

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Susanne Lutz
aus Göppingen
Tag der mündlichen Prüfung:

THEMA:

**Funktionelle Bedeutung der Nukleosid Diphosphat Kinase
für die G Protein-vermittelte Signaltransduktion des Herzens
unter Berücksichtigung pathogener Veränderungen bei der
Herzinsuffizienz**

Gutachter: PD Dr. Feraydoon Niroomand

Prof. Dr. Michael Brunner

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 SIGNALTRANSDUKTION IM HERZEN	1
1.1.1 Das β -adrenerge System	1
1.1.2 Der Calcium-gesteuerte Kontraktion-Relaxations-Zyklus des Herzens	5
1.2 DIE HERZINSUFFIZIENZ	6
1.2.1 Pathophysiologische Veränderungen der β -adrenergen Signaltransduktion in der Herzinsuffizienz	8
1.2.2 Behandlung der Herzinsuffizienz	11
1.3 DIE NUKLEOSID DIPHOSPHAT KINASEN	12
1.3.1 Enzymatische Aktivität und Struktur der NDPK-Familie	13
1.3.2 nm23H1	14
1.3.3 nm23H2	15
1.3.4 DR-nm23	17
1.3.5 nm23H4	18
1.3.6 NDPK und G-Protein vermittelte Signaltransduktion	19
2. VORAUSSETZUNG UND ZIELE	22
3. MATERIAL UND METHODEN	24
3.1 MATERIAL FÜR PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	24
3.2 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	25
3.2.1 Präparation sarkolemmaler Membranen aus Herzmuskelgewebe (Jones, 1988)	25
3.2.2 Cytosol-Präparation	26
3.2.3 Protein-Konzentrationsbestimmung	26
3.2.4 Western Blot (Towbin et al., 1979)	26
3.2.5 Immunpräzipitation von GRK2 (β -ARK1)	28
3.2.6 Co-Immunpräzipitation der β -Untereinheit von G-Proteinen	28
3.2.7 Messung der Nukleosid Diphosphat Kinase (NDPK) Aktivität	29
3.2.8 Messung der Adenylyl Cyclase (AC) Aktivität	30
3.2.9 Messung der 5'-Nukleotidase Aktivität	32
3.2.10 Bindungsstudien von β -adrenergen Rezeptoren	33
3.3 PUFFER FÜR PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	34
3.4 MATERIAL FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	36

Inhaltsverzeichnis

3.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	37
3.5.1 RNA-TRIZOL™-Aufreinigung	37
3.5.2 Northern Blot	37
3.5.3 Radioaktive Hybridisierung	38
3.5.4 RT-PCR	39
3.5.5 PCR mit Taq-Polymerase	40
3.5.6 DNA-Restriktionsverdau	41
3.5.7 Agarose-Gelelektrophorese	41
3.5.8 DNA-Fragmentisolierung	42
3.5.9 Ligation	42
3.5.10 Elektroporation	42
3.5.11 Klonierung rekombinanter Adenoviren	43
3.6 PUFFER FÜR MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	45
3.7 MATERIALIEN FÜR ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	46
3.8 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	47
3.8.1 Generierung rekombinanter Adenoviren	47
3.8.2 Transduktion von Zellen mit rekombinanten Adenoviren	49
3.8.3 cAMP-EIA	50
3.9 MEDIEN UND PUFFER FÜR ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	50
3.10 TIERVERSUCHE	51
4. ERGEBNISSE	53
4.1 ERHÖHUNG DER NDPK IN SARKOLEMMALEN MEMBRANEN AUS HERZEN MIT TERMINALER HERZINSUFFIZIENZ	53
4.1.1 Charakterisierung der Membranen	54
4.1.2 Gehalt und Aktivität der NDPK	56
4.1.3 Einfluss der erhöhten sarkolemmalen NDPK auf die Regulation der Adenylyl Cyclase	61
4.2 AUSWIRKUNG DER β -BLOCKER THERAPIE AUF DIE SARKOLEMMALE NDPK	63
4.2.1 Gehalt und Aktivität der NDPK	65
4.2.2 Charakterisierung der Membranen	67
4.2.3 Auswirkung der verminderten sarkolemmalen NDPK auf die Regulation der Adenylyl Cyclase in β -HI-Membranen	69

Inhaltsverzeichnis

4.3 CHARAKTERISIERUNG DER HUMANEN KARDIALEN NDPK	70
4.3.1 Nachweis der Transkription von nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 im humanen Herzen	70
4.3.2 Nachweis der nm23H1-, nm23H2- und DR-nm23-Proteine im humanem Sarkolemm	71
4.4 ERHÖHUNG DER SARKOLEMMALEN NDPK DURCH CHRONISCHE STIMULATION β -ADRENERGER REZEPTOREN	73
4.4.1 Ausbildung der Herzmuskelhypertrophie	73
4.4.2 Charakterisierung der Membranen	74
4.4.3 Gehalt und Aktivität der NDPK	75
4.5 CO-EXPRESSION VON NDPK UND $G_s\alpha$ IN EINER IMMORTALISIERTEN NEONATALEN HERZMUSKEL-ZELLINIE	77
4.5.1 Adenovirale Überexpression von nm23H2	77
4.5.2 Adenovirale Co-Expression von nm23H2 und $G_s\alpha$	79
4.5.3 Adenovirale Überexpression von $G_s\alpha$ in stabilen nm23H2-Zellklonen	80
5. DISKUSSION	83
5.1 NDPK - EIN AKTIVATOR DER G-PROTEINE?	83
5.2 NDPK - EIN PATHOGENER FAKTOR DER HERZINSUFFIZIENZ?	84
5.3 ERHÖHTE EXPRESSION ODER TRANSLOKATION DER SARKOLEMMALEN NDPK?	86
5.4 AUSBLICK	87
6. ZUSAMMENFASSUNG	88
7. LITERATURVERZEICHNIS	90
8. DANKSAGUNG	99

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors	2
Abbildung 2: Aktivierung heterotrimerer G-Proteine	3
Abbildung 3: Calcium-gesteuerte Kontraktion des Herzens	5
Abbildung 4: Regulation von β AR und β ARK bei Herzinsuffizienz	9
Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der NDPK-Gene	12
Abbildung 6: GDP-abhängige Stimulation der Adenylyl Cyclase	22
Abbildung 7: Aktivierung heterotrimerer G-Proteine durch die NDPK	23
Abbildung 8: Klonierung rekombinanter Adenoviren	44
Abbildung 9: $G_i\alpha$ -2/3-Gehalt in K- und HI-Membranen	55
Abbildung 10: NDPK-Gehalt in K- und HI-Membranen	56
Abbildung 11: NDPK-Gehalt in den Membranen verschiedener Herzbereiche	57
Abbildung 12: NDPK-Gehalt in verschiedenen Fraktionen von K- und HI-Herzen	58
Abbildung 13: NDPK-Aktivität in verschiedenen Fraktionen von K- und HI-Herzen	59
Abbildung 14: Inhibition der NDPK-Aktivität mit 8-Br-cAMP	60
Abbildung 15: Einfluss von 8-Br-cAMP auf die Regulation der Adenylyl Cyclase	60
Abbildung 16: GDP-Stimulation der Adenylyl Cyclase in K- und HI-Membranen	62
Abbildung 17: Regulation der Adenylyl Cyclase in K- und HI-Membranen	63
Abbildung 18: NDPK-Gehalt in β -HI- und HI-Membranen	65
Abbildung 19: NDPK-Aktivität in β -HI- und HI-Membranen	66
Abbildung 20: $G_s\alpha$, $G_i\alpha$, $G\beta$, β -ARK1 in β -HI- und HI-Herzen	68
Abbildung 21: Regulation der Adenylyl Cyclase in β -HI- und HI-Membranen	69
Abbildung 22: Transkription von nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 im humanen Herzen	71
Abbildung 23: Expression von nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 im humanen Herzen	72
Abbildung 24: Ausbildung einer Herzmuskelhypertrophie durch Isoprenalin	74
Abbildung 25: 5'-Nukleotidase und β -adrenerge Rezeptoren in behandelten Ratteherzen	75
Abbildung 26: Gehalt und Aktivität der NDPK in den behandelten Rattenherzen	76
Abbildung 27: Adenovirale Überexpression von nm23H2	78
Abbildung 28: Kombinierten adenovirale Überexpression von $G_s\alpha$ und nm23H2	79
Abbildung 29: Co-Immunpräzipitation von $G_s\alpha$ und $G\beta$	80
Abbildung 30: Transduktion stabiler nm23H2-Zellklone mit $G_s\alpha$ -Adenoviren	81

Abkürzungen

∞	Unendlich
β -AR	β -adrenerger Rezeptor
β ARK	β -adrenerge Rezeptorkinase
$^{\circ}$ C	Grad Celcius
A	Adenin
AC	Adenylyl Cyclase
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
Ad	Adenovirus Serumtyp V
AMP	Adenosinmonophosphat
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
AT	Angiotensin
ATP	Adenosintriphosphat
ATP γ S	Adenosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)
bav	Biologisch aktive Viren
bp	Basenpaar
Bq	Bequerel
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
C10	Neonatale immortalisierte Herzmuskelzelllinie
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy-Desoxynukleinsäure
Ci	Curie
CMV	Cytomegalovirus
dCTP	Desoxy-Cytosintriphosphat

Abkürzungen und Maße

DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKMP	dilatative Kardiomyopathie
(D)MEM	(Dulbeccos) Modified Eagle Medium
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(β -aminoethylether)- tetraessigsäure
EIA	Enzym Immunassay
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GDP β S	Guanosin 5'-O-(2-thiodiphosphat)
GFP	green flourescent protein
G _i	Inhibitorisches heterotrimeres G-Protein
GMP	Guanosinmonophosphat
GRK	G-Protein gekoppelte Rezeptorkinase
G _s	Stimulatorisches heterotrimeres G-Protein
GTP	Guanosintriphosphat
GTP γ S	Guanosin 5'-O-(3-thiotriphosphat)
h	Stunde
HEK	Humane embryonale Nierenzelllinie
HI	Herzinsuffizienz
HRP	Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
IHK	Ischämische Herzerkrankung

Abkürzungen und Maße

IL	Interleukin
K	Kontrolle
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria Bertani Broth
LV	linker Ventrikel
M	Molar
min	Minute
MOI	Multiplicity of Infection (bav/Zelle)
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
n	Probenzahl
n.s.	nicht signifikant
NDP	Nukleosiddiphosphat
NDPK	Nukleosid Diphosphat Kinase
NHE	Nuklease hypersensitives Element
NTP	Nukleosidtriphosphat
NYHA	New York Heart Association
OD	Optische Dichte
ON	Über Nacht
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonylfourid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase

Abkürzungen und Maße

RV	Rechter Ventrikel
S	Svedberg Konstante
S	Septum
SDS	Sodium-Dodecylsulfat
sec	Sekunde
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
T3	Trijodthyronin
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TEA	Triethanolamin
TNF	Tumornekrosisfaktor
U	Unit
UDP	Uracildiphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt

Maßeinheiten

T	tera 10^{12}
G	giga 10^9
M	mega 10^6
k	kilo 10^3
m	milli 10^{-3}
μ	mikro 10^{-6}
n	nano 10^{-9}
p	piko 10^{-12}
f	femto 10^{-15}

Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
B	Asx	Asparagin/-säure
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
Z	Glx	Glutamin/-säure

1. Einleitung

1.1 Signaltransduktion im Herzen

Das Herz ist ein Hohlmuskel und fungiert als Pumpe des Blutkreislaufs. Histologisch besteht 70% des Herzgewebes aus Kardiomyocyten, die jedoch nur ein Drittel aller Organ-bildenden Zellen ausmachen. Diese Zellen beinhalten den kontraktile Apparat des Herzmuskels und bewirken die Pumpfunktion durch rhythmische Kontraktion und Relaxation. Die Leistung des Herzens muss sich unterschiedlichen hämodynamischen Gegebenheiten anpassen um eine Versorgung aller Organe mit Sauerstoff und Nährstoffen zu jeder Zeit zu gewährleisten. Aus diesem Grund unterliegt das Herz verschiedenen Regelmechanismen, die dazu dienen die Calcium-abhängige Kontraktionskraft (Inotropie), Relaxationsrate (Lusitropie), Schlagrate (Chronotropie) und Erregungsleitung (Dromotropie) zu steuern. Durch Ausschüttung von Noradrenalin aus Nervenfasern des sympathischen Systems wird die Herzleistung erhöht. Die Übertragung des Signals erfolgt durch das β -adrenerge System. Im Gegensatz dazu bewirkt die Freisetzung des Neurotransmitters Acetylcholin aus parasympathischen Nervenfasern eine Erniedrigung der Schlagrate und eine Abnahme der Kontraktionskraft. Dieser Vorgang wird durch muskarinische Rezeptoren vermittelt und bewirkt unter anderem eine Hemmung des β -adrenergen Systems.

1.1.1 Das β -adrenerge System

Die β -adrenerge Signaltransduktion reguliert die Synthese des second messengers cAMP. Der erste Schritt dieser Signalübertragung beinhaltet die Bindung von Neurotransmittern, Hormonen oder Pharmaka an die β -adrenergen Rezeptoren. Bisher konnten vier dieser Rezeptoren (β_1 -AR, β_2 -AR, β_3 -AR und β_4 -AR) im Herzen nachgewiesen und pharmakologisch charakterisiert werden (Kaumann *et al.*, 1997; Molenaar *et al.*, 1997; Kaumann *et al.*, 1998). Der β_1 -AR hat mit 75-85% den höchsten Anteil im Herzen. Er wird vorwiegend in den Kardiomyocyten exprimiert. In Nicht-Kardiomyocyten findet man dagegen hauptsächlich den β_2 -AR (Bristow *et al.*, 1986). Zu diesen Zellen gehören Endothelzellen, glatte Muskelzellen des

Blutgefäßsystems und Fibroblasten. Es wurde aber auch eine funktionelle Beteiligung des β_2 -AR bei der Signalübertragung in Kardiomyocyten nachgewiesen (Post *et al.*, 1999).

β -adrenerge Rezeptoren gehören zu einer Familie von siebenfach Membrandurchspannenden, G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Nach der Anbindung eines Agonisten ändert der Rezeptor seine Konformation und aktiviert heterotrimere G-Proteine an der Innenseite der Plasmamembran. Für diese Aktivierung ist die Interaktion eines Teils der dritten intrazellulären Schleife des Rezeptors mit dem C-terminalen Ende der α -Untereinheit der G-Proteine verantwortlich (De Lean *et al.*, 1980; Samama *et al.*, 1993).

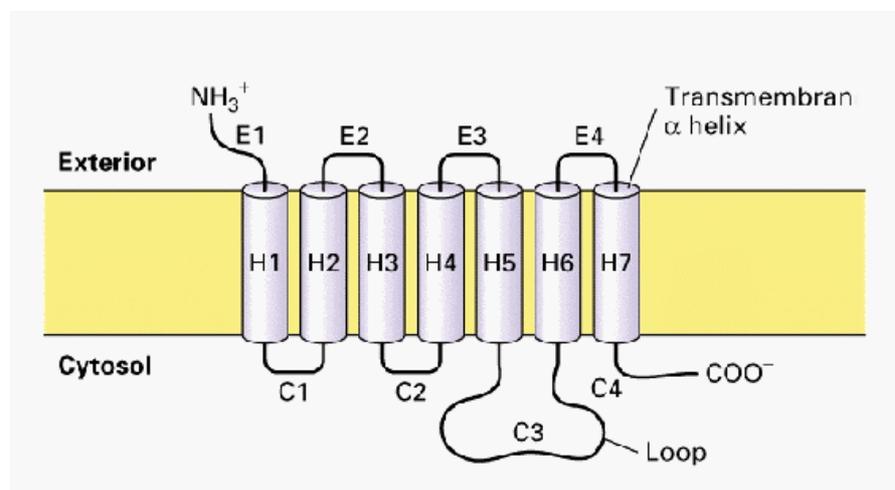


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines G-Protein gekoppelten Rezeptors

E = Extrazelluläre Schleife, C = Cytosolische Schleife, H = Transmembran-Helix

Heterotrimere G-Proteine setzen sich aus einer GDP/GTP-bindenden α -Untereinheit und den funktionell gekoppelten $\beta\gamma$ -Untereinheiten zusammen. Ihre Aktivierung beinhaltet den Austausch des gebundenen GDPs durch GTP und die Dissoziation der α -Untereinheit von den Membran-gebundenen $\beta\gamma$ -Untereinheiten. $G\alpha$ -Proteine regulieren im Herzen verschiedene Effektoren, wie die Adenylyl Cyclase, Ionen-Kanäle und Phospholipasen. Die Inaktivierung der $G\alpha$ -Untereinheiten erfolgt durch eine intrinsische GTPase-Aktivität, welche das gebundene GTP in GDP und Phosphat spaltet. Bisher wurden zahlreiche Varianten von α -Untereinheiten (unter anderem G_s , G_i , G_o , G_q und G_v) identifiziert. Diese regulieren

verschiedene Effektoren und wirken je nach Isoform stimulierend oder inhibierend. Bei der β -adrenergen Signalübertragung kommt es zur Stimulation der Adenylyl Cyclase durch $G_s\alpha$. Im menschlichen Herzen sind zwei Varianten dieses G-Proteins nachweisbar. Sie haben ein unterschiedliches Molekulargewicht und entstehen durch alternatives Splicing aus einem Gen (Monteith *et al.*, 1995).

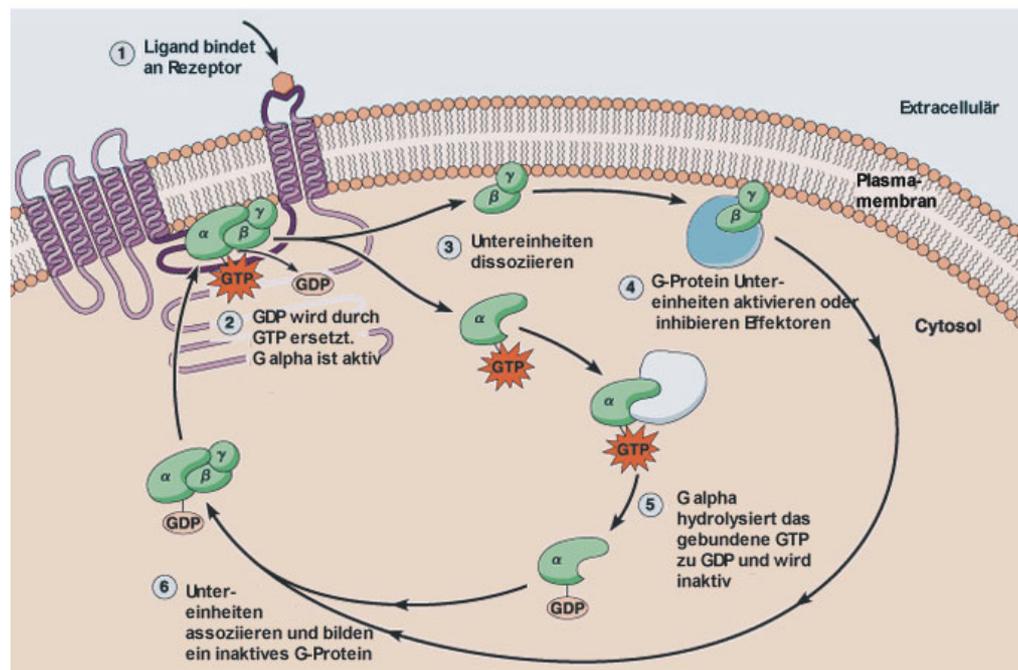


Abbildung 2: Aktivierung heterotrimerer G-Proteine

Langezeit galt die $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine als bloße Andockstelle für die funktionsausübende α -Untereinheit. Es zeigte sich aber, dass der $\beta\gamma$ -Komplex ebenfalls in der Lage ist Effektoren, wie die Adenylyl Cyclase (Wieland *et al.*, 1991), die β -adrenerge Rezeptorkinase (β ARK) (Pitcher *et al.*, 1992), die Phospholipase C (Morris und Scarlata, 1997) oder Ionenkanäle (Dascal, 2001) zu stimulieren bzw. zu inhibieren.

Die Adenylyl Cyclase unterliegt einer dualen Regulation durch stimulatorische und inhibitorische Rezeptoren und G-Proteine, deren Aktivierung sich direkt auf die Synthese des cAMPs aus einem ATP-Magnesium-Komplex auswirkt. Insgesamt wurden bisher 8 Adenylyl

Cyclase-Gene kloniert und charakterisiert (Krupinski *et al.*, 1992). Die dominanten Isoformen im humanen Herzen sind die AC V und die AC VI, welche eine hohe Homologie zueinander haben.

Die Bindung eines Agonisten an die β -adrenergen Rezeptoren bewirkt neben der Stimulation der cAMP-Synthese, einen schnellen negativen Rückkopplungsmechanismus, der eine Desensitivierung der Rezeptoren zur Folge hat. Diese Desensitivierung wird durch die Protein Kinase A (PKA) ausgelöst, deren verstärkte Aktivierung durch erhöhte intrazelluläre cAMP-Spiegel zu einer Phosphorylierung des Rezeptors führt (Freedman *et al.*, 1995). Diese Phosphorylierung ist unabhängig von der Agonisten-Bindung und wird als heterologe Desensitivierung bezeichnet. Im Gegensatz dazu steht die homologe Desensitivierung, die auf der Phosphorylierung des Agonisten-gebundenen Rezeptors durch sogenannte G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK/ β -ARK) beruht. Bis heute wurden sechs GRK-Gene kloniert, von denen vier im Herzen exprimiert werden (Lefkowitz, 1993; Inglese *et al.*, 1993). Die am stärksten exprimierte und am besten charakterisierte Form ist die β -ARK1/GRK2. Diese Rezeptorkinase ist mit der sarkolemmalen Membran der Kardiomyocyten nicht direkt assoziiert. Ihre Anheftung kommt durch die Interaktion mit der $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine zustande (Pitcher *et al.*, 1992; Koch *et al.*, 1993). Die Aktivierung der Rezeptoren durch Liganden-Bindung führt in Sekunden-schnelle zu einer Serin-Phosphorylierung des Rezeptors durch die GRK2. Dies ermöglicht einer Gruppe von cytosolischen Proteinen, den β -Arrestinen, an den Rezeptor zu binden und seine Interaktion mit den stimulatorischen G-Proteinen zu verhindern (Ferguson *et al.*, 1996; Krupnick und Benovic; 1998). Auf lange Sicht gesehen bewirkt eine chronische Stimulation des β -adrenergen Systems eine „down-regulation“ der Rezeptoren, ins Besondere des β_1 -AR. Die „down-regulation“ beinhaltet verschiedene Mechanismen zur Kontrolle der Expression der Rezeptoren. Unter anderem findet eine Internalisierung der Rezeptoren in Endosomen der Zelle statt (Pippig *et al.*, 1995; Krüger *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1996). Dies führt anschließend zu einer verstärkten Degradierung des Proteins. Darüber hinaus konnten steady state-Messungen eine verminderte Stabilität der mRNA nachweisen (Hadcock und Malbon, 1988; Hadcock *et al.*, 1989; Danner *et al.*, 1998).

1.1.2 Der Calcium-gesteuerte Kontraktion-Relaxations-Zyklus des Herzens

Die Kontraktion der Herzmuskelzellen wird durch die Depolarisierung der sarkolemmalen Membranen ausgelöst. Dies führt zu einem Calcium-Einstrom durch Spannungs-abhängige Calcium-Kanäle aus der extrazellulären Umgebung der Zellen in das Cytosol. Das eingeströmte Calcium aktiviert einen Calcium-sensitiven Calcium-Kanal (Ryanodin-Rezeptor), der in der Membran des sarkoplasmatischen Retikulums (SR) lokalisiert ist. Diese Aktivierung führt zu einem starken Ausstrom von Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Cytosol der Zellen. Die cytosolische Calcium-Konzentration wird dabei erhöht. Das ausgeschüttete Calcium wird durch das Calcium-bindenden Protein Troponin C komplexiert und ermöglicht so die Aktin/Myosin Interaktion am kontraktilem Apparat. Eine Kontraktion wird ausgelöst. Anschließend wird das Calcium durch die sarkoplasmatische Ca-ATPase in das Innere des SR zurückgeführt und in Form von Calcium-Calsequestrin-Komplexen gebunden.

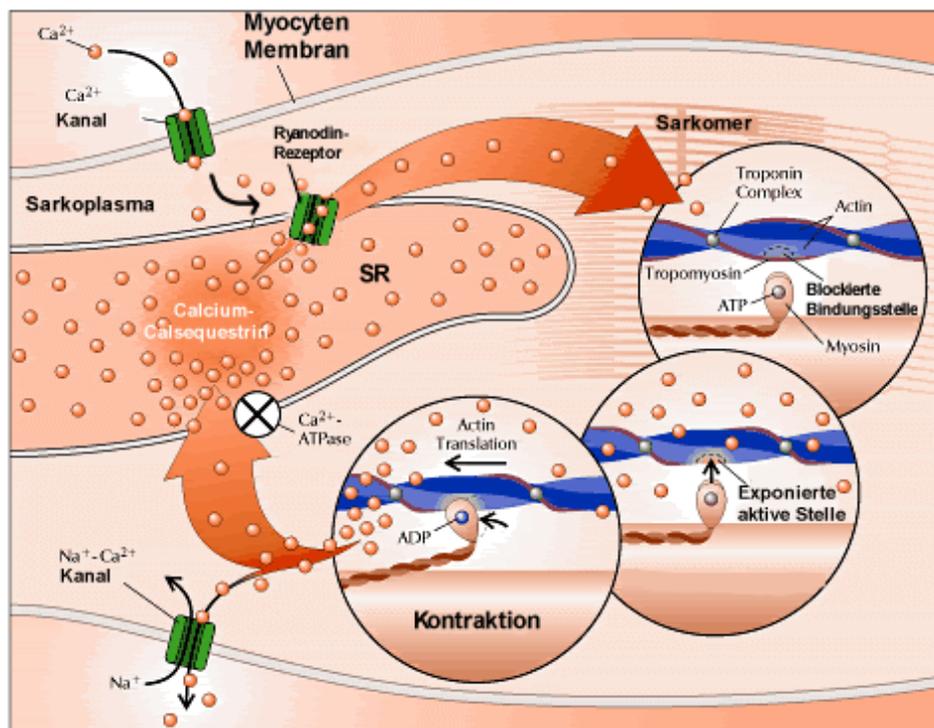


Abbildung 3: Calcium-gesteuerte Kontraktion des Herzens

Der Abfall der Calcium-Konzentration im Cytosol bewirkt die Relaxation des kontraktile Apparats. Ein geringerer Teil des in der Systole ausgeschütteten Calciums wird durch einen Natrium-Calcium Austausch und durch eine ATP-verbrauchende Calcium-Pumpe aus den Zellen ausgeschleußt.

Der Calcium-Zyklus wird durch zahlreiche Signalwege in der Herzmuskelzelle beeinflusst. Durch die Aktivierung der β -adrenergen Signalübertragung kommt es zur Erhöhung der cAMP-Synthese und zur Aktivierung der cAMP-abhängigen Protein Kinase A (PKA). Dies hat eine verstärkte Phosphorylierung der sarkolemmalen Calcium-Kanäle zur Folge. Der Einstrom des extrazellulären Calciums und der Ausstrom aus dem SR nehmen zu. Darüber hinaus bewirkt die erhöhte Aktivierung der PKA eine Zunahme der Phosphorylierung eines Regulators der SR Ca-ATPase, dem Phospholamban. Die Phosphorylierung dieses Pentahomomers führt zu einer erhöhten Aktivität der SR Ca-ATPase und somit zu einem schnelleren Calcium-Influx in das SR. Hierdurch wird die Relaxation und Kontraktion der Herzmuskelzellen gesteigert.

1.2 Die Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz stellt eine der häufigsten internistischen Erkrankungen dar. Weltweit wird die Anzahl der Patienten mit Herzinsuffizienz auf über 10 Millionen geschätzt. Die Krankheit ist altersabhängig und tritt bei Menschen zwischen dem 65. und 75. Lebensjahr mit einer Häufigkeit von 2-5% auf. Dabei sind Männer häufiger betroffen als Frauen.

Der Begriff Herzinsuffizienz bezeichnet die Unfähigkeit des Herzens die Organe ausreichend mit Blut zu versorgen. Diese unzureichende Leistung des Herzens führt unter anderem zu Atemnot und verminderter Leistungsfähigkeit bei den Patienten. Die Schwere der Herzinsuffizienz wird in vier Grade unterteilt (NYHA I-IV), die sich nach der Einschränkung der körperlichen Leistungsfähigkeit richten. Sie reichen von keiner Einschränkung bei normalen physischen Belastungen bis zu schweren Einschränkungen in Ruhe. Faktoren und Ursachen, welche eine Herzinsuffizienz auslösen können, sind angeborene Anomalien des Herzkreislaufsystems, chronische Durchblutungsstörungen bei koronaren Herzerkrankungen, langjährige Auswirkungen von Herzklappenschädigungen, eigenständige Herzmuskelerkrankungen wie z. B. die dilatative Kardiomyopathie, aber auch langjähriger

Bluthochdruck, schwere Herzmuskelentzündungen oder chronischer Alkoholismus. Dabei kann man die Ursachen der Herzinsuffizienz in zwei Kategorien unterteilen: Bei den primären Ursachen der Herzmuskelschwäche liegt eine eigenständige, meistens genetisch bedingte Erkrankung des Herzmuskels selbst zugrunde, bei den sekundären Ursachen entwickelt sich die eingeschränkte Pumpleistung als Folge einer chronischen Überlastung des eigentlich gesunden Herzens.

Die Herzinsuffizienz ist durch verschiedene mechanistische und molekulare Veränderungen charakterisiert. Dazu gehört eine Verminderung der durch Längenänderung induzierten Kontraktionskraftzunahme (Frank-Starling-Mechanismus). Dieser Mechanismus basiert auf einer Erhöhung der Calciumsensibilität kontraktile Proteine. Dementsprechend ist das bereits dilatierte Herz durch Veränderung der Funktion kontraktile Proteine nicht mehr in der Lage, die Calciumsensibilität und damit die entwickelte Kraft zu steigern. Weiterhin wird eine verminderte Kraft-Frequenz-Beziehung (Bowditch-Effekt) beobachtet. Unter dieser versteht man die Zunahme der Kontraktionskraft bei Erhöhung der Herzfrequenz. Dies beruht auf Veränderungen der intrazellulären Calciumhomöostase. Die Amplitude des Anstiegs der freien cytosolischen Calciumkonzentration ist ein Determinator der entwickelten Kontraktionskraft. Bei Herzinsuffizienz kommt es zu einem Anstieg der diastolischen Calciumkonzentrationen, was auf einer verminderten Wiederaufnahme von Calcium in das sarkoplasmatische Retikulum über die SR-ATPase beruht. Deshalb wird in der Systole auch weniger Calcium an das SR freigesetzt. Die Funktionseinschränkung der SR-Ca-ATPase wirkt sich besonders bei einer Zunahme der Herzfrequenz aus, da in der sich verkürzenden Diastole nicht mehr ausreichend Calcium in das SR zurückgeführt werden kann. Die Konsequenz ist eine Abnahme der Kontraktionskraft bei hohen Frequenzen. Zu den molekularen Veränderungen in der Herzinsuffizienz gehören, neben der eingeschränkten Katecholaminstimulierbarkeit der Kontraktion, die im folgenden Kapitel näher besprochen werden soll, interstitielle Veränderungen. Durch chronische Druckbelastungen des Herzens bei Bluthochdruck, aber auch durch die Zunahme der myokardialen Wandspannung (z.B. nach Myokardinfarkt) kommt es zu einer Aktivierung von neuroendokrinen Mechanismen und insbesondere zu einer Stimulation des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems im Herzen. Das vermehrt freigesetzte Angiotensin II führt über die Stimulation von AT1-Rezeptoren zu vermehrtem Wachstum von Fibroblasten (Schnee und Hsueh, 2000). Es entsteht eine Myokardfibrose. Die Vermehrung der interstitiellen Matrix schränkt die Dehnbarkeit des Herzens ein, was im Zusammenspiel mit der Hypertrophie einzelner Herzmuskelfasern zu einer diastolischen

Dysfunktion führen kann. Darüber hinaus kommt es bei schwerer Herzinsuffizienz und möglicherweise bei intestinaler Stauung zu einer Aufnahme bakterieller Toxine. Die Konsequenz ist, dass Zytokine (insbesondere IL-6 und TNF-alpha) resorbiert werden (Paulus, 1999). Diese führen zu strukturellen und funktionellen Veränderungen am Herzen und an den Gefäßen. Überexpression von TNF-alpha in transgenen Tiermodellen führt zum Bild einer dilatativen Kardiomyopathie (Kubota *et al.*, 1997). Ein weiterer wichtiger Faktor ist das Peptid Endothelin, welches vom Herzen freigesetzt wird. Die Freisetzung ist mechanistisch nicht geklärt. Sie bewirkt aber eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems und ist in der Lage, über die Stimulation von ETA-Rezeptoren direkt Myokardhypertrophie, Fibrose und linksventrikuläres Remodelling zu erzeugen (Giannessi *et al.*, 2001). Dieses neue System ist pathophysiologisch wahrscheinlich relevant und wird in zahlreichen Untersuchungen bearbeitet. Alle diese Mechanismen weisen eine gewisse Korrelation zur schlechten Prognose des Syndroms Herzinsuffizienz auf.

1.2.1 Pathophysiologische Veränderungen der β -adrenergen Signaltransduktion in der Herzinsuffizienz

β -adrenerge Rezeptoren

Im insuffizienten Herzen ist die β -adrenerge Signalübertragung eingeschränkt und somit cAMP gesteuerte Prozesse gestört. Der erste Schritt der Signalübertragung stellt die Aktivierung der β -adrenergen Rezeptoren durch die Bindung des Agonisten dar. Vergleichende Untersuchungen explantierter Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz mit gesunden Kontrollproben haben ergeben, dass in insuffizienten Herzen β_1 -adrenerge Rezeptoren vermindert exprimiert werden (Bristow *et al.*, 1986; Ungerer *et al.*, 1993; Bristow *et al.*, 1993). Der β_2 -AR wird in seiner Expression nicht reguliert, jedoch kommt es zu einer Entkopplung von seinem Effektor Adenylyl Cyclase (Bohm *et al.*, 1997). Dies wird durch eine gesteigerte Aktivierung der β -ARK (Ungerer *et al.*, 1993) vermittelt.

1994; Kunapuli *et al.*, 1994). Dennoch stellen diese Proteine einen vielversprechenden Ansatz für zukünftige Therapien der Herzinsuffizienz dar. In Versuchen an Schweinen führte die Blockierung β -adrenerger Rezeptoren mit einem Antagonisten (β -Blocker: Bisoprolol) zu einer reduzierten Aktivität der GRKs und dadurch zu einer Zunahme der β -adrenergen Stimulation der Adenyl Cyclase um das zweifache (Ping *et al.*, 1995). Mäuse, die einen GRK-Inhibitor überexprimierten, zeigten eine verstärkte Kontraktilität des Herzens und eine bessere Antwort auf den β -AR Agonisten Isoproterenol (Koch *et al.*, 1995). Dieser GRK-Inhibitor besteht aus den äußersten 194 C-terminalen Aminosäuren der β ARK-1 und kompetiert mit dem Wildtyp-Protein um die Bindungsstelle an der $\beta\gamma$ -Untereinheit der G-Proteine. Da die Erhöhung der GRK-Proteine in der Herzinsuffizienz sicherlich zur reduzierten β -adrenergen Stimulation der Herzfunktion beiträgt, stellt dieser Inhibitor eine gute Möglichkeit für eine Gentherapie dar.

G-Proteine

Die Signalübermittler zwischen den β -AR und den Effektoren sind die heterotrimeren G-Proteine. Die cAMP-Synthese wird durch $G_s\alpha$ stimuliert. Dieses Protein wird bei der Herzinsuffizienz nicht reguliert (Feldman *et al.*, 1988; Eschenhagen *et al.*, 1992). Die Gegenspieler sind die inhibitorischen G-Proteine $G_i\alpha-2$ und 3, die in die Übermittlung der negativ inotropen Antwort von muskarinischen Rezeptoren involviert sind. Bei Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie wurde eine Erhöhung der inhibitorischen G-Proteine nachgewiesen (Feldman *et al.*, 1988; Feldman *et al.*, 1989; Bohm *et al.*, 1994), die mit einer Erhöhung der $G_i\alpha-2$ mRNA korrespondiert (Eschenhagen *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu sind die Ergebnisse, die mittels verschiedener Tiermodelle gewonnen wurden nicht eindeutig. Diese variieren je nach Tierspezies zwischen einer leichten Abnahme bis zu einer deutlichen Zunahme des $G_i\alpha$ -Gehalts (Calderone *et al.*, 1991; Ping and Hammond, 1994; Marzo *et al.*, 1991; Kiuchi *et al.*, 1993). Die chronische Stimulation der β -adrenergen Rezeptoren führte in verschiedenen Tiermodellen immer zu einer Erhöhung von $G_i\alpha-2$ (Eschenhagen *et al.*, 1991; Mende *et al.*, 1992; Müller *et al.*, 1993).

Die Verschiebung zwischen dem Gleichgewicht stimulierender und inhibierender G-Proteine trägt sicher zur Pathophysiologie der Herzinsuffizienz bei. Jedoch hat die Überexpression von

G_sα in transgenen Mäusen gezeigt, dass es durch eine Erhöhung des stimulierenden Potentials der cAMP-Regulation ebenfalls zur Ausbildung einer Kardiomyopathie kommt (Iwase *et al.*, 1996, 1997).

1.2.2 Behandlung der Herzinsuffizienz

Die Herzinsuffizienz-Therapie hat das Ziel, die Progression der kardialen Funktionsstörung zu vermeiden, die Symptome und damit die Lebensqualität der Patienten zu verbessern, Komplikationen zu verhindern und die Überlebenszeit zu verlängern. Hierzu stehen medikamentöse und nichtmedikamentöse therapeutische Maßnahmen zur Verfügung.

Die nicht medikamentöse Therapie beinhaltet die Gewichtskontrolle, die Ernährungskontrolle, die Einschränkung von Alkohol und Nikotin und eine moderate körperliche Bewegung. Die medikamentöse Behandlung besteht in der Regel in einer kombinierten Gabe verschiedener Medikamente. Einen hohen Stellenwert nehmen dabei Inhibitoren des Angiotensin konvertierenden Enzyms ein (ACE-Inhibitoren). Diese reduzieren die Nachlast des Herzens durch Senkung des peripheren Widerstands, verhindern Hypertrophie und Remodelling des Herzens und reduzieren die Letalität der Krankheit. Aufgrund der eingeschränkten Herzfunktion kommt es bei der Herzinsuffizienz oft zu Flüssigkeitsstauungen in der Lunge oder in der Körperperipherie. Aus diesem Grund werden oft Diuretika in Kombination mit ACE-Inhibitoren gegeben. Diuretika führen zu einer Erhöhung der Harnbildung und unterbinden somit Flüssigkeitsretentionen im Körper. Studien haben gezeigt, dass sie eine signifikante Gewichtsabnahme und Beschwerdebesserung der Patienten herbeiführen.

Wichtig für die Behandlung der Herzinsuffizienz sind Herzglykoside (Digitoxin, Digoxin). Diese wirken über die Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase positiv inotrop, senken die Herzfrequenz und hemmen die sympathische, adrenerge Aktivierung. Antikoagulationsmittel werden ebenfalls verabreicht, da sie das Risiko einer Embolie durch einen Thrombus vermindern.

Die Behandlung mit sogenannten β-Blockern nimmt zunehmend einen großen Stellenwert in der Therapie von Patienten mit Herzinsuffizienz ein. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine vorsichtig eingeleitete β-Blocker Therapie zu einer Verbesserung der links-

ventrikulären Pumpfunktion führt. Dies konnte für β_1 -selektive Blocker, z.B. Metoprolol und Bisoprolol, und für vasodilatierende (α_1 -Blockade) nicht-selektive β -Blocker, z.B. Carvedilol, gezeigt werden. Unter β -Blocker-Therapie waren im Vergleich zu Placebo-behandelten Patienten weniger stationäre Behandlungen und Herztransplantationen erforderlich (CIBIS II und MERIT-HF-Studie). Eine erst kürzlich erschienene Studie (COPERNICUS), bei der insgesamt 2.292 herzinsuffiziente Patienten (Stadium NYHA IV) mit Carvedilol oder Placebo behandelt wurden, zeigte das die Ein-Jahres-Mortalität durch Carvedilol um 35% gesenkt werden konnte. Dieser statistisch hochsignifikant Unterschied konnte selbst in Hochrisikogruppen beobachtet werden.

1.3 Die Nukleosid Diphosphat Kinasen

Die Familie der Nukleosid Diphosphat Kinasen (NDPK) besteht im Menschen aus 8 homologen Genen (nm23H1-nm23H8). Diese lassen sich aufgrund ihrer DNA- und Aminosäure-Sequenzen in zwei Gruppen einteilen. Die erste Gruppe bilden nm23H1, nm23H2, DRnm23 und nm23H4. Diese vier Gene weisen eine Homologie von 58-88% über die gesamte Länge ihrer kodierenden Sequenzen auf. Ihre Proteine werden als NDPK A-D bezeichnet.

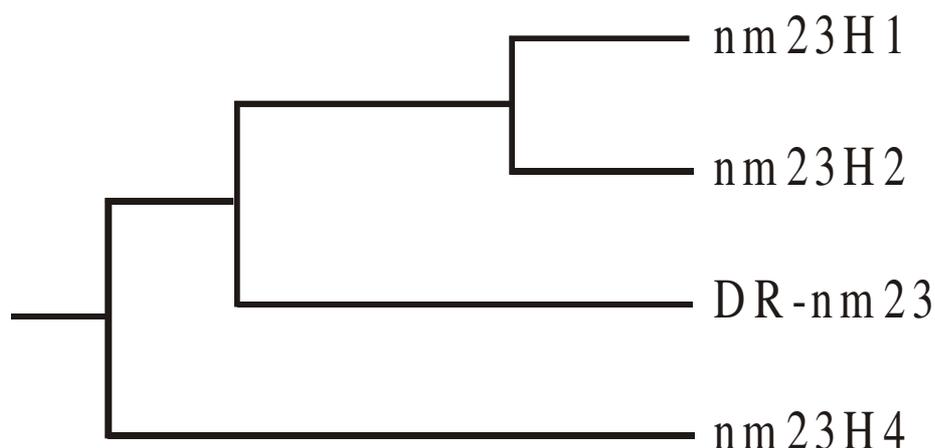


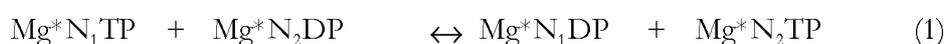
Abbildung 5: Phylogenetischer Baum der NDPK-Gene

(Lacombe *et al.*, 2000)

Nm23H5-nm23H8 bilden die zweite Gruppe der Nucleosid Diphosphat Kinasen. Diese Gene wurden hauptsächlich durch EST-Datenbanksuche identifiziert (Munier *et al.*, 1998; Mehus *et al.*, 1999). Über Ihre Funktion ist bisher nur wenig bekannt. Im Gegensatz zu den ubiquitär exprimierten Proteinen der Gruppe 1 zeigen die Mitglieder der Gruppe 2 eine nahezu ausschließliche Expression in Testis-Gewebe. Weiterhin unterscheiden sie sich durch diverse Insertionen in der kodierenden Sequenz. Im Folgenden soll auf diese zweite Gruppe der NDPK-Familie nicht weiter eingegangen werden.

1.3.1 Enzymatische Aktivität und Struktur der NDPK-Familie

Ein wesentliches Charakteristikum der ersten Gruppe der NDPK-Familie ist ihre enzymatische Aktivität (Lascu und Gonin, 2000). Diese Aktivität besteht in der Übertragung einer Phosphatgruppe von 5'-Nucleosidtriphosphaten auf 5'-Nucleosiddiphosphate. Die Reaktion läuft über die Bildung eines NDPK-Phosphointermediats. Die NDPK ist in der Lage diverse Nucleotide, Desoxynucleotide (Schaertl *et al.*, 1998) und in geringerem Ausmaß Didesoxynucleotide (Schneider *et al.*, 1998) umzusetzen. Die physiologisch wichtigste Reaktion ist jedoch die Phosphorylierung von GDP zu GTP unter Verbrauch von ATP. Für die ATP-Synthese in der Zelle spielt die NDPK keine Rolle. Essentielle Co-Faktoren dieser Reaktion sind zweiwertige Kationen, insbesondere Magnesium (Colomb *et al.*, 1969).



Die, im aktiven Zentrum liegende Aminosäure Histidin dient als Phosphatübermittler und ist Bestandteil eines „NDPK active site motifs“, welches durch die neun Aminosäuren NXXHG/ASD charakterisiert ist und evolutionär hochkonserviert wurde. Die Einführung verschiedenen Punktmutationen hat gezeigt, dass dieses Motiv entscheidend für die Katalyse und die Stabilität des Proteins ist. Zusätzlich besitzen die NDPK Proteine ein Leucin-Zipper-ähnliches Motiv und eine RGD-Domäne. Die Funktionen dieser beiden Motive sind bislang

nicht bekannt. Leucin-Zipper sind normalerweise typisch für DNA-bindende Transkriptionsfaktoren (Klug, 1995) und RGD-Domänen dienen den Proteinen zur Interaktion mit der Integrin-Superfamilie (Akiyama, 1996).

Die Proteine NDPK A-D besitzen ähnliche kinetische Eigenschaften (Gonin *et al.*, 1999) und sind in gereinigter Form in der Lage miteinander Hetero-Oligomere zu bilden (Erent *et al.*, 2001). Die wahrscheinlich wichtigste physiologische Form ist die eines Hexamers. Bisher konnte jedoch die genaue Zusammensetzung der „natürlich“ vorkommenden NDPK nicht entschlüsselt werden. Dies hängt vermutlich auch mit ihrer komplexen Verteilung in der Zelle zusammen. Sie wurde bisher im Cytosol, in Mitochondrien und Membran-ständig nachgewiesen. Eine Ausnahme bildet die nukleäre NDPK, die als NDPK B-Homodimer beschrieben wurde (Kraeft *et al.*, 1996; Pinon *et al.*, 1999).

Bisher ist jedoch nicht klar, wozu diese Diversifikation der NDPK-Proteine und ihre komplexe Kompartimentierung dient. In den folgenden Kapiteln werden durch nähere Charakterisierung einzelner Isoformen, mögliche Antworten auf diese Fragestellung gegeben.

1.3.2 nm23H1

Das nm23H1 Gen wurde erstmals bei differentiellen Hybridisierungsexperimenten entdeckt (Steege *et al.*, 1988). Diese Experimente basierten auf einem Vergleich von cDNAs einer murinen Melanom-Zelllinie mit hohem und mit niedrigem Metastasepotential. Die Expression von nm23 (non metastatic clone 23) war in der stark Metastasen-bildenden Zelllinie deutlich reduziert. In folgenden Studien wurde versucht eine Korrelation zwischen der Fähigkeit zur Bildung von Metastasen verschiedener Krebsarten und dem Expressionsniveau von nm23H1 herzustellen (Hartsough and Steeg, 2000). Die intensivsten Studien wurden an Brustkarzinomen und Melanomen angestellt. In den meisten Fällen konnte eine inverse Beziehung zwischen der Aggressivität der Metastasen und der mRNA, bzw. dem Protein-Gehalt von nm23H1 nachgewiesen werden. Von 24 Brust-Karzinom Studien zeigten 18 eine statistisch signifikante Korrelation zwischen einer verminderten nm23H1 Expression und mindestens einem Aspekt zur Beurteilung der Aggressivität der Metastasen-Bildung (z.B. Metastase-Freiheit, Status der Lymphknoten, Expressionsmuster bestimmter Hormonrezeptoren im Primärtumor). Jedoch lässt sich aus diesen Studien ebenfalls ableiten, dass nm23H1 kein unabhängiger Faktor für die Prognose von Brustkarzinomen ist. Weiterhin

zeigte sich bei verschiedenen Transfektionsstudien von nm23H1 und nm23H2 in Tumor Zelllinien ein deutlich vermindertes Potential (40-100%) zur Metastasenbildung der re-injizierten Zellen in immundefiziente Nacktmäuse. Aber auch hier ergab sich kein einheitliches Bild. Die Art und Weise, wie nm23H1 die Metastasen-Bildung von Tumorzellen beeinflussen soll, ist bis heute weitest gehend ungeklärt.

1.3.3 nm23H2

nm23H2 besitzt die höchste Homologie von ca. 88% zu nm23H1 (Stahl *et al.*, 1991). Beide Gene liegen in Tandem auf Chromosom 17q21 (Backer *et al.*, 1993). Dies veranlasste Spekulationen über eine mögliche Genduplikation eines Ur-NDPK Gens im Laufe der Evolution. Diese Annahme wird durch die Tatsache gestützt, dass in Prokaryonten (z.B. ndk-Gen von *E. coli*) und niederen Eukaryonten nur eine NDPK-Isoform existiert (Hama *et al.*, 1991; Jong und Ma, 1991; Izumiya und Yamamoto, 1995). Hierbei stellt sich erneut die Frage nach dem Grund der Komplexität der NDPK in Vertebraten. Vor allem unter dem Aspekt, dass eine Deletion des ndk-Gens in *E. coli* keinen Einfluss auf die Viabilität der Bakterien hatte (Lu *et al.*, 1995). Trotz der hohen Homologie zwischen nm23H1 und nm23H2 scheint es Unterschiede in der Funktion der Proteine zu geben. Im Folgenden soll ein Beispiel für eine nm23H2 spezifische Funktion gegeben werden.

Der Transkriptionfaktor PuF

1989 isolierten Postel und Mitarbeiter aus einer cDNA-Expressionsbibliothek das Protein PuF, welches *in vitro* an ein 104bp langes DNA-Fragment des c-myc Promotors bindet. Dieses Fragment ist ein positiv-regulierender Abschnitt des c-myc Gens. Er zeichnet sich durch eine Homopurin/Homopyrimidin-haltige Sequenz aus, die in der Lage ist intermolekulare Tripel-DNA-Strukturen zu bilden (Postel *et al.*, 1991). Zusätzlich besitzt das Fragment eine Schnittstelle für die DNaseI und mehrere S1-Nuklease Hypersensitive Elemente, die dem gesamten Abschnitt des Promoters den Namen NHE (nuclease-hypersensitive element) gegeben haben. Das isolierte, NHE-bindende Protein stellte sich nach Sequenzierung als nm23H2 heraus (Postel *et al.*, 1993). In nachfolgenden Arbeiten ist es gelungen nachzuweisen, dass nm23H2/PuF *in vitro* und *in vivo* die Funktion eines positiv-regulierenden Faktors der

Transkription des c-myc Gens hat (Berberich und Postel, 1995; Postel *et al.*, 1996). *In vitro* Rekonstitutions-Assays mit rekombinantem, gereinigtem nm23H2/PuF zeigten jedoch eine deutlich verminderte transkriptionelle Aktivität im Vergleich zu Versuchen, die zusätzlich PuF-depletierte Zellkernfraktionen mit einschlossen. Außerdem war PuF nicht in der Lage mit der RNA-Polymerase zu interagieren. Daraus wurde geschlossen, dass nm23H2 zwar einen positiv-regulierenden Einfluss auf die Transkription des c-myc Gens hat, aber in dieser Funktion abhängig von anderen Transkriptionsfaktoren ist. Ji und Mitarbeitern (1995) konnten diese Beteiligung von nm23H2 bei der Transkription des c-myc Gens bestätigen. Ihre Untersuchungen an Burkitt Lymphom Zellen, die eine chromosomale Translokation des c-myc Gens in unmittelbarer Nähe der Immunglobulin-Gen Loci besitzen, zeigten, dass das c-myc Gen über das Regulator-Element NHE durch nm23H2/PuF positiv reguliert wird.

Im Verlauf dieser Forschungsarbeiten stellte sich die Frage nach der Bedeutung der NDPK-Aktivität für die transkriptionelle Aktivierung des c-myc Gens. *In vitro* Experimente mit der inaktiven nm23H2-H118F Mutante zeigten keine Beeinträchtigung der transkriptionellen Aktivierung des c-myc Gens (Postel und Ferrone, 1994). Mutationsstudien von nm23H2/PuF ergaben, dass die Aminosäuren Arginin 34, Asparagin 69 und Lysin 135 entscheidend für die DNA-Bindung an das NHE-Fragment sind (Postel *et al.*, 1996). Die beiden letzten Aminosäuren sind zwischen nm23H1 und nm23H2 nicht konserviert. Dies erklärt möglicherweise das Unvermögen von nm23H1 die Transkription von c-myc zu beeinflussen. Jedoch konnten weitere Zielgene der transkriptionellen Aktivierung von nm23H2/PuF und auch von nm23H1 identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem wichtige Gene der myeloischen Differenzierung (Myeloperoxidase, CD11b und CCR5, Rooney *et al.*, 1999) und das Gen des Wachstumsfaktors PDGF A (Liu *et al.*, 1999).

Eine weitere Besonderheit von nm23H2 ist die Fähigkeit Sequenz-spezifisch DNA zu schneiden. Von Postel *et al.*, (1999) wurde nachgewiesen, dass nm23H2 als Endonuklease für NHE Sequenzen fungiert. Dabei kommt es zu einem Doppelstrangbruch der DNA und einer kovalenten Bindung von DNA und nm23H2. Inwiefern diese Fähigkeit in Zusammenhang mit der NDPK-Aktivität und der Transkriptionsfaktor-Aktivität steht ist unklar.

Der I-Faktor

1992 isolierten Okabe-Kado und Mitarbeiter einen sogenannten Inhibitor der Differenzierung (I-Faktor) aus dem konditionierten Medium einer Differenzierungs-resistenten murinen myeloischen Leukämie-Zelllinie (M1). Dieses Protein war in der Lage die Differenzierung einer Induktions-sensitiven M1-Zelllinie zu verhindern. Die Differenzierung dieser Zellen wird normalerweise durch verschiedene Induktoren (z.B. Dexamethason) ausgelöst und führt zur Bildung von Makrophagen und Granulozyten. Der gereinigt I-Faktor hatte ein Molekulargewicht von ca. 17 kDa und erwies sich nach seiner Sequenzierung als murines nm23H2. In folgenden Untersuchungen zeigten Okabe-Kado und Mitarbeiter (1995), dass nm23H1 und nm23H2 der Ratte und des Menschen ebenfalls I-Faktor Aktivität hatten. Diese Inhibition der Differenzierung war unabhängig von der Nukleosid Diphosphat Kinase Aktivität, da die Punktmutation der Aminosäure Histidin im aktiven Zentrum von nm23H2 keine Auswirkung auf die I-Faktor Aktivität hatte. Durch die Expression verschiedener Deletionsmutanten waren die Autoren in der Lage, den für die I-Faktor Aktivität notwendigen Abschnitt auf die äußersten 60, N-terminalen Aminosäuren einzugrenzen. Die I-Faktor Aktivität der NDPK setzt die Sezernierung des Proteins voraus, welches jedoch kein bekanntes Signal für den Export aus der Zelle hat.

1.3.4 DR-nm23

Das DR-nm23 Gen wurde bei differentiellen Hybridisierungsexperimenten von cDNA einer chronisch-myeloischen Leukämie Zelllinie (Venturelli *et al.*, 1995) identifiziert. Die Homologie der DNA-Sequenz mit nm23H1 und nm23H2 beträgt 70%, die Homologie der Aminosäure-Sequenz beträgt 65%. Korrespondierend zu nm23H1 und nm23H2 sind Aminosäuren hochkonserviert, die für die Interaktion mit anderen NDPK Proteinen (S61) und die Nukleosid Diphosphat Kinase Aktivität (H134, S136) entscheidend sind. Darüber hinaus besitzt DR-nm23 ebenfalls ein Leucin-Zipper-ähnliches Motiv und eine RGD-Domäne. Eine zusätzliche Besonderheit von DR-nm23 stellt das stark hydrophobe N-terminale Ende von 17 Aminosäuren dar. Homologe Gene wurden bislang in der Maus und in der Ratte nachgewiesen.

1995 zeigten Venturelli und Mitarbeitern, dass in den frühen Stadien der Differenzierung von myeloischen CD34+ haematopoetischen Vorläuferzellen, DR-nm23 stark exprimiert wird und

die Expression im Verlauf dieses Prozesses deutlich abnimmt. Diese Beteiligung von DR-nm23 an Differenzierungsprozessen wird gestützt durch Überexpressions-Experimente von DR-nm23 in IL-3-abhängigen myeloischen Vorläuferzellen (32Dcl3). Die Überexpression von DR-nm23 inhibiert in diesen Zellen die G-CSF (Growth-Colony Stimulating Factor) abhängige Differenzierung und führt statt dessen in die Apoptose (programmierter Zelltod). Die Grundlage dieses Mechanismus ist noch ungeklärt. Jedoch wurde von Venturelli und Mitarbeitern (2000) nachgewiesen, dass die Inhibition der Differenzierung und die Einleitung der Apoptose in diesen Zellen unabhängig von der NDPK Aktivität ist. Mutationen von Aminosäuren des aktiven Zentrums (Histidin 134 bzw. des Serin 136) hatten keinen Einfluss auf die apoptotischen Vorgänge. Im Gegensatz dazu kam es zur ungehinderten Differenzierung bei der Überexpression der „Interaktions“-Mutante S61 und der deletierten RGD-Mutante. Ein wichtiger Faktor zum Verständnis der Wirkungsweise von DR-nm23 ist die Lokalisierung des Proteins in der Zelle. DR-nm23 wurde zunächst als cytosolisches Protein beschrieben, da die Überexpression eines DR-nm23/GFP-Fusionsproteins eine punktuelle Färbung des Cytosols von Zellen bewirkte. Verfeinerte Zellfraktionierungen ergaben jedoch, dass überexprimiertes DR-nm23 in cytosolischen Fraktionen, leichten (150000g) und schweren (10000) Membranen muriner Neuroblastom-Zellen nachweisbar war. In diesen Zellen führte eine Überexpression zu einer verstärkten Differenzierung der Zellen. Negroni und Mitarbeiter (2000) exprimierten zusätzlich verschiedene DR-nm23 Mutanten in diesen Zellen über. Interessanterweise war die Verteilung abhängig von der Art der Mutation. Das Wildtyp-Protein und die inaktive Mutante fanden sich in allen drei Fraktionen wieder. Die nm23-Interaktionsmutante (S61) und das im RGD-Motiv deletierte Protein konnte nicht in den leichten Membranen nachgewiesen werden. Diese Mutanten, aber auch die inaktive Form, waren in diesen Experimenten nicht in der Lage mit nm23H1/nm23H2 zu interagieren.

1.3.5 nm23H4

nm23H4 wurde erstmals aus einer humanen Magen-cDNA-Bibliothek isoliert (Milon *et al.*, 1997). Es wird hauptsächlich in der Prostata, im Herz, in der Leber und im Skelettmuskel des Menschen exprimiert. Das Gen besitzt eine Homologie von 56% zu nm23H1, 55% zu nm23H2 und 60% zu DR-nm23. Wie schon für DR-nm23 beschrieben, weißt nm23H4 eine zusätzliche N-terminale Sequenz von 33 Aminosäuren auf. Diese zusätzliche Sequenz

beinhaltet stark positiv geladene Aminosäuren, die für den Export eines Proteins in die Mitochondrien charakteristisch sind. Milon und Mitarbeiter (2000) wiesen in Transfektionsexperimenten von 293 HEK-Zellen erstmals die mitochondrielle Lokalisierung eines überexprimierten NDPK D/GFP-Fusionsproteins nach. Die Experimente zeigten eine ausschließliche Lokalisierung der NDPK D in den Mitochondrien. Dieser Befund konnte durch Western Blot Experimente bestätigt werden. Darüber hinaus konnten Milon und Mitarbeiter zeigen, dass die zusätzliche 33 Aminosäuren-lange, N-terminale Sequenz während des Transports in die Mitochondrien abgespalten wird. Dieses trunkierte Protein liegt in den Mitochondrien an die äußere und innere Mitochondrienmembran assoziiert vor. Die Art der Assoziation ist jedoch nicht bekannt. Das Verteilungsmuster der NDPK D weist starke Ähnlichkeit mit dem mitochondrieller Porine auf, welche an den Kontaktstellen von äußerer und innerer Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Homologe Gene zu nm23H4 konnten bislang in der Ratte, in der Taube und im Huhn nachgewiesen werden. Somit ist die NDPK D (nm23H4) die einzige Isoform, die eine, nur auf ein Kompartiment beschränkte Lokalisierung aufweist. Ihre genaue Funktion in den Mitochondrien ist jedoch nicht bekannt.

1.3.6 NDPK und G-Protein vermittelte Signaltransduktion

Die Mitglieder der NDPK-Familie beeinflussen die Proliferation, die Entwicklung, und die Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen. Diese Prozesse werden ausgelöst durch die Aktivierung von Rezeptoren an der Oberfläche der Zellen. An der intrazellulären Weiterleitung des Signals sind verschiedene Signalkaskaden beteiligt, die untereinander vernetzt sind. Heterotrimere G-Proteine spielen dabei eine wichtige Rolle. Diese Proteine sind an der Plasmamembran lokalisiert und werden durch die Familie der siebenfach Membrandurchspannenden Rezeptoren aktiviert. Ihre Einteilung erfolgt abhängig davon, ob sie ihre Effektoren stimulieren oder inhibieren. Aktive G-Proteine setzen sich aus einem Membran-gebundenen $\beta\gamma$ -Dimer und einem dissoziierten α -Monomer mit gebundenem GTP zusammen. Nach der Regulation ihres Effektors, spaltet die intrinsische GTPase Aktivität der α -Untereinheit GTP in GDP und freies Phosphat. Die inaktive α -Untereinheit reassoziert mit dem $\beta\gamma$ -Dimer an der Plasmamembran.

Die Lokalisation der NDPK an der Plasmamembran und die von ihr katalysierte Synthese von GTP aus GDP und ATP lassen vermuten, dass die NDPK ihren Einfluss auf zelluläre Prozesse durch die Aktivierung von G-Proteinen ausübt.

Kimura und Shimada (1983; 1985; 1986; 1988; 1990) wiesen nach, dass die Aktivierung der Adenylyl Cyclase in Anwesenheit von GDP auf eine Interaktion der Membran-gebundenen NDPK mit dem stimulatorischen G-Protein zurückzuführen ist. Die Autoren zeigten, dass die Membran-gebundenen NDPK zwar nur einen geringen Anteil an der gesamten NDPK in der Zelle hat, aber dass diese Bindung sehr resistent gegenüber verschiedenen Solubilisierungsmethoden ist. Weiterhin ist es den Autoren gelungen in Co-Immünpräzipitationen G_sα-Proteine und NDPK gemeinsam zu isolieren.

Verschiedene andere Arbeiten wiesen ebenfalls auf eine Beteiligung der NDPK an der Regulation G-Protein gekoppelter Effektoren hin. Dazu gehörte die Aktivierung der Adenylyl Cyclase in den Membranen humaner Thrombocyten (Jakobs und Wieland, 1989), die Aktivierung der NADPH-Oxidase in HL-60 Zellen (Seifert *et al.*, 1988), sowie die Aktivierung muskarinischer Kalium-Kanäle in atriellen Zellen (Otero *et al.*, 1988; Heidbüchel *et al.*, 1993) und die Stimulation der Phospholipase D in Thrombocytenmembranen des Kaninchens (Fan *et al.*, 1994).

Mögliche Mechanismen der G-Protein Aktivierung durch die NDPK

Unterschiedliche Mechanismen der G-Protein Aktivierung durch die NDPK wurden diskutiert. Diese reichen von der einfachen Bereitstellung von GTP durch die NDPK, bis zu einer direkten Phosphorylierung am G-Protein gebundene GDP.

Im Hinblick auf die hohe intrazelluläre GTP-Konzentration von 0.3-2mM (Kleinecke *et al.*, 1979; Geisbuhler *et al.*, 1984) und die im Verhältnis dazu niedrige Dissoziationskonstante des GTPs im G-Protein von 0.3μM (Gilman, 1987) erscheint die alleinige Synthese von GTP nicht ausreichend für eine physiologisch relevante Regulation. Die Vermutung, dass diese Übertragung in einem GTP-armen oder -freien Signaltransduktions-Kompartiment der Plasmamembran stattfindet und somit abgeschirmt ist gegen den hohen intrazellulären GTP-Spiegel, konnte ebenfalls nie belegt werden.

Eine weitere Hypothese, die mit großem Enthusiasmus verfolgt wurde befasste sich mit der Möglichkeit der direkten Phosphorylierung des am inaktiven G-Protein gebundenen GDPs

durch die NDPK (Kikkawa *et al.*, 1990; Randazzo *et al.*, 1991; Ruggieri und McCormick, 1991; Zhu *et al.*, 1999). Diese schloss nicht nur die Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine mit ein, sondern auch die Gruppe der kleinen G-Proteine, die ebenfalls wichtige Signalübermittler sind. Dies konnte jedoch aus verschiedenen Gründen nicht aufrecht erhalten werden. Die Experimente basierten meist auf einer Beladung gereinigter G-Proteine mit radioaktivem GDP und der anschließenden Inkubation mit gereinigter NDPK und einem Phosphat-Donor. Anschließend wurde das eingesetzte, markierte GDP vom gebildeten GTP mittels Dünnschichtchromatographie getrennt. Diese Versuche ließen jedoch außer Acht, dass G-Proteine gebundenes GDP spontan freisetzen (Lutz *et al.*, 2001) und dieses als Substrat für die NDPK dienen kann. Eine weitere Fehlerquelle bestand darin, dass auch nach Abbruch der Versuchsininkubation eine nachträgliche Freisetzung des GDP aus dem G-Protein und dessen Phosphorylierung durch die NDPK möglich war (Randazzo *et al.*, 1992). Ein weiteres gewichtiges Argument gegen die direkte Phosphorylierung des GDPs betrifft die Struktur der beteiligten Proteine. Das katalytische Zentrum der NDPK befindet sich in einer tiefen Einstülpung des Proteins und ist somit nicht leicht zugänglich (Janin *et al.*, 2000), ebenso wie das im inaktiven, heterotrimeren G-Protein gebundene GDP. Dieses ist durch eine helikale Proteindomäne der α -Untereinheit und durch das gebundene $\beta\gamma$ -Dimer abgeschirmt (Sprang 1997).

Der wahrscheinlichste Mechanismus basiert auf der Phosphorylierung eines Phosphatübermittlers durch die NDPK. In diesem Zusammenhang wird die β -Untereinheit der G-Proteine diskutiert. Diese ist in der Lage ebenfalls Transphosphorylierungen auszuführen und dadurch Effektoren der G-Proteine zu regulieren (Wieland *et al.*, 1991; 1992; 1993, Klinker und Seifert, 1999). Bislang konnte jedoch *in vivo* noch kein eindeutiger Beweis für diese Hypothese erbracht werden.

2. Voraussetzung und Ziele

Die vorliegende Arbeit basierte auf Untersuchungen (Niroomand *et al.*, 1997) zur Regulation der kardialen Adenylyl Cyclase Aktivität durch Guanin-Nukleotide. Steigende GDP-Konzentrationen bewirkten eine Zunahme der Adenylyl Cyclase Aktivität, die in ihrer Höhe vergleichbar war mit der Stimulation durch einen β -adrenergen Rezeptor Agonisten und GTP. Der Verlauf der GDP-Stimulation ließ sich jedoch in zwei Phasen unterteilen, wobei die zweite Phase durch den kompetitiven NDPK-Hemmstoff UDP fast vollständig unterdrückt wurde. Der erste Anstieg resultierte aus der Inaktivierung von inhibitorischen G-Proteinen und wurde deshalb durch UDP nicht beeinflusst.

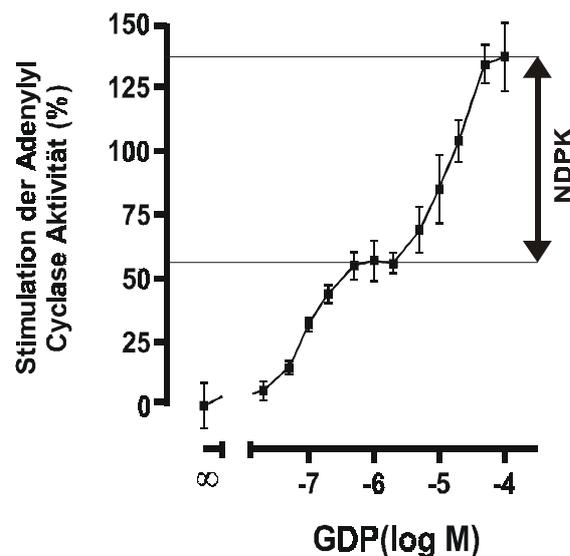


Abbildung 6: GDP-abhängige Stimulation der Adenylyl Cyclase

(Niroomand *et al.*, 1997)

Daraus wurde geschlossen, dass die zweite Phase der GDP-abhängigen Adenylyl Cyclase Stimulation auf einer Transphosphorylierung von GDP zu GTP durch die NDPK beruhte. Darüber hinaus hatten niedrige GDP-Konzentrationen und zusätzliches GTP nicht den selben Effekt und der Einfluss von GDP wurde durch einen β -adrenergen Rezeptor Agonisten nicht verändert.

Basierend auf diesen Ergebnissen lag dieser Arbeit die Hypothese zu Grunde, dass im Herzen zwei verschiedene Mechanismen der Aktivierung von heterotrimeren G-Proteinen existieren. Erstens, ein durch Liganden-Bindung aktivierter Rezeptor bewirkt den Austausch von GDP mit GTP an der α -Untereinheit des G-Proteins. Diese dissoziiert und reguliert ihren Effektor, in diesem Fall die Adenylyl Cyclase. Und zweitens, die Sarkolemm-gebundene NDPK aktiviert, durch Phosphorylierung von GDP zu GTP, G-Proteine unabhängig von einem Rezeptor und reguliert dadurch die Adenylyl Cyclase Aktivität.

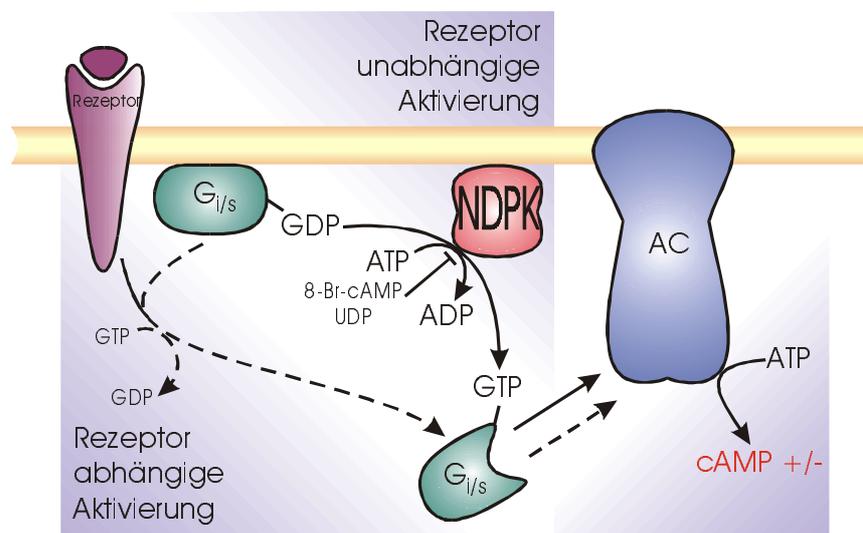


Abbildung 7: Aktivierung heterotrimerer G-Proteine durch die NDPK

(Lutz *et al.*, 2001a)

G_{i/s} = α -Untereinheiten der inhibitorischen (i) und stimulatorischen (s) G-Proteine

Das Ziel dieser Arbeit war es die NDPK-abhängige Aktivierung von G-Proteinen und deren Effektoren im Herzen nachzuweisen und ihre Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz zu untersuchen

3. Material und Methoden

3.1 Material für proteinbiochemische Methoden

Feinchemikalien:

Die verwendeten Feinchemikalien (Nukleotide etc.) wurden von den Firmen Roche/Boehringer Mannheim, Sigma und Biolog bezogen.

Radiochemikalien:

[α-³²P]-ATP:	3000Ci/mmol, 111TBq/mmol (NEN)
[α-³²P]-dCTP:	3000Ci/mmol, 111TBq/mmol (NEN)
[8-³H]-GDP:	11.3Ci/mmol, 418GBq/mmol (Amersham Pharmacia)
[¹²⁵I]-Cyanopindolol:	2200Ci/mmol, 81.4TBq/mmol (NEN)

Chemikalien:

Die verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Roth, Merck, Sigma, Calbiochem, Serva und ICN bezogen.

Sonstiges:

Nitrocellulose:	Protran Schleicher und Schuell
Sekundärantikörper:	Goat Anti-Maus IgG (H+L)-HRP Konjugat (Biorad) Goat Anti-Rabbit IgG1-HRP-Konjugat (Sigma)
Protein-Marker:	Broad Range, ungefärbt (Biorad)

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Präparation sarkolemmaler Membranen aus Herzmuskelgewebe (Jones, 1988)

Aus explantierten Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz wurde die freie Wand des linken und des rechten Ventrikels, sowie das Septum präpariert. In den Tierversuchen wurden drei komplette Ratten-Hezen für die Membranpräparation verwendet. Die Gewebestücke hatten ein Gewicht von 3-40g. Sie wurden während des Transports in eiskaltem PufferI gelagert, anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Die anschließende Präparation der sarkolemmalen Membranen wurde mit vorgekühlten Puffern und Materialien bei 4°C durchgeführt. Sämtliche Zentrifugationen fanden in vorgekühlten Rotoren der Firma Beckman bei 4°C statt.

Zuerst wurde das aufgetaute Herzmuskelgewebe mit einer Schere fein zerkleinert, anschließend wurde es in 100ml PufferI dreimal 15sec mit einem Polytron mit 20000rpm homogenisiert. 5ml dieses Homogenats wurde abgenommen und über eine dreifach gelegte Gaze filtriert, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das restliche Homogenat wurde in einem JA10-Rotor mit 21500g für 30min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut in 100ml PufferI dreimal 15sec mit 20000rpm homogenisiert und danach wieder mit 21500g für 30min zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 150ml PufferII dreimal 15sec mit 20000rpm homogenisiert und abermals zentrifugiert. Nach der folgenden Homogenisierung mit 20000rpm für dreimal 30sec in 26ml PufferII wurde das Homogenat erneut abzentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend über eine dreifach gelegte Gaze filtriert und der letzte Homogenisierungsschritt wiederholt. Die filtrierten Überstände wurden in der Ultrazentrifuge in einem Festwinkelrotor (Beckman Ti60) mit 55000g für 40min pelletiert. Das Pellet wurde in 5ml H_2O mit einem Glas/Glas-Homogenisator mit 20 Stößen resuspendiert und anschließend mit 5ml PufferIII vermischt. Darüber wurde ein diskontinuierlicher Saccharose-Gradient, bestehend aus 7ml PufferIV und 7ml PufferV gelegt. Dieser Saccharose-Gradient wurde 70min mit 370000g in einem Festwinkelrotor zentrifugiert. Nach der Zentrifugation hatte sich eine weiße Schicht zwischen der oberen und der mittleren Saccharose-Phase gebildet. Diese wurde vorsichtig mit einer Pipette abgenommen und anschließend auf 30ml mit H_2O aufgefüllt. Abschließend wurden

die gereinigten sarkolemmalen Membranen mit 170000g für 30min pelletiert. Das Membranpellet wurde in einem variablen Volumen (0.5-2ml) PufferV mit einem Glas/Glas-Homogenisator resuspendiert. Die sarkolemmalen Membranen wurden aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Alle Proteinproben wurden bei -80°C gelagert.

3.2.2 Cytosol-Präparation

Die präparierten Homogenate wurden für 60min mit 100000g in einem Festwinkelrotor in der Ultrazentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der cytosolische Überstand wurde abgenommen und aliquotiert. Das Pellet wurde dreimal mit PufferI gewaschen und anschließend in PufferI mit einem Polytron resuspendiert. Diese partikuläre Fraktion wurde ebenfalls aliquotiert. Sämtliche Fraktionen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.3 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinkonzentrationen wurden nach dem Verfahren von Bradford mit einer 5-fach konzentrierten Gebrauchslösung der Firma Biorad bestimmt. Dazu wurden die Proteine zunächst mit 0.1M NaOH für 20min inkubiert. Dies gewährleistete eine bessere Solubilisierung von Membranproteinen und somit eine exakte Bestimmung der Proteinkonzentration. Für die Protein-Standardreihe wurden 0, 2, 4, 6 und 8 μg BSA (Fraktion V) in 1ml Gesamtvolumen in Halbmikro-Einmalküvetten oder 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 und 2 μg BSA in 250 μl Gesamtvolumen in einer Mikrotiterplatte verwendet. Alle Proben wurden in Triplikaten bei 595nm gemessen.

3.2.4 Western Blot (Towbin *et al.*, 1979)

7.5-20 μg Protein wurde in SDS-PAGE Probenpuffer 5min bei 95°C denaturiert. Der prozentuale Anteil der Acrylamid-Bisacrylamid-Lösung des Trenngels, bei der anschließenden diskontinuierlichen SDS-PAGE, variierte je nach Größe des nachzuweisenden Proteins von 8-15%. Die Gelelektrophorese wurde in einer Mini-Gelapparatur von Biorad nach Laemmli (1970) durchgeführt. Anschließend wurden die Proteine in einem Nassblotverfahren auf eine

Nitrocellulose-Membran transferiert. Die durchschnittliche Transferzeit betrug 1h mit konstant 100V. Nach dem Transfer wurde mit einer 0.2%-igen Ponceau S-Lösung eine Färbung aller Proteine durchgeführt. Überschüssiges Ponceau S wurde mit Wasser entfernt und anschließend wurde die gefärbte Membran mittels eines Biorad MultiImager dokumentiert. Danach wurde die Membran in TBST entfärbt und die freien Bindungsstellen der Membran mit 5% BSA in TBST blockiert. Die Blockierungsdauer variierte von 1h bis ON. Anschließend erfolgte ein Waschschriff für 5min mit TBST um ungebundenes BSA zu entfernen. Die folgende Inkubation der Membran mit den spezifischen Primärantikörpern wurde für die jeweiligen Antikörper optimiert und sind in Tabelle 1 dargestellt. Hiernach wurde die Membran dreimal 10min mit TBST gewaschen. Der entsprechende Sekundärantikörper wurde 1:10000 in TBST verdünnt und für 1h bei RT mit der Membran inkubiert. Danach wurde die Nitrocellulose-Membran abermals dreimal 10min in TBST gewaschen. Der Nachweis des Primär-Sekundärantikörperkomplexes erfolgte über die, an den Sekundärantikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase, mit einem Chemolumineszenz-Substrat. Die Signale wurden mit einem Biorad MultiImager aufgenommen und quantifiziert.

Variation des Western Blots:

Zur Darstellung der unterschiedlichen α -Untereinheiten der G_i -Proteine wurde ein denaturierendes Harnstoffgel (10% Acrylamid/Bisacrylamid, 9M Harnstoff) zur Auftrennung der Proteine verwendet. Alle weiteren Schritte entsprachen dem beschriebenen Vorgang.

Primärantikörper	Konz.	Inkubations-dauer	Inkubations-temperatur
Anti-NDPK polyklonal, Santa Cruz (C-20)	1 μ g/ml	1h	RT
Anti-nm23H1 polyklonal, I. Lascu Uni. Bordeaux	0.6 μ g/ml	1h	RT
Anti-nm23H2 polyklonal, I. Lascu Uni. Bordeaux	2 μ g/ml	1h	RT
Anti-DRnm23 polyklonal, I. Lascu Uni. Bordeaux	2 μ g/ml	1h	RT
Anti-G β 3 polyklonal, Santa Cruz (C-10)	1 μ g/ml	1h	RT
Anti-G α s polyklonal, NEN (RM/1)	1:4000	1h	RT
Anti-G β polyklonal, Santa Cruz (M-14)	1 μ g/ml	1h	RT
Anti-GRK2/3 monoklonal, Upstate	1 μ g/ml	ON	4°C

Tabelle 1: Verwendete Primärantikörper

3.2.5 Immunpräzipitation von GRK2 (β -ARK1)

400 μ g cytosolisches Protein wurde mit 20 μ g GRK2-Antikörper (Kaninchen polyklonal, Santa Cruz, C-15) oder 10 μ l Kaninchen Serum über Nacht bei 4°C in IP-Puffer (50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X100 und 1 μ M PMSF) schüttelnd inkubiert. Am nächsten Tag wurde 100 μ l einer 1:1 Suspension, der in IP-Puffer äquilibrierten ProteinG-Sepharose (Fast flow, Amersham Pharmacia) dazugegeben und für weitere 4h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde die Sepharose zweimal mit je 5ml IP-Puffer gewaschen und bei 95°C mit 30 μ l 1xSDS-Probenpuffer für 5min denaturiert. Die Proben wurden in einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und wie im Kapitel Western Blot beschrieben mit einem monoklonalen GRK2/3 Antikörper gefärbt.

3.2.6 Co-Immunpräzipitation der β -Untereinheit von G-Proteinen

Konfluente, mit G_s α -Virus infizierte C10-Zellklone (je ca.10⁶ Zellen) wurden auf Eis mit 10ml eiskaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1ml C-IP-Puffer (10mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1mM EGTA, 1 μ M PMSF und 0.1% Triton X100) abgeschabt und 20sec mit einem Polytron bei 20000rpm homogenisiert. Die Homogenate wurden für 15min mit 20000g in einer Mikrozentrifuge pelletiert. 200 μ g des Überstands wurde mit 5 μ l anti-G_s Antikörper (NEN) oder 5 μ l eines 1:10 verdünnten Kaninchen Serums für 2h bei 4°C schüttelnd inkubiert. Danach wurde 50 μ l einer 1:1 Suspension der ProteinG-Sepharose (Fast flow, Amersham Pharmacia) in C-IP-Puffer für weitere 4h dazugegeben und bei 4°C schüttelnd inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben bei 20000g für 1min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Sepharose-Pellet wurde dreimal mit 1ml C-IP-Puffer gewaschen und in 30 μ l 1xSDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proben wurde 5min bei 95°C denaturiert, in einem 8%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Die Immunfärbung der co-präzipitierten G β -Untereinheit erfolgte mit einem polyklonalen G β -Antikörper (Santa Cruz) wie im Kapitel Western Blot beschrieben.

3.2.7 Messung der Nukleosid Diphosphat Kinase (NDPK) Aktivität

Die Aktivität der Nukleosid Diphosphat Kinase wurde in einem radioaktiven Versuchsansatz gemessen. Die Grundlage dieser Messung ist die Phosphorylierung von [8-³H]-GDP zu [8-³H]-GTP unter Verbrauch von ATP. Die eingesetzte Proteinmenge variierte zwischen 0.3 und 3µg. Als Leerwert diente ein Reaktionsansatz ohne Protein. Der Assay wurde in einem Gesamtvolumen von 100µl in Triplikaten durchgeführt. Die Zusammensetzung des Reaktionsansatzes ist in Tabelle 2 dargestellt.

Substanz	Endkonzentration im Assay
TEA pH 7.5	50mM
cAMP	0.1mM
EDTA	1mM
DTT	1mM
ATP	0.1mM
MgCl ₂	3mM
GDP	0.1mM
[8- ³ H]-GDP	10 ⁶ cpm

Tabelle 2: Reaktionsansatz der NDPK-Aktivitätsmessung

Zusätzlich wurde 8-Br-cAMP als kompetitiver Inhibitor der NDPK-Aktivität verwendet.

Vor Reaktionsbeginn wurde das Protein bei 4°C mit 1µg Alamethicin/µg Protein für 20 min vorinkubiert. Alamethicin erhöht die Durchlässigkeit von Membranvesikeln und gewährleistet somit einen verbesserten Zugang der Substrate an die Innenseite der Membranen. Es hat jedoch keinen Einfluss auf die, an der Regulation der Adenylyl Cyclase beteiligten Faktoren.

Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe des beschriebenen Reaktionsansatzes gestartet. Die Inkubation erfolgte für 10min bei 37°C im Wasserbad. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 10µl 5%iger SDS-Lösung gestoppt. 10% des Reaktionsvolumens wurden auf eine Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen. Zur besseren Auftrennung der Guanin-Nukleotide im Reaktionsansatz wurden zusätzlich 2µl einer je 3mM GMP/GDP/GTP-Lösung aufgetragen. Die Auftrennung der Nukleotide konnte mittels UV-Licht überprüft werden. Anschließend wurden die einzelnen Nukleotid-Banden ausgeschnitten und in 6ml Scintillationsflüssigkeit in einem β -Counter gemessen.

Messung der Nukleosid Diphosphat Kinase (NDPK) Aktivität mit ATP γ S als Substrat

Für die Messung der NDPK Aktivität in den sarkolemmalen Membranen der Rattenherzen wurde 10µM ATP γ S und 1µM [8-³H]-GDP als Substrat verwendet, da diese Membranen eine sehr hohe Phosphatase-Aktivität zeigten. ATP γ S wird von der NDPK ca. 1000mal schlechter als ATP umgesetzt, es hat jedoch den Vorteil, dass es kein Substrat für Phosphatasen darstellt. Die Reaktion wurden nach der Inkubation bei 37°C mit 10µl 100mM EDTA gestoppt und das synthetisierte GTP γ S vom eingesetzten GDP mittels einer Dünnschichtchromatographie getrennt. Das Laufmittel war in diesem Fall 500mM KH₂PO₄ pH 3.3

3.2.8 Messung der Adenylyl Cyclase (AC) Aktivität

Die Aktivität der AC wurde in einem radioaktiven Versuchsansatz gemessen. Dieser basiert auf der Synthese von [³²P]-cAMP aus [α -³²P]-ATP durch die AC. Die eingesetzte Proteinmenge betrug 3µg hochgereinigter sarkolemmaler Membranproteine. Als Leerwert diente ein Reaktionsansatz ohne Protein. Das Reaktionsvolumen betrug 100µl. Die basale AC-Aktivität wurde in dem in Tabelle 3 dargestellten Reaktionsansatz gemessen. Die Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

Substanz	Endkonzentration im Assay
TEA pH 7.5	50mM
cAMP	0,1mM
EDTA	1mM
DTT	1mM
ATP	0.1-1mM
[α - ³² P]-ATP	0.3-1x10 ⁶ cpm
MgCl ₂	3-5mM

Tabelle 3: Reaktionsansatz der Adenylyl Cyclase-Aktivitätsmessung

Zusätzlich wurden verschiedene Varianten des Assays mit den in Tabelle 4 aufgelisteten Substanzen durchgeführt.

Substanzen	Konzentrationsbereich
8-Br-cAMP	4mM
GDP	10nM-100 μ M
GTP	100 μ M
GDP β S	1nM-10 μ M
MnCl ₂	10mM
Isoprenalin	1 μ M
Carbachol	10 μ M

Tabelle 4: Stimulatoren und Inhibitoren des cAMP-Signalsystems

Zu Beginn des Versuchs wurden die Membranproteine bei 4°C mit 1µg Alamethicin/µg Protein für 20 min vorinkubiert. In diesem Vorinkubationsansatz waren gegebenenfalls die in Tabelle 4 aufgeführten Substanzen enthalten. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe des beschriebenen Reaktionsansatzes gestartet. Die Inkubation erfolgte für 10min bei 37°C im Wasserbad. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von 450µl 120mM Zinkacetat und 450µl 120mM NaHCO₃ gestoppt. Dabei bildete das unverbrauchte ATP mit dem NaHCO₃ einen unlöslichen Komplex, der in einer anschließenden Zentrifugation bei 4°C mit 3000g pelletiert wurde. 850µl des Überstandes wurde auf Aluminiumoxid-Säulen mit einem Bettvolumen von 1ml aufgetragen. Diese waren zuvor mit 8ml 100mM Tris-HCl pH 7.5 äquilibriert worden. Das gebildete cAMP wurde mit 4ml 100mM Tris-HCl pH 7.5 eluiert. Bei Versuchen mit ATP-Konzentrationen von 0.5-1mM wurde eine Vorreinigung des Überstandes mittels einer Ionenaustauschersäule (Dowex) hinzugefügt.

Das eluierte [³²P]-cAMP wurde in einem β-Counter gemessen. Die Reinigungseffizienz des cAMPs betrug bei dieser Methode 75%. Dies ließ sich durch die Zugabe von [³H]-cAMP als Referenzsubstanz im Assay nachweisen.

3.2.9 Messung der 5'-Nukleotidase Aktivität

Die Aktivitätsbestimmung der membranständigen 5'-Nukleotidase wurde nach einer von Emmelot *et al.* (1964) beschriebenen Methode durchgeführt. Bei dieser Methode wird die Menge an Phosphat gemessen, welches durch die 5'-Nukleotidase von dem Substrat AMP abgespalten wird. Die Reaktion wird in einem KCl-haltigem Puffer durchgeführt, um die Aktivität anderer Phosphatasen zu unterbinden. Dazu wurde 5µg Membranprotein in 50mM Tris pH 7.2 mit 0.1µg Alamethicin/µg Protein für 20min auf Eis in 200µl vorinkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 20µl Reaktionspuffer (Final: 50mM Tris pH 7.2, 100mM KCl, 5mM MgCl₂, 10mM AMP) gestartet und 20min im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde mit 50µl 25%iger TCA-Lösung gestoppt. Für den Farbnachweis des abgespaltenen Phosphats wurde zu den Proben 250µl 5%ige SDS-Lösung, 250µl einer Lösung von 1mg/ml 2.4-Diaminophenol-dihydrochlorid in 1%igem Natriumsulfit und 250µl einer 1.22%igen Ammoniummolybdat-Lösung in 1M Schwefelsäure dazugegeben. Nach einer Inkubation von 20min bei Raumtemperatur, wurden die Proben in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 660nm gemessen. Als Standard diente eine Phosphateichgerade mit

Kaliumdihydrogenphosphat. Alternativ zu dieser Methode wurde ein Diagnose-System der Firma Sigma verwendet. Dieses Messsystem basiert auf einer dreistufigen Reaktion: AMP wird zuerst durch die 5'-Nukleotidase in Adenosin und freies Phosphat umgesetzt. Das entstandene Adenosin wird in der folgenden Reaktion durch die Adenosindesaminase in Inosin und Ammoniak zersetzt. Die dritte Reaktion basiert auf einer Umsetzung von Ammoniak, 2-Oxoglutarat und NADH in L-Glutamat und NAD. Diese Reaktion wird von der L-Glutamatdehydrogenase katalysiert. Bei dieser von Arkesteijn (1976) beschriebenen Methode wird in einem Spektralphotometer die Oxidation von NADH zu NAD bei 340nm gemessen.

Dazu wurde 3µg Membranprotein in 50mM Tris pH 7.2 mit 0.1µg Alamethicin/µg Protein für 20min auf Eis in 10µl vorinkubiert. Anschließend wurde 100µl der Reaktionslösung (3.2mM AMP, 0.2mM NADH, 3.7mM 2-Oxoglutarat, 11U/ml L-Glutamatdehydrogenase, 0.4U/ml Adenosindesaminase) dazugegeben und bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Nach einer Vorlaufzeit von 5min wurden die Proben nach 15 und 30min gemessen.

3.2.10 Bindungsstudien von β -adrenergen Rezeptoren

3µg Membranprotein wurde in einem Bindungs-Puffer (75mM Tris/HCl pH 7.4, 12mM MgCl₂, 2mM EDTA) mit 0.1µg Alamethicin/µg Protein für 20min auf Eis vorinkubiert. Das Gesamtvolumen betrug 50µl. Danach fand die Bindung des Liganden [¹²⁵I]-Cyanopindolol (300pM) an die β -adrenergen Rezeptoren in einem Gesamtvolumen von 200µl für 60min bei 37°C statt. Zur Messung der unspezifischen Bindung wurden Kontrollproben mit 10µM Propranolol, einem unselektivem β -Blocker, vorbehandelt. Anschließend wurden die Proben über einen Glasfaserfilter (Millipore) abgesaugt und dreimal mit eiskaltem Bindungspuffer gewaschen. Die getrockneten Filter wurden ausgestanzt und in einem γ -Counter gemessen.

3.3 Puffer für proteinbiochemische Methoden

Präparation sarkolemmaler Membranen

PufferI:	10 mM	HEPES pH 7.5
	750 mM	NaCl
	2 mM	NaN ₃
PufferII:	10 mM	HEPES pH 7.5
	10 mM	NaHCO ₃
	2 mM	NaN ₃
PufferIII:	100 mM	Tris/HCl pH 7.5
	50 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
	300 mM	NaCl
	2 M	Saccharose
PufferIV:	100 mM	Tris/HCl pH 7.5
	50 mM	Na ₄ P ₂ O ₇
	300 mM	NaCl
	600 mM	Saccharose
PufferV:	10 mM	HEPES pH 7.5
	250 mM	Saccharose

SDS-PAGE und Western Blot

4x SDS-PAGE Probenpuffer:	0.2 M	Tris/HCl pH 6.8
	8 % (w/v)	SDS
	0.4 % (w/v)	Bromphenolblau
	40 % (v/v)	Glycerin
	0.1 M	DTT (frisch zugegeben)

5x SDS-PAGE

Elektrophorese-Puffer:	0.125 M	Tris
	1.25 M	Glycin
	0.5 %	SDS (v/v)
Western Blot-Puffer (10x):	38.6 mM	Glycin
	0.479 M	Tris
	0.037 %	SDS (v/v)
Western Blot-Puffer (1x):	500 ml	10x Puffer
	1 L	Methanol
		ad 5L
Ponceau S-Färbelösung:	0.2 % (w/v)	Ponceau S
	3 % (v/v)	Trichloressigsäure
		in H ₂ O
Abschmelzpuffer		
für Western Blot:	2 % (w/v)	SDS
	0.1 M	β-Mercaptoethanol
	62.5 mM	Tris/HCl pH 6.8
10xTBS:	100 mM	Tris/HCl pH 7.4
	1.5 M	NaCl
TBST-Puffer:	10 mM	Tris/HCl pH 7.4
	0.15 M	NaCl
	0.1 % (v/v)	Tween-20

3.4 Material für molekularbiologische Methoden

Plasmide

2. pBluescript-nm23H2 (Kimura N)
3. pAdTrack-CMV (He *et al.*, 1998)
4. pAdEasy-1 (He *et al.*, 1998)
5. pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen)

Enzyme

- Restriktionsenzyme:** New England Biolabs und GIBCO/Life Technologies
- T4-Ligase:** MBI
- Taq-Polymerase:** Roche/Boehringer Mannheim
- Reverse Transkriptase:** Roche/Boehringer Mannheim
- DNaseI:** Roche/Boehringer Mannheim
- Proteinase K:** Roche/Boehringer Mannheim

Genspezifische Primer

Die aufgelisteten Primer sind in 5' → 3'-Orientierung dargestellt und wurden von der Firma MWG-Biotech synthetisiert.

- Nm23H2for-Ad: CCGCTCGAGAATCCCTTCTGCTCTCCCA
- Nm23H2rev-Ad: TTATCTAGACTGTTGTGTCCACCTCTTA
- DR-nm23for-com: CATGATCTGTCTGGTGCTGACCATC
- DR-nm23rev -rat: AAATAGAGGGTGGGATGTGG

DNA-Größenmarker

1. 100bp-Leiter (MBI Fermentas)
2. Leitermix (MBI Fermentas)

Bakterien (*E. coli*)

XL1blue: *recA1 endA1 gyrA96thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F`proAB lac^zΔM15Tn10 (Tet^r)]^c*

XL2blue: *MRF^c: Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi recA1 gyrA96 relA1 lac[F`proAB lac^zΔM15 Tn10(Tet^r) Amy Cam^r]^f*

TOP10: *FmcrA Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD 139(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^r) endA1 nupG*

BJ5183: *endA sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str^r)*

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 RNA-TRIZOL™-Aufreinigung

Die Aufreinigung von Total-RNA aus Geweben erfolgte durch das TRIZOL™-Reagenz von GIBCO/Life Technologies. Dazu wurden zu 50-100mg Gewebe 1ml TRIZOL-Reagenz dazugegeben und mit einem Polytron mit 20000rpm homogenisiert. Der Ansatz wurde 5min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 0.2ml Chloroform pro 1ml TRIZOL versetzt. Nach gutem Durchmischen und einer Inkubation für 2-3min bei Raumtemperatur, wurde der ganze Ansatz bei 4°C mit 12000g für 15min zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen und mit 0.5ml Isopropanol pro 1ml TRIZOL vermischt. Nach einer Inkubation bei Raumtemperatur für 10min wurde die Lösung bei 4°C und 12000g für 10min zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70% EtOH gewaschen und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur in 10-50µl DEPC-H₂O gelöst.

3.5.2 Northern Blot

Die Lösungen für die RNA-Gelelektrophorese wurden mit 0.1% DEPC (Endkonzentration) behandelt. Durch kovalente Bindung von DEPC an RNasen werden diese inaktiviert (Fedorcak *et al.*, 1969). Dazu wird DEPC in Lösung gebracht und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Durch anschließendes Autoklavieren wurde das DEPC inaktiviert.

Die aus Gewebe gewonnene RNA wurde nach Einkonzentrierung in einer Speed-Vac in 20µl RNA-Probenpuffer resuspendiert und 10min bei 68°C denaturiert. Anschließend wurde 5µl 5x RNA-Auftragspuffer dazugegeben. Die RNA-Proben wurden in einem denaturierenden Agarosegel (1% w/v Agarose in 1x MOPS-Puffer mit 3.5% Formaldehyd) mit 80-100V in 1x MOPS-Puffer aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zweimal 20min in H₂O gewaschen und danach zweimal 20min in 20x SSC inkubiert.

Anschließend wurde die Übertragung der RNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran mittels kapillarem Transfer (Southern, 1975) in einem Hochsalzpuffer (Khandjian, 1987) durchgeführt. Der Transfer erfolgte in folgendem Aufbau:

1x Whatman3MM in 20x SSC-Reservoir

1x Agarosegel

1x Nylonmembran (Hybond-XL) für 5min in 10x SSC
äquilibriert

9x Whatman3MM

ca. 10cm Papiertücher

1x Glasplatte

ca. 800g Gewicht

Die Transferzeit betrug ca. 20h. Nach dem Transfer wurde die RNA in einem UV-Crosslinker kovalent an die Nylon-Membran gebunden.

3.5.3 Radioaktive Hybridisierung

Für die radioaktive Hybridisierung wurde 50ng einer doppelsträngigen DNA-Sonde 5min bei 95°C denaturiert und sofort auf Eis gestellt um eine Renaturierung zu verhindern. Die denaturierte Sonde wurde mit 5µl [α -³²P]-dCTP und einem Ansatz Ready-Prime (Amersham Pharmacia) für 60min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das nicht eingebaute [α -³²P]-dCTP über eine Sephadex G50-Säule (Roche) von der markierten DNA abgetrennt. Die radioaktiv markierte DNA wurde abschließend 5min bei 95°C denaturiert und in 5ml 68°C warmen Express-Hybridisierungsmix von Clontech gegeben. Zuvor wurde der Northern Blot 1h bei 68°C in 5ml Express-Hybridisierungsmix in einer Hybridisierungsflasche prähybridisiert. Die

anschließende Hybridisierung des Blots erfolgte für 1h bei 68°C. Danach wurden die Membranen unter mehrfachem Wechseln der Waschlösung¹ für 30min bei Raumtemperatur gewaschen und für weitere 30 min bei 50°C in Waschlösung². Nach dem Einschweißen der Membranen in Schlauchfolie erfolgte eine Exposition mit 10fach verstärkenden Hyperscreens von 1-14 Tagen auf Kodak XA-R Filme bei -80°C.

3.5.4 RT-PCR

Die Herstellung der DR-nm23-Sonde erfolgte mittels RT-PCR aus total RNA von humanem, adultem Herzmuskelgewebe. Die RNA wird dabei mit dem Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben und anschließend DR-nm23 mittels PCR amplifiziert (Sambrook *et al.*, 1989).

Menge	Reagenz	Volumen
10x	RT-PCR-Puffer (Roche)	2µl
10mM	je dNTP	2µl
25mM	MgCl ₂	4µl
2µg/µl	Random Hexamere	2µl
50U/µl	RNase-Inhibitor	1µl
0.5mg/ml	Gelatine	0.4µl
1U/µl	AMV-Reverse Transkriptase (Roche)	0.8µl
2µg	Total-RNA	xµl
xµl	H ₂ O	ad 20µl

Tabelle 5: RT-PCR Ansatz

Zeit	Temperatur
10min	25°C
60min	42°C
5min	99°C

Tabelle 6: RT-PCR Programm

2µl der cDNA-Reaktion wurden für die darauffolgende PCR eingesetzt.

3.5.5 PCR mit Taq-Polymerase

Zur Synthese von DNA-Sonden und zur gerichteten Klonierung wurde die PCR-Technik (Mullis *et al.*, 1986) mit der thermostabilen Taq-Polymerase aus *Thermus aquaticus* (Saiki *et al.*, 1988) angewendet.

Menge	Reagenz	Volumen
10x	PCR-Puffer (Roche)	10µl
10mM	je dNTP	2µl
10pmol/µl	Primer A	4µl
10pmol/µl	Primer B	4µl
5U/µl	Taq DNA-Polymerase (Roche)	0.5µl
10-500ng	Template-DNA	xµl
xµl	H ₂ O	ad 100µl

Tabelle 7: PCR Ansatz

Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
4min	95°C	1x
30sec	95°C	35 x
30sec	55°C	
1min	72°C	
7min	72°C	1x
∞	4°C	-

Tabelle 8: PCR Programm

ie Möglichkeit einer Fehlpaarung der Primer mit der Template-DNA wurde durch Ansetzen der Reaktion auf Eis reduziert. Der gesamte Reaktionsansatz wurde daraufhin in die auf Denaturierungstemperatur vorgeheizte PCR-Maschine gestellt („vereinfachter Heißstart“).

Die PCR-Produkte wurden anschließend nach Protokoll in den pCR2.1TOPO-Vektor (TopoTA Cloning Version K, Invitrogen) kloniert oder einem Restriktionsverdau unterzogen.

3.5.6 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNA wurde zur Analyse in 20-30µl und zur Präparation in 50-200µl Ansätzen durchgeführt. In der Regel wurden dabei 1µg DNA mit 1-10U Enzym 1-4h bei 37°C in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer inkubiert

3.5.7 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Visualisierung, Auftrennung und Präparation von Nukleinsäuren wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet (McDonnell *et al.*, 1977; Southern, 1979).

0.5-1.0% (w/v) Agarose (35kb-500bp DNA-Fragmente) wurden in 1xTAE aufgekocht und anschließend mit 0.5µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Zur DNA wurde 5x DNA-Ladepuffer

dazugegeben und die Elektrophorese mit einer Spannung von 80-130V in 1xTAE durchgeführt.

3.5.8 DNA-Fragmentisolierung

PCR-Produkte und Restriktionsfragmente wurden in einem Agarosegel aufgetrennt und anschließend ausgeschnitten. Die weitere Reinigung mit dem QiaEx II Gel Extraction Kit erfolgte nach dem vorgegebenen Protokoll.

3.5.9 Ligation

Die kovalente Verbindung zweier kohesiver (überlappender) oder zweier Blunt-End (glatter) DNA-Stücke wurde in einem Verhältnis von 0.1pM (Vektor) zu 0.3pM (Insert) DNA durchgeführt.

Ansatz:	x	µl	Vektor
	x	µl	Insert
	2	µl	T4 DNA-Ligase-Puffer
	1	µl	T4-Ligase (400U)
	x	µl	H ₂ O ad 20µl

Der Reaktionsansatz wurde ON bei 16°C (kohesiv) oder RT (Blunt-End) inkubiert.

3.5.10 Elektroporation

Eine exponentiell wachsende Bakterienkultur wurde nach 30minütiger Inkubation auf Eis 15min bei 4000g abzentrifugiert und anschließend zweimal mit dem halben Volumen 10%igem, eiskaltem Glycerin gewaschen. Das Pellet wurde in 0.2% des Ausgangsvolumens mit eiskaltem 10%-igem Glycerin resuspendiert.

Zu 50µl der Bakterien wurden 10-100ng DNA zugegeben und vorsichtig gemischt. Die DNA wurde durch einen Puls von 1.8kV in die Bakterien eingebracht. Nach Zugabe von 200µl SOC-Medium wurden die Bakterien 20min bei 37°C geschüttelt. Von diesem Ansatz wurden 100µl auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen und ON bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.5.11 Klonierung rekombinanter Adenoviren

Die Klonierung rekombinanter Adenoviren erfolgte nach einem Protokoll von He *et al.* (1998). Dazu wurde zunächst eine PCR mit den genspezifischen Primern Nm23H2for-Ad und Nm23H2rev-Ad und dem Plasmid pBluescript-nm23H2 (Kimura, N) durchgeführt. Diese Primer trugen zusätzlich zu ihrer nm23-spezifischen Sequenz 10 Basen lange Adaptoren mit XhoI, bzw. XbaI Restriktionsschnittstellen zur gerichteten Klonierung in den Vektor pAdTrack-CMV. Die klonierten Vektoren wurden anschließend mit PmeI linearisiert und 1µg davon mit 1µg supergecoilttem pAdEasy-1 Vektor in eine exponentiell wachsende BJ5183 Kultur co-transformiert. Die Selektion erfolgte auf einer Kanamycin-LB-Platte. Die kleinsten Kolonien wurden gepickt und ihre Plasmid-DNA auf die Rekombination mittels Restriktionsverdau untersucht. Das vervielfältigte, rekombinierte Gesamtplasmid wurde abschließend mit PacI verdaut, um die für die Virusgenerierung notwendigen LITR und RITR-Sequenzen freizulegen.

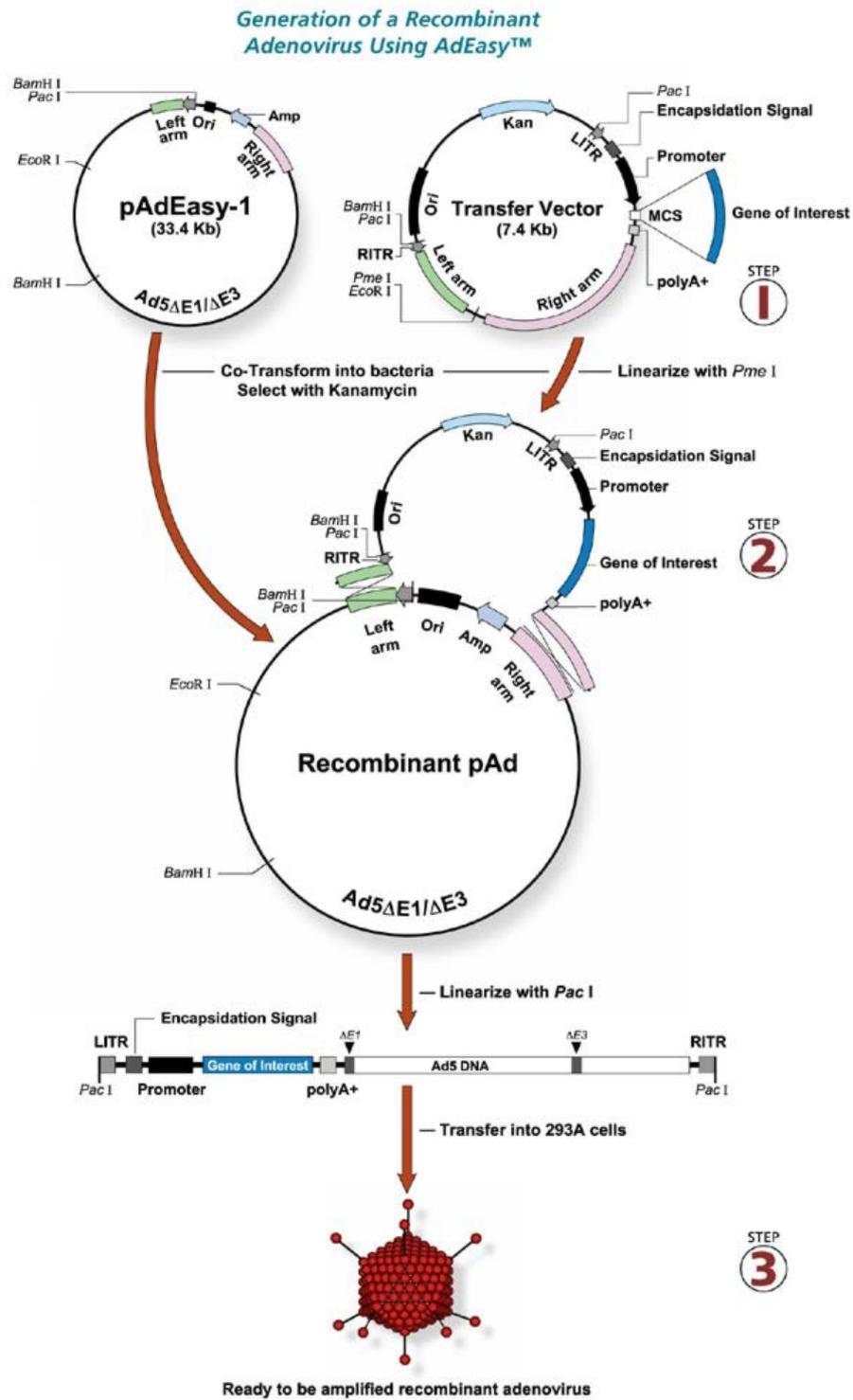


Abbildung 8: Klonierung rekombinanter Adenoviren

(He *et al.*, 1998)

3.6 Puffer für molekularbiologische Methoden

10x MOPS (RNA-Laufpuffer):	0.4 M	MOPS pH 7.0
	0.01 mM	EDTA
	0.1 mM	NaAcetat
RNA-Probenpuffer:	0.5 x	MOPS
	50 % (v/v)	Formamid (deionisiert)
	6.8 % (v/v)	Formaldehyd
	0.1 µg/µl	Ethidiumbromid
5x RNA-Auftragspuffer:	0.4 % (w/v)	Bromphenolblau
	50 % (v/v)	Glycerin
	0.1 M	NaH ₂ PO ₄ pH 7.0
20x SSC:	3 M	NaCl
	0.3 M	Natriumcitrat
Waschlösung1 für		
Express-Hybridisierung:	2 x	SSC
	0.05 % (w/v)	SDS
Waschlösung2 für		
Express-Hybridisierung:	0.1 x	SSC
	0.1 % (w/v)	SDS
50x TAE:	2 M	Tris
	5.7 % (v/v)	Essigsäure
	0.05 M	EDTA pH 8

Nährmedien für Bakterien

LB-Medium:	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
		ad 1L
SOC-Medium:	2 %	Trypton
	0.5 %	Hefeextrakt
	10 mM	NaCl
	2.5 mM	KCl
	10 mM	MgCl ₂
	10 mM	MgSO ₄
	20 mM	Glukose
LB-Platten:	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	5 g	NaCl
	14 g	Agar oder Agarose
		ad 1L
Additive:	100 µg/ml	Ampicillin
	50 µg/ml	Kanamycin-Sulfat

3.7 Materialien für zellbiologische Methoden

Medien und Zusätze:

DMEM:	GIBCO/Life Technologies (21969-035)
	Mit Natrium-Pyruvat und Pyridoxin
Fötale Kälberserum:	GIBCO/Life Technologies

Penicillin/ Streptomycin:	GIBCO/Life Technologies (15140-122) 10000u/ml Penicillin, 10mg/ml Streptomycin
L-Glutamin	GIBCO/Life Technologies (25030-024) 100x, 200mM
Accutase	PAA L11-007
Kollagen	Upstate biotechnology Rat tail, type1
Einfriermedium-DMSO	GIBCO/Life Technologies (11101-011)
1xPBS	GIBCO/Life Technologies (14040-091) ohne Natrium-Hydrogencarbonat

Kulturschalen und Zubehör:

Zellkulturschalen:	Becton+Dickinson (Falcon), Nunc
Serologische Pipetten:	Becton+Dickinson (Falcon), Greiner

3.8 Zellbiologische Methoden

3.8.1 Generierung rekombinanter Adenoviren

Transfektion

Die klonierten, rekombinierten und PacI-verdauten Virus-Plasmide wurden in HEK 293-Zellen mit Lipofectamin 2000 (GIBCO/ Life Technologies) transfiziert. Dazu wurden für 80-90% konfluente, 6cm Schalen 4µg Plasmid mit 300µl OPTI-MEM I Medium verdünnt. Anschließend wurde 20µl Transfektionsreagenz zu 280µl OPTI-MEM I Medium gegeben und für 5min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Bildung des Transfektions-DNA-Komplexes wurde die verdünnte DNA mit dem verdünnten Lipofectamin 20min bei Raumtemperatur inkubiert. In dieser Zeit wurden die Zellen mit 3ml DMEM Komplettmedium ohne Antibiotika gespült. Der DNA-Lipofectaminkomplex wurde direkt nach der Inkubation in das

Zellmedium gegeben. In den folgenden 10 Tagen wurde die Virusgenerierung anhand der zunehmenden Grünfluoreszenz durch das exprimierte GFP und der Lyse der Zellen beobachtet.

Vervielfältigung rekombinanter Adenoviren

Nach der vollständigen Infektion der transfizierten HEK-Zellen, wurden die Zellen und das Medium dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und wieder aufgetaut. Dies diente zur Lyse der HEK-Zellen. Anschließend wurden die Zelltrümmer mit 3000g für 5min pelletiert. Der Überstand wurde auf eine konfluente, mit Serum-freiem Medium gespülte 10cm Schale mit HEK-Zellen gegeben und 20min bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Medium auf 10ml mit Serum-reduziertem Medium ergänzt. Die vollständige Infektion der HEK-Zellen war nach 2-3 Tagen abgeschlossen. Die Zellen wurden wieder geerntet und durch dreimaliges Einfrieren vollständig aufgebrochen. Die Zelltrümmer wurden, wie schon beschrieben, durch Zentrifugation pelletiert. Im letzten Schritt der Virus-Vervielfältigung wurden 10 konfluente 15cm Schalen mit 1ml Virus-Überstand und 6ml Serum-freiem Medium für 20min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 13ml Serum-reduziertes Medium dazugegeben. Die fortschreitende Infektion der Zellen wurde beobachtet und meist nach 48h durch Abspülen der noch intakten Zellen abgebrochen. Die Zellen wurden abermals pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in einem Restvolumen von ca.15ml mit flüssigem Stickstoff eingefroren und für die spätere Aufreinigung bei -80°C gelagert.

Präparation rekombinanter Adenoviren

Die pelletierten Zellen wurde zu Beginn der Aufreinigung dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei 37°C wieder aufgetaut. Anschließend wurde mit einer Endkonzentration von 6µg/ml DNaseI und 30mM MgCl₂ dazugegeben. Die freigesetzte genomische DNA der HEK-Zellen wurde so für 30min bei 37°C verdaut. Eine Zentrifugation für 10min bei 4°C mit 3000g ermöglichte die Abtrennung der Zelltrümmer vom Virus-Überstand. Dieser Überstand wurde im folgenden dreimal mit gleichem Volumen 1.1.2-Trichlorflourethan (Merck) für 2min schüttelnd inkubiert, anschließend 5min mit 1800g bei 4°C zentrifugiert und die obere wässrige, Virus-beinhaltende Phase abgenommen. Dies diente zur Entfernung von Lipiden aus der Viruspräparation. Danach wurde ein diskontinuierlicher Cäsiumchlorid-Gradient

gebildet. Dieser bestand aus 4ml Heavy Stock, 4ml Light Stock und darüber 5ml Virus-Überstand. Diese Gradienten wurden in einem SW40-Rotor in einer Beckman Ultrazentrifuge über Nacht bei 4°C mit 27000rpm zentrifugiert. Am nächsten Tag wurde die „Virus-Bande“ die sich zwischen der schweren und der leichten Cäsiumchlorid-Schicht gebildet hatte mit einer 1ml Spritze abgenommen. In den folgenden zwei Tagen wurde dieser Virus dreimal gegen das 500-1000fache Volumen 1xPBS bei 4°C dialysiert. Abschließend wurde der Virus gegen das 500-1000fache in 1xVSB Puffer für 3h dialysiert. Der gereinigte Virus wurde mit dem gleichen Volumen 1xVSB + 90% Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

Titerbestimmung der Virus-Präparationen

Zur Titerbestimmung der Virus-Präparation wurde ein Aliquot des Virus-Dialysats entnommen (100-400µl) und auf 600µl mit TNE-Puffer ergänzt. Dazu wurden 60µl 10%iges SDS für 30min und anschließend 66µl 2.5M β -Mercaptoethanol für weitere 30min dazu gegeben. Für den Verdau der Virushülle wurden 38.5µl ProteinaseK (10mg/ml) für 60min mit den Viren inkubiert. Sämtliche Inkubationen wurden bei 37°C durchgeführt. Anschließend wurde die Virus-DNA mittels einer Phenol/Chloroform Extraktion von den Proteinen abgetrennt und in einer Alkohol-Fällung konzentriert. Die gereinigte Virus-DNA wurde in einem Spektralphotometer bei 260nm vermessen. Ein Aliquot dieser aufgereinigten DNA wurde in einem 0.5%igen Agarosegel mittels eines DNA-Standards quantifiziert. Anhand dieser DNA-Menge ließ sich die Virus-Konzentration (bav = biologisch aktive Viren) der Präparation berechnen.

3.8.2 Transduktion von Zellen mit rekombinanten Adenoviren

Die zu transduzierenden Zellen (parentale C10-Zellen oder α nm23H2-Klone) wurden zunächst mit Serum-freiem Medium gespült, anschließend in einem Drittel des Gesamtvolumens mit unterschiedlichen Virusdosen in Serum-freiem Medium für 20min bei 33°C inkubiert. Danach wurde das restliche Volumen mit Serum-reduziertem Medium ergänzt. Die Gesamtinkubationszeit der Zellen mit Virus betrug 48h. Die verwendeten Virusdosen betragen 10-200 Viren/Zelle (MOI 10-200).

3.8.3 cAMP-EIA

Die quantitativen cAMP Bestimmungen stimulierter und transduzierter Zellen wurden mit einem Immunassay der Firma R&D durchgeführt. Dazu wurden die Zellen zuerst für 4-12h in Serum-freiem oder Serum-reduziertem Medium kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für 30min mit 1mM IBMX in HEPES-Medium inkubiert um eine Akkumulation des cAMPs zu gewährleisten. Nach 30min wurde das Medium abgesaugt und durch eiskaltes 0.1M HCl ersetzt. Die Zellkulturschalen wurden bei -20°C eingefroren. Dies verbesserte den Zellaufschluss. Danach wurden die Zellen von den Platten geschabt und für 30min bei 4°C mit 20000g pelletiert. Die Überstände wurden in den cAMP-EIA eingesetzt der je nach erwarteter cAMP-Konzentration acetyliert oder nicht-acetyliert durchgeführt wurde. Das Acetylieren erhöhte die Sensitivität des Assays um das 10fache. Die eigentliche Prozedur wurde strikt nach Protokoll durchgeführt. Die pelletierten Zelltrümmer wurden mit 0.1M NaOH neutralisiert und für eine Protein-Bestimmung verwendet.

3.9 Medien und Puffer für zellbiologische Methoden

Medien

HEK-293-Medium:

DMEM
0-10% FCS
1:100 L-Glutamin
1:100 Penicillin/Streptomycin

C10-Zellklone:

DMEM
0-10% FCS
1:100 L-Glutamin
1:100 Penicillin/Streptomycin
Selektion mit $2\mu\text{g/ml}$ Puromycin

Puffer

10x VSB	100	mM	Tris/HCl pH 7.4
	1.37	M	NaCl
	50	mM	KCl
	10	mM	MgCl ₂
1x VSB + 90% Glycerin	10ml		10xVSB
	90ml		Glycerin (100%)
Cäsiumchlorid Heavy Stock	211g		CsCl ₂ ad 500g mit 1xVSB
Cäsiumchlorid Light Stock	112g		CsCl ₂ ad 500g mit 1xVSB
TNE-Puffer	10	mM	Tris/HCl pH 7.4
	100	mM	NaCl
	0.1	mM	EDTA

3.10 Tierversuche

Miniosmotische Pumpen:	Alzet Modell 2001
	Pumpgeschwindigkeit: 1µl/h
	Füllvolumen: 222µl
	Laufzeit: 7 Tage

Implantation der osmotischen Mini-Pumpen in Ratten

Männliche Wistar Ratten (190-220g) wurden durch intraperitoneale Injektion von Chloralhydrat und Ketaminen anesthesiert. Die osmotischen Mini-Pumpen wurden mit physiologischer Salzlösung, Isoproterenol in Vitamin C, Propranolol, Isoproterenol und Propranolol oder T3 gefüllt und subkutan implantiert. Die tägliche Dosis betrug 2.4mg/kg Isoproterenol, 10mg/kg Propranolol oder 0.5 mg/kg T3 (3,3',5-Triiodo-L-Thyronin). Nach sieben Tagen wurden neue Pumpen implantiert. Nach den angegebenen Zeiten (2-14 Tage)

wurden die Tiere mit Pentobarbital anesthesiert und die Herzen entnommen, gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4. Ergebnisse

4.1 Erhöhung der NDPK in sarkolemmalen Membranen aus Herzen mit terminaler Herzinsuffizienz

Diese Arbeit hatte zum Ziel die Rolle der Membran-gebundenen NDPK in der G-Protein vermittelten Signaltransduktion des Herzens zu charakterisieren. Dazu wurden sarkolemmale Membranen aus 13 explantierten Herzen von Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz (HI-Membranen) präpariert und diese mit Membranen von 5 humanen Kontrollherzen (K-Membranen) verglichen. Die wesentlichen Daten der Patienten sind in Tabelle 9 aufgeführt. Die gesunden Kontrollherzen stammten von Organspendern, für die kein passender Empfänger ermittelt werden konnte.

Geschlecht, Alter	Krankheit	Auswurf-Fraktion	kardialer Index	Medikation
Herzinsuffizienz-Patienten				
M, 61	DKMP	17	1.9	D, AI, A, OA
M, 68	DKMP	14	2.9	D, DI, AI, A, OA
M, 26	DKMP	6	2.3	D, AI, OA
W, 40	DKMP	28	2.6	D, DI, AI, OA
M, 63	IHK	19	1.4	D, DI, AI, OA
M, 59	DKMP	18	1.2	D, DI, AI, OA
W, 48	DKMP	12	1.6	D, AI, OA
W, 61	DKMP	22	2.3	D, DI, AI, AB, OA
M, 51	DKMP	19	1.9	D, DI, AI, S, OA
M, 58	DKMP	20	1.7	D, DI, AI, OA
M, 65	DKMP	nb	1.5	D, DI, AI, A
M, 67	IHK	nb	1.8	D, DI, AI, N, OA
M, 48	IHK	32	2.2	AI, N, S

Kontrollen				
M, 44	Schädeltrauma			Dopamin, Noradrenalin
M, 14	Schädeltrauma			D, CS, AVP
W, 71	Gehirnblutung			Dopamin
M, 15	Kopfschuss			AVP, CS
W, 26	Schädeltrauma			Dopamin

Tabelle 9: Angaben zu den Herzinsuffizienz-Patienten und den Kontrollpersonen

DKMP: dilatative Kardiomyopathie, IHK: Ischämische Herzerkrankung, D: Digitalis, DI: Diuretika, AI: ACE-Inhibitor, N: Nitrate, S: Statine, A: Amiodaron, AB: α -1 adrenerge Rezeptor Blocker, OA: orale Antigerinnungsmittel, AVP: Arginin-Vasopressin Derivate, CS: Cephalosporin nb = nicht bestimmt

4.1.1 Charakterisierung der Membranen

Markerproteine

Um einen Vergleich der Membranen, die aus verschiedenen Präparationen stammten, zu ermöglichen wurden die Aktivitäten und der Gehalt verschiedener Membran-Proteine untersucht. Dazu gehörte die 5'-Nukleotidase, die basale Adenylyl Cyclase und $G_s\alpha$ (Tabelle 10). Diese Proteine eignen sich als Marker-Proteine, da mehrfach gezeigt wurde, dass ihre Expression und Verteilung bei der Herzinsuffizienz nicht verändert ist (Fan *et al.*, 1987; Eschenhagen *et al.*, 1992).

	Kontrolle (K)	Herzinsuffizienz (HI)	n (K/HI)	p
5'-Nukleotidase $\mu\text{mol/h} \cdot \text{mg}$	20 \pm 2.3	22 \pm 3.5	5/13	n.s.
Adenylyl Cyclase 2 mM Mg^{2+} $\text{pmol}/\text{min} \cdot \text{mg}$	242 \pm 29	262 \pm 36	5/13	n.s.
$G_s\alpha$ (count$\cdot\text{mm}^2$)	667 \pm 43	694 \pm 122	5/5	n.s.

Tabelle 10: 5'-Nukleotidase, basale Adenylyl Cyclase und $G_s\alpha$ in K- und HI-Membranen (n.s.: nicht signifikant).

Bei allen drei Proteinen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in dem jeweils untersuchten Parameter. Die Aktivität der 5'-Nukleotidase betrug in den 5 K-Membranen 20 ± 2.3 $\mu\text{mol/h} \cdot \text{mg}$ und in den 13 HI-Membranen 22 ± 3.35 $\mu\text{mol/h} \cdot \text{mg}$. Die Aktivität der Adenylyl Cyclase wurde ohne Guanin-Nukleotide und ohne ein Energie-Phosphat regenerierendes System gemessen. Unter diesen Bedingungen kommt es zu keiner Regulation der Aktivität der Adenylyl Cyclase durch Rezeptoren, NDPK und G-Proteine. Diese „basale“ Aktivität, welche somit den Gehalt des Proteins in der Membran widerspiegelt, betrug in den K-Membranen 242 ± 29 $\text{pmol/min} \cdot \text{mg}$ und in den HI-Membranen 262 ± 36 $\text{pmol/min} \cdot \text{mg}$. Der Gehalt der α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins wurde mittels eines Western Blots bestimmt. Dazu wurden in einem direktem Vergleich je 5 Membranen beider Gruppen untersucht und mit 667 ± 43 count/mm^2 bei K-Membranen und 694 ± 122 count/mm^2 bei HI-Membranen kein Unterschied festgestellt.

α -Untereinheiten der inhibitorischen G-Proteine ($G_i\alpha 2/3$)

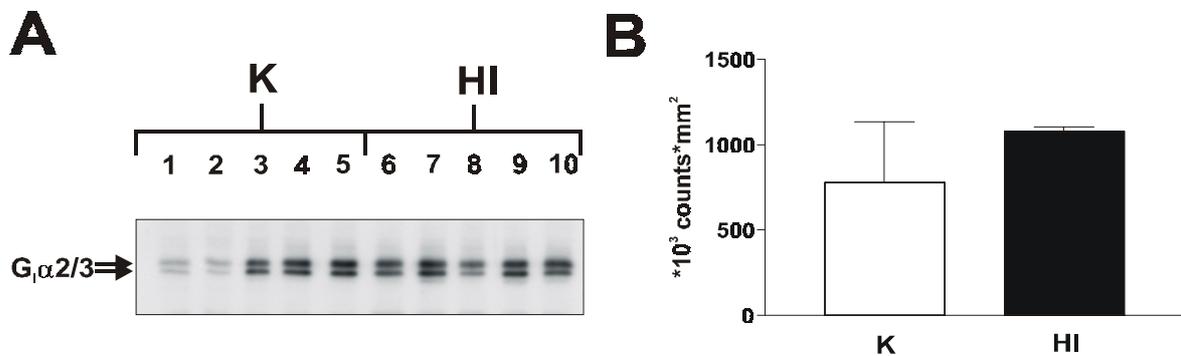


Abbildung 9: $G_i\alpha 2/3$ -Gehalt in K- und HI-Membranen

A: Western Blot

10 μg Protein von jeweils 5 K- (1-5) und HI-Membranen (6-10) wurden in einem 9%igem Harnstoffgel aufgetrennt. Die Immunfärbung erfolgte mit einem $G_i\alpha 2/3$ -spezifischem Primärantikörper.

B: Quantitative Auswertung

Die Chemolumineszenz-Signale wurden mit einem FlourS-MultImager detektiert, ausgewertet und die Mittelwerte der beiden Membrangruppen dargestellt.

Die Expression der α -Untereinheit inhibitorischer G-Proteine, insbesondere des Subtyps $G_i\alpha 2$, ist in der Herzinsuffizienz um ca. 40% erhöht (Eschenhagen *et al.*, 1992). Mittels eines

Western Blots (Abbildung 9) wurde eine Zunahme der $G_i\alpha$ -2/3 Proteine von 34% in den HI-Membranen nachgewiesen, welche jedoch aufgrund großer Schwankungen und der geringen Probenzahl der Kontrollgruppe nicht signifikant war.

4.1.2 Gehalt und Aktivität der NDPK

Der Gehalt der NDPK in den sarkolemmalen Membranen wurde in einem Western Blot Experiment bestimmt (Abbildung 10). Es zeigte sich in den HI-Membranen eine signifikante ($p=0.0028$), um 425% erhöhte NDPK im Vergleich zu den K-Membranen. Da der verwendete Antikörper keine Spezifität für die einzelnen NDPK-Isoformen hatte und diese sich nur geringfügig in ihrem Molekulargewicht unterscheiden, war es nicht möglich eine Aussage über die vorliegende Isoform, bzw. Isoformen der NDPK zu treffen.

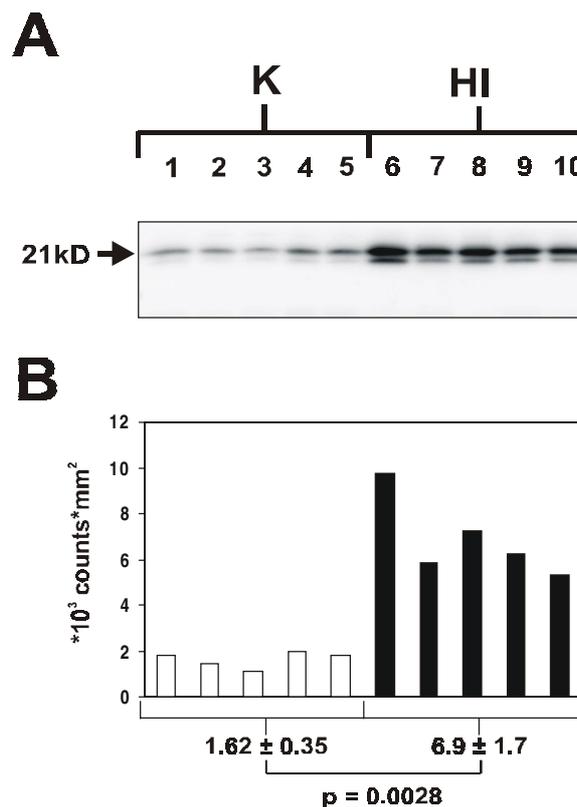


Abbildung 10: NDPK-Gehalt in K- und HI-Membranen

A: Western Blot

10µg Protein von jeweils 5 K-Membranen (1-5) und HI-Membranen (6-10) wurden in einem 15%igen SDS/Tris-Gel aufgetrennt. Die Immunfärbung erfolgte mit einem NDPK-spezifischem Primäranantikörper.

B: Quantitative Auswertung

Die Chemolumineszenz-Signale wurden mit einem FlourS-MultiImager detektiert und ausgewertet.

Die Erhöhung der Membran-ständigen NDPK zeigte sich in beiden Ventrikeln und im Septum der jeweils untersuchten insuffizienten Herzen (Abbildung 11).

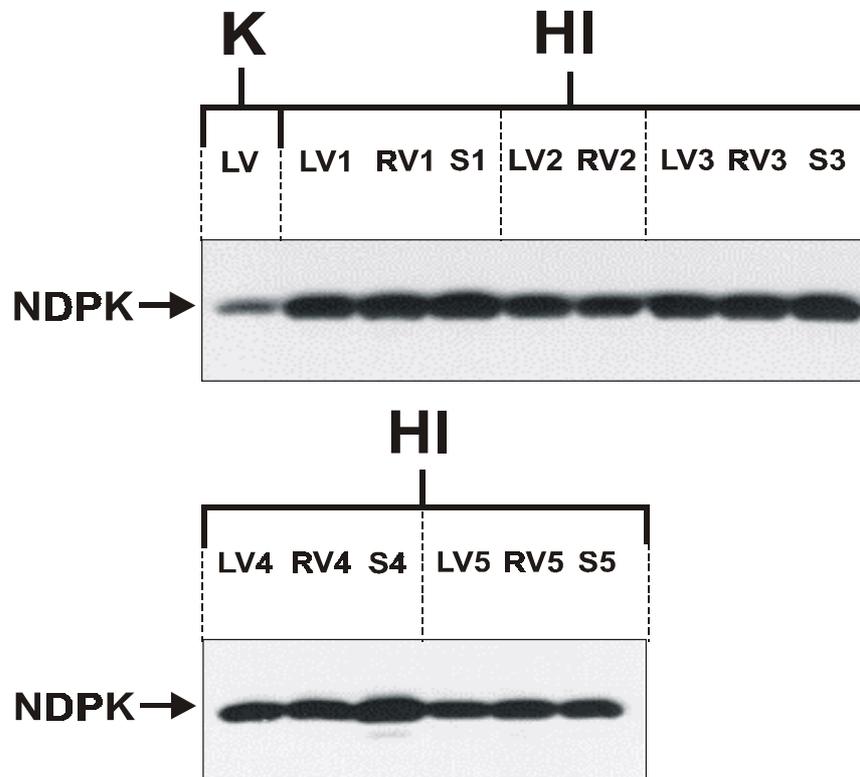


Abbildung 11: NDPK-Gehalt in den Membranen verschiedener Herzbereiche

Die NDPK wurde in jeweils 10µg Protein von 5 HI-Membranen (1-5) aus den linken Ventrikeln (LV), rechten Ventrikeln (RV) und Septen (S) in direktem Vergleich mit einer K-Membran (K) in einem Western Blot Experiment mit einem spezifischem Primärantikörper nachgewiesen.

Zusätzlich zu den präparierten Membranen wurden Homogenate, cytosolische und partikuläre Fraktionen aus den einzelnen Geweben gewonnen und der NDPK-Gehalt mit einem Western Blot bestimmt (Abbildung 12). Im Gegensatz zur erhöhten sarkolemmalen NDPK war die NDPK in diesen Fraktionen unverändert.

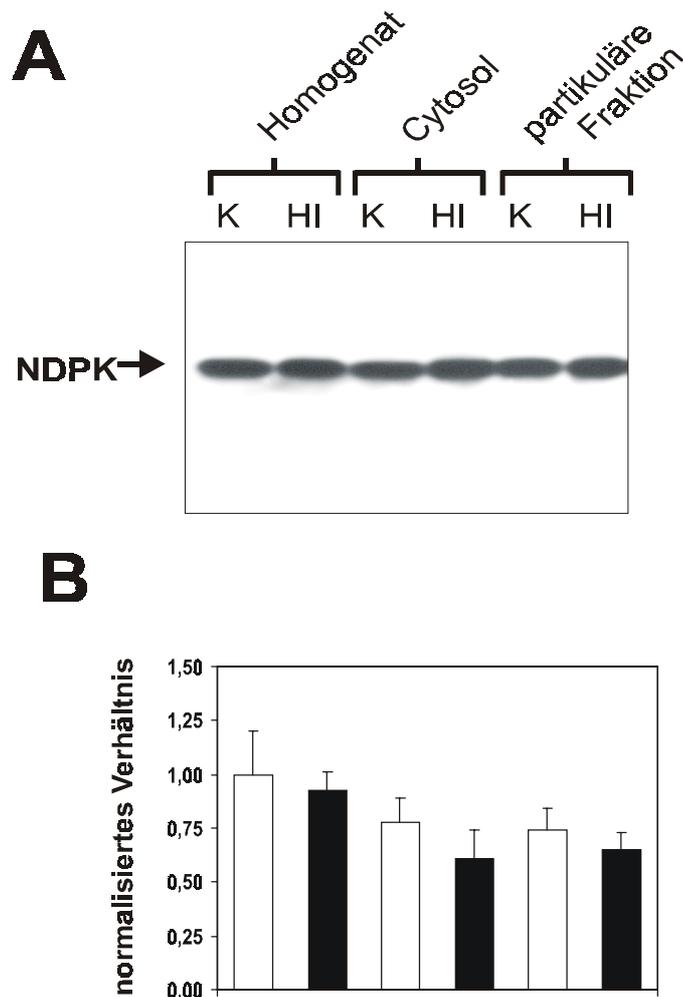


Abbildung 12: NDPK-Gehalt in verschiedenen Fraktionen von K- und HI-Herzen

A: Repräsentativer Western Blot

Stellvertretend wurde die NDPK in jeweils 10µg Protein von Homogenaten, Cytosolen und partikulären Fraktionen jeweils eines Kontrollherzens (K) und eines insuffizienten Herzens (HI) in einem Western Blot Experiment mit einem NDPK-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

B: Quantitative Auswertung

Die Chemolumineszenz-Signale wurden mit einem FlourS-MultImager detektiert und ausgewertet. Dargestellt sind die Mittelwerte aller durchgeführten Western Blot Experimente der 5 K- und 13 HI-Herzen, normalisiert auf die Signalstärke der Kontrollhomogenate.

Zusätzlich wurde die enzymatische Aktivität der NDPK in den unterschiedlichen Fraktionen der Kontrollherzen und der insuffizienten Herzen bestimmt (Abbildung 13). Dabei zeigte sich, vergleichbar mit den Western Blot Experimenten, kein signifikanter Unterschied in den Homogenaten, den Cytosolen und den partikulären Fraktionen der beiden Gewebegruppen.

Im Gegensatz dazu war die NDPK-Aktivität in den sarkolemmalen HI-Membranen signifikant ($p=0.0002$) um 394% erhöht.

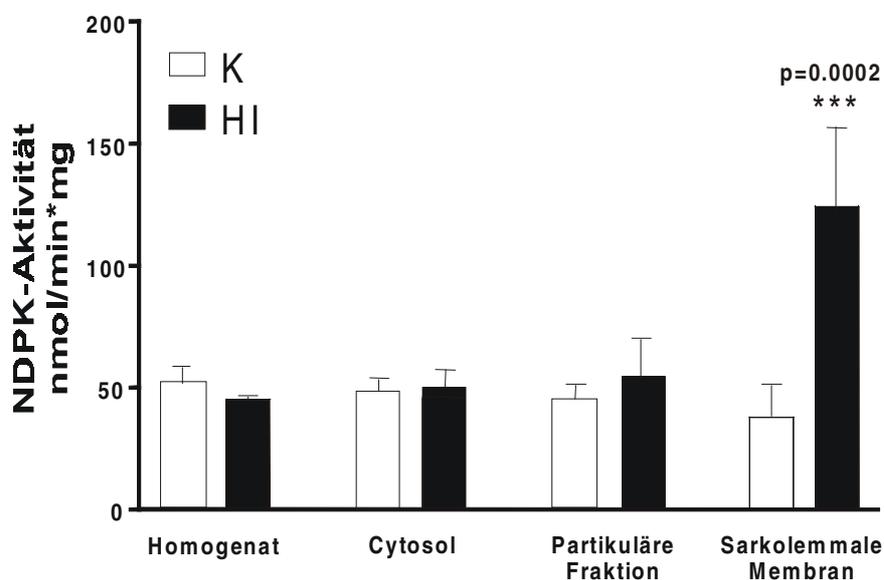


Abbildung 13: NDPK-Aktivität in verschiedenen Fraktionen von K- und HI-Herzen

Die NDPK-Aktivität wurde in je 0.3 μ g Homogenat, Cytosol, partikulärer Fraktion und sarkolemmaler Membranen der 13 HI-Herzen (HI) und der 5 Kontrollherzen (K) gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen.

Hemmung der NDPK-Aktivität mit 8-Br-cAMP

Die Inhibition der NDPK-Aktivität erfolgte mit dem kompetitiven Hemmstoff 8-Br-cAMP. Die maximale Hemmung der NDPK-Aktivität wurde bei einer Konzentration von 4mM dieses cAMP-Derivats erreicht und betrug für beide Membrangruppen etwa 85%. Somit kam es zu einer Inhibition der NDPK-Aktivität von 34 ± 13.5 nmol/min*mg auf 4.3 ± 2.6 nmol/min*mg in den K-Membranen und von 134 ± 30.7 nmol/min*mg auf 20.5 ± 8.1 nmol/min*mg in den HI-Membranen (Abbildung 14).

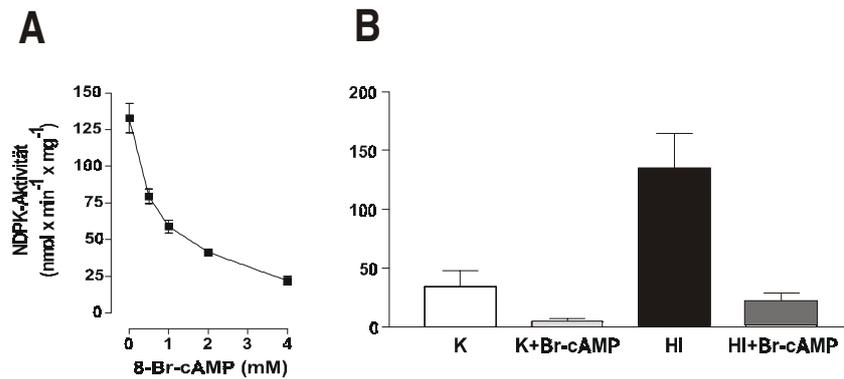


Abbildung 14: Inhibition der NDPK-Aktivität mit 8-Br-cAMP

A: Konzentrations-abhängige Inhibition

Die NDPK-Aktivität wurde in 0.3µg sarkolemmaler HI-Membran in Anwesenheit von 0, 0.5, 1, 2 und 4mM 8-Br-cAMP gemessen.

B: Vergleich von K- und HI-Membranen

Die NDPK-Aktivität wurde in je 0.3µg sarkolemmaler Membranen der 13 HI-Herzen (HI) und der 5 Kontrollherzen (K) mit und ohne 4mM 8-Br-cAMP gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen.

8-Br-cAMP beeinflusste die Rezeptor/G-Protein-abhängige Regulation der Adenylyl Cyclase nicht (Abbildung 15). Dies galt für die Stimulation der Adenylyl Cyclase Aktivität mit 100µM GTP, die Hemmung durch den muskarinischen Agonisten Carbachol (10µM), die Stimulation durch den β-adrenergen Agonisten Isoprenalin (10µM) und die Stimulation durch 10µM GDPβS.

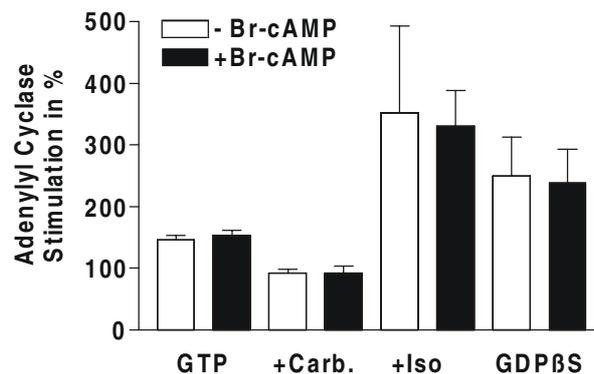


Abbildung 15: Einfluss von 8-Br-cAMP auf die Regulation der Adenylyl Cyclase

Die Adenylyl Cyclase Aktivität wurde in Anwesenheit von 100µM GTP, 100µM GTP + 10µM Carbachol (+Carb), 100µM GTP + 10µM Isoprenalin (+Iso) oder 10µM GDPβS mit und ohne 4mM 8-Br-cAMP gemessen und in Relation zur Adenylyl Cyclase Aktivität ohne Zusätze gesetzt

4.1.3 Einfluss der erhöhten sarkolemmalen NDPK auf die Regulation der Adenylyl Cyclase

Im folgenden wurden die Auswirkungen der erhöhten sarkolemmalen NDPK in insuffizienten Herzen auf die Regulation der Adenylyl Cyclase untersucht. Dazu wurde in den präparierten Membranen die Stimulation der Adenylyl Cyclase-Aktivität durch GDP und GDP β S und der Einfluss des NDPK-Inhibitors 8-Br-cAMP gemessen.

Einfluss von GDP auf die Adenylyl Cyclase-Aktivität

Um den Einfluss von GDP auf die Aktivität der Adenylyl Cyclase zu verstehen, muss man zwischen zwei unabhängigen Mechanismen der Aktivierung durch GDP unterscheiden. Zum einen ist GDP ein Substrat für die NDPK, das durch Phosphorylierung zu GTP eine Aktivierung der G-Proteine bewirkt. Zum anderen bindet GDP selbst an G-Proteine und bewirkt so deren Inaktivierung. Dies setzt voraus, dass Nukleotid-freie G-Proteine existieren und diese Effektoren beeinflussen können. In diesem Zusammenhang werden besonders inhibitorischen G-Proteine diskutiert, die ihr GDP spontan freisetzen und in dieser Konformation die Adenylyl Cyclase inhibieren (Lutz *et al.*, 2001c).

Der Einfluss von steigenden GDP-Konzentrationen auf die Adenylyl Cyclase-Aktivität (Abbildung 16A) bedingte eine Dosis-abhängigen Stimulation in den K-Membranen. Die maximale Stimulation erfolgte bei einer GDP-Konzentration von 100 μ M und betrug 100%. In den HI-Membranen war diese signifikant ($p < 0.0001$) um 50% vermindert. Um auszuschließen, dass die niedrigere Adenylyl Cyclase-Aktivität die Folge eines erhöhten ATP-Abbaus in den HI-Membranen war, wurde die Stimulation mit GDP in Anwesenheit verschiedener ATP-Konzentrationen gemessen. Es zeigte sich (Abbildung 16B), dass es auch bei hohen ATP-Konzentrationen zu einer signifikanten Verringerung ($p > 0.01$) der GDP-abhängigen Stimulation der Adenylyl Cyclase-Aktivität in HI-Membranen kommt.

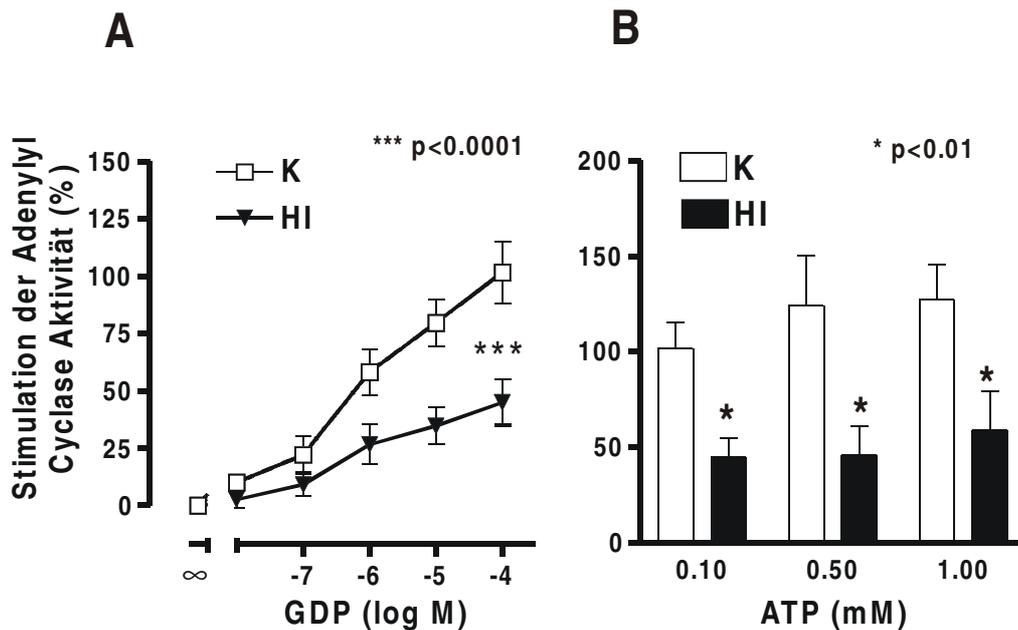


Abbildung 16: GDP-Stimulation der Adenylyl Cyclase in K- und HI-Membranen

A: Dosis-Wirkungskurve

Die Adenylyl Cyclase-Aktivität wurde in je 3µg Membranprotein der 5 K- (□) und 13 HI-Membranen (▼) in Anwesenheit steigender GDP-Konzentrationen gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulation relativ zur normalen Aktivität ohne GDP.

B: ATP-Abhängigkeit

Die Adenylyl Cyclase-Aktivität wurde in 3µg Membranprotein von jeweils einer K- und HI-Membran in Anwesenheit von 100µM GDP und 0.1, 0.5 und 1mM ATP gemessen. Dargestellt sind die Stimulationen relativ zur Adenylyl Cyclase-Aktivität ohne GDP bei der jeweiligen ATP-Konzentration.

Einfluss von GDPβS und 8-Br-cAMP auf die Stimulation der Adenylyl Cyclase

Um zu untersuchen, ob die geringere GDP-abhängige Adenylyl Cyclase-Aktivität in HI-Membranen auf die ca. 4-fach erhöhte NDPK zurückzuführen ist, wurde die NDPK-Aktivität mit 4mM 8-Br-cAMP inhibiert. Dies bewirkte einen Ausgleich der GDP-abhängigen Stimulation der Adenylyl Cyclase in K- und HI-Membranen (Abbildung 17). Darüber hinaus führte die Inkubation der Membranen mit GDPβS, das analog zu GDP an G-Proteine bindet, aber ein sehr schlechtes Substrat für die Phosphorylierung durch die NDPK ist, zu keiner signifikant unterschiedlichen Adenylyl Cyclase-Aktivität in den HI-Membranen.

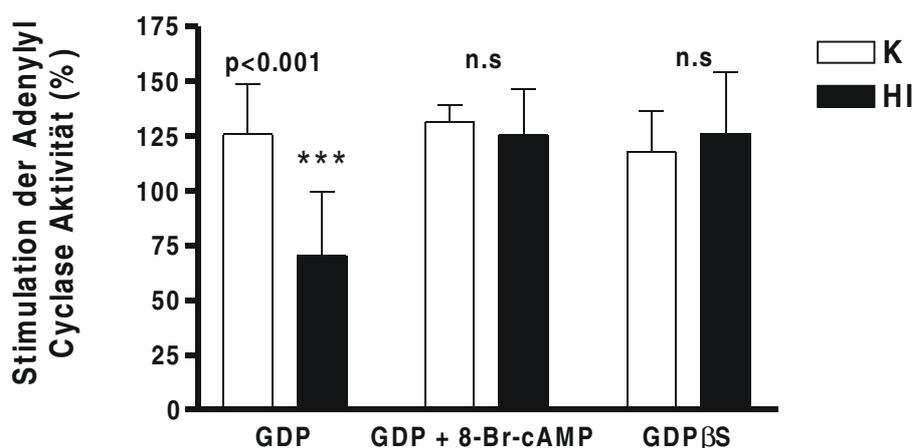


Abbildung 17: Regulation der Adenylyl Cyclase in K- und HI-Membranen

Die Adenylyl Cyclase-Aktivität wurde in je 3 µg Membranprotein der 5 K- und 13 HI-Membranen in Anwesenheit von 100 µM GDP, 100 µM GDP + 4 mM 8-Br-cAMP oder 10 µM GDPβS gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte der Stimulation relativ zur gemessenen Aktivität ohne Zusätze.

Zusammenfassend zeigte sich, dass in sarkolemmlen Membranen aus insuffizienten Herzen die um 400% erhöhte sarkolemmlale NDPK eine Hemmung Adenylyl Cyclase-Aktivität um 50-75% bewirkte.

4.2 Auswirkung der β-Blocker Therapie auf die sarkolemmlale NDPK

Beim Vergleich der Membranen aus insuffizienten und gesunden Herzen zeigte eine Reihe von HI-Membranen keinen, oder nur einen leicht erhöhten NDPK-Gehalt. Eine genauere Untersuchung der Medikation und verschiedener klinischer Parameter (Tabelle 11) der Patienten ergab, dass die Patienten mit niedriger sarkolemmlaler NDPK mit β-Rezeptor Antagonisten behandelt worden waren (β-HI-Membranen). Dabei kamen zwei verschiedene β-Blocker zum Einsatz: Carvedilol und Metoprolol. Ein weiterer Parameter, der die beiden Patientengruppen unterschied, war der signifikant niedrigere Noradrenalin-Spiegel im Blut der mit β-Blockern behandelten Patienten.

	HI (n=8)	β-HI (n=8)	p
Alter (Jahre)	56 ± 13.6	50 ± 14.9	n.s.
Geschlecht männlich (n)	8	7	n.s.
β-Blocker:			
Metoprolol (n; mg/d)	0	4; 87.5 ± 25.0	
Carvedilol (n; mg/d)	0	4; 21.9 ± 6.3	
ACE-Inhibitoren (n)	7	7	n.s.
Digitalis (n)	7	6	n.s.
Diuretika (n)	7	8	n.s.
Peak VO ₂ (ml x kg ⁻¹ x min ⁻¹)	12.34 ± 3.3	12.95 ± 3.2	n.s.
Schlagrate des Herzens	83.5 ± 19.9	82.1 ± 18.3	n.s.
Blutdruck			
Systolisch	100.8 ± 15.1	120.1 ± 29.4	n.s.
Diastolisch	73.9 ± 10.6	82.3 ± 22.1	n.s.
Auswurf-Fraktion (%)	18.1 ± 7.4	17.3 ± 8.3	n.s.
kardialer Index (L/ min X m ²)	2.03 ± 0.52	2.11 ± 0.68	n.s.
Noradrenalin (nM)	2.80 ± 1.23	1.58 ± 0.64	0.037
Adrenalin (nM)	0.34 ± 0.22	0.28 ± 0.21	n.s.

Tabelle 11: Angaben zu den Herzinsuffizienz-Patienten mit und ohne β-Blocker-Behandlung

Die Messung der NDPK-Aktivitäten in den Membranen bestätigte den niedrigeren sarkolemmalen NDPK-Gehalt in den β -HI-Membranen. Die β -HI-Membranen wiesen eine NDPK-Aktivität von 67 ± 5 nmol/min*mg im Vergleich zu den HI-Membranen mit 190 ± 38 nmol/min*mg. In beiden Membrangruppen lies sich die NDPK-Aktivität mit 4mM 8-Br-cAMP um ca. 90% hemmen (Abbildung 19).

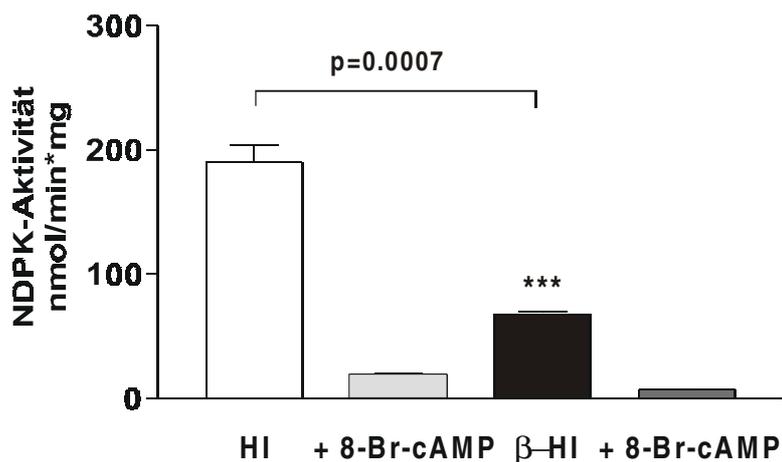


Abbildung 19: NDPK-Aktivität in β -HI- und HI-Membranen

Die NDPK-Aktivität wurde in je 0.3 μ g sarkolemmalen β -HI- und HI-Membran (je n=8) mit und ohne 4mM 8-Br-cAMP mittels eines radioaktiven Assays gemessen.

Die Messungen der NDPK-Aktivitäten in cytosolischen und partikulären Fraktionen zeigte, wie beim Vergleich insuffizienter und gesunder Herzen, keinen signifikanten Unterschied zwischen insuffizienten Herzen mit und ohne β -Blocker Therapie (Tabelle 12).

NDPK (nmol/min*mg)	HF (n=8, gepoolt)	β -HF (n=8, gepoolt)	p
Cytosol	44 ± 4	43 ± 2	n.s.
partikuläre Fraktion	46 ± 10	45 ± 7	n.s.

Tabelle 12: NDPK Aktivitäten in cytosolischen und partikulären Fraktionen von HI und β -HI-Herzen

Die NDPK-Aktivität wurde in je 0.3 μ g Cytosol und partikulärer Fraktion der HI- und β -HI-Herzen gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte aller Messungen.

4.2.2 Charakterisierung der Membranen

Wie im vorangegangenen Kapitel, wurden bei diesem Vergleich von HI- und β -HI-Membranen der Gehalt und die Aktivität verschiedener Proteine untersucht, um eine Beurteilung der Sarkolemm-Ausbeute zu ermöglichen. Dabei ergab sich ein geringer, aber signifikanter Unterschied ($p=0.0094$) zwischen den 5'-Nukleotidase Aktivitäten der HI-Membranen ($20.8 \pm 0.4 \mu\text{mol/h} \cdot \text{mg}$) und der β -HI-Membranen ($26.2 \pm 1.4 \mu\text{mol/h} \cdot \text{mg}$). Dieser Unterschied von ca. 25% zeigte sich ebenfalls bei den Adenylyl Cyclase-Aktivitäten und der Dichte β -adrenerger Rezeptoren (Tabelle 13). Somit war die Reinheit der sarkolemmalen Membranen aus den β -HI-Membranen etwas größer und die folgenden Messungen wurden auf die 5'-Nukleotidase-Aktivität normalisiert. Interessanterweise wurde die Dichte der β -adrenergen Rezeptoren durch die Therapie mit β -Blockern nicht beeinflusst. Frühere Arbeiten konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass es durch die Therapie mit Metoprolol zu einer Erhöhung der Dichte der β -adrenerger Rezeptoren kam, wohingegen Carvedilol eine Reduktion der Rezeptoren bewirkte (Heilbrunn *et al.* 1989; Sigmund *et al.* 1996; Yoshikawa *et al.*, 1996). Der untersuchte β -Membranpool setzte sich aus je vier Herzen von Patienten, die entweder mit Metoprolol oder mit Carvedilol behandelt wurden, zusammen. Dadurch ist es verständlich, dass keine Änderung im Gehalt der β -adrenergen Rezeptoren nachweisbar war.

	HI (n=8, vereint)	β -HI (n=8, vereint)	p
5' Nukleotidase ($\mu\text{mol} \times \text{h}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)	20.8 ± 0.4	26.2 ± 1.4	0.0094
Adenylyl Cyclase* 10 mM Mn^{2+} 2 mM Mg^{2+} ($\text{pmol} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$)	3000 ± 650	2900 ± 450	n.s.
	269 ± 37	261 ± 19	n.s.
β-adren. Rezeptoren* ($\text{fmol} \times \text{mg}^{-1}$)	382 ± 21	390 ± 37	n.s.

Tabelle 13: 5'-Nukleotidase, basale Adenylyl Cyclase und β -adrenerge Rezeptoren in HI- und β -HI-Membranen

* korrigiert auf die 5'-Nukleotidase

Es ist bislang nicht geklärt, wie β -Blocker die Pumpfunktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz verbessern. Deshalb war es von Interesse zu untersuchen, ob es außer der Änderung der sarkolemmlen NDPK zu weiteren Veränderungen bei anderen Proteinen der β -adrenergen Signalkaskade kommt. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Veränderung im Gehalt der α - und β -Untereinheiten von stimulatorischen und inhibitorischen G-Proteinen (Abbildung 20A, 20B). Ein weiterer, wichtiger Faktor in dieser Signalkaskade ist die β -adrenerge Rezeptorkinase1 (β -ARK1). Eine Immunpräzipitation zeigte, dass die Therapie mit β -Blockern keinen Einfluss auf die Expression des Proteins hatte (Abbildung 20C, 20D).

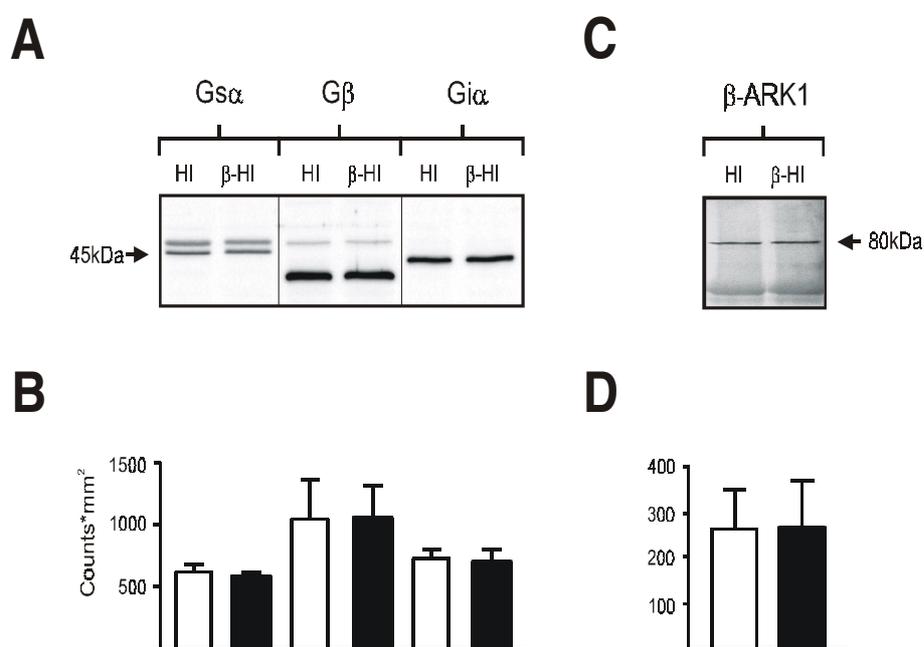


Abbildung 20: Gs α , Gi α , G β , β -ARK1 in β -HI- und HI-Herzen

A: Western Blot von Gs α , Gi α und G β

Je 10 μ g des β -HI- und des HI-Membranpools wurden in Western Blot Experimenten auf Ihren Gehalt an Gs α , G β und Gi α -Proteinen mit spezifischen Antikörpern untersucht.

B: Quantitative Auswertung zu A

Die Chemolumineszenz-Signale aller Western Blots wurden mit einem FlourS-MultImager detektiert und ausgewertet.

C: Immunpräzipitation von β -ARK1

Aus 400 μ g cytosolischem Protein von β -HI- und HI-Herzen (jeweils ein Pool aus acht Cytosolen) wurde die β -ARK1 mit einem spezifischem Primärantikörper präzipitiert und anschließend in einem Western Blot mit einem GRK2/3 spezifischem Antikörper nachgewiesen.

D: Quantitative Auswertung zu C

Die Chemolumineszenz-Signale der Immunpräzipitationen wurden mit einem FlourS-MultImager detektiert und ausgewertet.

4.2.3 Auswirkung der verminderten sarkolemmalen NDPK auf die Regulation der Adenylyl Cyclase in β -HI-Membranen

Die Auswirkung der um 50-65% reduzierten Membran-gebundenen NDPK auf die Regulation der Adenylyl Cyclase-Aktivität in β -HI-Membranen wurde in direktem Vergleich mit der Regulation in HI-Membranen gemessen. Beiden Membranen zeigten eine Dosis-abhängige Stimulation der Adenylyl Cyclase-Aktivität durch GDP. Die maximal effektive GDP-Konzentration betrug jeweils $100\mu\text{M}$. In den HI-Membranen kam es zu einer Erhöhung der Adenylyl Cyclase-Aktivität um ca. 50%. Dagegen fand sich in den β -HI-Membranen eine doppelt so hohe Stimulation. Die Hemmung der NDPK-Aktivität mit 4mM 8-Br-cAMP in den HI-Membranen führte zu einer Angleichung der Adenylyl Cyclase-Stimulation durch GDP. Das stabile GDP-Derivat $\text{GDP}\beta\text{S}$ bewirkte bei HI- und β -HI-Membranen eine vergleichbare Dosis-abhängige Stimulation der Adenylyl Cyclase-Aktivität um ca. 200%.

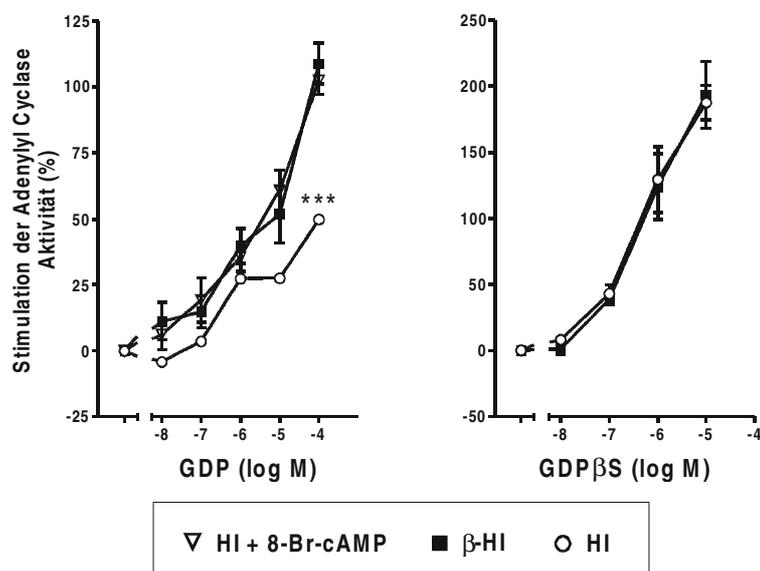


Abbildung 21: Regulation der Adenylyl Cyclase in β -HI- und HI-Membranen

Die Adenylyl Cyclase-Aktivitäten wurden in je $3\mu\text{g}$ Protein der β -HI- (■) und HI-Membranen (○) in Anwesenheit steigender GDP und $\text{GDP}\beta\text{S}$ -Konzentrationen gemessen. Zusätzlich wurde die NDPK-Aktivität in den HI-Membranen mit 4mM 8-Br-cAMP (▽) inhibiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Adenylyl Cyclase-Stimulationen relativ zur den Adenylyl Cyclase-Aktivitäten ohne GDP bzw. $\text{GDP}\beta\text{S}$.

Zusammenfassend findet sich in den Herzen von Patienten, die mit einem β -Blocker behandelt wurden, eine geringere sarkolemmale NDPK als bei Patienten ohne β -Blocker Behandlung. Dies bewirkte eine 2-fach höhere, NDPK-abhängige Stimulation der Adenylyl Cyclase Aktivität. Diese Aktivität ist in gesunden Herzen vergleichbar hoch.

4.3 Charakterisierung der humanen kardialen NDPK

Die exakte Charakterisierung der Zusammensetzung der NDPK in einem Kompartiment oder einem Gewebe ist schwierig. Die Isoformen sind zueinander sehr homolog und besitzen ähnliche Molekulargewichte, enzymatische Aktivitäten und Substratspezifitäten.

4.3.1 Nachweis der Transkription von nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 im humanen Herzen

Die Transkripte der beiden NDPK-Subtypen nm23H1 und nm23H2 wurde in einem Northern Blot nachgewiesen (Abbildung 22A). Beide Hybridisierungen wurden mit full-length cDNAs durchgeführt. Zusätzlich wurde ein Teil des DR-nm23-Transkripts in einer RT-PCR nachgewiesen (Abbildung 22B). Die Transkription des Subtyps nm23H4 wurde nicht untersucht, da es sich um ein mitochondrielles Protein handelt und für die Aktivierung der heterotrimeren G-Proteine keine Rolle spielen sollte.

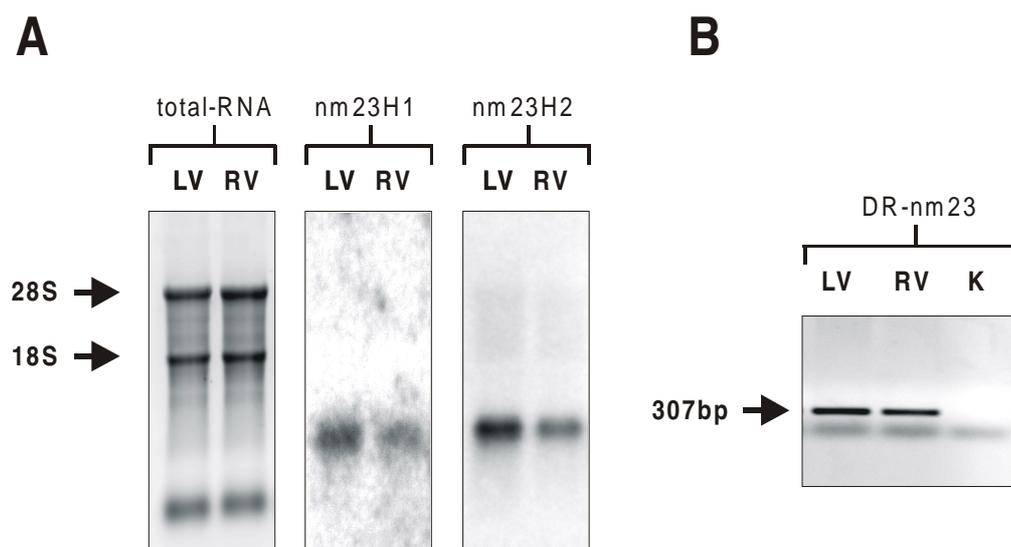


Abbildung 22: Transkription von nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 im humanen Herzen

A: Northern Blot

Je 10µg total-RNA von 6 humanen linken Ventrikeln (LV) und 6 humanen rechten Ventrikeln (RV) wurde für den Northern Blot verwendet. Die Hybridisierung erfolgte mit full-length Klonen von nm23H1 und nm23H2.

B: RT-PCR

1µg total-RNA von 6 humanen linken Ventrikeln (LV) und 6 humanen rechten Ventrikeln (RV) wurde in die RT-PCR Reaktion eingesetzt und die DR-nm23 Expression in der anschließenden PCR mit Gen-spezifischen Primern nachgewiesen. Als Negativkontrolle (K) diente ein Ansatz ohne cDNA.

4.3.2 Nachweis der nm23H1-, nm23H2- und DR-nm23-Proteine im humanem Sarkolemm

Western Blot Experimente mit Subtyp-spezifischen Antikörpern (von Dr. Lascu, Universität Bordeaux, Frankreich) zeigten, dass die transkribierten NDPK-Gene translatiert werden (Abbildung 23). In sarkolemmalen Membran (HI- und β -HI-Membranen) wurden eindeutig die Isoformen nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 nachgewiesen. Bei den verwendeten, rekombinanten DR-nm23-Proteinen fehlten die N-terminalen 17 Aminosäuren. Aus diesem Grund stimmt ihr Molekulargewicht mit dem der nativen Form nicht über ein.

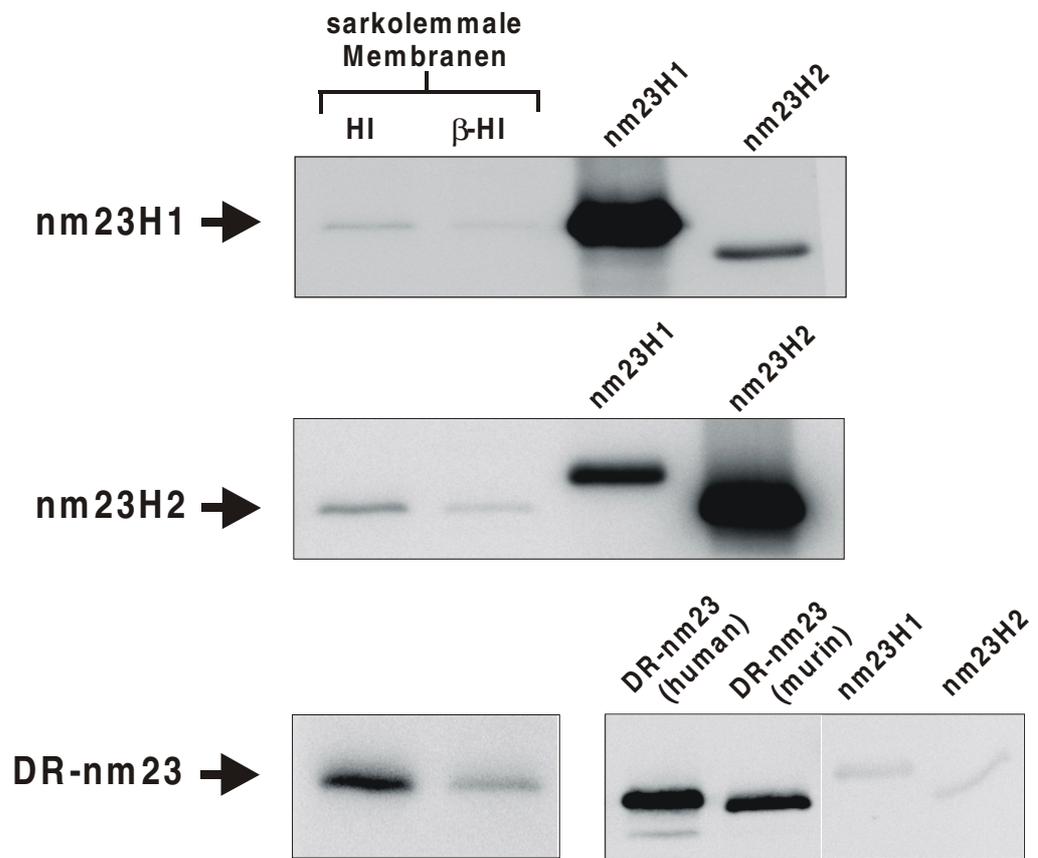


Abbildung 23: Expression von nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 im humanen Herzen

Je 7.5µg Protein der HI- und β-HI-Membranen, sowie je 500ng humanes, bzw. murines rekombinantes nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 wurden in einem Western Blot Experiment mit Isoform-spezifischen, polyklonalen Antikörpern untersucht.

Zusammenfassend zeigte sich, dass im humanen Herzen die NDPK-Isoformen nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 exprimiert werden. Der Gehalt aller untersuchten Isoformen ist im Sarkolemm von β-HI-Herzen deutlich gegenüber HI-Herzen reduziert.

4.4 Erhöhung der sarkolemmalen NDPK durch chronische Stimulation β -adrenerger Rezeptoren

4.4.1 Ausbildung der Herzmuskelhypertrophie

Männliche, adulte Ratten wurden mit einem β -adrenergen Rezeptor Agonisten (Isoprenalin) bis zu 14 Tage behandelt. Die tägliche Dosis betrug 2.4mg/kg Körpergewicht. Parallel dazu wurde eine Kontrollgruppe mit physiologischer Kochsalzlösung behandelt. Die chronische Stimulation mit Isoprenalin bewirkte eine Zeit-abhängige, signifikante ($p < 0.001$) Herzmuskelhypertrophie (Abbildung 24B). Die relative Zunahme des Verhältnisses vom Herzgewicht zum Körpergewicht betrug 40%. Die Hypertrophie konnte durch gleichzeitige Gabe des inversen Agonisten Propranolol (10mg/kg) verhindert werden. Propranolol alleine verursachte keine Hypertrophie. Um eine Unterscheidung zwischen adaptiven Hypertrophie-Prozessen und β -adrenerg-gesteuerten Prozessen zu ermöglichen, wurde eine zusätzliche Gruppe von Tieren mit dem Schilddrüsen-Hormon Trijodthyronin (T3) behandelt. Diese Hormon bewirkte in einer Dosis von 0.5mg/kg Körpergewicht ebenfalls eine signifikante ($p < 0.001$) Herzmuskelhypertrophie mit einer vergleichbaren Erhöhung des Herzgewichts wie Isoprenalin (Abbildung 24A).

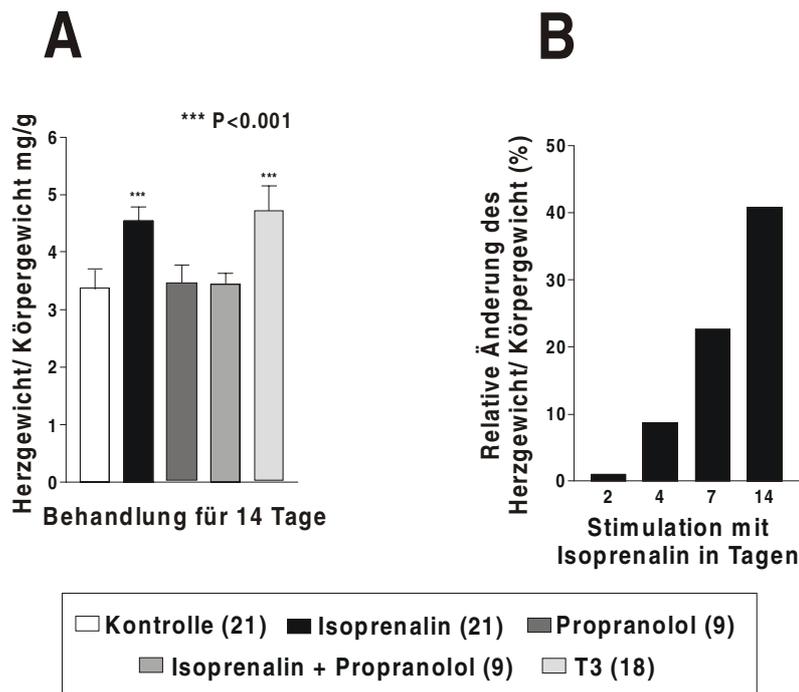


Abbildung 24: Ausbildung einer Herzmuskelhypertrophie durch Isoprenalin

A: Nach 14-tägiger Behandlung

Männliche adulte Ratten (n) wurden für 14 Tage mit physiologischer Kochsalzlösung, Isoprenalin (2.4 mg/kg), Propranolol (10mg/kg), Isoprenalin +Propranolol (2.4 mg/kg+10mg/kg) oder T3 (0.5mg/kg) behandelt.

B: Zeitverlauf

Männliche adulte Ratten (n) wurden für 2, 4, 7 und 14 Tage mit Isoprenalin (2.4 mg/kg) behandelt

4.4.2 Charakterisierung der Membranen

Je 3 der explantierten Herzen einer Gruppe wurden für eine Membranpräparation verwendet. Die 5'-Nukleotidase-Aktivität wurde in allen Membranen gemessen. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Präparationen (Abbildung 25A).

Wie erwartet zeigte die Bestimmung der Dichte β -adrenerger Rezeptoren, dass durch die chronische Stimulation mit Isoprenalin eine signifikante ($p=0.0027$) Reduktion um mehr als 50% erfolgte. Dies wurde durch die gleichzeitige Gabe von Propranolol verhindert. T3 bewirkte eine geringe, aber signifikante ($p=0.004$) Erhöhung der β -adrenergen Rezeptoren um etwa 13% (Abbildung 25B).

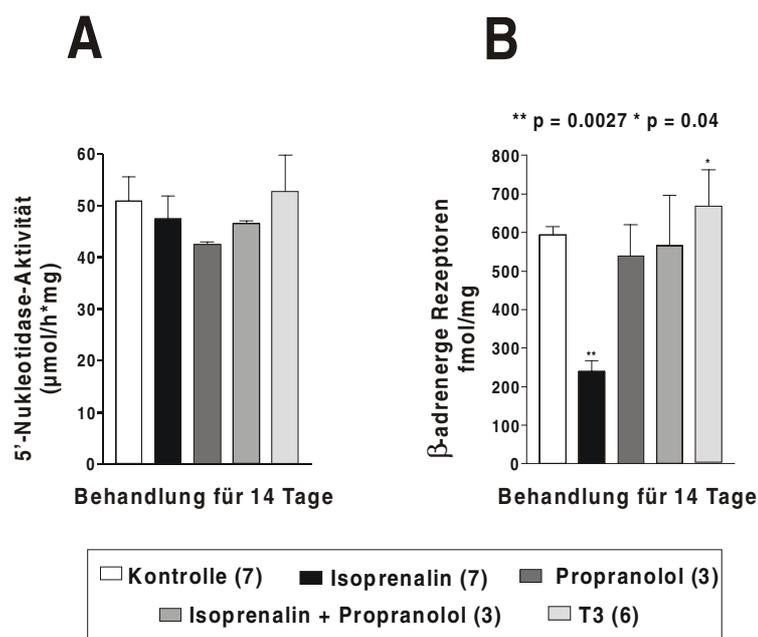


Abbildung 25: 5'-Nucleotidase und β-adrenerge Rezeptoren in behandelten Ratteherzen

Nach 14-tägiger Behandlung mit physiologischer Kochsalzlösung (Kontrolle), Isoprenalin (2.4mg/kg), Propranolol (10mg/kg), Isoprenalin+Propranolol (2.4mg/kg+10mg/kg) oder T3 (0.5mg/kg) wurden sarkolemmale Membranen (n= Anzahl der Präparationen) aus je 3 Herzen präpariert

A: 5'-Nucleotidase-Aktivität

Je 3µg Protein wurde für die Messung der 5'-Nucleotidase eingesetzt.

B: Dichte β-adrenerger Rezeptoren

Je 3µg Protein wurde für die Bestimmung der Dichte β-adrenerger Rezeptoren eingesetzt.

4.4.3 Gehalt und Aktivität der NDPK

Der Gehalt (Abbildung 26B) und die Aktivität (Abbildung 26A) der sarkolemmalen NDPK verhielt sich umgekehrt zur Dichte der β-adrenergen Rezeptoren. Die Behandlung mit Isoprenalin bewirkte eine signifikante (p<0.0001), zeitabhängige Zunahme der sarkolemmalen NDPK um etwa 60% (Abbildung 26C). Diese Zunahme wurde durch den inversen Agonisten Propranolol verhindert. Mit T3-behandelte Tiere zeigten dagegen eine geringe, aber signifikante (p<0.0001) Abnahme der sarkolemmalen NDPK um etwa 20%.

Im Gegensatz zur Plasmamembran-gebundenen NDPK zeigte sich keine Änderung der cytoplasmatischen und partikulären NDPK durch die Behandlung mit Isoprenalin (Abbildung 26D).

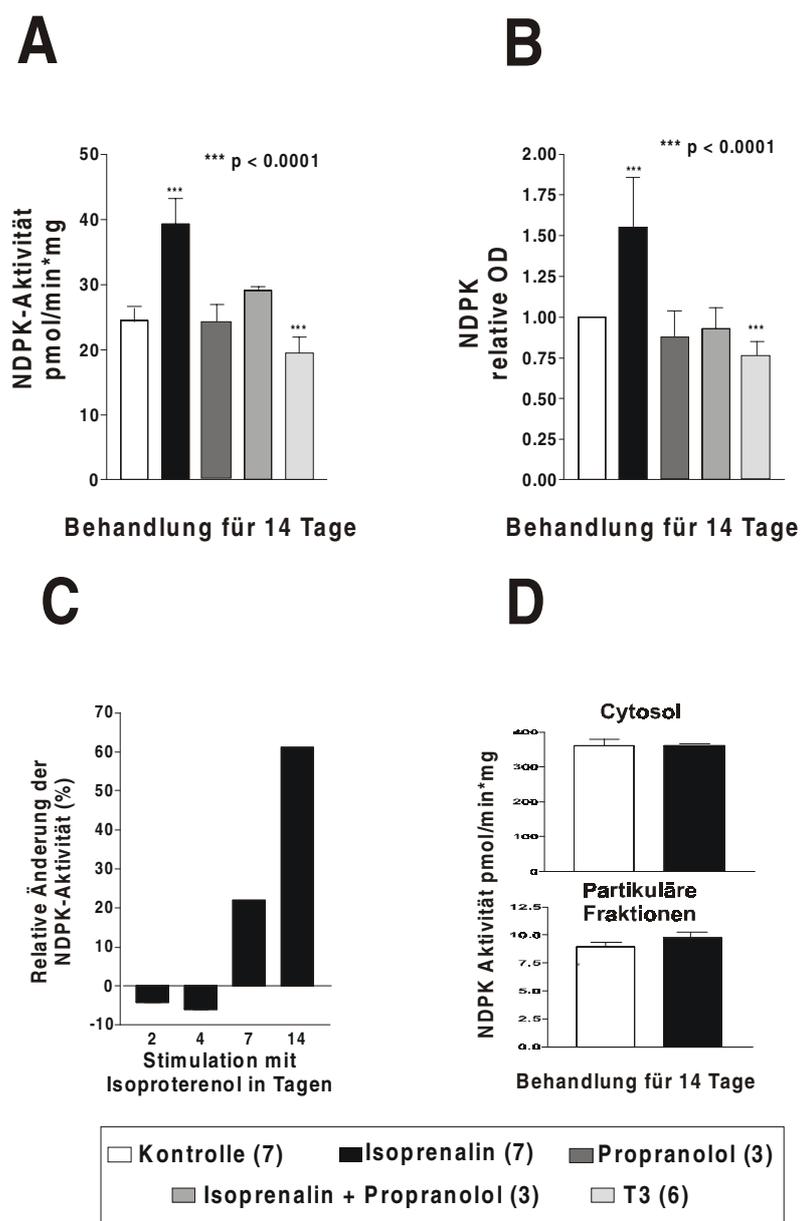


Abbildung 26: Gehalt und Aktivität der NDPK in den behandelten Rattenherzen

A: Aktivität in sarkolemmalen Membranen

Je 0.3µg Protein wurde für die Messung der NDPK-Aktivität in einem radioaktivem Assay eingesetzt.

B: Gehalt in sarkolemmalen Membranen

Die NDPK wurde in je 10µg sarkolemmaler Membran in einem Western Blot mit einem spezifischem Antikörper nachgewiesen und die Signale mit einem Fluores-MultImager ausgewertet.

C: Zeitverlauf der Isoprenalin-Wirkung auf die sarkolemmale NDPK

Nach Behandlung für 2, 4, 7 und 14 Tage mit Isoprenalin (2.4mg/kg) wurde die NDPK-Aktivität in je 0.3µg sarkolemmalem Protein gemessen.

D: Aktivität in cytosolischen und partikulären Fraktionen

Die NDPK-Aktivität wurde in je 0.3µg cytosolischer und partikulärer Fraktionen, der mit physiologischer Kochsalzlösung oder Isoprenalin (2.4mg/kg) behandelten Herzen, gemessen.

Zusammenfassend kam es in Herzen, die einer chronischen β -adrenergen Stimulation unterlagen, zur Ausbildung einer Hypertrophie, zur Reduktion der β -adrenergen Rezeptoren und zur Erhöhung der sarkolemmalen NDPK. Dies konnte durch einen inversen Agonisten unterbunden werden. Bei einer nicht- β -adrenerg ausgelösten Hypertrophie wurden keine Änderungen im Gehalt der β -adrenergen Rezeptoren und der sarkolemmalen NDPK beobachtet.

4.5 Co-Expression von NDPK und $G_s\alpha$ in einer immortalisierten neonatalen Herzmuskel-Zelllinie

4.5.1 Adenovirale Überexpression von nm23H2

Um erstmalig die Aktivierung von G-Proteinen durch die NDPK in einer intakten Zelle nachzuweisen, wurde die NDPK-Isoform nm23H2 mittels adenoviralem Gentransfer überexprimiert und der Einfluss auf die cAMP-Synthese untersucht.

Der NDPK-Gehalt in den transduzierten Zellen war deutlich höher als in Kontrollzellen oder in GFP-exprimierenden Zellen (Abbildung 27A). Dies spiegelte sich auch in einer 10-fach erhöhten NDPK-Aktivität der nm23H2-Zellen wieder (Abbildung 27B). Diese Überexpression hatte jedoch keine Auswirkung auf die cAMP-Synthese der Zellen (Abbildung 27C).

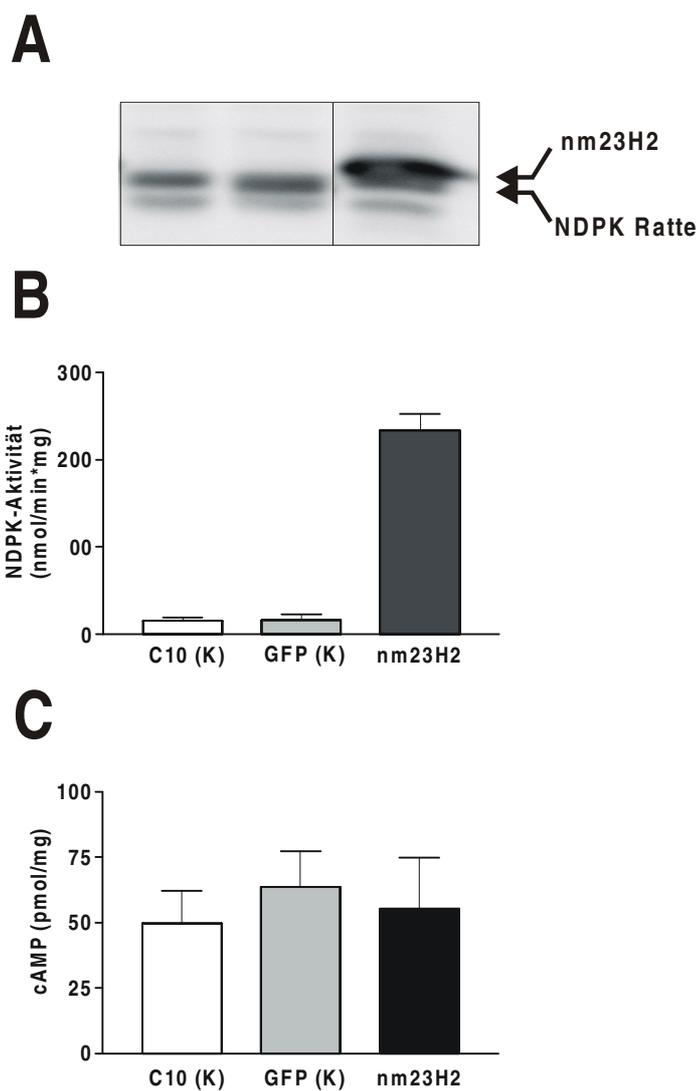


Abbildung 27: Adenovirale Überexpression von nm23H2

C10-Zellen wurden mit GFP- oder nm23H2-Adenoviren (je ca. 100 Viren/Zelle) für 48h transduziert. Im direkten Vergleich wurden untransduzierte C10-Zellen untersucht.

A: Überexpression von nm23H2

Die Überexpression von nm23H2 wurde in je 10µg Homogenat der transduzierten Zellen in einem Western Blot mit einem NDPK-spezifischem Antikörper nachgewiesen.

B: NDPK-Aktivität

Die NDPK-Aktivität wurde in je 1µg Homogenat (n=3) der transduzierten Zellen gemessen.

C: Intrazellulärer cAMP-Spiegel

Der cAMP-Spiegel der transduzierten Zellen wurde in einem EIA (n=9) gemessen und auf das Gesamtprotein bezogen.

4.5.2 Adenovirale Co-Expression von nm23H2 und $G_s\alpha$

Da die Überexpression von nm23H2 keinen Einfluss auf die cAMP-Synthese hatte wurde zusätzlich die α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins überexprimiert. $G_s\alpha$ alleine bewirkte eine signifikante ($p=0.0008$) Erhöhung der cAMP-Synthese um das ca. 24-fache. Die zusätzliche Überexpression von nm23H2 hatte keine weitere Erhöhung der cAMP-Synthese zur Folge (Abbildung 28).

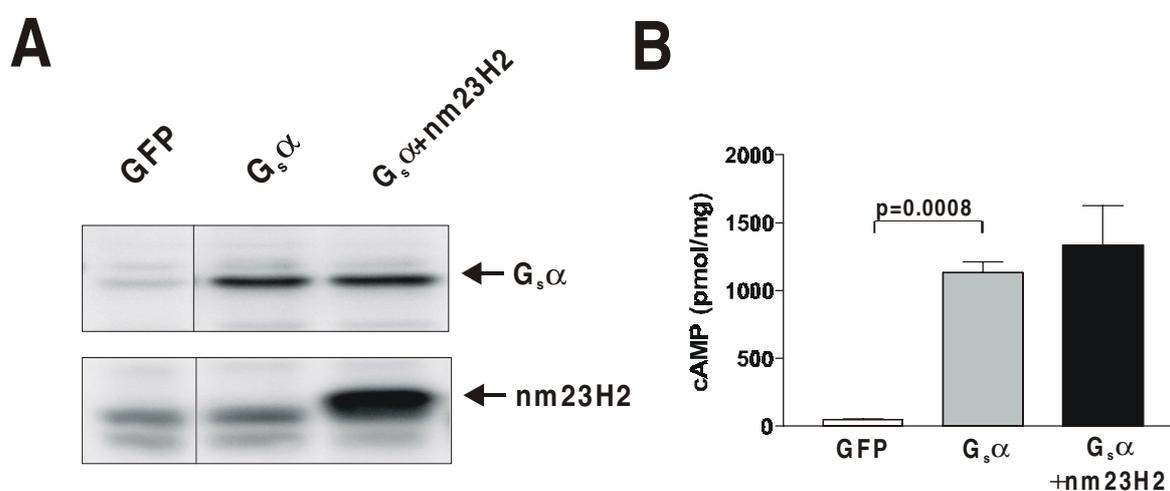


Abbildung 28: Kombinierten adenovirale Überexpression von $G_s\alpha$ und nm23H2

C10-Zellen wurden mit rekombinanten GFP-, $G_s\alpha$ - oder $G_s\alpha$ + nm23H2-Adenoviren (je 100 Viren/Zelle) für 48h transduziert ($n=4$).

A: Überexpression von $G_s\alpha$ und nm23H2

$G_s\alpha$ und nm23H2 wurden in je 10 μ g Homogenaten der transduzierten Zellen mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

B: cAMP-Spiegel

Der cAMP-Spiegel der transduzierten Zellen wurde in einem EIA gemessen und auf das Gesamtprotein bezogen.

Es stellte sich die Frage, warum die kombinierte, virale Überexpression beider Proteine zu keiner Änderung des cAMP-Spiegels führte. Eine Co-Immunpräzipitation von $G_s\alpha$ und $G\beta$ zeigte, dass es zur funktionellen Integration der überexprimierten α -Untereinheit gekommen war. In Zellen mit höherem $G_s\alpha$ -Gehalt wurde mehr $G\beta$ präzipitiert, als in Kontrollzellen (Abbildung 29)

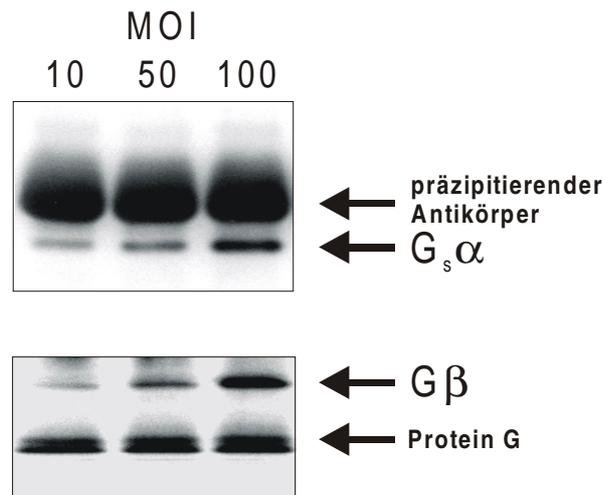


Abbildung 29: Co-Immunpräzipitation von G_sα und Gβ

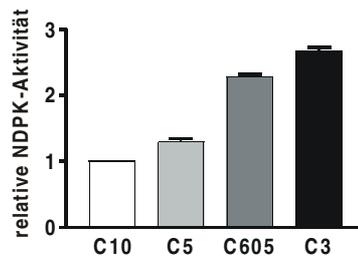
200µg solubiliertes Protein G_sα-überexprimierender Zellen (MOI=multiplicity of infection) wurden mit anti-G_s Antikörper (NEN) und Protein G-Sepharose inkubiert. G_sα und Gβ-Proteine wurden in einem anschließenden Western Blot Experiment mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen.

4.5.3 Adenovirale Überexpression von G_sα in stabilen m23H2-Zellklonen

Bislang ist nicht bekannt, wie die Membran-Bindung der NDPK vermittelt ist. Die chronische Stimulation β-adrenerger Rezeptoren von Rattenherzen hatte gezeigt, dass es sich bei der Erhöhung der sarkolemmalen NDPK um einen langsamen, mehrere Tage dauernden Vorgang handelt. Somit musste man die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass es während der 48h der Virustransduktion zu keiner Erhöhung der Membran-ständigen NDPK kommt und somit zu keiner funktionellen Interaktion mit den G-Proteinen. Aus diesem Grund wurden parallel zu den Co-Transduktionsexperimenten stabile, NDPK-überexprimierende C10-Zellklone konstruiert und diese mit G_sα-Virus in verschiedenen Dosen transduziert. Die Zellklone zeigten im Vergleich zur 10-fachen viralen Überexpression nur eine moderate, bis maximal 3-fache Überexpression der NDPK (Abbildung 30A). Die intrazellulären cAMP-Spiegel dieser Zellklone unterschieden sich nicht. Die zusätzliche Überexpression des stimulatorischen G-Proteins führte jedoch zu einer Erhöhung der cAMP-Synthese in Abhängigkeit der Expressionshöhen von G_sα und NDPK. Bei gleicher G_s-Expression war die Erhöhung der cAMP-Synthese streng proportional zur NDPK-Aktivität der Zellklone (Abbildung 30B). Die G-Protein-unabhängige Adenylyl Cyclase Aktivität war von der Höhe

der NDPK-Expression unbeeinflusst und somit nicht der Grund für die Erhöhung des cAMP-Synthese.

A



B

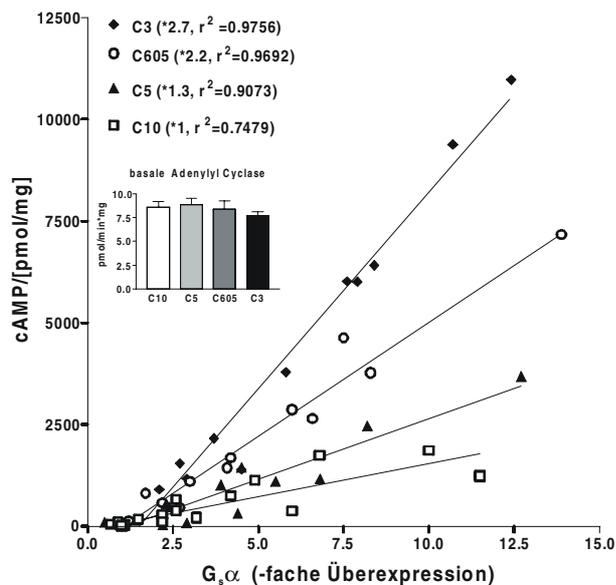


Abbildung 30: Transduktion stabiler nm23H2-Zellklone mit G_sα-Adenoviren

A: Relative NDPK-Aktivität

C10-Zellen wurden mit einem nm23H2-Expressionsvektor stabil transfiziert. Die NDPK-Aktivität von je 1µg Zellhomogenaten wurde bestimmt und relativ zu untransfizierten Zellen angegeben.

B: cAMP-Spiegel

In den stabil transfizierten Zellklonen wurde die basale Adenylyl Cyclase Aktivität gemessen (kleines Diagramm). Diese Zellklone wurden dann mit unterschiedlichen Dosen eines rekombinanten G_sα-Adenovirus transduziert und die cAMP-Spiegel gemessen.

Zusammenfassend fand eine NDPK-abhängige Regulation der G-Proteine nur statt, wenn das NDPK-Niveau der Zellen langfristig erhöht wurde. Die Überexpression von G_sα führte in

stabilen nm23H2-Zellklonen zu einer proportionalen Zunahme der cAMP-Synthese in Abhängigkeit vom Gehalt beider Proteine.

5. Diskussion

Die Nucleosid Diphosphat Kinasen (NDPK) sind Enzyme des Metabolismus, verantwortlich für die Phosphorylierung von Nucleosiddiphosphaten zu Nucleosidtriphosphaten. Sie galten lange Zeit als „Haushaltsenzyme“, die an der Synthese von Nucleinsäuren, Proteinen, komplexen Lipiden und Zuckern beteiligt sind (Parks und Argawal, 1973). Spätere Arbeiten wiesen aber zunehmend auf eine Beteiligung der NDPK bei der Regulation physiologischer und pathophysiologischer Prozesse hin. In den meisten Fällen sind jedoch die beteiligten Signalübertragungswege unbekannt.

5.1 NDPK - Ein Aktivator der G-Proteine?

Die NDPK wird seit etwa 20 Jahren als Aktivator GTP-bindender Proteine und somit als Komponente der Signaltransduktion diskutiert. Verschiedene Untersuchungen an aufbereiteten Zellen oder Geweben unter definierten experimentellen Bedingungen weisen auf eine Beteiligung der NDPK an der Regulation G-Protein gekoppelter Effektoren hin (Piacentini und Niroomand, 1996). Bislang ist es jedoch nicht gelungen den Mechanismus für die Aktivierung der G-Proteine durch die NDPK aufzuklären. Hieraus erwachsen zunehmend Zweifel gegenüber der Bedeutung dieser Signalübertragung in der Zelle (Otero, 2000).

Die vorliegende Arbeit beinhaltet Untersuchungen zur NDPK-abhängigen Aktivierung eines G-Protein gekoppelten Effektors in intakten Zellen. Durch unterschiedliche experimentelle Ansätze zur Überexpression der NDPK zeigt sich, dass für eine funktionelle Interaktion der NDPK mit $G_s\alpha$ eine längerfristige Erhöhung (mehrere Tage bis Wochen) des NDPK-Gehalts der Zellen notwendig ist. Zellen, deren NDPK- und $G_s\alpha$ -Gehalt durch adenoviralen Gentransfer transient erhöht werden, zeigen keinen Einfluss der NDPK auf die cAMP-Synthese. Im Gegensatz dazu steigt in Zellen, die stabil mit der NDPK-cDNA (nm23H2) transfiziert und anschließend mit einem $G_s\alpha$ -Adenovirus transduziert werden, die cAMP-Synthese proportional zur NDPK- und $G_s\alpha$ -Expression an. Das deutet darauf hin, dass noch andere Faktoren an der Aktivierung der G-Proteine durch die NDPK beteiligt sein müssen.

Diese Hypothese wird unterstützt durch den langsamen Anstieg der kardialen, sarkolemmalen NDPK bei chronischer β -adrenerger Stimulation von Ratten mit Isoprenalin. Dort kommt es

erst nach sieben Tagen zu einem messbaren Anstieg der NDPK um 20%. Wohingegen andere Arbeiten zeigen, dass unter vergleichbaren Bedingungen der $G_i\alpha$ -2-Gehalt bereits nach 4 Tagen um 45% erhöht ist (Müller *et al.*, 1994). Diese zeitliche Diskrepanz lässt sich unter der Annahme einer direkten gegenseitigen Regulation von NDPK und G-Proteinen nicht erklären.

Im wesentlichen stellt sich die Frage nach dem molekularen Mechanismus der G-Protein-Aktivierung durch die NDPK. HPLC-Messungen wiesen nach, dass es auch bei einer 2.7-fachen Überexpression der NDPK in C10-Zellen zu keinem Anstieg der intrazellulären GTP-Spiegel kommt (Lutz *et al.*, 2001b). Somit ist eine Erhöhung der GTP-Konzentration als Aktivierungsmechanismus für G-Proteine in diesen Versuchen ausgeschlossen. Phosphorylierungsstudien mit den stabil transfizierten C10-Zellklonen haben gezeigt, dass die Phosphorylierung eines 36kDa-Proteins in direktem Zusammenhang zur Expressionshöhe der NDPK-Isoform nm23H2 steht. Co-Präzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen die β -Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine beweisen, dass es sich bei dem phosphorylierten Protein um $G\beta$ handelt und dieses im Komplex mit nm23H2 präzipitiert. Co-Reinigungen von $G\beta$ und nm23H2 aus Gewebe zeigen ebenfalls, dass die Phosphorylierung von $G\beta$ durch nm23H2 vermittelt ist (Cuello *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von $G\beta$ führt durch einen Phosphattransfer an das in der inaktiven α -Untereinheit gebundene GDP zur Aktivierung des G-Proteins. Die Beteiligung phosphorylierter β -Untereinheiten an der Regulation G-Protein gekoppelter Effektoren ist mehrfach nachgewiesen (Wieland *et al.*, 1991; Pitcher *et al.*, 1992; Morris und Scarlata, 1997; Dascal, 2001).

5.2 NDPK - Ein pathogener Faktor der Herzinsuffizienz?

Ein molekulares Charakteristikum der Herzinsuffizienz ist die verminderte cAMP-Synthese. Daraus resultieren starke Einschränkungen der physiologischen Funktion des Herzens. Die Ansprechbarkeit auf β -adrenerge Stimulation ist reduziert und der Gehalt an gegensinnig wirkenden G_i -Proteinen ist erhöht. Diese Arbeit stellt zur Diskussion, ob die NDPK einen weiteren Beitrag zur geringeren cAMP-Synthese leistet und dadurch die Fehlregulation bei der Pathogenese der Herzinsuffizienz fördert.

In sarkolemmalen Membranen insuffizienter Herzen ist die NDPK um etwa 400% erhöht. Im Gegensatz zu vorhergehenden Untersuchungen an gesunden Hundeherzen (Niroomand *et al.*, 1997) bewirkt die NDPK hier keine Stimulation der Adenylyl Cyclase-Aktivität, sondern eine Inhibition um 50-75%. Ein Vergleich der Dichte der G-Proteine zeigt in guter Übereinstimmung mit anderen Arbeiten, eine erhöhte Expression der inhibitorischen G-Proteine um ca. 40% (Feldman *et al.*, 1988; Feldman *et al.*, 1989; Bohm *et al.*, 1994; Eschenhagen *et al.*, 1992) und keine Veränderung im Gehalt der stimulatorischen G-Proteine (Feldman *et al.*, 1988; Eschenhagen *et al.*, 1992). Es gibt keine Hinweise, dass die NDPK eine Spezifität für die Aktivierung eines bestimmten G-Proteins aufweist. Das Zusammenspiel aus erhöhter sarkolemmaler NDPK und erhöhtem inhibitorischen G-Protein bietet somit eine plausible Erklärung für die geringere Adenylyl Cyclase-Aktivität im insuffizienten Herzen. Bei Herzinsuffizienz-Patienten, die mit einem β -Blocker behandelt waren, findet man nur eine geringfügige Zunahme der sarkolemmalen NDPK gegenüber gesunden Herzen. In diesen Membranen zeigt sich auch keine NDPK-abhängige Hemmung der cAMP-Synthese.

Die sarkolemmale NDPK erfährt durch die Behandlung der Herzinsuffizienz-Patienten mit unterschiedlichen β -Blockern eine einheitliche Regulation, dh. sie wird unabhängig vom β -Blocker reduziert. Im Gegensatz dazu ist die Regulation der β -adrenergen Rezeptoren abhängig von der Wahl des β -Blockers. Frühere Arbeiten konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass es durch die Therapie mit Metoprolol zu einer Erhöhung der Dichte der β -adrenerger Rezeptoren kam, wohingegen Carvedilol eine Reduktion der Rezeptoren bewirkte (Heilbrunn *et al.* 1989; Sigmund *et al.* 1996; Yoshikawa *et al.*, 1996). In den untersuchten Membranen ist auch kein Einfluss der β -Blocker auf die Expression der verschiedenen G-Protein-Untereinheiten und der β -ARK1 nachweisbar. Die sarkolemmale NDPK ist somit das einzige der untersuchten Proteine, das eine unidirektionale Regulation durch verschiedene β -Blocker erfährt. Seine Relevanz für die Pathogenese und Behandlung der Herzinsuffizienz wird dadurch belegt.

Tierexperimente bestätigten den engen Zusammenhang zwischen der Regulation der sarkolemmalen NDPK und der Stimulation bzw. Blockierung der β -adrenergen Signalkaskade bei der Pathogenese der Herzmuskel-Hypertrophie. Dass die Erhöhung der sarkolemmalen NDPK kein unspezifischer, durch Hypertrophie-ausgelöster Effekt ist zeigt die Behandlung von Tieren mit dem Schilddrüsenhormon T3 (Trijodothyronin). Dies bewirkt ebenfalls eine

Herzmuskelhypertrophie, aber eine Reduktion der sarkolemmalen NDPK.. Untersuchungen an Zellen hatten ergeben, dass T3 die Expression der NDPK Isoform nm23H1 senkte (Lin *et al.*, 2000). Neuere Arbeiten zeigen, dass nm23H1 einen Anteil von etwa 20% an der Gesamt-NDPK im Herzen hat und somit die geringe Abnahme plausibel erklärt.

5.3 Erhöhte Expression oder Translokation der sarkolemmalen NDPK?

Im Gegensatz zur sarkolemmalen NDPK ist der Gehalt und die Aktivität der Gesamt-NDPK in den Homogenaten humaner insuffizienter Herzen und chronisch Isoprenalin-stimulierter Rattenherzen unverändert. Homogenate beinhalten zwar sarkolemmale Membranen, aber deren Anteil ist sehr gering, so dass sich eine Erhöhung der sarkolemmalen NDPK nicht in einer Erhöhung der Gesamt-NDPK widerspiegeln muss. Aufgrund der hohen Homologie der verschiedenen Isoformen und ihrer ähnlichen Molekulargewichte konnte die genaue Zusammensetzung der NDPK-Hexamere in den einzelnen Kompartimenten zunächst nicht untersucht werden. Der, in dieser Arbeit, verwendete Antikörper erkennt mindestens drei Isoformen (nm23H1, nm23H2 und DR-nm23) mit unterschiedlicher Affinität. Spätere Experimente mit Isoform-spezifischen Antikörpern zeigen, dass die sarkolemmale NDPK sich zumindest aus nm23H1, nm23H2 und DR-nm23 zusammensetzt. Im insuffizienten Herzen wird eine Erhöhung aller drei Isoformen beobachtet. Die cytosolische NDPK besteht hauptsächlich aus nm23H2. nm23H1 besitzt einen wesentlich geringeren Anteil und DR-nm23 ist durch den verwendeten Antikörper nicht oder nur äußerst schwierig nachweisbar. Im Herzen ist DR-nm23 somit fast ausschließlich im Sarkolemm lokalisiert.

DR-nm23 weist am N-terminalen Ende eine, aus 17 Aminosäuren bestehende, zusätzliche Sequenz auf. Diese beinhaltet viele hydrophobe Aminosäuren, die möglicherweise für eine Membran-Bindung verantwortlich sind (Venturelli *et al.*, 1995). Experimente mit gereinigten Isoformen haben gezeigt, dass DR-nm23 in der Lage ist mit anderen Isoformen Komplexe zu bilden (Erent *et al.*, 2001). Co-Immunpräzipitationen aus homogenisierten Zellen bestätigten die Interaktion zwischen überexprimiertem DR-nm23 und endogenem nm23H1/nm23H2 (Negroni *et al.*, 2000). Die Erhöhung der sarkolemmalen NDPK in den humanen insuffizienten Herzen könnte somit auf eine erhöhte Expression der NDPK-Isoform DR-nm23 beruhen, die eine Translokation von nm23H1 und nm23H2 an die Membran bewirkte.

5.4 Ausblick

Diese Arbeit verdeutlicht, dass es sich bei der NDPK nicht nur um ein ubiquitäres „Haushaltsenzym“ handelt, sondern um eine Proteinfamilie, die einer komplexen Regulation und Verteilung unterliegt und deren Mitglieder wichtige Funktionen in der Physiologie der Zelle einnehmen. Sie geraten zunehmend ins Blickfeld bei Untersuchungen von Signalübertragungen, deren Fehlregulationen zu schweren Krankheiten führen.

Um die Bedeutung der NDPK für die Physiologie und Pathophysiologie der Zelle zu untermauern, müssen zukünftige Untersuchungen die NDPK-abhängige Regulationen anderer G-Proteine und des zugrunde liegenden molekularen Mechanismus mit einschließen. Darüber hinaus ist es für das Verständnis dieses Signalübertragungsweges wichtig, die Rolle von DR-m23 für die Plasmamembran-Bindung näher zu definieren. Die gezielte Manipulation der Membran-ständigen NDPK ist die Grundlage für zukünftige Therapien von Krankheiten, die mit einer veränderten Regulation der NDPK assoziiert sind.

6. Zusammenfassung

Diese Arbeit hatte zum Ziel, die NDPK-abhängige Aktivierung von G-Proteinen und deren Effektoren nachzuweisen und ihre Rolle in der Herzinsuffizienz zu untersuchen.

Dazu wurden immortalisierte neonatale Rattenherzmuskelzellen mit NDPK (nm23H2) stabil transfiziert. Die generierten Zellklone zeigten eine unterschiedliche, bis zu 2.7-fach erhöhte NDPK-Expression, jedoch keine nachweisbaren Unterschiede in der cAMP-Synthese. In diesen Zellen wurde eine Überexpression der α -Untereinheit des stimulatorischen G-Proteins ($G_s\alpha$) mit rekombinanten Adenoviren induziert. Dies bewirkte in allen Zellen einen Anstieg der cAMP-Synthese, selbst in Gegenwart eines inversen Agonisten β -adrenerger Rezeptoren. Dieser Anstieg war in allen untersuchten Zellklonen streng proportional zur NDPK-Aktivität. In Zellen mit 2.7-facher NDPK-Überexpression war, bei gleicher $G_s\alpha$ -Überexpression, die cAMP-Synthese 7-fach gegenüber Zellen ohne NDPK-Überexpression gesteigert. Die basale, G-Protein-unabhängige Adenylyl Cyclase-Aktivität aller Zellklone zeigte dagegen keine signifikanten Unterschiede.

Um die NDPK-abhängige G-Protein-Aktivierung im Herzen zu untersuchen, wurden die Aktivitäten und der Gehalt der NDPK in verschiedenen Zellfraktionen von terminal insuffizienten Herzen und gesunden Kontrollherzen verglichen. Die Sarkolemm-gebundene NDPK war in den linken und rechten Ventrikeln insuffizienter Herzen um 400% erhöht. Durch Aktivierung der ebenfalls im Gehalt erhöhten inhibitorischen G-Proteine bewirkte die NDPK *in vitro* eine Hemmung der Adenylyl Cyclase-Aktivität um 50-75%. Im Gegensatz zur Membran-gebundenen NDPK, war die NDPK in den Cytosolen und den restlichen partikulären Fraktionen insuffizienter Herzen nicht verändert. In insuffizienten Herzen von Patienten, die mit einem β -adrenergen Antagonisten behandelt wurden, war die sarkolemmale NDPK kaum erhöht. Die NDPK-abhängige Adenylyl Cyclase-Aktivität war in diesen Herzen vergleichbar mit gesunden Kontrollen, obwohl auch hier der Gehalt der inhibitorischen G-Proteine erhöht war. Im Tierversuch bewirkte eine chronische Stimulation β -adrenerger Rezeptoren eine Zunahme der sarkolemmalen NDPK. Durch Blockierung der β -adrenergen Rezeptoren wurde die Zunahme verhindert.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Membran-gebundenen NDPK G-Proteine aktiviert und dadurch die cAMP-Synthese reguliert. In der Herzinsuffizienz kommt es zu einer

Zusammenfassung

Erhöhung des Enzyms an der sarkolemmale Membran und in Kombination mit den erhöht exprimierten G_i -Proteinen zu einer Inhibition der Adenylyl Cyclase-Aktivität. Die Erhöhung wird durch die β -adrenerge Signalübertragung gesteuert.

7. Literaturverzeichnis

- Akiyama SK. *Hum Cell*. 1996 **9(3)**:181-6. Review.
- Amendola R, Martinez R, Negroni A, Venturelli D, Tanno B, Calabretta B, Raschella G. *J Natl Cancer Inst*. 1997 **89(17)**:1300-10.
- Amendola R, Martinez R, Negroni A, Venturelli D, Tanno B, Calabretta B, Raschella G. *Med Pediatr Oncol*. 2001 **36(1)**: 93-6.
- Arkesteijn CL. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1976 **14(3)**:155-8.
- Backer JM, Mendola CE, Kovessi I, Fairhurst JL, O'Hara B, Eddy RL Jr., Shows TB, Mathew S, Murty VVVS and Changanti RSK. *Oncogene* 1993 **8**: 497-502
- Berberich SJ, Postel EH. *Oncogene* 1995 **9**:2699-2706.
- Biggs J, Hersperger E, Steeg PS, Liotta LA, Shearn A. *Cell*. 1990 **63(5)**: 933-40.
- Biggs J, Tripoulas N, Hersperger E, Dearolf C, Shearn A. *Genes Develop*. 1988 **2**: 1333-1343.
- Bohm M, Eschenhagen T, Gierschick P, Larisch K, Lensche H, *et al*. *J. Mol. Cell. Cardiol*. 1994 **26**: 133-149.
- Bohm M, Flesch M, Schnabeel P. *J. Mol. Med*. 1997 **75**: 842-848.
- Bristow MR, Minobe WA, Raynolds MV, Port JD, Rasmussen R. *J. Clin. Invest*. 1993 **92**: 2737-2745.
- Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W. *Circ. Res*. 1986 **59**: 297-309.
- Bristow RM. *Circulation* 2000 **101**: 558-569.
- Calderone A, Bouvier M, Li K, Juneau C, de Champlain J, Rouleau JL. *Circ. Res*. 1991 **69**: 332-343.
- Colomb MG, Cheruy A, Vignais PV. *Biochemistry* 1969 **8**: 1926-1939.
- Cuello F, Hippe HJ, Niroomand F, Wieland T. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2001 **363**, R57 abstract.
- Danner S, Frank M, Lohse MJ. *J. Biol. Chem*. 1998 **273**: 3223-3229.
- Dascal N. *Trends Endocrinol Metab*. 2001 **12(9)**:391-8. Review.

- De Lean A, Stadel JM, Lefkowitz RJ. *J. Biol. Chem.* 1980 **255**: 7108-7117.
- Emmelot P, Bos CJ, Benedetti EL, Rümke P. *Biochim. Biophys. Acta* 1964 **90**: 126-145.
- Erent M, Gonin P, Cherfils J, Tissier P, Raschella G, Giartosio A, Agou F, Sarger C, Lacombe ML, Konrad M, Lascu I. *Eur J Biochem.* 2001 **268(7)**:1972-81.
- Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Haverich A, Hirt S, Döring V, Kalmr P, Höppner W, Seitz Hj. *Circ. Res.* 1992 **70**: 688-696.
- Eschenhagen T, Mende U, Nose M, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Warnholz A.. *Mol. Pharmacol.* 1992 **42**: 773-783.
- Eschenhagen T, Mende U, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Sempell R,Warnholtz A, Wustel JM. *Eur Heart J.* 1991 **12 Suppl F**:127-31.
- Eschenhagen T. *Cell. Biol. Int.* 1993 **17**: 723-749.
- Fan TH, Liang CS, Kawashima S, Banerjee SP. *Eur. J. Pharmacol.* 1987 **140(2)**: 123-32
- Fan XT, Sherwood JI, Haslam RJ. *Biochem. J.* 1994 **299**: 701-709.
- Fedorcsak I, Natarajan AT, Ehrenberg L. *Eur. J. Biochem.* 1969 **10**:450-458.
- Feldman AM, Cates AE, Bristow MR, Van Dop C. J. *Mol. Cell. Cardiol.* 1989 **21**: 359-365.
- Feldman AM, Cates AE, Veazey WB, Hershberger RE, Bristow MR, *et al.* *J. Clin. Invest.*1988 **82**: 189-197.
- Ferguson SS, Downwy WE III, Colapietro AM, Barak LS, Menard L, Caron MG. *Science* 1996 **271**: 363-366.
- Freedman NJ, Liggett SB, Drachman DE, Pei G, Caron MG, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem.* 1995 **270(30)**: 17953-61.
- Geisbuhler T, Altschuld RA, Trewyn RW, Ansel AZ, Lamka K, Brierley GP. *Circ Res.* 1984 **54(5)**: 536-46.
- Giannessi D, Del Ry S, Vitale RL. *Pharmacol Res.* 2001 **43(2)**: 111-26. Review.
- Gilles AM, Presecan E, Vonica A and Lascu I. *J. Biol. Chem.* 1991 **266**: 8784-8789
- Gilman AG. *Annu. Rev. Biochem.* 1987 **56**: 615-649

- Gonin P, Xu Y, Milon L, Dabernat S, Morr M, Kumar R, Lacombe ML, Janin J, Lascu I. *Biochemistry* 1999 **38**: 7265-7272.
- Hadcock JR, Malbon CC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988 **85**: 5021-5025.
- Hadcock JR, Wang HY, Malbon CC. *J. Biol. Chem.* 1989 **264**: 19928-19933.
- Hama H, Almaula N, Lerner CG, Inouye S, Inouye M. *Gene* 1991 **105**: 31-36.
- Hartsough MT, Steeg PS. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000 **32**: 301-308.
- He TC, Zhou S, Da Costa LT, Yu J, Kinzler KW, Vogelstein B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998 **95**: 2509-2514.
- Heidbüchel H, Callewaert G, Vereecke J, Carmeliet E. *Pflugers Archive* 1993 **422**:316-324.
- Heibrunn SM *et al.* *Circulation* 1989 **79**: 483-490.
- Huang H, Colella S, Kurrer M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. *Cancer Res.* 2000 **60(24)**: 6868-74.
- Inglese J, Freedman NJ, Koch WJ, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem.* 1993 **268(32)**: 23735-8.
- Iwase M, Bishop SP, Uechi M, Vatner DE, Shannon RP, *et al.*, *Circ. Res.* 1996 **78**: 517-524.
- Iwase M, Uechi M, Vatner DE, Asai K, Shannon RP, *et al.* *Am. J. Physiol.* 1997 **272**: H585-589.
- Izumiya H, Yamamoto M. *J. Biol. Chem.* 1995 **270**: 27859-27864.
- Jakobs KH, Wieland T. *Eur. J. Biochem.* 1989 **183**: 115-121.
- Janin J, Dumas C, Morera S, Xu Y, Meyer P, Chiadmi M, Cherfils J. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000 **32**: 215-225.
- Ji L, Arcinas M, Boxer LM. *J. Biol. Chem.* 1995 **270**: 13392-13398.
- Jones LR, Maddock SW, Besch HR, Jr. *J. Biol. Chem.* 1980 **255**: 9971-9980.
- Jones LR. *Methods Enzymol* 1988 **157**: 1983-1989.
- Jong AY, Ma JJ. *Arch Biochem Biophys.* 1991 **291(2)**: 241-6.
- Kaumann AJ. *Trends Pharmacol Sci.* 1997 **18(3)**: 70-6. Review.
- Khandjian EW. *Mol Biol Rep.* 1986;**11(2)**:107-15.

- Kikkawa S, Takahashi K, Takahashi KI, Shimada N, UI M, Kimura N, Katada T. *J. Biol. Chem.* 1990 **258**: 21536-21540.
- Kimura, N. *Handbook of experimental pharmacology*. 1993 **108**: 485-498. Springer-Verlag, Berlin
- Kimura N, Shimada N. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985 **131(1)**: 199-206.
- Kimura N, Shimada N. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986 **134(2)**: 928-36.
- Kimura N, Shimada N. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990 **151**: 248-256.
- Kimura N, Shimada N. *J. Biol. Chem.* 1983 **258**: 2278-2283.
- Kimura N, Shimada N. *J. Biol. Chem.* 1988 **263**: 4647-4653.
- Kiuchi K, Shannon RP, Komamura K, Cohen DJ, Bianchi C, *et al.* *J. Clin. Invest.* 1993 **91**: 907-914.
- Kleinecke J, Duls C, Soling HD. *FEBS Lett.* 1979 **107**: 197-202.
- Klinker JF, Seifert R. *Eur. J. Biochem.* 1999 **261**: 72-80.
- Klug A. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 **758**:143-60. Review.
- Koch WJ, Inglese J, Stone WC, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem.* 1993 **268(11)**: 8256-60.
- Koch WJ, Hawes BE, Inglese J, Luttrell LM, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem.* 1994 **269(8)**: 6193-7.
- Koch WJ, Rockman HA, Samama P, Hamilton RA, Bond RA, Milano CA, Lefkowitz RJ. *Science.* 1995 **268(5215)**: 1350-3.
- Kraeft SK, Traincart F, Mesnildrey S, Bourdais J, Veron M, Chen LB. *Exp. Cell Res.* 1996 **227**: 63-69.
- Krüger K, Daaka Y, Pitcher J, Lefkowitz R. *J. Biol. Chem.* 1997 **272**: 5-8.
- Krupinski J, Lehman TC, Frankenfield CD, Zwaagstra JC, Watson PA. *J. Biol. Chem.* 1992 **267**: 24858-24862.
- Krupnick JG, Benovic JL. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998 **38**: 289-319. Review.
- Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. *Circ Res.* 1997 **81(4)**: 627-35.
- Kunapuli P, Onorato JJ, Hosey MM, Benovic JL. *J Biol Chem.* 1994 **269(2)**: 1099-105.
- Laemmli UK. T4. *Nature* 1970 **227**: 680-685.

- Lascu I, Gonin P. *J. Bioenerg. Biomembr.* 2000 **32**: 237-246.
- Lefkowitz RJ. *Cell* 1993 **74**: 409-412.
- Lin KH, Shieh HY, Hsu HC. *Endocrinology.* 2000 **141(7)**: 2540-7.
- Liotta LA, Steeg PS. *J Natl Cancer Inst.* 1990 **82(14)**: 1170-2.
- Liu B, Pedigo NG, Zhang H, Drake P, Postel EH, Kaetzel DM. *Proc. 3rd Intern. Congr. Genet. Biochem. Physiol. nm23/NDPK*, University of Bordeaux 2, France 20-22 Sep. 1999 Absh. T15
- Lu Q, Zhang X, Almaula N, Mathews CK, Inouye M. *J. Mol. Biol.* 1995 **254**: 144-149.
- Lutz S, Mura R, Baltus D, Movsesian M, Kubler W, Niroomand F. *Cardiovasc Res.* 2001a **49(1)**: 48-55.
- Lutz S, Hippe HJ, Vogt A, Eschenhagen T und Niroomand F. *Zeitschrift für Kardiologie* 2001b **90 (Abstr. Suppl.):** S2
- Lutz S, Baltus D, Jakobs KH and Niroomand F. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2001c DOI 10.1007/s00210-001-0500-3 (Online First Publication)
- Martinez R, Venturelli D, Perrotti D, Veronese ML, Kastury K, Druck T, Huebner K, Calabretta B. *Cancer Res.* 1997 **57(6)**: 1180-7.
- Marzo KP, Frey MJ, Wilson JR, Liang BT, Manning DR, Lanoce V, Molinoff PB. *Circ Res.* 1991 **69(6)**: 1546-56.
- McDonnell MW, Simon MN, Studier FW. *J. Mol. Biol.* 1977 **110**: 119-146.
- Mehus JG, Deloukas P, Lambeth, DO. *Hum. Genet.* 1999 **104**: 454-459.
- Melki R, Lascu I, Carlier MF, Veron M. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992 **187(1)**: 65-72.
- Mende U, Eschenhagen T, Geertz B, Schmitz W, Scholz H, Schulte am Esch J, Sempell R, Steinfath M. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1992 **345(1)**: 44-50.
- Milon L, Meyer P, Chiadmi M, Munier A, Johansson M, Karlsson A, Lascu I, Capeau J, Janin J, Lacombe ML. *J. Biol. Chem.* 2000 **275**: 14264-14272.
- Milon L, Rousseau-Merck MF, Munier A, Erent M, Lascu I, Capeau J, Lacombe ML. *Hum Genet.* 1997 **99(4)**: 550-7.
- Molenaar P, Sarsero D, Kaumann AJ. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 1997 **24**: 647-656.
- Monteith MS, Wang T, Brown MJ. *Clin Sci (Lond).* 1995 **89(5)**: 487-95.

- Morris AJ, Scarlata S. *Biochem Pharmacol.* 1997 **54(4)**: 429-35. Review.
- Müller FU, Boheler KR, Eschenhagen T, Schmitz W, Scholz H. *Circ. Res.* 1993 **72**: 696-700.
- Muller FU, Eschenhagen T, Reidemeister A, Schmitz W, Scholz H. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1994 **(7)**: 869-75
- Mullis K, Faloon F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 1986 **1**: 263-273.
- Munier A, Feral C, Milon L, Pinon VP, Gyapay G, Capeau J, Guellaen G, Lacombe ML. *FEBS Lett.* 1998 **434**: 289-294.
- Negroni A, Venturelli D, Tanno B, Amendola R, Ransac S, Cesi V, Calabretta B, Raschella G. *Cell Death Differ.* 2000 **7(9)**: 843-50.
- Niroomand F, Mura R, Jakobs KH, Rauch B, Kübler W. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997 **29**: 1479-1486.
- Okabe-Kado J, Kasukabe T, Honma Y, Hayashi M, Henzel WJ, Hozumi M. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992 **182(3)**: 987-994.
- Okabe-Kado J, Kasukabe T, Hozumi M, Honma Y, Kimura N, Baba H, Urano T, Shiku H. *FEBS Lett.* 1995 **24**: 311-315.
- Orlov NY, Orlova TG, Nomura K, Hanai N, und Kimura N. *FEBS Lett.* 1996 **389**: 186-190.
- Orlov NY, Kimura N. *Biochemistry (Mosc)* 1998 **63(2)**: 171-179
- Otero, A. D. *Biochem.Pharmacol.* 1990 **39**, 1399-1404.
- Otero AS, Breitwieser GE, Szabo G. *Science* 1988 **242**: 443-445.
- Otero AS., Xu L, Ni Y, Szabo G. *J. Biol. Chem.* 1998 **273**: 28868-28872.
- Otero AS. *J Bioenergetics Biomembranes* 2000 **32(3)**: 269-275.
- Parks RE, Agarwal RP. *Enzymes* 1973 **8**: 307-334.
- Paulus WJ. *Eur J Heart Fail.* 1999 **1(4)**: 309-12. Review.
- Penn RB, Benovic JL. *J Biol Chem.* 1994 **269(21)**: 14924-30.
- Piacentini L, Niroomand F. *Mol. Cell. Biochem.* 1996 **157**: 59-63.

- Ping P, Hammond HK. *Am. J. Physiol.* 1994 **267**: H2079-2085.
- Ping P, Gelzer-Bell R, Roth DA, Kiel D, Insel PA, Hammond HK. *J Clin Invest.* 1995 **95(3)**: 1271-80.
- Ping P, Anzai T, Gao M, Hammond HK. *Am J Physiol.* 1997 **273(2 Pt 2)**: H707-17.
- Pinon VP, Millot G, Munier A, Vassy J, Linares-Cruz G, Capeau J, Calvo F, Lacombe ML. *Exp Cell Res.* 1999 **246(2)**: 355-67.
- Pippig S, Andexinger S, Lohse MJ. *Mol. Pharmacol.* 1995 **47**: 666-676.
- Pitcher JA, Inglese J, Higgins JB, Arriza JL, Casey PJ, Kim C, Benovic JL, Kwatra MM, Caron MG, Lefkowitz RJ. *Science.* 1992 **257(5074)**: 1264-7.
- Post SR, Hammond KH, Insel PA. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999 **39**: 343-360.
- Postel EH, Berberich SJ, Flint SJ, Ferrone CA. *Science* 1993 **261**: 478-480.
- Postel EH, Ferrone CA. *J. Biol. Chem.* 1994 **269**: 8627-8630.
- Postel EH, Flint SJ, Kessler DJ, Hogan ME. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991 **88**: 8227-8231.
- Postel EH, Mango SE, Flint SJ. *Mol. Cell. Biol.* 1989 **9**: 5123-5133.
- Postel EH, Weiss VH, Beneken J, Kirtane A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996 **93**: 6892-6897.
- Postel EH. *J. Biol. Chem.* 1999 **274**: 22821-22829.
- Postel EH, Berberich SJ, Rooney JW, Kaetzel DM. *J Bioenerg. Biomembr.* 2000 **32(3)**: 277-84.
- Randazzo P, Northup J, Kahn R. *Science* 1991 **254**: 850-853.
- Randazzo PA, Northup JK, Kahn RA. *J. Biol. Chem.* 1992 **267**: 18182-18189.
- Rooney JW, Postel EH, Calame K. *Proc. 3rd Intern. Congr. Genet. Biochem. Physiol. nm23/NDPK*, University of Bordeaux 2, France 20-22 Sep. 1999 Absh. T15
- Rosengard AM, Krutzsch HC, Shearn A, Biggs JR, Barker E, Margulies IM, King CR, Liotta LA, Steeg PS. *Nature.* 1989 **342(6246)**: 177-80.
- Roymans D, Vissenberg K, De Jonghe C, Willems R, Engler G, Kimura N, Grobden B, Claes P, Verbelen JP, Van Broeckhoven C, Slegers H. *Exp Cell Res.* 2001 **262(2)**: 145-53.

- Roymans D, Willems R, Vissenberg K, De Jonghe C, Grobben B, Claes P, Lascu I, Van Bockstaele D, Verbelen JP, Van Broeckhoven C, Slegers H. *Exp Cell Res.* 2000 Nov **261(1)**: 127-38.
- Ruggieri R, McCormick F. *Nature.* 1991 **353(6343)**: 390-1.
- Saiki RK: Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. *Science* 1988 **239**: 487-491.
- Samama P, Cotecchia S, Costa T, Lefkowitz RJ. *J Biol Chem.* 1993 **268(7)**: 4625-36.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual *Cold Spring Harbor Laboratory Press* 1989.
- Schaertl S, Konrad M, Geeves MA. *J. Biol. Chem.* 1998 **273**: 5662-5669.
- Schnee JM, Hsueh WA. *Cardiovasc Res.* 2000 **46(2)**: 264-8. Review.
- Schneider B, Xu YW, Janin J, Veron M, Deville-Bonne D. *J Biol Chem.* 1998 **273(44)**: 28773-8.
- Seifert R, Rosenthal W, Schultz G, Wieland T, Gierschick P, Jakobs KH. *Eur. J. Biochem.* 1988 **175**: 51-55.
- Sigmund M, *et al.* *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1996 **51**, 127-132.
- Southern EM. *J. Mol. Biol.* 1975 **98**: 503-517.
- Southern EM. *Anal. Biochem.* 1979 319-323.
- Sprang SR. *Annu Rev Biochem.* 1997 **66**: 639-78. Review.
- Stahl JA, Leone A, Rosengard AM, Porter L, King CR, Steeg PS. *Cancer Res.* 1991 **51**: 445-449.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L, Thorgeirsson UP, Talmadge JE, Liotta LA, Sobel ME. *J Natl Cancer Inst.* 1988 **80(3)**: 200-4.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Pozzatti R, Liotta LA, Sobel ME. *Cancer Res.* 1988 **48(22)**: 6550-4.
- Steeg PS, Bevilacqua G, Sobel ME, Liotta LA. *Basic Life Sci.* 1991 **57**: 355-60; discussion 360-1.
- Towbin H, Staehlin T, Gordon J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979 **76**: 4350-4354.
- Ungerer M, Böhm M, Elce JS, Erdmann E., Lohse MJ. *Circulation* 1993 **87**: 454-463.
- Venturelli D, Martinez R, Melotti P, Casella I, Peschle C, Cucco C, Spampinato G, Darzynkiewicz Z, Calabretta B. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995 **92(16)**: 7435-9.

- Venturelli D, Cesi V, Ransac S, Engelhard A, Perrotti D, Calabretta B. *Exp Cell Res.* 2000 **257(2)**: 265-71.
- Wallet V, Mutzel R, Troll H, Barzu O, Wurster B, Veron M, Lacombe ML. *J. Natl. Cancer Inst.* 1990 **82**: 1199-1202.
- Wieland T, Nürnberg B, Ulibarri I, Kaldensberg-Stasch S, Schultz G, Jakobs KH. *J. Biol. Chem.* 1993 **268**: 18111-18118.
- Wieland T, Ronzani M, Jakobs KH. *J. Biol. Chem.* 1992 **267**: 20791-20797.
- Wieland T; Ulibarri I, Gierschick P, Jakobs KH. *Eur. J. Biochem.* 1991 **196**: 707-716.
- Yoshikawa T, Port JD, Asano K, Chidiak P, Bouvier M, Dutcher D, Roden RL, Minobe W, Trammel KD, Bristow MR. *Eur. Heart J.* 1996 **17 (suppl B)**: B8-B16.
- Zhang X, Lu Q, Inouye M, Mathews CK. *J. Bacteriol.* 1996 **178**: 4115-4121.
- Zhu J, Tseng YH, Kantor JD, Rhodes CJ, Zetter BR, Moyers JS, Kahn CR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999 **96**: 14911-14918.
- Zierhut W und Zimmer HG. *Basic Res Cardiol.* 1989 **84(4)**: 359-70.
- The Cardiac Insufficiency Bisoprolol Study II (CIBIS-II): a randomised trial. *Lancet* 1999 **353**: 9-13.
- Effect of metoprolol CR/XL in chronic heart failure: Metoprolol CR/XL Randomised Intervention Trial in Congestive Heart Failure (MERIT-HF). *Lancet* 1999 **353**: 2001-2007 (1999).
- Primary results of COPERNICUS, a pivotal landmark study (Carvedilol Prospective Randomised Cumulative Survival Trial). *Cardiovasc J S Afr.* 2001 **12(1)**: 57.

8. Danksagung

Ich möchte mich herzlichst bedanken bei PD Dr. Feraydoon Niroomand. Er hat diese Arbeit ermöglicht, hat mich gefördert und inspiriert. Seine Kompetenz und sein Enthusiasmus trugen entscheidend zu dieser Arbeit bei. Ich danke Ihm für seine Geduld mit einer unerfahrenen Doktorandin und seine wissenschaftliche Ungeduld!

Weiterhin möchte ich mich bedanken bei meinem Gutachter Prof. Dr. Brunner und meinem Prüfungsvorsitzenden Prof. Dr. Dobberstein. Sie haben mir die Dissertation an der Fakultät für Biologie der Universität Heidelberg erst ermöglicht.

Mein spezieller Dank geht an Frau Doris Baltus, die alle Höhen und Tiefen mit mir geteilt hat. Eine bessere Unterstützung kann man sich nicht wünschen!

Ich danke allen meinen Kollegen und den Mitarbeitern des Institut für die kollegiale Zusammenarbeit!

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Freund Martin. Er hat mich immer unterstützt und vor allem ertragen!

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern, denen diese Arbeit gewidmet ist.

