et al. 2002). Unter der Statinintervention zeigten sich siebenfach erhöhte Konzentrationen von histonassoziierten DNA-Fragmenten im Vergleich zu den Kontrollen. Während der

Apoptose kommt es zur Spaltung von DNA durch eine Nuklease, jedoch nicht in den Nukleosomen, da die dortige DNA durch Assoziation an Histone geschützt ist und als Marker für eine stattgefundene Apoptose dienen kann. Auch hier beruht der Effekt vermutlich auf der Hemmung der HMG-CoA Reduktase, da in Anwesenheit von Mevalonsäure und GGPP keine erhöhten Spiegel von histonassoziierten DNA-Fragmenten evaluiert werden konnten (Demyanets et al. 2006).

### Haben Statine auch Einflüsse auf die Expression anderer Rezeptoren außer dem LDL-Rezeptor?

Bisher ist wenig über die Auswirkung der Statintherapie auf die Expression von Transportproteinen und Regulationsmechanismen von Enzymen, die am Arzneimetabolismus beteiligt sind, bekannt. Das Beobachten von Veränderungen in der Expressionsaktivität von sowohl Einwärts- als auch Auswärtstransportern könnte zu einem besseren Verständnis der pharmakokinetischen Eigenschaften von Atorvastatin in Bezug auf die Resorption, die systemische Bioverfügbarkeit und das Auftreten von gefürchteten Nebenwirkungen, wie der Rhabdomyolyse, führen (Wu et al. 2005). In dieser Arbeit konnte auf Proteinebene gezeigt werden, dass unter einer 48-stündigen Atorvastatinbehandlung die OATP2B1 Expression in infizierten Herzmuskelzellen mit steigender Atorvastatinkonzentration zunahm (Abbildung 35). Dieses Ergebnis war zunächst unerwartet, weil in den Versuchen ein CMV-Promotor die Expression treibt, der von Atorvastatin unabhängig sein sollte. Außerdem würde es sich bei dem Effekt um einen positiven Feedback-Loop handeln, weil der vermehrt exprimierte Einwärtstransporter mehr Atorvastatin in die Zelle transportieren würde. Die Zunahme der OATP2B1 Expression konnte aber auf mRNA-Ebene auch *in vitro* in zwei unterschiedlichen Zellsystemen gezeigt werden. Unter der Atorvastatintherapie kam es sowohl zu einer konzentrations- als auch zeitabhängigen Zunahme der OATP2B1 Transkription in Caco-2 und in HepG2 Zellen. In den Caco-2 Zellen war bereits nach einer 12-stündigen Behandlung mit 20  $\mu\text{M}$  Atorvastatin eine fünffach höhere mRNA-Konzentration zu verzeichnen. In den HepG2 Zellen konnten um das 4-, 8- und 12-fach höhere mRNA-Konzentrationen analog ansteigend zu den Atorvastatinkonzentrationen 0,1  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  gemessen werden. Kontrovers zu diesen Ergebnissen zeigte sich bei Patienten, die Atorvastatin einnahmen, eine Abnahme der OATP2B1 mRNA Expression (Grube et al. 2006). Die Untersuchungen mit Simvastatin zeigten in Bezug auf die OATP2B1 mRNA-Konzentrationen in den verschiedenen Zellreihen unterschiedliche Ergebnisse. In den Caco-2 Zellen wurde eine Abnahme der mRNA-Konzentrationen gemessen, während Simvastatin in HepG2 zu keiner Veränderung der OATP2B1 mRNA-Konzentrationen führte (Rodrigues et al. 2009).

Eine Untersuchung an unter Hypercholesterinämie leidenden Patienten hat gezeigt, dass unter der Statintherapie das P-Glykoprotein (ABCB1) in mononukleären peripheren Blutzellen vermindert exprimiert wurde (Rodrigues et al. 2006). Weitere *in vitro* Untersuchungen belegen, dass Statine an der Regulation weiterer Auswärtstransporter beteiligt sind. In HepG2 Zellen wurde unter Atorvastatin eine konzentrations- und zeitabhängige Zunahme der mRNA-Konzentration für das Breast Cancer Resistance Protein (ABCG2) nach 24-stündiger und das Multidrug Resistance Protein 2 (ABCC2) nach 12-stündiger Behandlung mit Atorvastatin ab einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  nachgewiesen. Simvastatin hingegen führte zu einer Abnahme der mRNA-Konzentration für P-Glykoprotein (ABCB1) ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$ . Im Gegensatz dazu konnte in Caco-2 Zellen, sowohl unter der Atorvastatin- als auch unter der Simvastatintherapie, eine Abnahme der mRNA-Konzentration für das P-Glykoprotein (ABCB1) um ca. 50% verzeichnet werden, während Simvastatin auch zu verminderter Expression von Multidrug-Resistance-Protein-2 (ABCC2) führte. Diese Ergebnisse zeigen auf, dass die Einwärts- und Auswärtstransporter in der Leber und im Darm unterschiedlich reguliert werden, was Auswirkungen auf die systemische Bioverfügbarkeit von Statinen und somit auch auf die Effektivität der Plasmacholesterinsenkung haben könnte (Rodrigues et al. 2009).

Es wird angenommen, dass die Expression der Transporter über Transkriptionsfaktoren reguliert wird. Höchstwahrscheinlich haben Statine Einfluss auf eine Reihe von unterschiedlichen Kernhormonrezeptoren, wie dem CAR (Constitutive Active Receptor) und dem PXR (Pregnane X Receptor), welche an der Regulation von Einwärts- und Auswärtstransportern beteiligt sind und somit Einfluss auf den Arzneimetabolismus haben (Kocarek et al. 2002; Kobayashi et al. 2005). In der Literatur finden sich Hinweise, dass CAR und AhR (aryl hydrocarbon receptor) die Expression von OATP2B1 in humanen Hepatozyten unterdrücken, während für eine konsekutive Expression des OATP2B1 in der Leber und im Darm der Transkriptionsfaktor Sp1 von elementarer Bedeutung ist (Maeda et al. 2006). In dieser Arbeit konnte eine zunehmende OATP2B1 Expression mit steigender Atorvastatinkonzentration in Herzmuskelzellen beobachtet werden (Abbildung 35). Inwieweit Atorvastatin in Herzmuskelzellen an der OATP2B1 Expression über die Hoch- oder Herunterregulation von Transkriptionsfaktoren, wie CAR, AhR und Sp1 beteiligt ist, ist unklar, da es sich hier um eine exogene Expression des OATP2B1 über einen CMV-Promotor handelt. Für das Wachstum und die Differenzierung der Herzmuskelzellen ist u.a. der Transkriptionsfaktor SRF (Serum Response Factor) essenziell. In der Skelettmuskulatur von Mäusen konnte gezeigt werden, dass der SRF zu einer erhöhten Aktivität des CMV-Promotors mit einem erhöhten Expressionslevel

führt (Li et al. 1999). Versuche an männlichen Dahl-Iwai salzsensitiven Ratten, die einer Salzdiät mit hoher versus niedriger Salzkonzentration unterzogen waren und gleichzeitig mit Pitavastatin behandelt wurden, zeigten, dass die DNA-Bindungsaktivität des Transkriptionsfaktors SRF in der Pitavastatin-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erniedrigt war (Saka et al. 2006). In der Literatur gibt es keine Hinweise, dass auch Atorvastatin eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor SRF zeigt. Worauf die erhöhte OATP2B1-Expression unter steigender Atorvastatinkonzentration beruht und inwieweit Atorvastatin hier eine Rolle spielt kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

### Welchen Einfluss hat Atorvastatin in Anwesenheit von OATP2B1 auf die Lokalisation heterotrimerer G-Proteine und die $\beta$ -adrenerge Signalkaskade?

Bei Patienten mit koronarer Herzerkrankung führt eine Statintherapie zu einer Verlangsamung der Progression der Arteriosklerose, zu einer Reduktion der kardiovaskulären Ereignisse und der Letalität. Statine hemmen nicht nur die Cholesterinbiosynthese, sondern auch die Synthese von isoprenoiden Zwischenstufen (GGPP, FPP). Isoprenoide sind unerlässlich für die Membranverankerung von heterotrimeren G-Proteinen (Evanko et al. 2001). Das heterotrimere G-Protein  $G\alpha_s$  ist an der Weiterleitung der  $\beta$ -adrenergen Stimulation beteiligt. Funktionell aktiv sind nur Membran gebundene und an bestimmte Rezeptoren gekoppelte G-Proteine. Da Atorvastatin zu einer Umverteilung der G-Proteine ( $G\alpha_s$ ,  $G\gamma$ ) aus der Zellmembran in das Zytosol führt, hätte Atorvastatin Betablocker-ähnliche Wirkungen. Hierfür waren jedoch hohe Atorvastatinkonzentrationen notwendig, da Herzmuskelzellen neonataler Ratten, im Gegensatz zum Menschen, keine endogene OATP2B1 Expression aufzeigten. Um sich bei weiteren Untersuchungen der *in vivo* Situation anzunähern, wurden Herzmuskelzellen neonataler Ratten mit OATP2B1 adenoviral infiziert und die Effekte von Atorvastatin auf die Lokalisation von G-Proteinen und die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade untersucht.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit unter der Statintherapie in den OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen ein Anstieg von  $G\gamma_3$  Einheiten im Zytosol (Abbildung 36) bereits unter niedrigeren Atorvastatinkonzentrationen im Vergleich zu den nicht infizierten Herzmuskelzellen beobachtet werden. Durch diese Ergebnisse werden erstens die bereits bestehenden Hinweise, dass Atorvastatin eine Translokation der heterotrimeren G-Proteine aus der Membran ins Zytosol bewirkt und es somit zu einer Desensitivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade führt, bekräftigt und ergänzt. Zweitens belegen die Ergebnisse wiederum, dass OATP2B1-Expression gegenüber

Atorvastatin sensitiviert. Dies ist mit der angenommenen Funktion als Atorvastatin-Einwärtstransporter vereinbar.

Im Widerspruch zu bereits vorliegenden Ergebnissen zeigte sich auch in den vorliegenden Experimenten ein Anstieg von  $G\gamma_3$  Einheiten in der Membranfraktion (Abbildung 37). Zu diesem Ergebnis kann hier keine eindeutige Aussage getroffen werden. Eine Kontamination der Membranfraktion durch die Zytosolfraction bei der Herstellung von Zelllysaten ist nicht auszuschließen.

$G\alpha_s$  war auch unter Atorvastatin nicht im Zytosol nachweisbar. Eine Erklärung ist, dass die zu untersuchenden Proben gemäß Proteinbestimmung auf die gleiche Proteinmenge normiert werden mussten, um die Ergebnisse miteinander vergleichen zu können. Dies gestaltete sich jedoch schwierig, da aufgrund des ausgeprägten Zelluntergangs unter hohen Atorvastatinkonzentrationen eine sehr geringe absolute Proteinmenge vorlag. Möglicherweise war auch die Zellzahl der Herzmuskelzellen zu gering gewählt.

Die hemmende Wirkung von Atorvastatin auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade wird durch weitere *in vivo* Untersuchungen an Wistar Ratten, die gleichzeitig mit Atorvastatin und kontinuierlich mit Isoprenalin behandelt wurden, bekräftigt. Hierbei kam es zu einer geringeren Herzhypertrophie im Vergleich zur Kontrollgruppe (Schmechel et al. 2009).

### Könnten an einer Herzinsuffizienz erkrankte Patienten von einer hypothetischen Desensitivierung der $\beta$ -adrenergen Signalkaskade bei einer Statintherapie profitieren?

Neben der bereits bewährten und erfolgreichen Herzinsuffizienztherapie mit u.a. Betablockern könnte Atorvastatin durch die Modulation des  $\beta$ -adrenergen Systems bei herzinsuffizienten Patienten therapeutisch eingesetzt werden. Grundlegend für die Annahme der Wirksamkeit von Atorvastatin bei Herzinsuffizienz ist die Inaktivierung der G-Proteine durch Translokation aus der Membran in das Zytosol aufgrund der fehlenden posttranslationalen Lipidmodifikation. Eine weitere Hypothese ist, dass aufgrund der Abnahme der Gesamtproteinmenge und der Translokation des  $G\alpha_s$  in das Zytosol das Ungleichgewicht zwischen stimulierenden und inhibierenden G-Proteinen zugunsten des inhibitorischen  $G\alpha_i$  verschoben wird. Diese beiden Effekte könnten zur Statin-vermittelten Desensitivierung der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade führen, was eine verminderte Herzarbeit und als Folge dessen auch eine verminderte Herzhypertrophie nach sich ziehen würde.

In der CORONA-Studie (Controlled Rosuvastatin Multinational Trial in Heart Failure), einer randomisierten, doppelblinden, placebokontrollierten Studie, wurde untersucht, wie sich die zusätzlich Verordnung von 10 mg Rosuvastatin zur bestehenden Medikation auf die kardiovaskuläre Mortalität und Morbidität und das allgemeine Überleben bei älteren an Herzinsuffizienz erkrankten Patienten auswirkte. In die Studie wurden Patienten mit einer ischämisch bedingten chronischen Herzinsuffizienz NYHA II-IV, mit einem Alter > 60 Jahre und einer linksventrikuläre Ejektionsfraktion < 40% und bei NYHA II Patienten < 35% eingeschlossen. Für Rosuvastatin konnte kein Effekt auf das Auftreten der primären Endpunkte bestehend aus kardiovaskulär bedingtem Tod und nichttödlichem Myokardinfarkt oder Schlaganfall gezeigt werden. Die meisten Todesfälle ereigneten sich plötzlich oder durch eine Verschlechterung der Herzinsuffizienz, jedoch nicht durch atherothrombotische Ereignisse. Dagegen traten bei den mit Rosuvastatin behandelten Patienten nichttödliche vaskuläre Ereignisse und Hospitalisierungen wegen Herzinsuffizienz oder aus kardiovaskulärer Ursache signifikant seltener auf (Kjekshus et al. 2007). Auch die 2008 veröffentlichte GISSI-HF Studie (The Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico Heart Failure), in der Patienten mit ischämischer und nicht-ischämischer Herzinsuffizienz NYHA II-IV in einem durchschnittlichen Alter von 68 Jahren eingeschlossen wurden, zeigten auf die Gesamtsterblichkeit und Hospitalisierung aus kardiovaskulären Gründen keinen Unterschied zwischen Rosuvastatin und Placebo (Tavazzi et al. 2008).

Diese Daten sprechen zwar nicht generell gegen einen Nutzen von allen Statinen bei der Herzinsuffizienz, machen ihn aber doch sehr unwahrscheinlich. Im Positiven belegen sie, dass Statine bei Herzinsuffizienz nicht schaden.

Über Ursachen der Diskrepanz zwischen den aus experimentellen Studien angenommenen günstigen Effekte und dem Fehlen eines Nutzens in den bekannten klinischen Studien lässt sich nur spekulieren. Eine Möglichkeit ist, dass die klinisch erreichten Plasmakonzentrationen von Atorvastatin für spezielle Herzeffekte nicht ausreichen. Eine andere ist, dass die Effekte einfach zu klein sind und der mögliche positive Effekt auf die  $\beta$ -adrenerge Signalkaskade unter gleichzeitiger Gabe von Betablockern nicht mehr ins Gewicht fällt.

#### **4.4 Bedeutung des OATP2B1 für die Wirkung von Atorvastatin**

Sowohl die ubiquitäre Expression von OATP2B1 im humanen Organismus als auch das Substratspektrum postulieren, dass der Transporter in der Pharmakokinetik und -dynamik von Arzneimitteln, aber auch in der Wirkung von Steroidhormonen, eine

wichtige Rolle spielt. Bisher wurde eine deutliche OATP2B1 Expression sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene im Gefäßendothel und eine schwächere Expression in menschlichen Herzmuskelzellen nachgewiesen. In dieser Arbeit wurden Herzmuskelzellen mit einem für den OATP2B1 kodierenden Adenovirus behandelt.

### Wird das OATP2B1 nach erfolgter adenoviraler Infektion der Herzmuskelzellen exprimiert und wo ist es lokalisiert?

Die in dieser Arbeit mittels Western Blot und konfokaler Lasermikroskopie gewonnenen Ergebnisse über die Expression und Lokalisation von OATP2B1 in der Membran in transient und stabil transfizierten MDCK II Zellen (Abbildungen 22 und 24) korrelieren mit bereits vorliegenden Ergebnissen (Grube et al. 2006). Weitere Untersuchungen erfolgten an Herzmuskelzellen, die stets als eine Mischkultur, zusätzlich bestehend aus Fibroblasten und Endothelzellen, vorlagen. Nach erfolgter adenoviraler Infektion der Herzmuskelzellen mit dem OATP2B1 Virus konnte auf Proteinebene eine OATP2B1 Expression nachgewiesen werden (Abbildung 35). In der konfokalen Lasermikroskopie zeigte sich allerdings in den Herzmuskelzellen lediglich eine zytosolische Lokalisation (Abbildung 25). Im Gegensatz dazu konnte OATP2B1 in Fibroblasten in der Membran lokalisiert werden (Abbildung 26). Wie lässt sich diese Diskrepanz erklären? Am Beispiel des Oatp1a1 der Ratte wurde in *in vitro* Untersuchungen an HEK293T-Zellen gezeigt, dass für eine korrekte Lokalisation in der Zellmembran eine Interaktion mit PDZ Proteinen notwendig ist. Über vier C-terminale Aminosäuren kann das Oatp1a1 an der ersten oder dritten Domäne des PDZK1-Proteins binden und somit in die Zellmembran lokalisiert werden. *In vivo* Untersuchungen an PDZK1 *knockout* Mäusen zeigten, dass Oatp1a1 zwar exprimiert wurde, jedoch vornehmlich in Vesikeln im Zytosol der Leberzellen lokalisiert war. Dahingegen war Oatp1a1 in Wildtyp Mäusen hauptsächlich in der basolateralen Membran der Leberzellen zu finden (Wang et al. 2005). Für zahlreiche humane OATP, wie zum Beispiel OATP1A2 und OATP2B1 sind potenzielle Sequenzen für die Bindung an PDZ-Proteine beschrieben worden (Sugiura et al. 2006). Es handelt sich dabei um Gerüstproteine, bestehend aus mehreren PDZ Domänen, die die Grundlage für die zelluläre Organisation und Lokalisation von größeren Proteinkomplexen bilden.

Diese Proteinkomplexe sind häufig an der Signaltransduktion von Zellen und sogar am Aufbau und Erhalt von der Zellpolarität beteiligt (Sheng et al. 2001; Nourry et al. 2002). Die gefundenen Hinweise über die Notwendigkeit von PDZK1 zur Expression von Oatp1a1 in der Zellmembran in der Leber und die Tatsache, dass in den OATP2B1-infizierten Herzmuskelzellen das OATP2B1 hauptsächlich im Zytosol in Vesikeln nachgewiesen wurde, lässt vermuten, dass in den Herzmuskelzellen das PDZK1 zur

korrekten Lokalisation fehlte. Eine andere Erklärung für den zytosolischen Nachweis von OATP2B1 in Herzmuskelzellen könnte in einer zu geringen Expressionsdichte liegen. Sollte allerdings tatsächlich die korrekte Lokalisation von OATP2B1 in der Zellmembran auf einer Interaktion mit dem PDZK1 beruhen, gilt es der Frage nachzugehen, wieso Herzmuskelzellen nicht in der Lage gewesen sind, OATP2B1 in die Zellmembran einzubringen. PDZK1 wird in zahlreichen Geweben, wie zum Beispiel Leber und Niere (Kocher et al. 1998) exprimiert. In der Literatur gibt es keine Hinweise über die PDZK1 Expression am Herzen der neonatalen Ratte. Die adenovirale Überexpression von Proteinen wie dem OATP2B1 hat höchstwahrscheinlich auch einen Effekt auf die intrazelluläre Expression von anderen Proteinen. Dies könnte dazu geführt haben, dass zu Gunsten der OATP2B1 Expression vielleicht PDZK1 und andere Proteine in den Herzmuskelzellen vermindert exprimiert wurden.

### Welche Bedeutung hat OATP2B1 für die Wirkung von Atorvastatin auf Herzmuskelzellen?

Die Bedeutung von OATP2B1 im humanen Organismus, insbesondere im kardiovaskulären System kann in dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden. Zum jetzigen Zeitpunkt ist OATP2B1 der einzige im humanen Herzen und im Gefäßendothel nachgewiesene Transporter, welcher Atorvastatin als Substrat akzeptiert und damit Atorvastatin in die Herzmuskelzellen transportiert. Auch wenn die Immunfluoreszenzaufnahmen von Herzmuskelzellen neonataler Ratten keine eindeutige Expression des OATP2B1 an der Zellmembran zeigten, sprechen die Ergebnisse dafür, dass OATP2B1 auch in den Herzmuskelzellen in der Zellmembran exprimiert wurde, jedoch mittels konfokaler Lasermikroskopie nicht detektierbar war (Abbildung 25a-d). Ob und inwiefern eine eventuelle PDZK1 Unterdrückung zu dem Ergebnis der Immunfluoreszenz geführt hat, bleibt unklar. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass der bereits bekannte zytotoxische Effekt von Atorvastatin auf Zellen durch die OATP2B1-Überexpression deutlich ausgeprägter ausfiel. Sowohl in OATP2B1-exprimierenden MDCK II Zellen, als auch in den Herzmuskelzellen, die OATP2B1 adenoviral überexprimierten, zeigten sich bereits deutliche zytotoxische Effekte ab einer Atorvastatinkonzentration von 1  $\mu\text{M}$ , während in den Kontrollzelllinien (nicht OATP2B1 exprimierende Zellen) eine Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  notwendig war. Dies lässt vermuten, dass OATP2B1 durch den Einwärtstransport von Atorvastatin zu einer höheren intrazellulären Konzentration mit ausgeprägteren zytotoxischen Effekten führt. Funktionelle *in vitro* Untersuchungen an OATP2B1 exprimierenden MDCK II Zellen zeigten eine hohe Aufnahme des physiologischen Substrats Estronsulfat ins Zellinnere. Die Aufnahme konnte durch verschiedene Statine, besonders Atorvastatin signifikant gehemmt werden (Grube et al. 2006). Auch

in dieser Arbeit konnte an der stabilen MDCK II pcDNA3.1(-) Hygro-OATP2B1 Zelllinie eine um ca. fünffach höhere Aufnahme des  $^3\text{H}$ -markierten Estronsulfats im Vergleich zu den MDCK II Wildtypzellen nachgewiesen werden. Atorvastatin hemmte in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  die Aufnahme von Estronsulfat um ca. 30% (Abbildung 38). In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal an OATP2B1 adenoviral überexprimierenden Herzmuskelzellen eine siebenfach höhere Aufnahme des  $^3\text{H}$ -markierten Estronsulfats im Vergleich zu nicht-infizierten und AV44-infizierten Herzmuskelzellen gezeigt werden. Die Aufnahme wurde bei gleichzeitiger Gabe von Atorvastatin um ca. 80% reduziert. Die in der Zellkultur gewonnenen Ergebnisse bekräftigen bereits vorliegende Ergebnisse, dass OATP2B1 eine hohe Affinität für Atorvastatin aufweist und an der Aufnahme von Atorvastatin in die oben genannten Herzmuskelzellen maßgeblich beteiligt ist (Abbildung 39). Auch bei Untersuchungen an humanen Herzmuskelgewebeproben konnte eine signifikante Abnahme der  $^3\text{H}$  Estronsulfataufnahme unter Atorvastatin um bis zu 55% gezeigt werden, während im Herzgewebe der neonatalen Ratte ein deutlich geringerer und nicht durch Atorvastatin hemmbarer Transport von  $^3\text{H}$ -markiertem Estronsulfat gezeigt werden konnte (Abbildungen 40-41). Sowohl die aufgezeigte höhere Toxizität von Atorvastatin als auch die gezeigte Aufnahme von  $^3\text{H}$  Estronsulfat in das humanen Herzgewebe und die kompetitive Hemmung durch Atorvastatin weisen darauf hin, dass OATP2B1 eine hohe Bedeutung für die Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von Statinen, insbesondere Atorvastatin, hat. Somit könnte das OATP2B1 indirekt über die Erhöhung der pharmakologischen Potenz von Atorvastatin auch an der Verstärkung pleiotroper Effekte beteiligt sein.

## 5. Zusammenfassung

In der Therapie der koronaren Herzerkrankung ist die Wirksamkeit von Statinen gut belegt. Es gibt zahlreiche Hinweise, dass Statine durch die Hemmung der HMG-CoA Reduktase nicht nur die Cholesterinbiosynthese, sondern auch die Bildung von Isoprenoiden hemmen, welche für die Funktion einiger Elemente der  $\beta$ -adrenergen Signalkaskade essenziell sind. Tatsächlich ist in Ratten gezeigt worden, dass Statine in hohen Konzentrationen als „intrazelluläre Betablocker“ wirken können, da sie durch die verminderte Isoprenylierung eine Translokation von G-Proteinen aus der Membran in das Zytosol bewirken.

Die vorliegende Arbeit hat die Hypothese getestet, dass die notwendigen hohen Konzentrationen von Atorvastatin Folge der in Rattenherzen fehlenden Expression des kürzlich als Atorvastatin-Einwärtstransporter identifizierten OATP2B1 ist. Konkret wurde daher untersucht, ob eine Überexpression von OATP2B1 zu einer Sensitivierung der Ratten-Herzmuskelzellen gegenüber Atorvastatin führt. Zunächst wurde eine stabile MDCK II Zelllinie, die OATP2B1-überexprimiert, entwickelt und ein Adenovirus, das die Sequenz des OATP2B1 enthielt, generiert. Anschließend wurden Herzmuskelzellen der neonatalen Ratte mit dem OATP2B1-Adenovirus infiziert und mit Atorvastatin behandelt. Die Lokalisation und Funktionalität von OATP2B1 wurden mit konfokaler Mikroskopie und in einem Transport-Assay ermittelt. Konzentrations-Wirkungskurven mit Atorvastatin an infizierten und nicht infizierten Zellen erlaubte eine Aussage zur funktionellen Relevanz der OATP2B1 Expression. Dabei wurde einerseits die Lokalisation von Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine mittels Proteinfractionierung im Western Blot ermittelt.

In den stabil OATP2B1-exprimierenden MDCK-Zellen war OATP2B1 überwiegend an der Membran lokalisiert, in adenoviral infizierten Herzmuskelzellen dagegen überwiegend zytosolisch. In allen OATP2B1-exprimierenden Zellen konnte gegenüber Kontrollen eine verstärkte Aufnahme des bekannten OATP2B1-Substrats  $^3\text{H}$ -Estronsulfat und eine Hemmung derselben durch Atorvastatin demonstriert werden. Dieser Befund konnte *in vitro* an Gewebefragmenten aus humanen, atrialen Herzgewebeproben, nicht aber an entsprechenden Proben der Ratte reproduziert werden. Bei der Behandlung von OATP2B1-exprimierenden MDCK-Zellen oder adenoviral infizierten Herzmuskelzellen zeigte Atorvastatin bereits in 10-fach niedrigeren Konzentrationen toxische Effekte als in den entsprechenden Wildtyp Zellen. In ähnlicher Weise ließ sich auch die Translokation von heterotrimeren G-Proteinen in das Zytosol bereits in niedrigeren Konzentrationen beobachten.

Diese Arbeit zeigt, dass die Überexpression von OATP2B1 Zellen (MDCK- und Herzmuskelzellen) gegenüber toxischen, aber auch potenziell günstigen Wirkungen von Atorvastatin sensitiviert und dass OATP2B1 tatsächlich als Einwärtstransporter für Atorvastatin, auch in Herzmuskelzellen fungiert. Somit sind kardiale Effekte von Atorvastatin beim Menschen bereits in niedrigeren Konzentrationen zu erwarten als bei der Ratte, da das menschliche Herz im Gegensatz zu der Ratte OATP2B1 exprimiert.

## 6. Literaturverzeichnis

- Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-9.
- Abou-El-Hassan MA, Rabelink MJ, van der Vijgh WJ, Bast A, Hoeben RC. A comparative study between catalase gene therapy and the cardioprotector monohydroxyethylrutoside (MonoHER) in protecting against doxorubicin-induced cardiotoxicity *in vitro*. *Br J Cancer* 2003; 89:2140-6.
- Abu-Zahra TN, Wolkoff AW, Kim RB, Pang KS. Uptake of enalapril and expression of organic anion transporting polypeptide 1 in zonal, isolated rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2000; 28:801-6.
- Benihoud K, Yeh P, Perricaudet M. Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* 1999; 10:440-7.
- Bett AJ, Prevec L, Graham FL. Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors. *J Virol* 1993; 67:5911-21.
- Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; 7:1513-23.
- Black AE, Sinz MW, Hayes RN, Woolf TF. Metabolism and excretion studies in mouse after single and multiple oral doses of the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor atorvastatin. *Drug Metab Dispos* 1998; 26:755-63.
- Boyd RA, Stern RH, Stewart BH, et al. Atorvastatin coadministration may increase digoxin concentrations by inhibition of intestinal P-glycoprotein-mediated secretion. *J Clin Pharmacol* 2000; 40:91-8.
- Braunwald E. Unstable angina: an etiologic approach to management. *Circulation* 1998; 98:2219-22.
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med* 1982; 307:205-11.
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 1997; 89:331-40.
- Chen C, Mireles RJ, Campbell SD, et al. Differential interaction of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coa reductase inhibitors with ABCB1, ABCC2, and OATP1B1. *Drug Metab Dispos* 2005; 33:537-46.
- Cilla DD, Jr., Whitfield LR, Gibson DM, Sedman AJ, Posvar EL. Multiple-dose pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of atorvastatin, an inhibitor of HMG-CoA reductase, in healthy subjects. *Clin Pharmacol Ther* 1996; 60:687-95.

- Dansette PM, Jaoen M, Pons C. HMG-CoA reductase activity in human liver microsomes: comparative inhibition by statins. *Exp Toxicol Pathol* 2000; 52:145-8.
- Davies MJ. The pathophysiology of acute coronary syndromes. *Heart* 2000; 83:361-6.
- Davies SW. Clinical presentation and diagnosis of coronary artery disease: stable angina. *Br Med Bull* 2001; 59:17-27.
- de Lorgeril M, Salen P, Martin JL, Monjaud I, Delaye J, Mamelle N. Mediterranean diet, traditional risk factors, and the rate of cardiovascular complications after myocardial infarction: final report of the Lyon Diet Heart Study. *Circulation* 1999; 99:779-85.
- Demyanets S, Kaun C, Pfaffenberger S, et al. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes *in vitro*. *Biochem Pharmacol* 2006; 71:1324-30.
- Dumasius V, Jameel M, Burhop J, et al. *In vivo* timing of onset of transgene expression following adenoviral-mediated gene transfer. *Virology* 2003; 308:243-9.
- Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. *FEBS Lett* 1976; 72:323-6.
- Evanko DS, Thiyagarajan MM, Siderovski DP, Wedegaertner PB. Gbeta gamma isoforms selectively rescue plasma membrane localization and palmitoylation of mutant Galphas and Galphaq. *J Biol Chem* 2001; 276:23945-53.
- Evanko DS, Thiyagarajan MM, Wedegaertner PB. Interaction with Gbetagamma is required for membrane targeting and palmitoylation of Galpha(s) and Galpha(q). *J Biol Chem* 2000; 275:1327-36.
- Garnier A, Cote J, Nadeau I, Kamen A, Massie B. Scale-up of the adenovirus expression system for the production of recombinant protein in human 293S cells. *Cytotechnology* 1994; 15:145-55.
- Goldstein JL, Brown MS. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-30.
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 1977; 36:59-74.
- Grube M, Kock K, Karner S, et al. Modification of OATP2B1-mediated transport by steroid hormones. *Mol Pharmacol* 2006; 70:1735-41.
- Grube M, Kock K, Oswald S, et al. Organic anion transporting polypeptide 2B1 is a high-affinity transporter for atorvastatin and is expressed in the human heart. *Clin Pharmacol Ther* 2006; 80:607-20.

- Guyton JR. Clinical assessment of atherosclerotic lesions: emerging from angiographic shadows. *Circulation* 2002; 106:1308-9.
- Hagenbuch B, Meier PJ. The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1609:1-18.
- Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/ SLC21 family: phylogenetic classification as OATP/ SLCO superfamily, new nomenclature and molecular/functional properties. *Pflugers Arch* 2004; 447:653-65.
- He TC, Zhou S, da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95:2509-14.
- Henwood JM, Heel RC. Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemia. *Drugs* 1988; 36:429-54.
- Igel M, Sudhop T, von Bergmann K. Pharmacology of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors (statins), including rosuvastatin and pitavastatin. *J Clin Pharmacol* 2002; 42:835-45.
- Kass-Eisler A, Falck-Pedersen E, Alvira M, et al. Quantitative determination of adenovirus-mediated gene delivery to rat cardiac myocytes *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90:11498-502.
- Kirshenbaum LA. Adenovirus mediated-gene transfer into cardiomyocytes. *Mol Cell Biochem* 1997; 172:13-21.
- Kjekshus J, Apetrei E, Barrios V, et al. Rosuvastatin in older patients with systolic heart failure. *N Engl J Med* 2007; 357:2248-61.
- Kobayashi D, Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. Involvement of human organic anion transporting polypeptide OATP-B (SLC21A9) in pH-dependent transport across intestinal apical membrane. *J Pharmacol Exp Ther* 2003; 306:703-8.
- Kobayashi K, Yamanaka Y, Iwazaki N, et al. Identification of HMG-CoA reductase inhibitors as activators for human, mouse and rat constitutive androstane receptor. *Drug Metab Dispos* 2005; 33:924-9.
- Kocarek TA, Dahn MS, Cai H, Strom SC, Mercer-Haines NA. Regulation of CYP2B6 and CYP3A expression by hydroxymethylglutaryl coenzyme A inhibitors in primary cultured human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2002; 30:1400-5.
- Kocher O, Comella N, Tognazzi K, Brown LF. Identification and partial characterization of PDZK1: a novel protein containing PDZ interaction domains. *Lab Invest* 1998; 78:117-25.

- Kopplow K, Letschert K, König J, Walter B, Keppler D. Human hepatobiliary transport of organic anions analyzed by quadruple-transfected cells. *Mol Pharmacol* 2005; 68:1031-8.
- Kullak-Ublick GA, Ismail MG, Stieger B, et al. Organic anion-transporting polypeptide B (OATP-B) and its functional comparison with three other OATPs of human liver. *Gastroenterology* 2001; 120:525-33.
- LaRosa JC, He J, Vupputuri S. Effect of statins on risk of coronary disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Jama* 1999; 282:2340-6.
- Lau YY, Okochi H, Huang Y, Benet LZ. Multiple transporters affect the disposition of atorvastatin and its two active hydroxy metabolites: application of *in vitro* and *ex situ* systems. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 316:762-71.
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97:1129-35.
- Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem* 1999; 274:21926-31.
- Li X, Liu L, Tupper JC, et al. Inhibition of protein geranylgeranylation and RhoA/RhoA kinase pathway induces apoptosis in human endothelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277:15309-16.
- Li S, MacLaughlin FC, Fewell JG, et al. Increased level and duration of expression in muscle by co-expression of a transactivator using plasmid systems. *Gene Ther* 1999; 6:2005-11.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-74.
- Libby P, Aikawa M. Mechanisms of plaque stabilization with statins. *Am J Cardiol* 2003; 91:4B-8B.
- Lohse MJ, Engelhardt S, Eschenhagen T. What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure? *Circ Res* 2003; 93:896-906.
- Louis N, Eveleigh C, Graham FL. Cloning and sequencing of the cellular-viral junctions from the human adenovirus type 5 transformed 293 cell line. *Virology* 1997; 233:423-9.
- Luo J, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system. *Nat Protoc* 2007; 2:1236-47.
- Maeda T, Hirayama M, Higashi R, Sato M, Tamai I. Characterization of human OATP2B1 (SLCO2B1) gene promoter regulation. *Pharm Res* 2006; 23:513-20.

- Maliapaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, et al. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. *Cancer Res* 2001; 61:3458-64.
- Matsushima S, Maeda K, Kondo C, et al. Identification of the hepatic efflux transporters of organic anions using double-transfected Madin-Darby canine kidney II cells expressing human organic anion-transporting polypeptide 1B1 (OATP1B1)/multidrug resistance-associated protein 2, OATP1B1/multidrug resistance 1, and OATP1B1/breast cancer resistance protein. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 314:1059-67.
- McMurray JJ, Stewart S. Epidemiology, aetiology, and prognosis of heart failure. *Heart* 2000; 83:596-602.
- Molkentin JD, Dorn GW, 2nd. Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol* 2001; 63:391-426.
- Moore SL, Schaber MD, Mosser SD, et al. Sequence dependence of protein isoprenylation. *J Biol Chem* 1991; 266:14603-10.
- Muhlhauser U, Zolk O, Rau T, Munzel F, Wieland T, Eschenhagen T. Atorvastatin desensitizes beta-adrenergic signaling in cardiac myocytes via reduced isoprenylation of G-protein gamma-subunits. *Faseb J* 2006; 20:785-7.
- Muntz KH, Sternweis PC, Gilman AG, Mumby SM. Influence of gamma subunit prenylation on association of guanine nucleotide-binding regulatory proteins with membranes. *Mol Biol Cell* 1992; 3:49-61.
- Nagase T, Ishikawa K, Suyama M, et al. Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. XII. The complete sequences of 100 new cDNA clones from brain which code for large proteins *in vitro*. *DNA Res* 1998; 5:355-64.
- Nakakariya M, Shimada T, Irokawa M, Maeda T, Tamai I. Identification and species similarity of OATP transporters responsible for hepatic uptake of beta-lactam antibiotics. *Drug Metab Pharmacokinet* 2008; 23:347-55.
- Nishikimi T, Tadokoro K, Wang X, et al. Cerivastatin, a hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor, inhibits cardiac myocyte hypertrophy induced by endothelin. *Eur J Pharmacol* 2002; 453:175-81.
- Nourry C, Grant SG, Borg JP. PDZ domain proteins: plug and play! *Sci STKE* 2003; 2003:RE7.
- Nozawa T, Imai K, Nezu J, Tsuji A, Tamai I. Functional characterization of pH-sensitive organic anion transporting polypeptide OATP-B in human. *J Pharmacol Exp Ther* 2004; 308:438-45.

- Ogata Y, Takahashi M, Takeuchi K, et al. Fluvastatin induces apoptosis in rat neonatal cardiac myocytes: a possible mechanism of statin-attenuated cardiac hypertrophy. *J Cardiovasc Pharmacol* 2002; 40:907-15.
- Pizzagalli F, Varga Z, Huber RD, Folkers G, Meier PJ, St-Pierre MV. Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:3902-12.
- Reinoso RF, Sanchez Navarro A, Garcia MJ, Prous JR. Preclinical pharmacokinetics of statins. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 2002; 24:593-613.
- Rodrigues AC, Curi R, Britto LR, et al. Down-regulation of ABCB1 transporter by atorvastatin in a human hepatoma cell line and in human peripheral blood mononuclear cells. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1760:1866-73.
- Rodrigues AC, Curi R, Genvigir FD, Hirata MH, Hirata RD. The expression of efflux and uptake transporters are regulated by statins in Caco-2 and HepG2 cells. *Acta Pharmacol Sin* 2009; 30:956-64.
- Roglans N, Verd JC, Peris C, et al. High doses of atorvastatin and simvastatin induce key enzymes involved in VLDL production. *Lipids* 2002; 37:445-54.
- Ross E, Kenakin T. Pharmacodynamics: mechanisms of drug action and the relationship between drug concentration and effect. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McCraw-Hill, Medical Publishing Division, New York, Chicago, San Francisco, Lisbon, London, Madrid, Mexico City, Milan, New Delhi, San Juan, Seoul, Singapore, Sydney, Toronto: L. L. Hardman JG, Goodman Gilman A, 2001:31-43.
- Saka M, Obata K, Ichihara S, et al. Attenuation of ventricular hypertrophy and fibrosis in rats by pitavastatin: potential role of the RhoA-extracellular signal-regulated kinase-serum response factor signalling pathway. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2006; 33:1164-71.
- Satoh H, Yamashita F, Tsujimoto M, et al. Citrus juices inhibit the function of human organic anion-transporting polypeptide OATP-B. *Drug Metab Dispos* 2005; 33:518-23.
- Schmechel A, Grimm M, El-Armouche A, et al. Treatment with atorvastatin partially protects the rat heart from harmful catecholamine effects. *Cardiovasc Res* 2009; 82:100-6.
- Schuler G, Hambrecht R, Schlierf G, et al. Myocardial perfusion and regression of coronary artery disease in patients on a regimen of intensive physical exercise and low fat diet. *J Am Coll Cardiol* 1992; 19:34-42.
- Sheng M, Sala C. PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci* 2001; 24:1-29.

- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995; 333:1301-7.
- Simonds WF, Butrynski JE, Gautam N, Unson CG, Spiegel AM. G-protein beta gamma dimers. Membrane targeting requires subunit coexpression and intact gamma C-A-A-X domain. *J Biol Chem* 1991; 266:5363-6.
- Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356,222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *Jama* 1986; 256:2823-8.
- Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, et al. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1995; 92:1355-74.
- St-Pierre MV, Hagenbuch B, Ugele B, Meier PJ, Stallmach T. Characterization of an organic anion-transporting polypeptide (OATP-B) in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87:1856-63.
- Sugiura T, Kato Y, Tsuji A. Role of SLC xenobiotic transporters and their regulatory mechanisms PDZ proteins in drug delivery and disposition. *J Control Release* 2006; 116:238-46.
- Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1712-9.
- Tamai I, Nezu J, Uchino H, et al. Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 273:251-60.
- Tavazzi L, Maggioni AP, Marchioli R, et al. Effect of rosuvastatin in patients with chronic heart failure (the GISSI-HF trial): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008; 372:1231-9.
- Toraason M, Luken ME, Breitenstein M, Krueger JA, Biagini RE. Comparative toxicity of allylamine and acrolein in cultured myocytes and fibroblasts from neonatal rat heart. *Toxicology* 1989; 56:107-17.
- Tousoulis D, Davies GJ, Crake T, Toutouzas PC. Vasomotion and nitric oxide bioactivity in diseased coronary arteries. *Heart* 2002; 87:320-1.
- Ugele B, St-Pierre MV, Pihusch M, Bahn A, Hantschmann P. Characterization and identification of steroid sulfate transporters of human placenta. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 284:E390-8.

- Vavricka SR, Van Montfoort J, Ha HR, Meier PJ, Fattinger K. Interactions of rifamycin SV and rifampicin with organic anion uptake systems of human liver. *Hepatology* 2002; 36:164-72.
- Wang P, Wang JJ, Xiao Y, et al. Interaction with PDZK1 is required for expression of organic anion transporting protein 1A1 on the hepatocyte surface. *J Biol Chem* 2005; 280:30143-9.
- Wang ZH, Liu XL, Zhong M, et al. Pleiotropic Effects of Atorvastatin on Monocytes in Atherosclerotic Patients. *J Clin Pharmacol* 2009.
- Wannamethee SG, Shaper AG, Walker M. Physical activity and mortality in older men with diagnosed coronary heart disease. *Circulation* 2000; 102:1358-63.
- Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001; 7:687-92.
- Wu CY, Benet LZ. Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res* 2005; 22:11-23.
- Young JL, Libby P, Schonbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2002; 88:554-67.
- Zimmermann WH, Schneiderbanger K, Schubert P, et al. Tissue engineering of a differentiated cardiac muscle construct. *Circ Res* 2002; 90:223-30.

## 7. Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Professor Dr. Thomas Eschenhagen für die fachkundige Unterstützung, während der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Ariane Schmechel und Frau Gritt Höppner für die herzliche und freundschaftliche Betreuung, für die weitreichende und wertvolle Unterstützung, sowie für die unermüdliche Motivation während mancher Zeit des Zweifels.

Herrn Dr. Thomas Rau, der „guten Seele“ des Instituts, möchte ich auf diesem Wege für die unzähligen Diskussionen am Rande, sowie für seine immerwährende Hilfsbereitschaft danken.

Herrn Dr. Felix Hansen, der durch seine Menschlichkeit, Hilfsbereitschaft, grenzenlosen Optimismus sowie Humor mir nicht nur eine schöne Laborzeit sondern auch eine schöne Studienzeit bescherte, sage ich auf diesem Wege vielen Dank.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern, meinem Bruder und meiner Ehefrau, denen meine Dissertation gewidmet ist, bedanken. Ohne ihre uneingeschränkte Unterstützung wäre das Medizinstudium nicht möglich gewesen und ich könnte nicht in der Position sein, in der ich mich jetzt glücklich schätzen kann.

Ein letzter Dank gilt allen bisher Unerwähnten, die sich als tapfere und hartnäckige Korrekturleser erwiesen haben, oder mich während dieser Zeit mit ihrer Geduld und Hilfsbereitschaft unterstützt haben

## **8. Lebenslauf**

## **9. 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 einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....