Charakterisierung des Guaninnukleotid-Austauschfaktors p63RhoGEF als neuen Mediator der $G\alpha_{q/11}$-induzierten RhoA-Aktivierung

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät

der

Ruprecht-Karls-Universität

Heidelberg

vorgelegt von

Diplom-Biologin Christiane Vettel

aus Bensheim

April 2009

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Hilgenfeldt

Tag der mündlichen Prüfung:

Für meine Familie und Freunde

I.Inhaltsverzeichnis

I.Inhaltsverzeichnis I

II. Abbildungsverzeichnis V

III. Tabellenverzeichnis VIII

IV. Abkürzungsverzeichnis IX

1. Zusammenfassung 1

2. Summary 2

3. Einleitung 3

3.1 Monomere GTPasen 3

3.1.1 Struktur und Funktion der GTPase-Domäne 3

3.1.2 Lipidmodifikation der monomeren GTPasen 4

3.1.3 RhoGTPasen 5

3.1.4 Funktion von RhoGTPasen 6

3.2 RhoGEFs-Die Dbl-Familie 8

3.2.1 p115RhoGEF-Familie 9

3.2.2 p63RhoGEF 10

3.3 Heterotrimere G-Proteine 10

3.3.1 Effektoren heterotrimerer G-Proteine 12

3.3.2 Regulators of G-Protein Signaling (RGS) 13

3.4 GPCRs 14

3.5 Kardiale Hypertrophie 15

3.5.1 $G\alpha_{q/11}$ in der kardialen Hypertrophie 15

3.5.2 RhoA und Rac1 in der kardialen Hypertrophie 16

3.5.3 Kardiale Fibroblasten 18

3.6 Zielsetzungen der Arbeit 18

4. Material und Methoden 20

4.1 Material 20

4.1.1 Tiere 20

4.1.2 Chemikalien 20

4.1.3 Feinchemikalien 20

4.1.4 Radiochemikalien 21

4.1.5 Antikörper 21
4.1.6 Enzyme 22
4.1.7 Genspezifische Primer 22
4.1.8 siRNA-Sequenzen und DNA-Oligonukleotid-Matrizen für Haarnadelschleifen-shRNA 24
4.1.9 Plasmide 25
4.1.10 Klonierungen 26
4.1.10.1 Schematische Darstellung der Klonierung von LARG-ΔPDZ 26
4.1.11 Adenoviren 26
4.1.12 Bakterien 26
4.1.13 Zellkultur 27
4.1.14 Transfektionsreagenzien 27
4.1.15 Verbrauchsmaterialien 27
4.1.16 Sonstige Materialien 27
4.1.17 Geräte 27

4.2 Puffer und Nährmedien 28
4.2.1 Puffer für molekularbiologische Methoden 28
4.2.2 Puffer für proteinbiochemische Methoden 29
4.2.3 Medien für die Zellkultur und Bakterienzucht 30
4.2.4 Puffer zur Isolierung von Primärzellen 32

4.3 Molekularbiologische Methoden 32
4.3.1 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli* 32
4.3.2 DNA-Fällung 32
4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen 32
4.3.4 DNA-Gelelektrophorese 33
4.3.5 DNA-Sequenzierung 33
4.3.6 Restriktion von DNA mit Endonukleasen 33
4.3.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden 34
4.3.8 Enzymatische Verlängerung von DNA-Enden 34
4.3.9 Verknüpfung von DNA-Molekülen mit der T4-DNA-Ligase 34
4.3.10 Transformation von Bakterien 34
4.3.11 Kryokonservierung von Bakterien 35
4.3.12 PCR 35
4.3.13 Mutagenese 36
4.3.14 Herstellung rekombinanter Adenoviren 36
4.3.15 Klonierung des Haarnadelschleifen-shRNA-Inserts in einen Expressionsvektor (pAdTrack-shRNA) 39

4.4 Proteinbiochemische Methoden 40
4.4.1 Proteingewinnung und Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 40
4.4.2 Protein-Konzentrationsbestimmung 40
4.4.3 SDS-PAGE 40
4.4.4 Western Blot 40
4.4.5 Ko- bzw. Immunopräzipitation (IP) 41
4.4.6 Pulldown-Assay 41
4.5 Zellbiologische Methoden 43
4.5.1 Verwendete permanente Zelllinien bzw. Primärzellen 43
4.5.2 Passagieren von Zellkulturen 43
4.5.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen 44
4.5.4 Transiente Transfektion von Zelllinien 44
4.5.5 Adenovirale Infektion von Primärzellen 45
4.5.6 SRF/SRE-Luziferase-Assay in HEK-Zellen 45
4.5.7 Luziferase-Assay in NRCM 45
4.5.8 Färbung des Aktin-Zytoskeletts 46
4.5.9 GFP-Expressionsassay 46
4.5.10 ^{3}[H]-Leucin-Einbau 46
4.5.11 Bestimmung der Apoptoserate in NRCM 47
4.5.12 Zytotoxizität-Assay 47
4.5.13 Isolierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten und kadialen Fibroblasten 47
5. Ergebnisse 49
1. Teil 49
5.1 p63RhoGEF als Mediator der $G\alpha_{q/11}$-vermittelten RhoA-Aktivierung 49
5.1.1 Vergleich von p63RhoGEF und LARG in der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine 49
5.1.2 Charakterisierung der Interaktionsstelle zwischen $G\alpha_q$ und p63RhoGEF durch Mutationsanalyse 60
5.1.3 Verifizierung der Interaktionsoberflächen von p63RhoGEF und $G\alpha_q$ mittels Punktmutation 64
5.1.4 Analyse der $G\alpha_q$-abhängigen Aktivierung der beiden p63RhoGEF-Homologe Duet und Trio 66
5.1.5 Das *C.elegans* Ortholog von Trio (Unc73) in der $G\alpha_q$-vermittelten Signaltransduktion 71

2. Teil 75

5.2 Charakterisierung der GPCR-vermittelten RhoGTPase-Aktivierung in kardialen Primärzellen 75

5.2.1 Analyse der endogenen RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten 76

5.2.2 Expression von p63RhoGEF in kardialem Gewebe 78

5.2.3 Charakterisierung der p63RhoGEF-abhängigen RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten 78

5.2.3 Untersuchung zur Beteiligung von RhoA und Rac1 an der Ausbildung hypertropher Reaktionen in Kardiomyozyten 82

5.2.4 Analyse der endogenen Rac1-Aktivierung in Kardiomyozyten 89

5.2.5 Zytotoxizität der verwendeten Agonisten und Inhibitoren 89

5.2.7 Analyse der endogenen RhoA-Aktivierung in kardialen Fibroblasten 91

6. Diskussion 94

6.1 p63RhoGEF 94

6.1.1. p63RhoGEF und LARG sind Mediatoren der $G\alpha_{q/11}$-abhängigen RhoA-Aktivierung mit unterschiedlichen Eigenschaften 94

6.1.2. Der C-Terminus der PH-Domäne von p63RhoGEF ist essentiell für die Interaktion mit $G\alpha_{q/11}$ 96

6.1.3. p63RhoGEF, Duet und Trio zeigen die gleichen Eigenschaften in ihrer Interaktion mit $G\alpha_{q/11}$ und in der $G\alpha_{q/11}$-abhängigen RhoA-Aktivierung 97

6.1.4. Das *C. elegans* Ortholog von Trio (Unc73) ist ein Mediator der $G\alpha_q$ (Egl30)-vermittelten RhoA-Aktivierung 98

6.2 GPCR-vermittelte Aktivierung der monomeren GTPasen RhoA und Rac1 in kardialen Primärzellen 99

6.2.1 Die ET-1 und PE-induzierte RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten wird von $G\alpha_{q/11}$- und $G\alpha_{12/13}$-Proteinen vermittelt 99

6.2.2 Die ET-1 induzierte, $G\alpha_{q/11}$-abhängige Stressfaserbildung in Kardiomyozyten benötigt die Aktivierung von p63RhoGEF 100

6.2.3 Die PE/ET-1-induzierte Hypertrophie wird über $G\alpha_{q/11}$/PLC und $G\alpha_i$/Rac vermittelt 100

6.2.4 Phenylephrin: Pro-survival? 103

6.2.5 Angiotensin II-induzierte RhoA-Aktivierung in kardialen Fibroblasten wird durch p63RhoGEF vermittelt 103

6.3 Ausblick 104

7. Literaturverzeichnis 105

8. Danksagung 123

II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Der molekulare Schaltermechanismus monomerer GTPasen....4
Abb. 3.2: Phylogentischer Stammbaum der Rho-Familie....5
Abb. 3.3: Einfluss von aktiviertem Rho, Rac und Cdc42 auf die Organisation des Aktinzytoskeletts in Swiss 3T3 Fibroblasten....7
Abb. 3.4: Aktivierungs-Zyklus heterotrimerer G-Proteine....11
Abb. 3.5: Effektoren heterotrimerer G-Proteine....13
Abb. 3.6: Kardiale Morphologie von RhoA-überexprimierenden transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp....17
Abb. 4.1: DNA-Oligonukleotid-Matrixe für Haarnadelschleifen-shRNA....25
Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Klonierung von LARG-ΔPDZ....26
Abb. 4.3: Herstellung rekombinanter Adenoviren mittels des pAdEasy1-Systems....37
Abb. 4.4: Schematische Darstellung des Virusrings....39
Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Proteindomänen von p63RhoGEF und LARG....49
Abb. 5.2: Vergleich der basalen SRF-Aktivierung und der basalen RhoA-Aktivierung von p63RhoGEF und LARG....50
Abb. 5.3: Einfluss von p63RhoGEF und LARG auf die SRF-Aktivierung $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$-gekoppelter Rezeptoren....51
Abb. 5.4: Einfluss von p63RhoGEF und LARG auf die SRF-Aktivierung des unstimulierten H_1-Rezeptors....51
Abb. 5.5: Einfluss von p63RhoGEF und LARG auf die H_1R-vermittelte SRF-Aktivierung in Abhängigkeit der Histaminkonzentration....52
Abb. 5.6: Interaktion von p63RhoGEF und LARG mit $G\alpha_{i/q}$ in der Rezeptor-vermittelte SRF-Aktivierung....54
Abb. 5.7: Interaktion von p63RhoGEF und LARG mit konstitutiv aktiven Gα-Mutanten in der Ko-Immunpräzipitation....55
Abb. 5.8: Einfluss von LARG auf die durch konstitutiv aktive Gα-Mutanten vermittelte SRF-Aktivierung....56
Abb. 5.9: Schematische Darstellung der Proteindomänen von LARG und der Deletionsmutante LARG-ΔPDZ....56
Abb. 5.10: Einfluss von LARG-ΔPDZ auf die durch konstitutiv aktive Gα-Mutanten vermittelte SRF-Aktivierung....57
Abb. 5.11: Einfluss von LARG-ΔPDZ auf die Rezeptor-vermittelte SRF-Aktivierung....58
Abb. 5.12: Analyse putativer Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von p63RhoGEF und LARG in der Immunpräzipitation....59
Abb. 5.13: Strukturmodel des RhoA-p63-$G\alpha_q$-Komplexes....60

Abb. 5.14: Interaktion zwischen $G\alpha_q$RC und trunkierter p63-Mutanten in der Ko-Immunpräzipitation 61
Abb. 5.15: RhoA-Aktivierung trunkierter p63-Mutanten im Pulldown-Assay 62
Abb. 5.16: Konzentrationsabhängiger Einfluss von p63ΔN/ΔC-Mutanten auf die SRF-Aktivierung 63
Abb. 5.17: Einfluss von Punktmutationen in der DH/PH-Domäne von p63RhoGEF auf die $G\alpha_q$RC-vermittelte SRF-Aktivierung 64
Abb. 5.18:Einfluss von $G\alpha_{i/q}$-α3-Helix-Mutanten auf die p63RhoGEF abhängige SRF-Aktivierung 65
Abb. 5.19: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Trio, Duet und p63 66
Abb. 5.20: Interaktion von Duet und Trio mit $G\alpha_q$RC in der Ko-Immunpräzipitation....67
Abb. 5.21: Analyse $G\alpha_q$-vermittelte Aktivierung trunkierter Duet- und Trio-Mutanten 69
Abb. 5.22: $G\alpha_q$-vermittelte Aktivierung der Volllängenproteine Duet und Trio 70
Abb. 5.23: Schematische Darstellung des $G\alpha_q$/$G\alpha_o$-Signalwegs in *C.elegans*. 71
Abb. 5.24: Schematische Darstellung der Proteindomänen von humanem Trio, seinem Ortholog Unc73 und dessen Splice-Varianten in *C.elegans*....72
Abb. 5.25: $G\alpha_q$-Bindung und $G\alpha_q$-vermittelte Aktivierung von Trio Ce 73
Abb. 5.26: Einfluss der MutanteTrio 310 IN auf die $G\alpha_q$-vermittelte SRF-Aktivierung....74
Abb. 5.27: Inhibitoren der GPCR-vermittelten, RhoGTPase-abhängigen Zellantwort....75
Abb. 5.28: Endogene RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten 76
Abb. 5.29: Analyse der ET-1 und PE induzierten, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$-abhängigen RhoA-Aktivierung 77
Abb. 5.30: Quantitative Analyse der ET-1- und PE-induzierten RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten 77
Abb. 5.31: Expression von p63RhoGEF in kardialem Gewebe....78
Abb. 5.32: RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten induziert durch die Über-Expression von $G\alpha_q$ und p63RhoGEF 79
Abb. 5.33: ET-1 und PE induzierte RhoA-Aktivierung in p63RhoGEF über-exprimierenden Kardiomyozyten 79
Abb. 5.34: Einfluss von p63RhoGEF Knockdown auf die ET-1 und PE induzierten RhoA-Aktivierung 80
Abb. 5.35: ET-1 induzierte Stressfaserbildung 81
Abb. 5.36: Vergleich des ET-1 und PE induzierten Leucin-Einbaus in Kardiomyozyten....82
Abb. 5.37: Analyse der Rolle von $G\alpha_i$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ bezüglich des PE induzierten Leucin-Einbaus....83
Abb. 5.38: Einfluss von C3T, H1152P und Fasudil auf den PE induzierten Leucin-Einbau 84
Abb. 5.39: Einfluss von über-exprimiertem p63RhoGEF auf den PE induzierten Leucin-Einbau .84
Abb. 5.40: ET-1 vs. PE: Vergleich der ET-1 und PE induzierten Aktivität des cmv-Promotors....85

Abb. 5.41: Einfluss des PLC-Inhibitors U73122 auf die PE-induzierte Aktivität des cmv-Promotors 86
Abb. 5.42: Einfluss von H1152P und Fasudil auf die ET-1 bzw. PE-induzierte cmv-Promotoraktivität.....86
Abb. 5.43: Einfluss von Fasudil und H1152P auf die ET-1- und PE-induzierte Aktivität des.s.-α-Aktin-Promotors 87
Abb. 5.44: Einfluss von NSC 23766 auf die PE induzierte Transkiption 88
Abb. 5.45: Analyse der ET-1 und PE induzierten ANP-Expression 88
Abb. 5.46: Einfluss von NSC 23766 auf die kurzzeitige Rac1-Aktivierung.....89
Abb. 5.47: Auswirkungen von Stimulation und Inhibition auf Apoptose und Redoxpotential in NRCM.....90
Abb. 5.48: Differenzierung von NRCF in der Zellkultur 91
Abb. 5.49: Endogene RhoA-Aktivierung in NRCF.....91
Abb. 5.50: Analyse der AT II-induzierten, $G\alpha_{q/11}$- und $G\alpha_{12/13}$-abhängigen RhoA-Aktivierung 92
Abb. 5.51: Einfluss von p63RhoGEF Knockdown auf AT II-induzierte RhoA-Aktivierung.....93

III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Primärantikörper. 21
Tab. 2: Sekundärantikörper. 22
Tab. 3: Reaktionsansatz für die PCR....35
Tab. 4: Programm für die PCR mit TaqPolymerase....35
Tab. 5: Programm für die PCR mit PfuTurboPolymerase 36
Tab. 6: Programm zur gerichtete Mutagenese....36
Tab. 7: Verwendete permanente Zelllinien bzw. Primärzellen 43
Tab. 8: Parameter für die transiente Plasmid-DNA Transfektion von HEK-Zellen mit PolyFect-Transfektionsreagenz 44

IV. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
α_1-AR	α_1-adrenerger Rezeptor
AA	engl.: aminoacid
	dt.: Aminosäure
Abb.	Abbildung
Ad	Adenovirus
ANP	engl.: atrial natriuretic peptide
APS	Amoniumperoxodisulfat
Arf	engl.: ADP-ribosylation factor
ATP	Adenosintriphosphat
AT II	Angiotensin II
AT_1R	Angiotensin II-Typ1-Rezeptor
bp	Basenpaar
BrdU	5-Bromo-2‘desoxyuridin
BSA	engl.: bovine serum albumin
	dt.: Rinder-Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C3T	C3-ADP-Ribosyltransferase
ca.	circa
Ca^{2+}	Calciumion
cAMP	zyklisches 3'-5'-Adenosinmonophosphat
C. elegans	*Caenorhabditis elegans*
Ci	Curie
CIAP	engl.: calf intestinal alkaline Phosphatase
	dt.: Kalbsdarm alkalische Phosphatase
Cl^-	Chloridion
cm	Zentimeter
CMV	engl.: Cytomegalovirus
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CREB	engl.: cAMP response element binding protein
CsCl	Cäsiumchlorid
C-terminal	Carboxy-terminal
DAG	Diazylglyzerol
Dbl	diffuses menschliches B-Zell Lymphom
dest.	destilliert

DH	Dbl-homologe
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
dt.	deutsch
E	Extinktion
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF-Tu	engl.: elongation factor-Tu
	dt.: Verlängerungs-Faktor-Tu
EGF	engl.: endothelial growth factor
	dt.: endothelialer Wachstumsfaktor
EGFP	engl.: enhanced green fluorescent protein
	dt.: verstärktes grün fluoreszierendes Protein
engl.	englisch
$ET_{A/B}R$	$Endothelin_{A/B}$-Rezeptor
ET-1	Endothelin-1
FCS	engl.: foetal calf serum
	dt.: fötales Kälberserum
for	engl.: forward
	dt.: vorwärts
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G-Domäne	GTPase-Domäne
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GAP	engl.: gtpase activating protein
	dt.: GTPase-aktivierendes Protein
GBD	GTPase-bindende Domäne
GDI	engl.: guanine nucleotide dissociation inhibitor
GEF	engl.: guanine nucleotide exchange factor
	dt.: Guaninnukleotid-Austauschfaktor
GDP	Guanosindiphosphat
GPCR	engl.: G protein coupled receptor
	dt.: G-Protein gekoppelter Rezeptor
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H	Wasserstoff

^3H	Tritium
h	Stunde
H-1152P	ROCK-Inhibitor
HCl	Salzsäure
HEK	engl.: human embryonal kidney
	dt.: humane embryonale Niere
H_2O	Wasser
H_1R	Histamin-H_1-Rezeptor
Hz	Herz
IP	Immunpräzipitation
IP_3	Inositol-1,4,5-triphosphat
IPTG	Isopropylthiogalactosid
K^+	Kaliumion
kb	Kilobase
KCl	Kaliumchlorid
KH_2PO_4	Kaliumhydrogenphosphat
H_2SO_4	Schwefelsäure
L	Liter
LAR	Luziferase-Assay Reagenz
LARG	Leukämie-assoziiertes RhoGEF
LimK	Lim Kinase
LPA	engl.: lysophosphatic acid
	dt.: Lysophosphatsäure
M	Molar (mol/L)
m	milli (10^{-3})
m	Meter
µ	mikro (10^{-6})
mDia	engl.: diaphanous related formin
	dt.: Diaphanous-verwandtes Formin 1
MCS	engl.: multiple cloning site
	dt.: multiple Klonierungsstelle
Mg^{2+}	Magnesiumion
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
$MgSO_4$	Magnesiumsulfat
min	Minute
MHC	engl.: myosin heavy chain
	dt.: schwere Myosinketten
MLC	engl.: myosin light chain

	dt.: leichte Myosinkette
MOI	engl.: multiplicity of infection
	dt.: Multiplizität der Infektion
mol	Stoffmenge
M_3R	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor-3
MTT	Methylthiazolyldiphenyl-Tretrazoliumbromid
N_2	Stickstoff
n	nano (10^{-9})
NA	Noradrenalin
Na^+	Natrium
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaF	Natriumfluorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
$NaHPO_4$	Natriumhydrogenphosphat
NaN_3	Natriumazid
Na_3VO_4	Natriumorthovanadat
NFκB	engl.: nuclear factor kappa B
	dt.: Kern-Faktor kappa B
NRCF	engl.: neonatal rat cardiac fibroblats
	dt.: kardiale Fibroblasten aus neonatalen Ratten
NRCM	engl.: neonatal rat cardiomyocytes
	dt.: Kardiomyozyten aus neonatalen Ratten
NSC23766	RacGEF-Inhibitor
N-terminal	Amino-terminal
O_2	Sauerstoff
OD	optische Dichte
p	engl.: plasmid
	dt.: Plasmid
p	pico
Pak	p21-aktivierte Kinase
PBS	engl.: phosphate buffered saline
	dt.: Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	engl.: polymerase chain reaction
	dt.: Polymerase-Kettenreaktion
PDE	Phosphodiesterase
PDZ	post synaptic density-disc large-zonula occludens
PE	Phenylephrin

PFA	Paraformaldehyd
Pfu	*Pyrococcus furiosus*
PH	Pleckstrin-homologe
PI-4,5-P_2	Phosphatidyl-Inositol-4,5-biphosphat
PI-3,4,5-P_3	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-triphosphat
Pi	anorganisches Phosphat
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PKN	Proteinkinase N
PLC	Phospholipase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
pRL-TK	engl.: plasmid renilla luciferase-thymidine kinase
pSRE.L	engl.: plasmid serum response element luciferase
Rab	engl.: Ras-like proteins in brain
	dt.: Ras-ähnliche Proteine im Gehirn
Ran	engl.: Ras-like nuclear
	dt.: Ras-ähnliches nukleäres Protein
Ras	engl.: Rat sarcoma oncogene
	dt.: Ratten-Sarkoma Onkogen
RBD	Rho-Bindedomäne
rev	engl.: revers
	dt.: rückwärts
RGS	engl.: regulator of G protein signalling
	dt.: Regulator des G-Protein-Signalwegs
Rho	engl.: Ras-homologous
	dt.: Ras-homolog
RNA	Ribonukleinsäure
ROCK	Rho-Kinase
rpm	engl.: rounds per minute
	dt.: Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Schwefel
SDS	engl.: sodium dodecyl sulfate
	dt.: Natrium-Dodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
s	Sekunde
SEM	engl.: standard error of the mean

	dt.: Standardabweichung des Mittelwertes
sh	engl.: short hairpin
	dt.: kleine Haarnadel
SM	engl.: smooth muscle
	dt.: glatter Muskel
SOC	Salz-optimiertes Medium mit Glukose
	(„salt-optimized + carbon“)
SRE	engl.: serum response element
SRF	engl.: serum response factor
SV 40	engl.: simian virus 40
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	*Termophilus aquaticus*
TBS	engl.: Tris-buffered-saline
	dt.: Tris-gepufferte Salzlösung
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetramethylendiamin
TIAM-1	engl.: T-cell lymphoma invasion and metastasis
TRITC	Tetramethyl Rhodamin Iso-Thiocyanat
U	engl.: unit
	dt.: Einheit
ü. N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
v	Volumen
W	Watt
WASP	Wiskott-Aldrich-syndrome-protein
WAVE	Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein
w	engl.: weight
	dt.: Gewicht
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel

Aminosäuren

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

1. Zusammenfassung

Monomere GTPasen der Rho-Familie spielen als zentrale Mediatoren eine entscheidende Rolle bei der Regulation multipler zellulärer Prozesse, wie der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, der Genexpression, Proliferation, Migration und Apoptose. Bis heute ist jedoch nur wenig über die unmittelbar beteiligten akzessorischen Proteine und Signalübertragungswege bekannt. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Funktion des neu identifizierten, $G\alpha_{q/11}$-spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktors (GEF) p63RhoGEF näher zu charakterisieren, zu untersuchen ob er an der RhoA-Aktivierung in kardialen Primärzellen der Ratte beteiligt ist und welche Bedeutung er bei der Entwicklung einer zellulären Hypertrophie in isolierten Kardiomyozyten hat.

Zunächst wurden die biochemischen Eigenschaften von p63RhoGEF im Vergleich zum Leukemia-associated RhoGEF (LARG), das ebenfalls als $G_{q/11}$-reguliert beschrieben war, analysiert. Für beide GEFs konnte die Aktivierung über $G\alpha_{q/11}$-Proteine bestätigt werden, wobei unterschiedliche Mechanismen dieser Aktivierung zu Grunde liegen. Während für die Aktivierung von LARG, zusäztlich zur Bereitstellung von aktiviertem $G\alpha_{q/11,}$ ein direkter Kontakt des GEFs mit dem Agonist-gebunden $G_{q/11}$PCR benötigt wird, ist für die Stimulation von p63RhoGEF eine direkte Interaktion mit aktivierten Proteinen der $G\alpha_{q/11}$-Familie ausreichend. Wie durch Analyse der Kristallstruktur von p63RhoGEF und Punktmutationen gezeigt, umfasst dabei die Kernregion der Bindung den C-terminalen Bereich der PH-Domäne („PH-Extension“) und wird zusätzlich durch einzelne Aminosäuren innerhalb der DH- und der PH-Domäne stabilisiert. Vergleichbare Charakteristika zeigen auch die beiden p63RhoGEF-Homologe Kalirin/Duet und Trio, so dass die drei GEFs zu einer neuen Dbl-Unterfamilie zusammengefasst werden können, die sich entwicklungsbiologisch von einem schon in Invertebraten (z.B. Unc73 in *C.elegans)* vorhanden Vetreter dieser Familie ableiten.

Die Stimulation isolierter Kardiomyozyten der neonatalen Ratte (NRCM) mit Phenylephrin (PE) und Endothelin-1 (ET-1) induzierte eine partiell über $G\alpha_{q/11}$-vermittelte Aktivierung von RhoA. Im Gegensatz zu PE, führte dabei die ET-1-induzierte RhoA-Aktivierung zur Stressfaserbildung und dem Aufbau sarkomerer Strukturen, wobei der $G\alpha_{q/11}$-abhängige Anteil über p63RhoGEF vermittelt wurde. Klassische Hypertrophie-Indikatoren (verstärkte Proteinsynthese, Expression von Markerproteinen) zeigten keine Abhängigkeit von p63RhoGEF bzw. RhoA, sondern wurden über den $G\alpha_{q/11}$-Effektor PLCβ sowie die monomere GTPase Rac1 reguliert. Die Stimulation von isolierten kardialen Fibroblasten mit Angiotensin II induzierte eine RhoA-Aktivierung, die selektiv über den Angiotensin II–Rezeptoren-Typ I - $G\alpha_{q/11}$ - p63RhoGEF-Signalweg erfolgte. Die Daten belegen eine $G\alpha_{q/11}$-p63RhoGEF-vermittelte RhoA-Aktivierung sowohl in Kardiomyozyten als auch in kardialen Fibroblasten. Da Angiotensin II ein wichtiger Mediator der pathologischen Fibrose im Herzen ist, könnte dieser Signalweg von pathophysiologischer Bedeutung sein.

2. Summary

Momomeric GTPases of the Rho-family play an essential role as central mediators in the regulation of multiple cellular processes such as the reorganization of the actin-cytoskeleton, gene expression, proliferation, migration and apoptosis. To date, little is known about directly involved associated proteins or signal transduction pathways. Therefore this work aimed to characterize the function of the recently identified, $G\alpha_{q/11}$ -specific guanine nucleotide exchange factor (GEF) p63RhoGEF, to analyze whether it is involved in the activation of RhoA in rat primary cardiac cells and to evaluate its relevance in the development of cellular hypertrophy in isolated cardiomyocytes.

First, the biochemical properties of p63RhoGEF were analyzed in comparison to leukemia associated RhoGEF (LARG), which had also been described as $G\alpha_{q/11}$ –regulated GEF. Although the activation by $G\alpha_{q/11}$ -proteins could be confirmed for both GEFs, the underlying mechanisms of this activation proved to be different. The activation of LARG is, apart from the presence of activated $G\alpha_{q/11}$, additionally dependent on a direct contact between LARG and the agonist-bound $G\alpha_{q/11}$PCR. In contrast, the direct interaction with activated $G\alpha_{q/11}$-proteins was sufficient for the stimulation of p63RhoGEF. Analysis of the crystal structure of p63RhoGEF and point mutations revealed the core region of the binding site comprises the C-terminal part of the PH-domain ("PH-extension"). Stabilization by discrete amino acids within the PH- and DH-domain is however additionally required. As p63RhoGEF and its homologues Kalirin/Duet and Trio exhibited similar characteristics, all three GEFs can be categorized as a new Dbl-subfamily originating from one member already present in invertebrates (e.g. Unc-73 in *C.elegans*).

The stimulation of isolated neonatal rat cardiomyocytes (NRCM) with penylephrine (PE) or endothelin-1 (ET-1) induced a partially $G\alpha_{q/11}$-dependent activation of RhoA. Contrary to PE, ET-1-induced RhoA-activation led to the formation of stress fibres and the assembly of sarcomeric structures. The $G\alpha_{q/11}$-dependent part in these processes was mediated by p63RhoGEF. The induction of classical indicators of hypertrophy (enhanced protein synthesis, expression of marker proteins) was not dependent on p63RhoGEF or RhoA activation, but was regulated by the $G\alpha_{q/11}$-effector PLCβ and the monomeric GTPase Rac1. The stimulation of isolated cardiac fibroblasts with angiotensin II induced an activation of RhoA, which was selectively mediated by the angiotensin II-receptor-type I – $G\alpha_{q/11}$– p63RhoGEF-signalling pathway. The data proves a $G\alpha_{q/11}$-p63RhoGEF-mediated RhoA-activation in cardiomyocytes as well as in cardiac fibroblasts. As Angiotensin II is an important mediator of the pathological fibrosis in the heart a pathophysiological relevance of this pathway can be anticipated.

3. Einleitung

3.1 Monomere GTPasen

Die Familie der monomeren GTPasen, die auch als „Ras (Rat sarcomeric oncogene)-Superfamilie“ bezeichnet wird, setzt sich aus mehr als 150 bekannten, strukturell homologen Proteinen zusammen, wobei evolutionär konservierte Orthologe in Vertebraten, Invertebraten, Pflanzen und Mirkroorganismen vetreten sind (Hall 1998; Wennerberg *et al.* 2005). Aufgrund des für alle GTPasen typischen, biochemischen Mechanismus der GTP-Bindung und -Hydrolyse sind monomere GTPasen an der Regulation zahlreicher, zellulärer Prozesse beteiligt (Bourne *et al.* 1991).

Basierend auf Homologie und physiologischer Funktion wurde die Ras-Superfamilie in folgende fünf Familien unterteilt: Rab, Arf, Ran, Ras und Rho (Boguski and McCormick 1993; Takai *et al.* 2001). Die RabGTPasen (Ras-like proteins in brain) stellen mit 61 beschrieben Proteinen die größte Familie dar. Sie agieren als Regulatoren des intrazellulären Vesikeltransports (Zerial and McBride 2001). Eine ähnliche Funktion übernehmen die bislang 30 beschriebenen Proteine der Arf (ADP-ribosylation factor)-Familie, die an der Bildung von Vesikelhüllen des exo- und endozytotischen Transports beteiligt sind (Nie *et al.* 2003). Die Ran (Ras-like nuclear)-Familie besteht bisher aus nur einem Protein, dessen Funktion vor allem als Regulator des nukleozytoplasmatischen Transports von RNA und Proteinen beschrieben wurde (Weis 2003). Die 39 Isoformen der Ras-Familie sind besonders aufgrund ihres onkogenen Potentials bekannt und Mutationen in Ras-Genen wurden bisher in mehr als 30 % aller humanen Karzinome gefunden (Takai *et al.* 2001). Trotz ihrer prominenten Rolle in der Onkogenese scheinen einige Vertreter auch als Tumorrepressoren zu agieren, wie z.B. Rerg, Noey2 und D-Ras (Wennerberg *et al.* 2005). Proteine der Ras-Familie regulieren Zellproliferation, Apoptose, Differenzierung und Genexpression. Die Proteine der Rho-Familie (Ras-homologous) sind in ihrer Funktion der Ras-Familie ähnlich und agieren als zentrale Regulatoren in verschiedenen zellulären Signalwegen, die zu Modulationen des Aktinzytoskeletts, des Zellzyklus und der Genexpression führen (Jaffe and Hall 2005). Sie werden in den folgenden Kapiteln eingehender besprochen.

3.1.1 Struktur und Funktion der GTPase-Domäne

GTP-bindende Proteine (G-Proteine), zu welchen neben den monomeren GTPasen auch heterotrimere G-Proteine, Elongationsfaktoren der Proteinsynthese oder das Motorprotein Dynein zählen, zeichnen sich durch eine konservierte, 20 kDa große GTPase-Domäne aus, die auch als G-Domäne bezeichnet wird (Bourne *et al.* 1991). Die G-Domäne besteht aus fünf konservierten Bereichen, G-1 bis G-5, und ist für die Nukleotid- und Mg^{2+}-Bindung, für die intrinsische GTPase-Aktivität und für den Nukleotid-abhängigen Konformationswechsel notwendig (Bourne *et al.* 1991; Vetter and Wittinghofer 2001). In monomeren GTPasen erfolgt die Bindung von GDP und GTP

mit einer hohen Affinität und in Abhängigkeit des gebundenen Nukleotids, verändern G2-Region („switch I“) und G3-Region („switch II) ihre Konformation. In der GTP-gebundenen Konformation bilden diese beiden Regionen die primäre Interaktionsoberfläche für Effektormoleküle (Bishop and Hall 2000; Vetter and Wittinghofer 2001). Die intrinsische GTP-Hydrolyse, sowie die Dissoziation von GDP aus der Bindestelle erfolgen nur mit geringer Aktivität und der Wechsel zwischen aktivem und inaktivem Zustand wird daher von akzessorischen Proteinen kontrolliert. Der GDP/GTP-Zyklus wird hauptsächlich von zwei Proteinklassen reguliert: Guaninnukleotid Austauschfaktoren (GEF), die den Austausch von GDP zu GTP katalysieren (s.a. Kap. 3.2) und GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) (Schmidt and Hall 2002; Bernards and Settleman 2004) (Abb. 3.1).

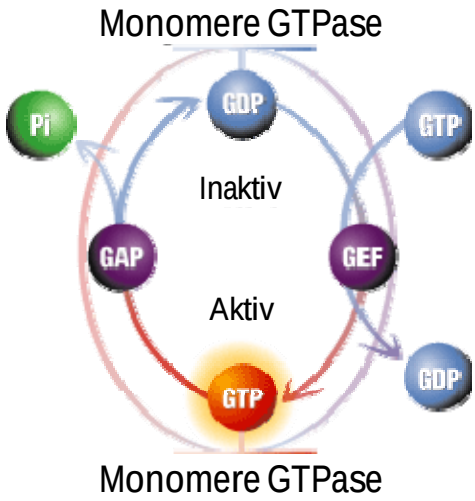


Abb. 3.1: Der molekulare Schaltermechanismus monomerer GTPasen. Abkürzungen: GEF (guanine nucleotide exchange factor), GAP (GTPase activating protein), Pi (anorganisches Phosphat),

3.1.2 Lipidmodifikation der monomeren GTPasen

Eine wichtige Eigenschaft monomerer GTPasen ist die posttranslationale Modifikation durch Lipide. Die Mehrheit der Ras- und Rho-Proteine beispielsweise besitzt am C-Terminus ein Erkennungsmotiv für Farnesyl- und Geranylgeranyltransferasen (Cox and Der 2002). Die kovalent gebundenen Fettsäuren bilden zusammen mit weiteren Lipidmodifaktionen, wie z.B. Palmitylierung, eine Oberfläche, die eine Interaktion mit bestimmten Membrankompartimenten ermöglicht und die subzelluläre Lokalisation des Proteins bestimmt. Die Rekrutierung an die Membran ist ein essentieller Bestandteil im Aktivierungszyklus vieler monomerer GTPasen und wird im Fall der Rab- und Rho-Familie von Guaninnukleotid Dissoziationsinhibitoren (GDI) reguliert. GDIs verhindern durch Maskierung der Lipidmodifikation eine Lokalisation dieser Proteine an Membransysteme und inhibieren gleichzeitig deren Interaktion mit Effektormolekülen (Olofsson 1999; Wennerberg *et al.* 2005).

3.1.3 RhoGTPasen

Die Familie der RhoGTPasen setzt sich aus bisher 25 Proteinen zusammen, die sich strukturell von anderen Mitgliedern der Ras-Superfamile durch eine Rho-Insert-Domäne innerhalb der G-Domäne unterscheiden (Valencia *et al.* 1991). Rho-GTPasen haben ein Molekulargewicht von 20-30 kDa und weisen bezüglich der G-Domäne eine ungefähr 30%ige Aminosäure-Homologie zu den Ras-Proteinen und eine 40-95%ige Homologie innerhalb der Rho-Familie auf. Basierend auf strukturellen Motiven, biologischer Funktion und Sequenzhomologien wurde die Familie der RhoGTPasen wiederum in 6 Subfamilien unterteilt: Die RhoA- (RhoA, B, C), die Rac1- (Rac1, 1b, 2, 3, RhoG), die Cdc42- (Cdc42, Cdc42-G25K, TC10, TCL, Chp/Wrch-2, Wrch-1), die Rnd- (Rd1, Rnd2, RhoE/Rnd3), die RhoBTB- (RhoBTB1, 2, 3) und die Miro- (Miro-1, 2) Subfamilie, wobei sich einige RhoGTPasen wie RhoD, Rif und TTF/RhoH keiner der Subfamilien zuordnen lassen (Wennerberg *et al.* 2005). Die Miro-Proteine stellen aufgrund der Sequenz-Divergenz zu den anderen RhoGTPasen und dem Fehlen der Rho-spezifischen Insert-Domäne die ungewöhnlichsten Mitglieder dieser Familie dar (Abb. 3.2).

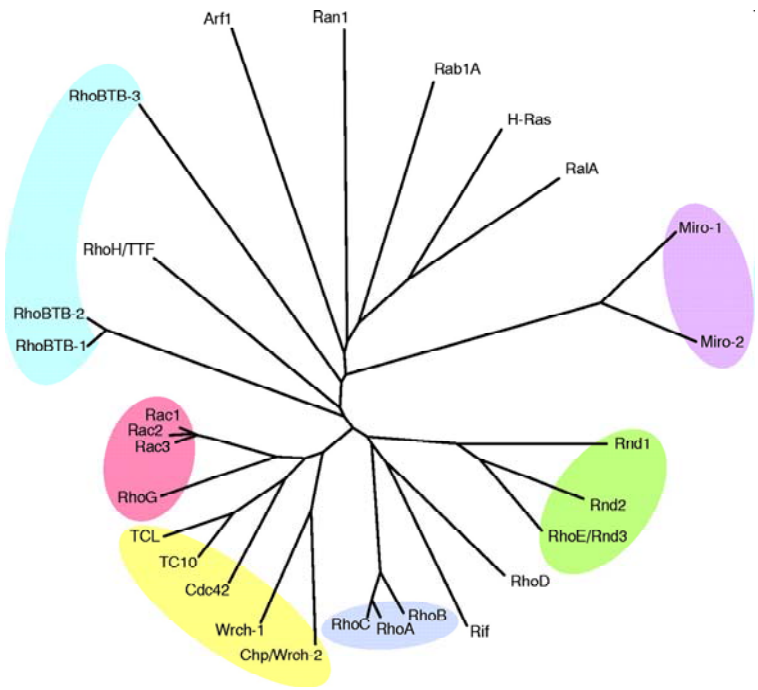


Abb. 3.2: Phylogentischer Stammbaum der Rho-Familie. Die sechs Unterfamilien der Rho-Familie: RhoBTB, Rac1-ähnliche, Cdc42-ähnliche, RhoA-ähnliche, Rnd, Miro (Wennerberg *et al.* 2005)

Die meisten funktionellen Daten zu RhoGTPasen wurden aus Studien an RhoA, Rac1 und Cdc42 gewonnen. Eine der ersten etablierten Charakteristika war der Einfluss dieser Proteine auf die Organisation des Aktinzytoskeletts (Ridley and Hall 1992; Ridley *et al.* 1992; Hall 1998; Bishop and Hall 2000). Die physiologische Rolle von RhoA, Rac1 und Cdc42 wurde daher besonders in Bezug auf Zellmigration, Chemotaxis, Phago- und Pinozytose, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Adhäsion untersucht (Hackam *et al.* 1997; Jones *et al.* 1998; Sander and Collard 1999; Schmitz *et al.*

2000). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass RhoGTPasen auch andere zelluläre Prozesse, wie Genexpression, Zellzyklus und Apoptose regulieren (Mackay and Hall 1998; Pruitt and Der 2001; Coleman and Olson 2002). Über 50 Effektorproteine für Rho, Rac und Cdc42 konnten bisher identifiziert werden, u.a. werden Serin/Threonin-Kinasen, Tyrosin-Kinasen, Lipid-Kinasen, Lipasen, Oxidasen und komplexbildende Proteine reguliert (Jaffe and Hall 2005).
Eine wichtige Rolle spielen RhoGTPasen in Erkrankungen, die durch bakterielle Proteine verursacht werden. Es konnte gezeigt werden, dass einige Clostridienspezies Enzyme produzieren, die zur Inaktivierung verschiedener RhoGTPasen in eukaryotischen Zellen führen (Aktories *et al.* 2000). Die Cytotoxine A und B des Diarrhoe-verursachenden Bakteriums *Clostridium difficile,* sowie das lethale Toxin aus *Clostridium sordellii* inaktivieren z.B. durch Glukosylierung verschiedene Rho-, Rac- und Cdc42-Isoformen (Just *et al.* 1994; Dillon *et al.* 1995; Just *et al.* 1995; Popoff *et al.* 1996). Neben ihrer Bedeutung für die Pathogenese bakterieller Erkrankungen haben diese Toxine auch als molekulare Werkzeuge zum Verständnis von Rho-GTPasen beigetragen, wie das Exoenzym C3-ADP-Ribosyltransferase (C3T) des Botulismus auslösenden Bakteriums *Clostridium botulinum*. Die C3-Transferase inaktiviert spezifisch RhoA-C (Aktories *et al.* 1989; Sekine *et al.* 1989; Aktories *et al.* 1992) und gibt daher Aufschluss über eine Beteiligung dieser GTPasen an deffinierten zellulären Prozessen.

3.1.4 Funktion von RhoGTPasen

Die ersten direkten Hinweise auf die biologische Funktion von RhoGTPasen ergaben sich durch Mikroinjektion von rekombinanten, konstitutiv aktiven Rho-Proteinen bzw. Rho-cDNAs in Swiss 3T3 Fibroblasten (Paterson *et al.* 1990). Dadurch konnte gezeigt werden, dass aktivierte Rho-Proteine eine Reorgansierung des Aktinzytoskeletts induzieren. Weitere Untersuchungen zu diesem Effekt belegen, dass die RhoGTPasen Rho, Rac und Cdc42 in Abhängigkeit extrazellulärer Stimuli die Struktur des Aktinzytoskeletts beeinflussen. Jede der drei Subfamilien produziert dabei einen distinkten zellulären Phänotyp, wobei die koordinierte Aktivierung aller drei GTPasen für eine gerichtete Zellmigration notwendig ist (Nobes and Hall 1995; Hall 1998; Schmitz *et al.* 2000; Aspenstrom *et al.* 2004) (Abb. 3.3).
Überexpressionsstudien zeigen, dass RhoA-C gleichermaßen Stressfasern und fokale Adhäsionen induzieren (Ridley and Hall 1992). Stressfasern sind kontraktile Bündel, die hauptsächlich aus Aktinfilamenten, Myosin II und α-Actinin bestehen und im gesamten Zellkörper lokalisiert sind (Byers and Fujiwara 1982). Diese Filamente werden an den „fokalen Adhäsionen“ durch verschiedene Adapterproteine und Transmembran-Verbindungsproteine, die zur Integrin-Familie gehören, mit der extrazellulären Matrix verknüpft (Ridley and Hall 1992; Akiyama 1996). Die Enstehung von Stressfasen wird über verschiedene Mechanismen reguliert. Ein Mechanismus ist die Induktion der Aktinpolymerisation durch den direkten Rho-Effektor mDia1 (mammalian homolog of drosophila diaphanous) und die gleichzeitige Inhibition der Aktindepolymerisation durch die Phosphorylierung von Cofilin (Watanabe *et al.* 1999; Ohashi *et*

al. 2000). Cofilin wird dabei durch die Lim-Kinase (LimK) phosphoryliert, die ihrerseits ein Effektor von Rho-Kinasen (ROCK) ist. Die ROCK-abhängige Aktivierung der LimK führt außerdem zur Inhibition der inhibitorischen Myosinleichtketten-Phosphatase (MLCP) und verstärkt so die Phosphorylierung der Myosinleichtkette. Dadurch wird die Bündelung und Kontraktilität der Aktin:Myosin-Filamente kontrolliert und eine gerichtete Migration ermöglicht (Kimura *et al.* 1996; Riento and Ridley 2003).

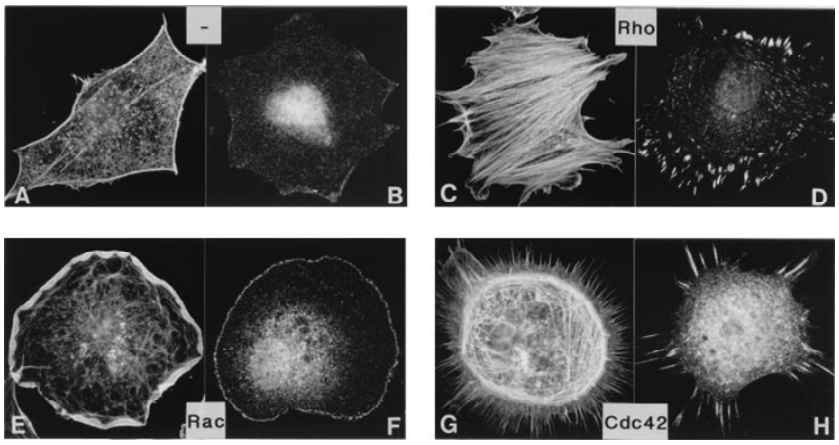


Abb. 3.3: Einfluss von aktiviertem Rho, Rac und Cdc42 auf die Organisation des Aktinzytoskeletts in Swiss 3T3 Fibroblasten. (A), (C), (E), (G): Phalloidin-Färbung des Aktinzytoskeletts. (B), (D), (E), (F) Vinculin-Färbung der Adhäsionskomplexe (Hall 1998)

Die Aktivierung der Rac-Subfamilie induziert am Leitsaum der Zelle die Bildung von Lamellipodien bzw. „Membrankräuselungen“ sowie fokale Adhäsionen (Ridley *et al.* 1992; Nobes and Hall 1995). Lamellipodien werden kurz nach der Zelladhäsion ausgebildet und bestimmen die Polarität bzw. die Richtung bei der Zellmigration (Nobes and Hall 1999; Pollard *et al.* 2001; Ridley *et al.* 2003). Außerdem spielen sie eine Rolle bei pino- und phagozytotischen Prozessen (Bar-Sagi and Feramisco 1986; Ridley *et al.* 1992; Cox *et al.* 1997). Die Bildung von Lamellipodien ist begleitet von einer Aktin-Polymerisation, welche hauptsächlich durch die Aktivierung von WAVE (Wiskott-Aldrich syndrome protein family verprolin-homologous protein) (Miki *et al.* 1998) und der p21-aktivierten-Kinase (p21 activated kinase, Pak) gesteuert wird (Sells *et al.* 1997). Die Aktivierung von Pak führt gleichzeitig auch zu einer Aufhebung von RhoA-induzierten Stressfasern und fokalen Adhäsionen im hinteren Teil der wandernden Zelle (Manser *et al.* 1997). Die Aktivierung der Cdc42-Subfamilie induziert dagegen eine Bildung von fingerförmigen Zellausläufern (Filopodien), die als Chemosensoren gelten und deren Form durch parallele Bündel von Aktinfilamenten bestimmt ist (Mallavarapu and Mitchison 1999; Jacinto and Wolpert 2001). Die Bildung der Filopodien wird unter anderem durch die Phosphorylierung von WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) oder N-WASP initiiert (Machesky and Insall 1998).

Neben der Regulation des Aktinzytoskeletts sind RhoGTPasen an der Kontrolle der Signaltransduktionskaskaden beteiligt, die zu einer Änderung in der Genexpression führen. Einer

der prominentesten Mediatoren von Rho, Rac und Cdc42 ist der „serum response factor“ (SRF), der nach Aktivierung an die Regulatorsequenz „serum response element“ (SRE) bindet und die Gentranskription entsprechend gekoppelter Promotoren aktiviert (Hill et al, 1995). Das SRE ist unter anderem mit Genen des Zytoskeletts und der Muskulatur assoziiert, wie β-Aktin, Glattmuskel-α-Aktin (sm-α-Aktin) und Skelettmuskel-α-Aktin (s.-α-Aktin), sowie des atrialen natriuretischen Proteins (ANP), das als Indikator in der kardialen Hypertrophie gilt (Chai and Tarnawski 2002). RhoGTPasen spielen außerdem über eine direkte Interaktion mit MAP(mitogen activated protein)-Kinase-Kinase-Kinasen (Perona *et al.* 1997; Gallagher *et al.* 2004) oder über die Aktivierung der Proteinkinase N (PKN) und des p38-MAPK-Signalwegs in weiteren Genregulatorischen Prozessen eine Rolle (Marinissen *et al.* 2001; Deaton *et al.* 2005).
Einige zusätzliche Enzymaktivitäten werden von RhoGTPasen beeinflusst, insbesondere Enzyme des Lipidmetabolismus, wie z.B. der Phosphatidyinositol-4-Phosphat-Kinase (PIP5K) und Phosphoinositid-3 Kinase (PI3K), die beide an der Generierung weiterer Lipidbotenstoffe beteiligt sind (Welch *et al.* 2003; Weernink *et al.* 2004). Einer der ersten Effektoren, die für Rac beschrieben wurden, war p67phox, ein struktureller Bestandteil des NADPH-Oxidase-Komplexes (Diekmann *et al.* 1994). In weiteren Studien konnte für viele Zellsysteme belegt werden, dass die Aktivierung von Rac zu einer Akkumulation von Sauerstoffradikalen führt (Jaffe and Hall 2005).

3.2 RhoGEFs-Die Dbl-Familie

Die GEFs der Dbl-Familie katalysieren den GDP/GTP-Austausch von RhoGTPasen und sind damit entscheidend an deren Aktivierung und Regulation beteiligt. Der erste entdeckte Austauschfaktor war das Onkogen Dbl (diffuse B-cell lymphoma) und basierend auf dessen katalytischer Domäne konnten bisher 69 homologe, putative RhoGEFs identifiziert werden (Eva and Aaronson 1985; Hart *et al.* 1994; Schmidt and Hall 2002). Die katalytische Domäne, auch als Dbl-homologe (DH) Domäne bezeichnet, umfasst ca. 180 Aminosäuren und weist drei konservierte Regionen auf, CR1-CR3, an welchen die Interaktion mit der Nukleotidbindetasche der GTPase stattfindet. GEFs binden GDP-beladene RhoGTPasen und Destabilisieren dadurch den GDP-GTPase-Komplex, gleichzeitig wird der nukleotidfreie Zustand stabilisiert und freies GTP kann aufgrund des zellulären GDP/GTP-Verhältnisses stattdessen an die GTPase binden (Cherfils and Chardin 1999). Die Spezifität der RhoGEFs bezüglich ihres Substrats wird nicht über die konservierten Regionen, sondern über dazwischen liegenden Sequenzen innerhalb der DH-Domäne vermittelt, wobei manche GEFs nur eine GTPase aktivieren und andere mehrere Substrate aufweisen (Zheng *et al.* 1996). Neben der DH-Domäne besitzen die meisten RhoGEFs der Dbl-Familie eine dazu C-Terminal gelegene ca. 100 Aminosäuren umfassende Plextrin-homologe (PH) Domäne. Die beiden Domänen werden daher auch als DH/PH-Tandemmotiv bezeichnet. Eine distinkte Funktion für die PH-Domäne konnte bisher nicht etabliert werden. PH-Domänen können sowohl mit Proteinen als auch mit Phospholipiden der Plasmamembran

interagieren, so dass verschiedene regulatorische Mechanismen, wie zusätzliche Substratspezifizierung, zelluläre Lokalisation und allosterische Wechselwirkungen vorgeschlagen werden. Viele Vetreter der Dbl-Familie verfügen über zusätzliche Proteindomänen, welche die spezifische zelluläre Funktion dieser GEFs bestimmen können. Aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften werden manche RhoGEFs in Subfamilien zusammengefasst (Schmidt and Hall 2002; Rossman *et al.* 2005).

Als Regulator zahlreicher zellulärer Signalwege unterliegt die Aktivität der RhoGEFs selbst einer strikten Kontrolle. Bisher konnten verschieden Aktivierungsprinzipien etabliert werden, die auf der Beseitigung intramolekularer und intermolekularer Inhibition, Phosphorylierung, Protein-Proteininteraktion oder der Interaktion mit Phospholipiden basieren. Die Inaktivierung kann wiederum durch Dephosphorylierung, Degradation oder durch spezifische Inhibitoren reguliert werden. Eine Vielzahl unterschiedlicher Rezeptorenklassen scheint an der Induktion GEF-regulierter Signalkaskaden beteiligt zu sein, diese umfassen Rezeptortyrosinkinasen (RTK), G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR), Zytokin-Rezeptoren, sowie Rezeptoren der Zell-Zell- und Zell-Matrixinteraktion (Schmidt and Hall 2002; Rossman *et al.* 2005; Garcia-Mata and Burridge 2007).

Weitgehend unklar bleibt bisher, wie diese Aktivierung mit der Induktion spezifischer Signalkaskaden in der Zelle koordiniert wird, da zum einen mehrere GEFs in der Lage sind dieselbe GTPase zu binden und zum anderen einzelne GEFs von verschiedenen Rezeptoren bzw. Signalproteinen aktiviert werden können. Einige RhoGEFs, aber nicht alle, zeigen ein gewebsspezifisches Expressionsmuster, und eine mögliche Regulation könnte daher durch die distinkte zelluläre Umgebung gewährleistet sein (Katzav *et al.* 1989). Weitere Möglichkeiten der Koordination bestehen in der subzellulären Lokalisation der GEFs und in der Rekrutierung zusätzlicher Signalproteine (Buchsbaum *et al.* 2003).

3.2.1 p115RhoGEF-Familie

Die p115RhoGEF-Familie umfasst die strukturell homologen Austauschfaktoren p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF und Leukemia-associated RhoGEF (LARG). Alle drei Proteine aktivieren spezifisch RhoA und besitzen neben dem DH/PH-Tandemmotiv eine N-terminal gelegene RGS (regulator of g-protein signalling)-homologe Domäne (Hart *et al.* 1998; Fukuhara *et al.* 1999; Kourlas *et al.* 2000). RGS-Domänen wurden erstmals als funktionelle Einheit für GAPs heterotrimerer G-Proteine (vgl. Kap. 3.3.2) beschrieben, wo sie die Bindung an spezifische Gα-Untereinheiten vermitteln und die GTP-Hydrolyse beschleunigen (Snow *et al.* 1997; Ross and Wilkie 2000). In weiteren Studien konnte belegt werden, dass die p115RhoGEF-Familie über ihre RGS-Domäne an aktivierte Proteine der $G\alpha_{12/13}$-Familie bindet und durch diese Interaktion die Aktivierung von RhoA vermittelt wird (Hart *et al.* 1998; Kozasa *et al.* 1998; Fukuhara *et al.* 1999; Fukuhara *et al.* 2001). Dabei scheint LARG eine Ausnahme zu bilden, im Gegensatz zu p115RhoGEF konnte für diesen Ausstauschfaktor neben der $G\alpha_{12/13}$-induzierten RhoA-Aktivierung, auch eine Aktivierung

durch $G\alpha_{q/11}$-Proteine nachgewiesen werden (Booden *et al.* 2002). Dieser Befund blieb jedoch umstritten. LARG und PDZ-RhoGEF unterscheiden sich strukturell von p115RhoGEF durch eine zusätzliche PDZ-Domäne, die am N-Terminus der Proteine lokalisiert ist. PDZ-Domänen binden an spezifische Sequenzen in anderen Proteinen oder an andere PDZ-Domänen und sind daher an der Bildung von Proteinkomplexen beteiligt (Doyle *et al.* 1996; Sheng and Sala 2001). Im Fall von LARG und PDZ-RhoGEF scheint diese Domäne eine Aktivierung durch direkte Interaktion mit Plexin B-Rezeptoren zu vermitteln (Aurandt *et al.* 2002; Perrot *et al.* 2002). Für LARG konnte außerdem eine Interaktion der PDZ-Domäne mit der IGF (insulin-like growth factor)-1-Rezeptor nachgewiesen werden, wobei allerdings keine Abhängigkeit in der LARG-Aktivierung über IGF-induzierte Tyrosin-Phosphorylierungen festgestellt werden konnte (Taya *et al.* 2001).

3.2.2 p63RhoGEF

Der Austauschfaktor p63RhoGEF wurde erstmals 2002 von Souchet und Mitarbeitern aufgrund von Datenbank-Analysen als weiteres Mitglied der Dbl-Familie identifiziert. Das Protein besteht aus 580 Aminosäuren und besitzt außer dem typischen DH/PH-Tandemmotiv keine weiteren funktionellen Proteindomänen. p63RhoGEF wird primär in Herz und Gehirngewebe exprimiert, wobei eine Lokalisation des Proteins in der I-Bande kardialer Muskelfasern angenommen wurde. Erste funktionelle Analysen bestätigten die Datenbank-Ergebnisse und klassifizierten p63RhoGEF als RhoA-spezifischen Austauschfaktor (Souchet *et al.* 2002). In weiteren Studien konnte schließlich demonstriert werden, dass p63RhoGEF in direkter Interaktion mit Proteinen der $G\alpha_{q/11}$-, nicht aber der $G\alpha_{12/13}$-Familie aktiviert wird. Die Interaktionsoberfläche konnte zudem auf die C-Terminale Region des GEFs eingegrenzt werden (Lutz *et al.* 2005).
Weitere strukturelle Analysen zeigen eine 60-70% tige Homologie zu zwei anderen Mitgliedern der Dbl-Familie auf, den beiden GEFs Kalirin/Duet und Trio (Souchet *et al.* 2002). Im Gegensatz zu p63RhoGEF besitzen diese Austauschfaktoren zwei DH/PH-Tandemmotive, das jeweils N-terminal gelegene, Rac-spezifische und das C-terminal gelegene, Rho-spezifische Tandemmotiv, sowie weitere funktionelle Domänen. Kalirin/Duet und Trio werden in mehreren Splice-Varianten exprimiert, wobei manche dieser Varianten entweder nur als Rac oder nur als Rho-spezifische GEFs agieren, wie beispielweise die Transkripte Duet, TrioC oder TrioN. Divergenzstudien haben zudem gezeigt, dass die beiden Proteine ursprünglich aus demselben Gen hervorgegangen sind (Debant *et al.* 1996; McPherson *et al.* 2002).

3.3 Heterotrimere G-Proteine

Die Familie der heterotrimeren G-Proteine bildet die zweite große Gruppe innerhalb der GTPasen. Wie auch monomere GTPasen agieren sie als molekulare Schalter und kontrollieren die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden.

Heterotrimere G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten α, β und γ, wobei die α-Untereinheit die funktionelle GTPase-Domäne beinhaltet. Anders als bei monomeren GTPasen wird der GDP/GTP-Austausch und damit die Aktivierung des G-Proteins durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR, vgl. Kapt. 3.4) in der Plasmamembran katalysiert. Heterotrimere G-Proteine stellen daher das Bindeglied zwischen extrazellulären Stimuli und der Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden dar. Der durch die Ligandenbindung des Rezeptors induzierte GDP/GTP-Austausch führt zu einer Konformationsänderung in den drei „switch"-Regionen der Gα-Untereinheit und hat die Destabilisierung des Gαβγ-Komplexes zur Folge. Dieser zerfällt in zwei funktionelle Einheiten, Gα-GTP und das Gβγ-Dimer, die jeweils unterschiedliche Kaskaden in der Zelle aktivieren (Wall *et al.* 1998; McCudden *et al.* 2005). Die Inaktivierung von Gα wird von spezifischen, GTPase-aktivierenden Proteinen durch Beschleunigung der GTP-Hydrolyse kontrolliert, die als „regulator of g-protein signalling" (RGS) bezeichnet werden (Wieland and Mittmann 2003). Neben den RGS-Proteinen besitzen auch einige Gα-Effektormoleküle eine GTPase-aktivierende Domäne (Berstein *et al.* 1992; Ross and Wilkie 2000). Die Hydrolyse von GTP und die damit verbundene Konformationsänderung von Gα ermöglicht eine Reassoziation des Gαβγ-Komplexes und beendet den Aktivierungszyklus (Abb. 3.4).

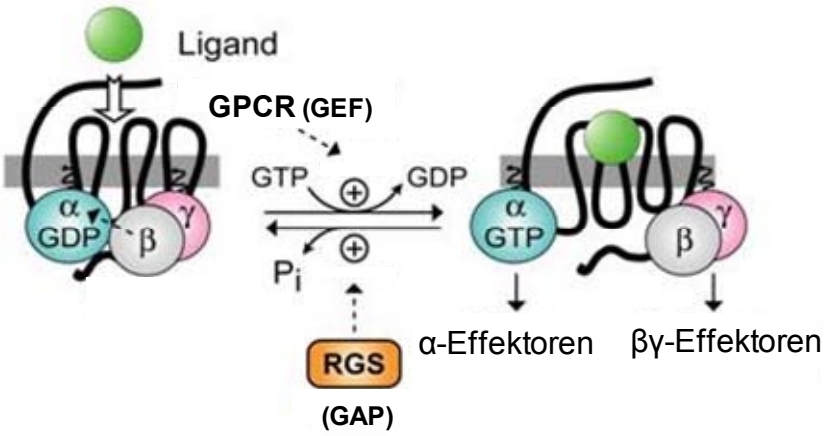


Abb. 3.4: Aktivierungs-Zyklus heterotrimerer G-Proteine. Abkürzungen: GAP (GTPase activating Protein), GEF (guanine nucleotide exchange factor),), Pi (anorganisches Phosphat), RGS (regulator of g-protein signalling). (Siderovski and Willard 2005)

Im Menschen wurden bisher 21 Gα, 6 Gβ und 12 Gγ-Untereinheiten identifiziert (Downes and Gautam 1999), die basierend auf Sequenzhomologien und Funktion der Gα-Untereinheiten in vier Klassen eingeteilt werden G_s, $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$ (Strathmann and Simon 1990; Ross and Wilkie 2000). Nicht alle der 60 möglichen Gβγ-Dimere bilden sich auch tatsächlich in der Zelle und manche der Gα-Untereinheiten assozieren mit der gleichen Gβγ-Kombination. Eine Regulation der Effektor-Aktivierung wird daher in der Lokalisation und im Expressionsmuster der Komponenten vermutet (Graf *et al.* 1992; Oldham and Hamm 2008).

3.3.1 Effektoren heterotrimerer G-Proteine

Die zellulären Zielproteine der vier Gα-Klassen sind in der Zwischenzeit weitgehend beschrieben und etabliert (Abb. 3.5). Der erste charakterisierte Effektor von Gα-induzierten Signalkaskaden war die Adenylylzyklase (AC), deren Aktivität durch $G\alpha_s$ und $G\alpha_i$-Proteine reguliert wird. Dabei führt die Bindung von $G\alpha_s$-GTP zu einer Stimulation der AC und damit zu einer Erhöhung des zellulären cAMP-Niveaus. Dieser Effekt wird von Proteinen der $G\alpha_i$-Klasse entweder durch direkte Bindung an die AC oder indirekt durch Aktivierung der Phosphodiesterase antagonisiert. Ein etablierter Effektor von $G\alpha_{q/11}$-Proteinen ist das Enzym Phospholipase Cβ (PLCβ), dessen Aktivierung zu der Produktion des membranständigen Diacylglycerin (DAG) und zytosolischen Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) führt. IP_3 induziert die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum, welches zusammen mit der DAG zu einer Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) führt (McCudden *et al.* 2005). Lange Zeit wurde nur vermutet, dass $G\alpha_{q/11}$-Proteine auch an der Aktivierung monomerer GTPasen beteiligt sind (Sah *et al.* 2000). Besonders die Beteiligung von LARG als potentielles GEF in der $G\alpha_{q/11}$-induzierten RhoA-Aktivierung führte zu kontroversen Publikationen (Booden *et al.* 2002; Chikumi *et al.* 2002b; Vogt *et al.* 2003). Mit der Entdeckung und Charakterisierung von p63RhoGEF konnte schließlich eine direkte Verbindung zwischen $G\alpha_{q/11}$ und der monomeren GTPase RhoA etabliert werden. Dabei wurde die $G\alpha_{q/11}$-induzierte RhoA-Aktivierung sowohl mittels konstitutiv aktiver $G\alpha_{q/11}$-Mutanten als auch für die Rezeptor-gekoppelte Aktivierung belegt (Lutz *et al.* 2005). Die Aktivierung von RhoA durch Proteine der $G\alpha_{12/13}$-Klasse ist dagegen schon seit längerem bekannt und wird von den GEFs der p115RhoGEF-Familie vermittelt (vgl. Kap. 3.3.2).

Weniger klar umrissen sind die durch Gβγ-Dimere induzierten Signalkaskaden. Es wurde lange angenommen, Gβγ-Untereinheiten hätten lediglich die Funktion, den inaktiven Gα-GDP-Rezeptor zu stabilisieren und einen spontanen Nukleotidaustausch zu inhibieren. In der Zwischenzeit wurde erkannt, dass das Gβγ-Dimer eine spezifische funktionelle Einheit darstellt und eigene Signalkaskaden aktiviert (McCudden *et al.* 2005). Neben der beschriebenen Regulation von Ca^{2+}- und K^+- Kanälen und der Aktivierung verschiedener PLC-Isoformen, wurde außerdem eine G_iPCR-induzierte, Gβγ-abhängige Aktivierung der monomeren GTPase Rac etabliert (Coso *et al.* 1996). In den bisher untersuchten Zellsystemen konnten dabei die beiden RacGEFs TIAM-1 und P-Rex als Mediatoren in der Gβγ-abhängigen Aktivierung von Rac1 identifiziert werden. Ob diese Aktivierung dabei auf einer direkten Interaktion der GEFs mit dem Gβγ-Dimer basiert oder weitere Effektoren involviert sind, wird noch diskutiert. Manche Arbeitsgruppen schlagen dabei eine Phosphoinostid-3 Kinase (PI3K)-vermittelte Aktivierung der GEFs vor (Welch *et al.* 2003; Li *et al.* 2005; Brown *et al.* 2006).

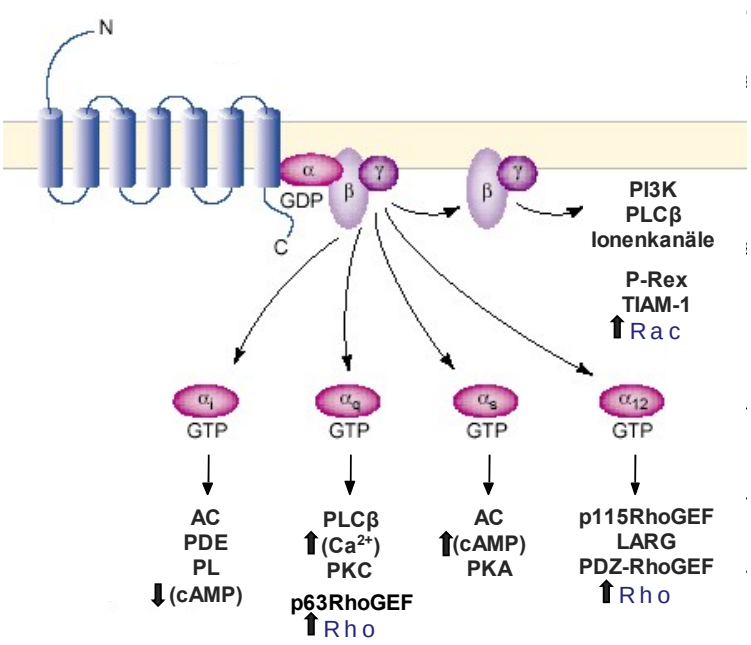


Abb. 3.5: Effektoren heterotrimerer G-Proteine. Abkürzungen: AC (Adenylylzyklase), PDE (Phophodiesterase), PI3K (Phosphoinositid-3 Kinase), PL (Phospholipase), PK (Phosphokinase), P-Rex (RacGEF), TIAM-1 (RacGEF)

3.3.2 Regulators of G-Protein Signaling (RGS)

Die ersten Hinweise auf Proteine, die an einer negativen Regulation heterotrimerer G-Proteine beteiligt sind, wurden durch Studien an *S.cerevisiae*, *A. nidulans* und *C.elegans* gewonnen. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle isolierten Regulatoren eine homologe, etwa 120 Aminosäuren umfassende Sequenz besitzen, die als „regulator of g-protein signaling"-Box bezeichnet wurde (Wieland and Mittmann 2003). Die funktionelle Analyse zeigte schließlich, dass es sich bei diesen Regulatoren um für Gα-Untereinheiten spezifische, GTPase-aktivierende Proteine (GAP) handelt, welche die endogene GTPase-Reaktion um ca. den Faktor 100 beschleunigen. Bisher konnten in Mammalia mehr als 25 RGS bzw. RGS-ähnliche Proteine identifiziert werden, die sehr unterschiedliche strukturelle Eigenschaften aufweisen. Zusätzliche funktionelle Domänen, wie Gβγ-Bindestellen, Kinase- oder PDZ-Domänen lassen darauf schließen, dass diese Proteine an der Koordination multipler Komponenten GPCR-induzierter Signalkaskaden beteiligt sind. Die RGS-Superfamlie wurde basierend auf strukturellen Analysen in 8 Unterfamilien eingeteilt RZ, R4, R7, R12, RA, GEF, GRK und SNX (Siderovski and Willard 2005). Aufgrund von Spezifität und GAP-Potential der RGS-Domäne werden einige Mitglieder häufig als molekulare Werkzeuge in der Analyse G-Protein-abhängiger Signalkaskaden eingesetzt. In diesem Zusammenhang werden im Folgenden die Unterfamilien R4 und GEF kurz vorgestellt.

Die R4-Unterfamilie umfasst 7 Mitglieder, RGS1, 2, 4, 5, 8, 13 und 16. Im Vergleich zu anderen RGS-Proteinen besteht diese Unterfamilie aus relativ kleinen Proteinen (20-30 kDa), die in der

Regel nur eine C-Terminal lokalisierte RGS-Domäne besitzen und spezifisch die GTPase-Aktivität von Proteinen der $G\alpha_{q/11}$- und $G\alpha_{i/o}$-Familie beschleunigen. RGS2 bildet dabei eine Ausnahme, hier konnte eine Präferenz für Proteine der $G\alpha_{q/11}$-Familie nachgewiesen werden. Neben der RGS-Box zeigen die R4-Proteine RGS4, 5 und 16 eine N-terminal lokalisierte, konservierte Domäne und es wird vermutet, dass diese Domäne an der Selektion spezifischer G_qPCR-induzierter Signalkaskaden beteiltigt ist (Zeng *et al.* 1998; Xu *et al.* 1999).
Die GEF-Unterfamilie besteht aus den bereits erwähnten RhoGEFs p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF und LARG. Ungeachtet der möglichen Spezifitäten einzelner RhoGEFs dieser Familie für die $G\alpha_{12}$ oder $G\alpha_{13}$-induzierte RhoA-Aktivierung, interagieren die isolierten RGS-Domänen aller drei GEFs mit beiden G-Protein-Subtypen. Die Überexpression von sowohl RGS-p115, RGS-PDZ und RGS-LARG führt zu einer nachweislichen Inhibition der $G\alpha_{12/13}$-Aktivierung konstitutiv aktivierter Mutanten (Rumenapp *et al.* 2001; Fahimi-Vahid *et al.* 2002).

3.4 GPCRs

Die Superfamilie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) wird von fast 800 veschiedenen Genen kodiert und umfasst damit eine der größten Proteingruppen des menschlichen Genoms. Die überwiegende Anzahl der GPCRs sind Rezeptoren der Plasmamembran und transduzieren extrazelluläre Stimuli in ein Netzwerk intrazellulärer, G-Protein-abhängiger Signalkaskaden. Sie werden in vier Klassen eingeteilt, Rhodopsin-ähnliche, die bei weitem die größte Familie darstellen, Sekretin-ähnliche, metatrope Glutamatrezeptoren und die Frizzled-Familie (Jacoby *et al.* 2006). Alle Vertreter dieser Superfamilie bestehen aus 7 transmembranösen α-Helices, einem extrazellulären N-Terminus, einem intrazellulären C-Terminus und drei interhelikalen Schleifen auf jeder Seite der Plasmamembran (Oldham and Hamm 2008). Trotz gemeinsamer Strukturmerkmale weisen GPCRs ein weites Ligandenspektrum auf und können von Substanzklassen wie biogenen Aminen, Purinen, Nukleinsäure-Derivaten, Lipiden, Proteinen, Peptiden und sogar Photonen aktiviert werden (Jacoby *et al.* 2006). Die Interaktionsoberfläche zwischen Agonist und Rezeptor variert dabei und kann je nach Substanzklasse des Agonisten und Rezeptor-Typ die transmembrane Region, die extrazellulären Schleifen oder den N-terminalen Bereich mit einschließen (Gershengorn and Osman 2001). Unabhängig von der eigentlichen Interaktionsstelle induziert die Agonist-Bindung eine Konformationsänderung im zytosolischen Bereich des Rezeptors, welche zur Bildung des Rezeptor-G-Protein-Komplexes führt und den Nukleotidaustausch induziert. Der Rezeptor interagiert dabei hauptsächlich mit dem C-Terminus der Gα-Untereinheit, wobei die Bindung durch selektive Gβγ-Dimere zusätzlich stabilisiert wird (Taylor *et al.* 1996; Oldham and Hamm 2008). Obwohl Studien zur Spezifität der G-Protein-Rezeptor-Interaktion gezeigt haben, dass der Austausch des C-Terminus von $G\alpha_q$ durch die respektive $G\alpha_i$-Sequenz zu einer durch G_iPCRs-induzierte PLC-Aktivierung führt, kann die Selektion des Rezeptors auch durch Mutationen in anderen Bereichen der Gα-Untereinheit

beeinträchtigt werden (Conklin *et al.* 1993; Kostenis *et al.* 1998). Umgekehrt zeigen Rezeptoren, welche die gleichen G-Proteine aktivieren, manchmal nur eine geringe Homologie in ihrer Bindesequenz. Selektivität sowie die Aktivierung spezifischer GPCR-induzierter Signalkaskaden durch die gleiche G-Protein-Familie bleibt daher weitgehend unklar (Milligan and Kostenis 2006; Oldham and Hamm 2008).

3.5 Kardiale Hypertrophie

Kardiale Hypertrophie ist die adaptive Antwort des Myokards auf eine physiologisch oder pathologisch verursachte erhöhte Belastung und durch Größenzunahme einzelner Kardiomyozyten sowie einer Zunahme des Anteils kontraktiler Proteine gekennzeichnet. Im Gegensatz zur physiologischen Hypertrophie wird die pathologische Form durch Faktoren wie arterielle Hypertonie, hormonelle Störungen oder genetische Mutation kardialer Proteine induziert (McKinsey and Kass 2007). Der initiale Kompensationsvorgang entwickelt sich dabei zu einer dekompensatorischen Hypertrophie mit charakteristischem Phänotyp, wie die Dilatation der Herzkammern, eine durch Fibrose verursachte Versteifung der Muskulatur und die daraus folgende, kontinuierliche Abnahme der Kontraktilität. Ein wichtiger Bestandteil der pathologischen Hypertrophie ist die Änderung des kardialen Genexpressionsmusters, die sich in Kardiomyozyten durch die Aktivierung embryonaler Gene manifestiert. Indikatoren sind z.B. die Expression des atrialen natriuretischen Proteins (ANP), der schweren β-Myosinkette (β-MHC) und von α-Skelettmuskel-Aktin (α-s.-Aktin) (Chien *et al.* 1991; Dorn and Brown 1999). Die Funktion des Myokards ist nicht nur abhängig von Muskelzellen, sondern basiert auf dem Zusammenspiel verschiedener Zelltypen. Fibroblasten, Immunzellen, extrazelluläre Matrix und vaskuläres Gewebe beeinflussen wichtige Faktoren wie Struktur, Versorgung und Signalweiterleitung (Baudino *et al.* 2006; McKinsey and Kass 2007). Die Entwicklung zur dekompensatorischen Hypertrophie wird daher von einer Vielzahl endokriner, parakriner und autokriner Mechanismen reguliert, die wiederum multiple zytoplasmatische Signalkaskaden aktivieren. In den letzten zwei Jahrzehnten wurde eine Reihe von Signalwegen publiziert, die in der Transduktion zur hypertrophen Zellantwort eine wichtige Rolle spielen. Diese umfassen heterotrimere G-Proteine, die monomeren GTPasen Ras, Rho und Rac, MAPK, PKC, Calcineurin, sowie Rezeptortyrosin-Kinasen (RTK)-abhängige Effektoren (Molkentin and Dorn 2001; Sugden and Clerk 2005; Brown *et al.* 2006). Im Folgenden werden die dieser Arbeit zugrunde liegenden Signalkaskaden vorgestellt.

3.5.1 $G\alpha_{q/11}$ in der kardialen Hypertrophie

Die kardiale Kontraktionskraft wird über verschiedene Kontrollmechanismen kontinuierlich moduliert, so dass die Leistung an den sich stetig änderenden Bedarf des Organismus angepasst und eine ausreichende Versorgung gewährleistet werden kann. Von zentaler

pathophysiologischer Bedeutung sind dabei Signale, die über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren vermittelt werden. Die in diesem Zusammenhang wichtigen kardialen GPCRs lassen sich in drei funktionale Gruppen einteilen, die vorwiegend $G\alpha_s$-gekoppelten Rezeptoren (z.B β-Adrenozeptoren), $G\alpha_i$-gekoppelte Rezeptoren (z. B. M_2-muskarinische Acetylcholin-Rezeptoren) und die dritte Gruppe, welche die primär $G\alpha_{q/11}$-gekoppelten Rezeptoren (z.B. Angiotensin II-Typ 1-, $Endothelin_{A/B}$ und α_1-adrenerge Rezeptoren) umfasst. Die letzte Gruppe ist dabei weniger wichtig in der Regulation der aktuten Herzfunktion, sondern spielt wahrscheinlich eine wesentliche Rolle in der langfristigen Belastungsanpassung (Molkentin and Dorn 2001). Detailierte Studien zum Mechanismus der kardialen Hypertrophie wurden zunächst im Zellkulturmodell isolierter neonataler Rattenkardiomyozyten gewonnen (NRCM). In diesem Modell konnte gezeigt werden, dass die Agonisten Angiotensin II (AT II), Endothelin-1 (ET-1) und Phenylephrin (PE), sowie die Überexpression von $G\alpha_q$ zu einer hypertrophen Zellantwort führen, die sich anhand der Proteinsynthese, der Expression von Markergenen oder Änderungen der sarkomeren Struktur belegen lässt (Knowlton *et al.* 1993; Adams *et al.* 1998; Dorn and Brown 1999). Studien an transgenen Mausmodellen zeigten schließlich, dass die kardiale Überexpression von $G\alpha_q$ bzw. konstitutiv aktivem $G\alpha_q$ ausreichend ist, um eine maladaptive Hypertrophie zu induzieren. In beiden Modellen lassen sich die Expression fötaler Gene, Bradykardie, ventrikuläre Dilatation und Abnahme der Kontraktilität, sowie die Ablagerung von Kollagen (Fibrose) nachweisen (D'Angelo *et al.* 1997; Mende *et al.* 1998; Sakata *et al.* 1998). Umgekehrt zeigen Mäuse, in welchen transgene Inhibitoren wie dominant negatives $G\alpha_q$ oder RGS4 überexprimiert wurden, sowie das konditionelle $G\alpha_{q/11}$-Deletionsmodell eine Resistenz gegen artifiziell induzierte Hypertrophie (Rogers *et al.* 1999; Wettschureck *et al.* 2001). Die ersten Kontroversen ergaben sich allerdings aus der Frage nach den beteiligten Mediatoren der $G\alpha_q$-induzierten kardialen Hypertrophie. In der Mehrheit der Publikationen wird darin ein PLC-abhängiger Prozess vermutet, in welchem monomere GTPasen, MAPK und Calcineurin als nachgeschaltete Mediatoren eine Rolle spielen (Clerk and Sugden 2004; Sugden and Clerk 2005; Woodcock *et al.* 2008). Andere Arbeitsgruppen dagegen postulieren, dass neben der PLC zusätzliche $G\alpha_q$-Effektoren aktiviert werden, da sich nicht immer eine Korrelation zwischen PLC-Aktivierung und hypertrophen Phänotyp nachweisen lässt (Sah *et al.* 1996; Mende *et al.* 2001; Brown *et al.* 2006). Ein zusätzlicher Aspekt ergibt sich aus der Tatsache, dass die in diesem Zusammenhang untersuchten GPCRs nicht nur an $G\alpha_q$, sondern auch an Proteine der $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_i$-Familie koppeln (Sadoshima and Izumo 1997; Gohla *et al.* 1999; Yamazaki *et al.* 1999). Eine parallele Aktivierung der monomeren GTPasen RhoA und Rac1 kann daher nicht ausgeschlossen werden (Brown *et al.* 2006).

3.5.2 RhoA und Rac1 in der kardialen Hypertrophie

Die meisten in vitro-Daten zur Beteiligung von RhoA in der kardialen Hypertrophie wurden durch die Verwendung direkter Inhibitoren von RhoA oder dessen Effektor ROCK gewonnen. Da RhoA

in vielen Publikationen als ein der Aktivierung von Ras-und Rac- nachgeschalteter Effektor beschrieben wurde (Nobes and Hall 1995), konnte zunächst gezeigt werden, dass RhoA als parallel aktivierter Mediator der PE-induzierten Hypertrophie agiert. Die Aktivierung von RhoA durch PE wurde sowohl als $G\alpha_q$-abhängig als auch $G\alpha_{12/13}$-abhängig beschrieben und dessen direkte Inhibition durch Applikation von C3-Transferase führte zu einer Reduktion in der Proteinsynthese, der Myofibrillen-Organisation sowie in der Expression spezifischer Markergene, wie ANP und β-MHC (Sah *et al.* 1996; Hines and Thorburn 1998; Maruyama *et al.* 2002). Einige Arbeitsgruppen konnten zusätzlich eine Beteilligung des Effektors ROCK nachweisen und ähnliche Befunde wurden auch für die ET-1- bzw. AT II-induzierte Hypertrophie publiziert (Aoki *et al.* 1998; Kuwahara *et al.* 1999; Yanazume *et al.* 2002). Trotz manigfaltiger Publikationen bleibt die Rolle von RhoA in der kardialen Hypertrophie strittig, da Resultate der bisher gewonnenen in vivo Daten Abweichungen zum Rho/ROCK-abhängigen Hypertrophie-Modell zeigen. Transgene Mäuse, in welchen RhoA kardial überexprimiert wurde, weisen zwar eine vergleichbare Expression embryonaler Gene auf, zeigen aber nur eine marginale Zuhnahme der ventrikuläre Masse. Stattdessen konnte eine massive Dilatation der Atrien zusammen mit einer ausgeprägten Bradykardie nachgewiesen werden, die schließlich zur ventrikulären Dilatation und Abnahme der Kontraktilität führten (Abb. 3.6) (Sah *et al.* 1999). Untermauert werden diese Befunde durch Studien an Mäusen, bei denen einen Allel des ROCK1-Gens inaktiviert wurde. Diese partielle Deletion zeigte keinen direkten Einfluss auf die Induktion der Hypertrophie in Kardiomyozyten. Die untersuchten Tiere zeigten dagegen eine Reduktion in der den Phänotyp begleitenden Fibrose (Rikitake *et al.* 2005).

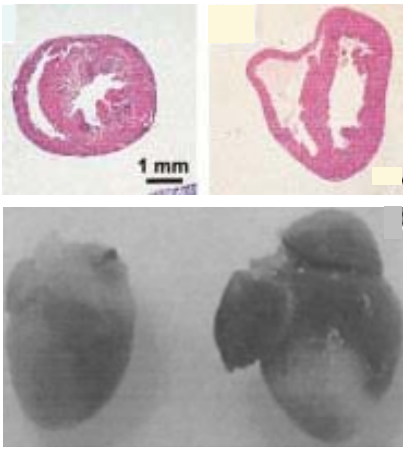


Abb. 3.6: Kardiale Morphologie von RhoA-überexprimierenden transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp. Oben: Hematoxilyn- und Eosin-Färbung, Transversalschnitt des rechten und linken Ventrikels von Wildtyp (rechts) und transgen (links). Unten: Herz, Wildtyp (rechts) und transgen (links) (Sah *et al.* 1999).

Studien zur Überexpression von konstitutiv aktivem Rac1 in isolierten Rattenkardiomyozyten belegen die Induktion eines kardialen Phänotyps, der deutliche Übereinstimmungen mit der PE-

induzierten Hypertrophie zeigt (Pracyk *et al.* 1998). In weiteren Untersuchungen konnte belegt werden, dass die Stimulation mit PE, ET-1 und AT II zu einer endogenen Rac1-Aktivierung führt, die wiederum die Expression MAPK-abhängiger Hypertrophie-Gene zur Folge hat (Clerk *et al.* 2001; Nishida *et al.* 2005). Welche Mediatoren bei der Aktivierung von Rac1 eine Rolle spielten, ist allerding noch unklar. Während Clerk und Mitarbeiter eine Aktivierung über Ras oder Gßy für möglich halten, wurde die AT II-induzierten Rac1-Aktivierung als einer der $G\alpha_{12/13}$-vermittelten RhoA-Aktivierung nachgeschalter Effekt publiziert (Nishida *et al.* 2005). Erste in vivo Daten zur Rolle von Rac1 wurden anhand transgener Mäuse gewonnen, die kardial konstitutiv aktives Rac1 überexprimieren. Dabei konnten zwei unterschiedliche Phänotypen dokumentiert werden: Die schnell einsetzende hohe Expression von Rac1 führte zu einer lethalen, dilatativen Kardiomyopathie, während eine langsam ansteigende Expression eine transiente Hypertrophie zur Folge hatte, die sich mit zunehmendem Alter der Tiere auflöste. Eine eindeutige Verbindung zwischen Rac1-Aktivierung und Hypertrophie konnte bisher nicht etabliert werden (Brown *et al.* 2006).

3.5.3 Kardiale Fibroblasten

Die Funktion des Myokards ist nicht nur abhängig von der Kontraktionskraft der Kardiomyozyten, sondern wird durch die Interaktion verschiedener Zelltypen bestimmt und der extrazellulären Matrix (ECM), die diese umgibt. Eine der häufigsten Zelltypen neben den Myozyten sind kardiale Fibroblasten, deren primäre Aufgabe in der Erhaltung der Homöostase und in der Strukturierung der ECM besteht. Chronische, pathologische Bedingungen wie mechanischer Stress oder Ischämie-induzierte Apoptose führen zu einer fibrotischen Reorganisation des Gewebes und förden damit die kontinuierliche Abnahme der kardialen Funktion (Brown *et al.* 2005). In diesem Zusammenhang wurde im Besonderen die Rolle Angiotensin II-Typ1-Rezeptor (AT_1R)-vermittelter Signalkaskaden untersucht. Angiotensin II wird als Antwort auf mechanische Stimuli von Kardiomyozyten freigesetzt und induziert wiederum die Produktion von Wachstumsfaktoren, wie TGFβ (transforming growth factor β) und Zytokinen in kardialen Fibroblasten. Die sezernierten Faktoren vermitteln über autokrine und parakrine Effekte Migration, Proliferation, Differenzierung und die Reorganisation der ECM (Rosenkranz 2004; Baudino *et al.* 2006).

3.6 Zielsetzungen der Arbeit

Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor p63RhoGEF wurde als ein spezifischer Mediator der $G\alpha_{q/11}$-vermittelten RhoA-Aktivierung identifiziert (Lutz *et al.* 2005). Die biochemischen Mechanismen, die dieser Aktivierung zu Grunde liegen, waren allerdings noch unklar. Im Gegensatz zu p115RhoGEF, PDZ-RhoGEF und LARG besitzt p63RhoGEF keine G-Protein-spezifische RGS-Domäne, die eine Interaktion mit Proteinen der $G\alpha_{q/11}$-Familie vermitteln könnte. Stattdessen konnte von Lutz und Mitarbeitern anhand der Mutante p63ΔN gezeigt werden, dass

die Interaktion zwischen p63RhoGEF und $G\alpha_{q/11}$ den C-terminalen Bereich des Proteins umfasst. Neben p63RhoGEF wurde auch für den Austauschfaktor LARG eine Aktivierug über $G\alpha_{q/11}$-Proteine postuliert (Booden *et al.* 2002). Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die $G\alpha_{q/11}$-vermittelte RhoA-Aktivierung anhand eines direkten Vergleichs zwischen den beiden RhoGEFs zu analysieren und die spezifische Interaktion zwischen GEF und G-Protein zu definieren. Im Rahmen der Charakterisierung von p63RhoGEF sollten zudem die Eigenschaften dieses Austauschfaktors mit den Eigenschaften der beiden einzigen homologen GEFs Kalirin/Duet und Trio verglichen werden.

Basierend auf der postulierten Dominanz $G\alpha_{q/11}$-vermittelter Signalkaskaden in der Entstehung kardialer Hypertrophie (D'Angelo *et al.* 1997; Mende *et al.* 1998; Wettschureck *et al.* 2001) sollte im physiologischen Teil dieser Arbeit die noch strittige Rolle von RhoA im Hypertrophie-Modell isolierter neonataler Rattenkardiomyozyten untersucht werden. Bisher konnte weder ein $G\alpha_{q/11}$-vermittelter Aktivierungsmechanismus für RhoA noch eine distinkte pathophysiologische Funktion etabliert werden (Sah *et al.* 1999; Brown *et al.* 2006). In diesem Zusammenhang sollte die Funktion des kardial exprimierten Mediators p63RhoGEF näher charakterisiert werden (Souchet *et al.* 2002).

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Tiere

Wistar-Kyoto-Ratten

4.1.2 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden analysenrein, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Calbiochem, Fluka, Roth, Serva, Sigma-Aldrich und Merck bestellt. Weitere Materialien wurden bezogen von:

4.1.3 Feinchemikalien

Angiotensin II	Sigma-Aldrich
Atenolol	ICI
ATP	SIGMA-Aldrich
Bradykinin	Calbiochem
C2-Transporter	Aktories, Freiburg
C2/3-Toxin	Aktories, Freiburg
Carbachol	Sigma-Aldrich
DAPI	Sigma-Aldrich
Endothelin-1	Anaspec.
Fasudil	Tocris
H1152P	Calbiochem
Histamin	Calbiochem
Mepyramin	Sigma-Aldrich
MTT (TLC)	Sigma-Aldrich
Noradrenalin	Sigma-Aldrich
NSC 23766	Biotrend
Phenylephrin	Sigma-Aldrich
Protease-Inhibitor	Complete (mini) Tablette, Roche
TRITC-Phalloidin	Sigma-Aldrich
U-46619	Cayman Chemical
U-73343	Calbiochem
U-73122	Calbiochem

4.1.4 Radiochemikalien

[4,5-^{3}H]L-Leucin Hartmann Analytic

4.1.5 Antikörper

Die Primär- bzw. Sekundärantikörper wurden in TBST-Puffer verdünnt.

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubations-bedingung	Sekundärantikörper
anti-RhoA monoklonal, sc-418, Santa Cruz	1:200	ü. N., 4°C	anti-Maus
anti-Rac1 monoklonal, 610650, Transduction	1:1'000	ü. N., 4°C	anti-Maus
anti-c-myc monoklonal, Klon 9E10, Roche	1:200	1 h, RT	anti-Maus
anti-Flag M2 monoklonal, F3165 Sigma-Aldrich	1:2’000	ü. N., 4°C	anti-Maus
anti-eGFP polyklonal, sc-8334 Santa Cruz	1:200	ü. N., 4°C	anti-Kaninchen
anti-Penta-His monoclonal, 34660 Qiagen	1:1'000	ü. N., 4°C	anti-Maus
anti $G\alpha_{q/11}$ (C19) polyclonal, sc-392 Santa Cruz	1:200	ü. N., 4°C	anti-Kaninchen
anti $G\alpha_{12/13}$ polyklonales Serum, Gramsch	1:1'000	ü. N., 4°C	anti-Kaninchen
anti-ANP (N-20) polyklonal, sc-18811 Santa Cruz	1:200	ü. N., 4°C	anti-Ziege
anti β-Aktin monoklonal, Klon AC-74 Sigma-Aldrich	1:4’000	ü. N., 4°C	anti-Maus
anti Glattmuskelaktin monoklonal, Klon hSM-V Sigma-Aldrich	1:4’000	ü. N., 4°C	anti-Maus
anti-Gβ (T-20) polyklonal, sc-378, Santa Cruz	1:1’000	ü. N., 4°C	anti-Kaninchen
anti p63RhoGEF polyklonal Proteintech Group	1:1'000	ü. N., 4°C	anti-Kaninchen
anti-Phospho-Tyr monoklonal Cell Signaling	1:1'000	ü. N., 4°C	anti-Maus

Tab. 1: Primärantikörper.

Sekundärantikörper	Verdünnung	Inkubations-bedingung
anti-Kaninchen-IgG-Peroxidase-Konjugat (Ziege) A-9169, Sigma-Aldrich	1:80'000	45 min, RT
anti-Maus-IgG-Peroxidase-Konjugat (Ziege) A-9044, Sigma-Aldrich	1:10'000	45 min, RT
Anti-Ziege-IgG-Peroxidase-Konjugat (Kanninchen) Sigma-Aldrich	1: 10’000	45 min RT

Tab. 2: Sekundärantikörper.

4.1.6 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fermentas
Klenow (Großes Fragment der DNA Polymerase I)	Fermentas
PfuTurboHotstart-Polymerase	Stratagene
Restriktionsenzyme	Fermentas, Invitrogen, New England BioLabs
Taq-Polymerase	Qiagen
T4-DNA-Ligase	Fermentas

4.1.7 Genspezifische Primer

Die Primer wurden von der Firma Sigma-Genosys synthetisiert und sind in 5’→3’-Orientierung aufgelistet. „For“ steht für einen Primer in sense- und „rev“ für einen Primer in antisense-Richtung. Die gelieferten Lyophilisate wurden in einer adäquaten Menge dest. Wasser aufgenommen um eine 100 µM Primerlösung zu erhalten.

PCR-Primer

p63RhoGEF

p63-149for	*ATATCAAGCTTA*AGTGAGGAGGAACAGAAGAAG
p63-295for	*ATATCAAGCTTA*ATCATGAAATACCAGCTGCTG
p63-502rev	*CCCCCTCGAGGTTTA*AGGGCTCCCCACTCCAGGCCC
p63-492rev	*CCCCCTCGAGGTTTA*CCCCAGGCTGTTGGTCTGGCT
p63-482rev	*CCCCCTCGAGGTTTA*CTGGTACTCAATGGGTGACTG

Duet

Duet-219for	*ATATCAAGCTTA*AAAAACCAGAAGAAGAACAGAAAG
Duet-558rev	*CCCCCTCGAGGTTTA*AGGTTGAGACCTCATCTCAGC

Trio

Trio-1894for	*ATATCAAGCTTA*TTATTAGTCCGCCCCCACCAG
Trio-2232rev	*CCCCCTCGAGGTTTA*ATCATTTTCCACATTTTCCTC

Mutagenese-Primer

Folgenden Mutagenese-Primer wurden zur Amplifikation des Fragments **p63-149-502** eingesetzt:

DH-Domäne

R204Afor	GAGAGTCTTCGAGGCCGTGACGCGATTGTGTTTGGAATATCC
I205Nfor	CTTCGAGGCCGTGACAGGAATGTGTTTGGGAATATCCAGC
Q212Afor	GTGTTTGGGAATATCCAGGCAATCTATGAGTGGCACCGAG
W216Ffor	GGAATATCCAGCAAATCTATGAGTTCCACCGAGACTATTTCTTGC
Y220Afor	CTATGAGTGGCACCGAGACGCTTCTTGCAAGAGCTACAACG

PH-Domäne

R244Afor	CAGCTATTCATCAAACACGCGGCCCGGCTGCATATGTATG
R245Afor	CATCAAACACGAGCGCGCGCTGCATATGTATGTGGTGTAC
R341Afor	GATATGATGACGCTGGGGGCATTGCGGGGATTTGAGGGCAAAC
A351Kfor	GGATTTGAGGGCAAACTGACTAAGCAGGGGAAGCTCTTGG
E385Afor	GAGGCGCGTCTTCCTCTTTTGCGCAAATCATCATCTTCAG
Q386Afor	CGCGTCTTCCTCTTTGAGGCAATCATCATCTTCAGTGAAG
S415Gfor	GAACAGCATTAAGGTGGGCTGCCTGGGACTGGAG
F471Efor	GATCTTGGAGAGCCAACGGGACGAGCTCAACGCATTGCAGTC
A474Dfor	GAGAGCCAACGGGACTTCCTCAACGACTTGCAGTCACCCATTG
L475Afor	GCCACGGGACTTCCTCAACGCAGCGCAGTCACCCATTGAG
P478Gfor	CCTCAACGCATTGCAGCAGGCATTGAGTACCAGAGACGGGAG
I479Dfor	CTCAACGCATTGCAGTCACCCGATGAGTACCAGAGACGGGAGAG
Y481Afor	GCATTGCAGTCACCCATTGAGGCCCAGAGACGGGAGAGC
Q482Afor	GCAGTCACCCATTGAGTACGCGAGACGGGAGAGCCAGACCAAC

Folgenden Mutagenese-Primer wurden zur Amplifikation von **Maus-G$\alpha_{i/q}$** eingesetzt:

A253K for	GCATGGAGGAGAGCAAAAAACTCTTTAGAACAATTATCACCTACC
Y261N for	GAACAATTATCACCAACCCCTGGTTCCAGAACTCC
W263D for	CACCAACCCCGACTTCCAGAACTCCTCTGTGATTCTG
D321A for	CCTGAACCCCGACAGTGCCAAAATCATCTACTC
Y356A for	CTGAACCTGAAGGAGGCCAATCTGGTCTAACCGTG

4.1.8 siRNA-Sequenzen und DNA-Oligonukleotid-Matrizen für Haarnadelschleifen-shRNA

Die siRNA-Sequenz gegen p63RhoGEF wurde von der Firma Qiagen berechnet und hergestellt. Die resultierenden RNA-Oligonukleotide wurden als 20µM Lösung in DEPC-behandeltem H_2O gelagert.

Zunächst wurde die Funktionalität der siRNA in transienten Transfektions-Experimenten überprüft und dann die Sequenz zur Herstellung der Haarnadelschleifen-shRNAs verwendet. Mit Hilfe eines speziellen Software-Programms (www.ambion.com/techlib/misc/psilencer_converter.html) wurde die siRNA-Sequenz in eine DNA-Oligonukleotid-Matritze konvertiert und so modifiziert, dass bei späterer Expression in der Zelle ein RNA-Oligonukleotid mit Haarnadelschleifen-Struktur entsteht. Dazu wurden sense- und antisense-Sequenz der siRNA hintereinander als ein Strang synthetisiert, der durch eine kurze Schleifensequenz unterbrochen wird. Diese Sequenz wurde zusätzlich für Klonierungszwecke mit den Schnittstellen der Restriktionsenzyme BamHI und HindIII flankiert. Die DNA-Oligonukleotid-Matrize wurde von der Firma Sigma-Genosys hergestellt und als 200 µM Lösung in dest. H_2O gelagert.

siRNA-Sequenzen:

sense-siRNA-p63RhoGEF-Ratte	cagaacugacguuauugacua
antisense-siRNA-p63RhoGEF-Ratte	uagucaauaacgucaguucug

DNA-Oligonukleotid-Matrizen für Haarnadelschleifen-shRNA:

sense-Haarnadelschleifen-shRNA-Insert-p63RhoGEF-Ratte:
GATCCCcagaactgacgttattgactaTTCAAGAGAtagtcaataacgtcagttctgTTTTTGGAAA

antisense-Haarnadelschleifen-shRNA-Insert-p63RhoGEF-Ratte:
AGCTTTTCCAAAAAcagaactgacgttattgactaTCTCTTGAAtagtcaataacgtcagttctgGG

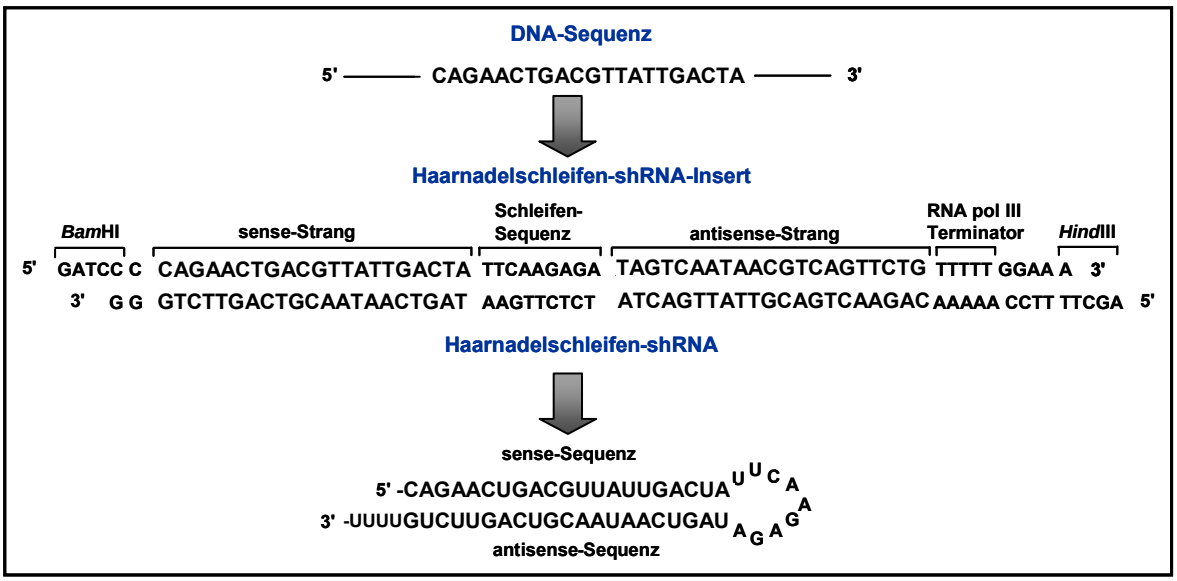


Abb. 4.1: DNA-Oligonukleotid-Matrixe für Haarnadelschleifen-shRNA.

4.1.9 Plasmide

pCMV-Tag3/2 A, B, C	Stratagene
pcDNA 3.1	Invitrogen
pSRE.L	Dian Wu, Rochester,USA
pRL-TK	Promega
pα.s.actin.L	Stephen Ferguson, London, Kanada
pAdEasy-1	Bert Vogelstein, Baltimore, USA
pAdTrack	Bert Vogelstein, Baltimore, USA

pcmV-Tag2-Duet, human	
pC1-Trio, human	Anne Debant, Boston, USA
pcmV-Tag2-Trio 310, C.elegans	Kenneth G. Miller, Oklahoma, USA
pcmV-Tag2-Trio 309, C.elegans	Kenneth G. Miller, Oklahoma, USA
pcmV-Tag2-Trio 309IN, C.elegans	Kenneth G. Miller, Oklahoma, USA
pcDNA-G_oQL, C.elegans	Kenneth G. Miller, Oklahoma, USA
pcDNA-G_qQL, C.elegans	Kenneth G. Miller, Oklahoma, USA

4.1.10 Klonierungen

4.1.10.1 Schematische Darstellung der Klonierung von LARG-ΔPDZ

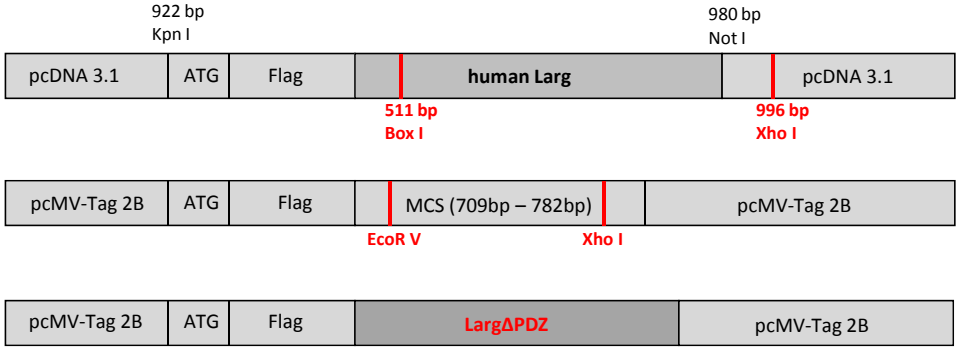


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Klonierung von LARG-ΔPDZ

4.1.11 Adenoviren

Adp63FL	Susanne Lutz, Mannheim
Adp63ΔN	Susanne Lutz, Mannheim
AdGFP	Susanne Lutz, Mannheim
AdGFPsh	Friederike Cuello, London, GB
AdGα_q	Hans-Jörg Hippe, Heidelberg
AdRGS16	Thomas Wieland, Hamburg
AdPDZ-RGS	Thomas Wieland, Hamburg
AdLscII	Thomas Wieland, Hamburg

4.1.12 Bakterien

E. coli BL21 (DE3) pLysS {F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm met* (DE3) pLysS (Cam^R)}
Novagen

E. coli BJ5183 {*end*A *sbc*BC *rec*BC *gal*K *met* thi-1 *bio*T *bsd*R (Str^r)}
Stratagene

E. coli XL10 Gold {Tet^r *D(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac* Hte [F' *proAB lacI*^{q}*ZDM15 Tn10* (Tet^r) Tn5 (Kan^r) Amy]}
Stratagene

E. coli Rosetta^{TM} {F^- *ompT hsdS*$_B$ (r_B^- m_B^-) *gal dcm* pRARE^2 (CamR)}
Novagen

4.1.13 Zellkultur

BrdU	Sigma-Aldrich
DMEM	Sigma-Aldrich
Fötales Kälberserum	Biozol
Kollagen I	BD Bioscience
Kollagenase Type II	CellSystems
L-Glutamin	Sigma-Aldrich
Pankreatin	Sigma-Aldrich
PBS	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA	Sigma-Aldrich

4.1.14 Transfektionsreagenzien

PolyFect™	Qiagen
TransFast™	Promega

4.1.15 Verbrauchsmaterialien

Pipettenspitzen	Sarstedt
Zellkulturmaterial	Sarstedt, Nalge Nunc Int.
Zellsiebe	BD Bioscience

4.1.16 Sonstige Materialien

DNA-Größenmarker	1 kb DNA-Leiter, Peqlab
Glutathion-Sepharose Beads	Glutathion-Sepharose 4 Fast-Flow, GE Healthcare
Nitrozellulose-Membran	Protran, Schleicher&Schuell
Protein-Marker	Roti-Mark Standard, Roth
Protein A-Sepharose CL-4B	GE Healthcare

4.1.17 Geräte

Bakterienbrutschrank	Memmert
Elektroporator	GenePulser, Biorad
Feinwaage	Sartorius
Gelelektrophoresekammer/Blot Modul	Protean II/ Biorad
Gel-Imager	Multi Image Light Cabinet, AlphaImager™ 2200, Alpha-Innotech

Heizblock	Thermomixer comfort, Eppendorf
Homogenisator	Braun-Sonic 300, Quigley-Rochester, Inc
	Polytron PT1200E, Kinematica
Mikroskop	Axiovert 25, Zeiss
	IX 81, Olympus
Mikroskop-Kamera	XM 10, Olympus
Multilabel Reader	EnVision, Perkin Elmer
PCR-Gerät	Techne
pH-Meter	Microprocessor pH-Meter, WTW
Photometer	Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech
	Titertek Multiscan MCC/340
Rotor für Ultrazentrifuge	SW 27, Beckmann
Schüttler	Neolab
	REAX2, Heidolph
Sterile Werkbank	HeraSafe, Heraeus
Szintillationszähler	Tri-Carb 2100TR, Packard
Ultrazentrifuge	L5,65, Beckmann
Vakuum-Konzentrator	Speed Vac Concentrator, Backofer
Waage	PC440, Mettler
Zellkulturbrutschrank	HeraCell, Heraeus
Zentrifugen	Biofuge fresco, Heraeus
	Centrifuge 54125C, Eppendorf
	Hettich Rotixa/K
	J2-21, Beckmann

4.2 Puffer und Nährmedien

4.2.1 Puffer für molekularbiologische Methoden

DNA-Gelelektrophorese:

50x TAE-Puffer:	2 M Tris-HCl, pH 8
	5,7 % Essigsäure (v/v)
	0,05 M EDTA

Klonieren von Haarnadelschleifen-shRNA-Insert in einen Expressionsvektor:

10x Annealing-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10 mM EDTA
	1 M NaCl

4.2.2 Puffer für proteinbiochemische Methoden

Adenovirus-Aufreinigung:

Cäsiumchlorid-light:	11,02 g CsCl ad 50 mL 1x VSB-Puffer {1 mL ≈ 1,2 g; 22,4 % (w/w)}
Cäsiumchlorid-heavy:	21,1 g CsCl ad 1x VSB-Puffer {1 mL ≈ 1,45g; 42,2 % (w/w)}
10x VSB-Puffer:	100 mM Tris-HCl, pH 7,4 1,37 M NaCl 50 mM KCl 10 mM $MgCl_2$

Ko- bzw. Immunopräzipitation (IP):

IP-Puffer:	10% Glycerin (v/v) 1 % Triton X-100 (v/v) 1,5 mM $MgCl_2$ 50 mM HEPES-NaOH, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 100 mM NaF 10 mM $Na_4P_2O_7$ 1 % PMSF-Lösung (v/v) 10 % Na_3VO_4-Lösung (v/v)
Na_2VO_4-Lösung:	10 mM Na_2VO_4 (in H_2O dest. aufgekocht)
PMSF-Lösung:	100 mM PMSF (in Isopropanol)

Pulldown-Assay:

GST-Fish-Puffer:	50 mM Tris-HCl, pH 7,4 150 mM NaCl 2 mM $MgCl_2$ 10 % Glycerin (v/v) 1 % Igepal CA630 (v/v)
Einfrierpuffer:	50 mM Tris/HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 5 mM $MgCl_2$

	10% Glycerin (v/v)
	1 mM DTT
	0,5 % Triton X-100

SDS-PAGE:

Elektrophorese-Puffer:	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8
	1,25 M Glycin
	0,5 % SDS (w/v)
Western Blot-Puffer:	25 mM Tris-HCl
	190 mM Glycin
	20 % Methanol (v/v)
10x TBS-Puffer:	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 % Tween-20 (v/v)
Ponceau-S-Färbelösung:	0,2 % Ponceau-S (w/v)
	5 % Essigsäure (v/v)
4x SDS-PAGE Probenpuffer:	0,2 M Tris-HCl, pH 6,8
(Laemmli-Puffer)	8 % SDS (w/v)
	0,4 % Bromphenolblau (w/v)
	40 % Glycerin (v/v)
	10 % β-Mercaptoethanol (v/v)
Strip-Puffer:	2 % SDS (w/v)
	0,1 M β-Mercaptoethanol
	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8

4.2.3 Medien für die Zellkultur und Bakterienzucht

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 → mit 0,45 µm Filter steril filtrieren
2x YT-Medium:	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl → ad 1 L mit dest. H_2O; autoklavieren
LB-Medium:	10 g Trypton 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl → ad 1 L mit dest. H_2O; autoklavieren
LB-Platten:	2,8 g Agar-Agar 200 mL autoklaviertes LB-Medium → Zusätze entweder 100 µg/mL Ampicillin oder 50 µg/mL Kanamycin
PBS-Puffer:	148 mM NaCl 2,7 mM KCl 6,5 mM $NaHPO_4$ 1,5 mM KH_2PO_4 → pH 7,4; autoklavieren
Zellkulturwachstumsmedien:	DMEM + Zusätze: 10 % FCS 2 mM L-Glutamin 100 U/mL Penicillin 0,1 mg/mL Streptomycin
Einfriermedium für eukaryotische Zellen:	DMEM mit 10 % DMSO und 10 % FCS
Einfriermedium für prokaryotische Zellen (*E. coli*):	50 % Glycerin in dest. H_2O

4.2.4 Puffer zur Isolierung von Primärzellen

10x Präparationspuffer:	1,2 M NaCl 0,2 M HEPES/NaOH pH 7,4 55 mM Glucose 50 mM KCl 8,3 mM $MgSO_4$ → sterilfiltrieren, Lagerung bei 4°C
Verdaulösung:	0,5 g/mL Kollagenase Typ II 0,6 g/mL Pankreatin in Präparationspuffer → sterilfiltrieren

4.3 Molekularbiologische Methoden

4.3.1 Plasmid-DNA Präparation aus *E. coli*

Einzelne Bakterienkolonien wurden in 5 mL bzw. 150 mL LB-Medium (50 µg/mL Kanamycin oder 100 mg/mL Ampicillin) ü. N. mit 250 rpm bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Plasmidpräparationen erfolgten mit dem „Plasmid Mini Kit“ bzw. dem „Plasmid Midi Kit“ der Firma Qiagen. Das Prinzip der Aufreinigung beruht auf der modifizierten alkalischen Lyse der Bakterien und der Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikatmatrix. Zur Verifizierung der aufgereinigten Plasmide wurde ein Restriktionsverdau mit anschließender Agarosegelelektrophorese durchgeführt.

4.3.2 DNA-Fällung

Zur Aufreinigung und Fällung von DNA wurden 0,1 Volumenanteile Natriumacetat (3 M, pH 5) und 0,7 Volumenanteile Isopropanol zugegeben. Dadurch wurde die Hydrathülle der DNA von den Kationen verdrängt und die Ionenbindung zwischen den Kationen und den Phosphatgruppen der DNA ermöglicht. Die dadurch als Salz ausgefällte DNA wurde mittels Zentrifugation pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen und in einer geeigneten Menge dest. H_2O aufgenommen.

4.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen

Zur Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäurelösungen (nach Clark und Swika, 1977) wurde in einem Spektralphotometer eine geeignete Menge der Nukleinsäurelösung mit dest. H_2O verdünnt und in einer Quartzküvette gemessen. Für die Konzentrationsberechnung von Nukleinsäurelösungen gelten folgende Zusammenhänge (Cryer *et al.* 1975):

Doppelsträngige (ds) DNA: 1 OD_{260nm} entspricht E 50 µg/mL
Einzelsträngige (ss) RNA: 1 OD_{260nm} entspricht E 37 µg/mL
Einzelsträngige (ss) DNA: 1 OD_{260nm} entspricht E 20 µg/mL
Durch Bestimmen der Extinktion bei 230, 260 und 280 nm können Verunreinigungen der Nukleinsäurelösungen bestimmt werden. Für eine ausreichende Reinheit der isolierten Nukleinsäuren gelten folgende Richtwerte:
$E_{260}/E_{280} \approx 1{,}8$
$E_{260}/E_{230} \approx 2{,}2$

4.3.4 DNA-Gelelektrophorese

Zur qualitativen Analyse von Nukleinsäurepräparationen wurde eine horizontale Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Nukleinsäuren wurden in einem elektrischen Feld in einer Agarosematrix (üblicherweise 1%iges Agarosegel in 1x TAE-Puffer) aufgetrennt (McDonell *et al.* 1977). Die Agarose wurde unter Erwärmung in der Mikrowelle gelöst und nach Abkühlen auf 50°C mit 0,5 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Um den Fortschritt der Elektrophorese abschätzen zu können, wurde in die Proben Bromphenolblau (6x DNA Ladepuffer, peqLab) gegeben und als Größenmarker wurde die „1 kb DNA-Leiter “ der Firma Peqlab verwendet. Die Elektrophorese wurde in 1x TAE-Puffer mit einer elektrischen Spannung von 120 V durchgeführt. Unter UV Durchstrahlung (302 nm) können DNA-Stränge durch Einlagerung von Ethidiumbromid sichtbar gemacht werden. Zur Isolierung eines DNA-Fragmentes wurde dieses unter UV-Bestrahlung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche) aufgereinigt.

4.3.5 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA wurde von der Firma GATC durchgeführt.

4.3.6 Restriktion von DNA mit Endonukleasen

Spezifische palindromische Tetra- bis Oktanukleotidsequenzen werden von Restriktionsendonuklasen vom Typ II erkannt. Sie hydrolisieren die DNA innerhalb der Erkennungssequenzen (Arber 1978). Dabei entstehen entweder 5’- bzw. 3’- überstehende („sticky-ends“) oder glatte („blunt-ends“) Enden. Zu analytischen Zwecken wurden 1 bis 3 µg DNA (20 µL Ansatz) und zu präparativen Zwecken 15 bis 20 µg DNA (100 µL Ansatz) mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten. 1 bis 10 U Restriktionsenzym pro 1 µg DNA wurden für 1 bis 3 h in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer bei geeigneter Reaktionstemperatur inkubiert. Mittels einer horizontalen Agarosegelelektrophorese wurde der Restriktionsverdau überprüft.

4.3.7 Dephosphorylierung von DNA-Enden

DNA-Enden wurden durch direkte Zugabe von alkalischer Phosphatase in den Restriktionsansatz (CIAP) (0,05 U/pmol DNA-Enden) dephosphoryliert. Bei glatten Enden oder 3'-überhängenden Enden wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C und für 30 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde erneut CIAP zugegeben und die Inkubationsschritte wiederholt. Bei 5'-überhängenden Enden wurde der Ansatz für 30 min bei 37°C inkubiert. Die CIAP wurde durch Erhitzen auf 85°C für 15 min inaktiviert.

4.3.8 Enzymatische Verlängerung von DNA-Enden

Das Auffüllen von 3'-überhängenden Enden erfolgte mit dem großen Fragment der Polymerase I (Klenow, Fermentas). Der Reaktionsansatz wurde gemäß Herstellerangaben ergestellt und für 15 min bei 37°C inkubiert. Zur Beendigung der Reaktion wurde der Ansatz für 10 min auf 70°C erhitzt.

4.3.9 Verknüpfung von DNA-Molekülen mit der T4-DNA-Ligase

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die ATP-abhängige Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 3'-Hydroxy- und 5'-Phosphat-Enden von doppelsträngigen DNA-Molekülen (Weiss *et al.* 1968). Die Ligationsreaktion wurde nach Angaben des Herstellers mit dem mitgelieferten Puffersystem durchgeführt. Für den Ligationsansatz wurden 0,3 pmol Insert-DNA und 0,1 pmol Vektor-DNA verwendet und ü. N. bei RT inkubiert. Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Insert. Zur Inaktivierung der Ligase wurde der Ligationsansatz für 10 min auf 65°C erhitzt und einer Chloroformextraktion unterzogen. Nach Zugabe von 50 µL Chloroform wurde der Ligationsansatz gemischt, für 3 min bei 16'000 g zentrifugiert und auf ein Uhrglas gegeben. Die wässrige Phase, welche die DNA enthält, wurde vorsichtig abgenommen.

4.3.10 Transformation von Bakterien

Für die Transformation von Bakterien wurden zunächst kompetente Bakterienzellen nach Hanahan (Hanahan 1983) hergestellt. Bei der Elektrotransformation wurden 2 - 4 µL des gereinigten Ligationsansatzes oder 100 ng Plasmid-DNA und 50 µL elektrokompetente Bakterien in eine kalte Küvette mit einem Elektrodenabstand von 2 mm gegeben. Die DNA wurde mit Hilfe eines „Gene Pulsers" (25 µF, 200 Ω, 2,5 kV) in die Bakterien gebracht. Anschließend wurde zu den Bakterien 200 µL 37°C warmes SOC-Medium gegeben und für 20 min bei 37°C schüttelnd inkubiert. Die Bakterien wurden auf LB-Selektionsplatten ausgestrichen (Kanamycin oder Ampicilin) und ü. N. bei 37°C inkubiert.

4.3.11 Kryokonservierung von Bakterien

Bakterien aus einer Übernachtkultur wurden 1:1 mit 50 % Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C eingefroren.

4.3.12 PCR

Die Amplifikation von DNA-Abschnitten mittels der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgte entweder mit der Taq-Polymerase oder mit der PfuTurbo-Polymerase, um die Wahrscheinlichkeit für fehlerhafte Produkte zu reduzieren. Die jeweiligen Reaktionsansätze wurden gemäß den Angaben des Herstellers pipettiert. Um unspezifische Reaktionen zu minimieren, wurde das PCR-Gerät auf die Denaturierungstemperatur vorgeheizt und anschließend der Reaktionsansatz hineingestellt.

Reagenz	Endkonzentration
10 x Reaktionspuffer	1x
Desoxynukleotid-Mix	0,2 mM
Primer for	0,4 µM
Primer rev	0,4 µM
Template-DNA	5 ng/µl
Taq-Polymerase/ PfuTurboPolymerase	U

Tab. 3**: Reaktionsansatz für die PCR**.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	95°C	1
Denaturierung	30 sec	95°C	
Anlagerung	30 sec	57°C	30
Extension	1 min/kb	72°C	
Finale Extension	10 min	72°C	1
Kühlung	∞	4°C	

Tab. 4: Programm für die PCR mit TaqPolymerase

Zyklus	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	5 min	94°C	1
Denaturierung	30 sec	94°C	30
Anlagerung	30 sec	57°C	
Extension	2 min/kb	68°C	
Finale Extension	10 min	68°C	1
Kühlung	∞	4°C	

Tab. 5: Programm für die PCR mit PfuTurboPolymerase

4.3.13 Mutagenese

Der Austausch einzelner Basen erfolgte mit dem „Quik Change Site Directed Mutagenesis Kit“ (Stratagene) gemäß den Angaben des Herstellers. Das PCR-Programm ist in Tabelle 6 dargestellt.

Zyklus	Zeit	Temperatur	Anzahl der Zyklen
Initiale Denaturierung	30sec	95°C	1
Denaturierung	30 sec	95°C	16
Anlagerung	1 min	55°C	
Extension	2 min/kb	68°C	
Kühlung	∞	4°C	

Tab. 6**: Programm zur gerichtete Mutagenese**.

4.3.14 Herstellung rekombinanter Adenoviren

Die Herstellung rekombinanter Adenoviren erfolgte mit dem pAdEasy1-System, welches genomische Abschnitte des Adenovirus Serotyp-5 (Ad5) enthält. Die dadurch generierten Adenoviren sind durch eine Deletion des E1 und E3 Gens, des linearen doppelsträngigen 36 kb großen Ad5-Genoms zwar infektiös, aber replikationsdefizient. In Abbildung 7 ist das Schema der Adenovirus-Generierung dargestellt, dessen Vorgehensweise im Anschluss genauer erläutert wird (He *et al.* 1998).

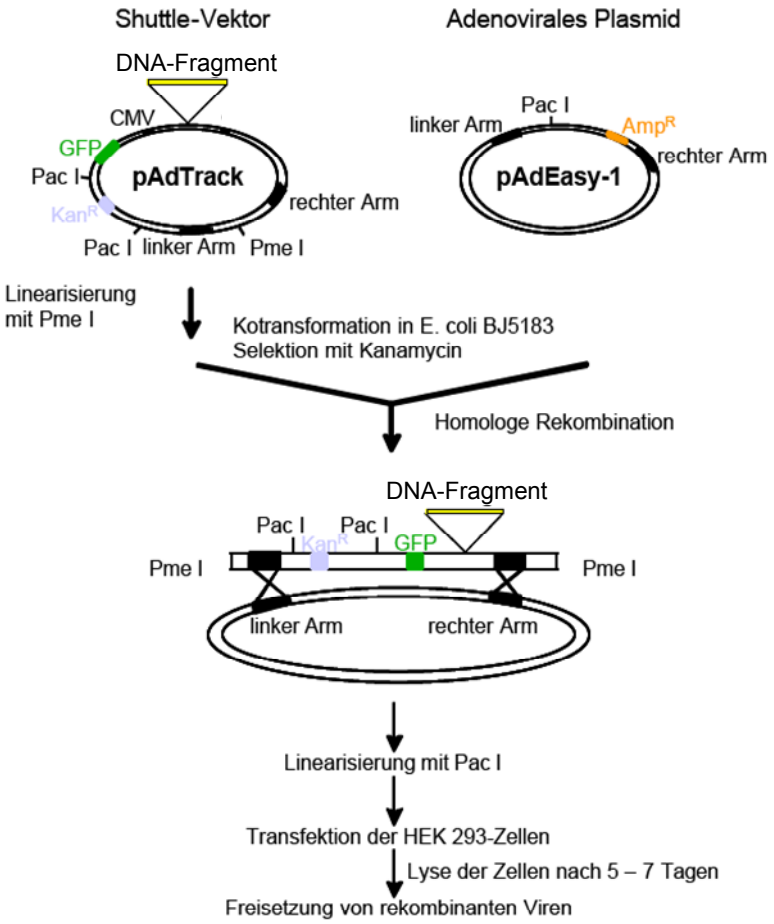


Abb. 4.3: Herstellung rekombinanter Adenoviren mittels des pAdEasy1-Systems. Nach Insertion des entsprechenden DNA-Fragments in den Transfervektor pAdTrack-CMV erfolgt eine homologe Rekombination mit dem Vektor pAdEasy-1 in E. coli BJ 5183-Bakterien. Für die anschließende Produktion rekombinanter Adenoviren wurden HEK-Zellen mit dem rekombinierten und Pac1 linearisierten Vektorkonstrukt transfiziert.

Im ersten Schritt der Virusgenerierung wurde das Haarschleifen-shRNA-Konstrukt inklusive des H1-Promotors (s.4.3.15) in den Transfervektor pAdTrack kloniert. Dieser Vektor kodiert für das grün fluoreszierende Protein EGFP („enhanced green fluorescent protein“), so dass zum einen die Transfektionseffizienz bei Generierung des Virus als auch die spätere Infektionsrate stetig dokumentiert werden konnten. Nach erfolgreich abgeschlossener Klonierung wurde der pAdTrack mittels des Restriktionsenzyms PmeI linearisiert und über ein Agarosegel aufgereinigt. Aus dem erhaltenen Produkt wurden 100ng für die anschließende homologe Rekombination eingesetzt. Der Transfervektor sowie 1µg des in „supercoiled“-Struktur vorliegenden Vektors pAdEasy1 wurden mittels Elektroporation zur Ko-Transformation des Bakterienstamms E.*coli* BJ5183 eingesetzt. Durch die homologe Rekombination in den Bakterien kam es zur Übertragung des in den Transfervektor klonierten Konstrukts auf das Virusgenom und zusätzlich zu einem Austausch der im pAdEasy1-Vektor kodierten Ampicillin-Resistenz gegen das Kanamycin-Resistenzgen des pAdTrack-Vektors. Positive Klone wurden daher auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten

selektiert und zusätzlich durch ein Restriktionsverdau mit PacI überprüft. Bei erfolgreicher homologer Rekombination zeigten sich nach dem Verdau zwei DNA-Fragmente mit einer Größe von 33 kb bzw. 4,1 kb im Agarosegel. Zur eigentlichen Virusgenerierung wurde das mit PacI linearisierte Virusgenom in die permissive Ziellinie HEK-293 transfiziert. Diese Zelllinie zeichnet sich dadurch aus, dass sie die oben genannten deletierten Virusgene exprimiert und damit die Produktion infektiöser Viruspartikel ermöglicht (Graham *et al.* 1977). Die Amplifikation wurde durch Transfektion von HEK-Zellen in einer 6 cm Schale gestartet und diese Zellen dann für die Dauer von mindestens 10 Tagen kultiviert. Während der Inkubation konnte der Erfolg der Transfektion und die Virusproduktion anhand der Expression des Reportergens EGFP mit Hilfe eines inversen Mikroskops kontrolliert werden. Das verwendete Mikroskop verfügte über eine Epifluoreszenzeinrichtung mit einem Filtersatz für EGFP (Anregung 470 nm, Emission 515 nm). Die Isolierung der rekombinanten Adenoviren erfolgte durch mechanisches Ablösen der infizierten HEK-Zellen von der Schalenoberfläche. Die erhaltene Zellsuspension wurde dreimal in flüssigem N_2 eingefroren, um eine vollständige Lyse der Zellen zu erreichen. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation für 5 min bei 600 g entfernt. Mit den im Überstand befindlichen rekombinanten Adenoviren wurden nach und nach bis zu 5 x 10^8 Zellen infiziert. Im letzten Schritt der Amplifikation wurden die adenoviral infizierten HEK-Zellen kurz vor Einsetzten der Lyse geerntet d.h. Zellen, die abgerundet aber noch adhärent waren. Etwa 20 x 10^6 Zellen wurden mit 5 mL serumreduzierten DMEM-Medium von der Schalenoberfläche abgespült und die Zellsuspension anschließend bei 150 g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 mL PBS resuspendiert. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen durch dreimaliges Schockgefrieren in flüssigem N_2. Die dadurch entstandenen Zelltrümmer wurden durch mehrmalige Zentrifugation mit 600 g für 5 min entfernt. Die Aufreinigung und Konzentrierung der rekombinanten Adenoviren erfolgte durch eine Cäsiumchlorid-Dichtegradzentrifugation. Dazu wurde zuerst 5 mL der CsCl-Lösung mit der höheren Dichte („Cäsiumchlorid-heavy“; 42,2 % {w/w}) in das Zentrifugationsröhrchen (Herolab, PA dünnwandig, 17 mL) gegeben und dann mit 5 mL CsCl-Lösung mit der niedrigeren Dichte („Cäsiumchlorid-light“; 22,4 % {w/w}) überschichtet. Anschließend wurde die virushaltige Suspension auf den CsCl-Gradienten pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte in einer J2-21 Beckmann-Ultrazentrifuge mit einem SW-27 Schwenkbecher-Rotor bei 87'000 g für etwa 20 h bei 4°C. Die von der Zelle fertig gestellten rekombinanten Adenoviren bildeten aufgrund ihrer höheren Dichte einen sichtbaren opaken Ring unterhalb der noch leeren Viruskapside (Abb. 4.4).

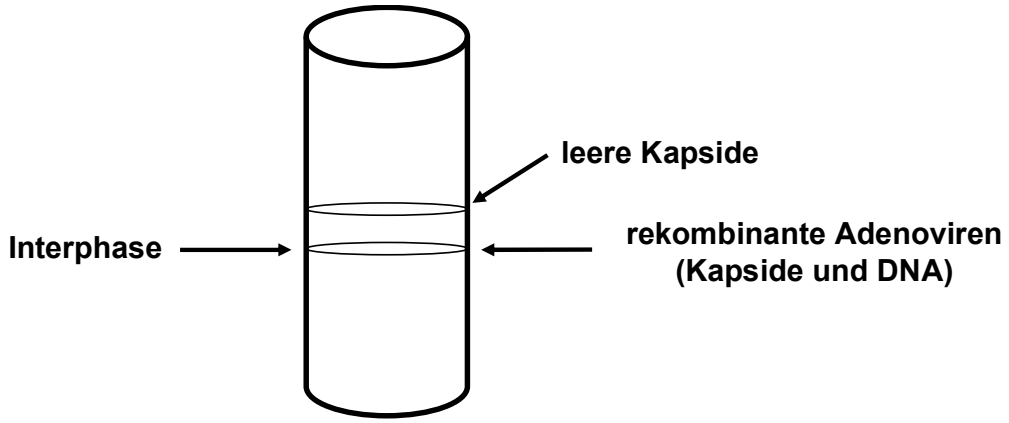


Abb. 4.4: Schematische Darstellung des Virusrings. Nach der Ultrazentrifugation war an der Interphase zwischen der leichten und schweren Phase des CsCl-Gradienten eine dünne, weiße Bande (rekombinante Adenoviren) und eine dickere weiße Bande (leere Kapside) im oberen Drittel des Ultrazentrifugationsröhrchens zu sehen.

Der Virusring wurde mit einer Spritze abgenommen und zunächst für 8 h und danach ü. N. gegen PBS dialysiert (Float-A-Lyzer, 15 kDa MWCO, 3 mL; Spectrum). Anschließend erfolgte eine 6-stündige Dialyse gegen 1x VSB-Puffer. Die Lagerung des rekombinanten Adenovirus erfolgte bei -20°C durch Zugabe des gleichen Volumens einer 90%igen Glycerinlösung in 1x VSB-Puffer.

4.3.15 Klonierung des Haarnadelschleifen-shRNA-Inserts in einen Expressionsvektor (pAdTrack-shRNA)

Zur Klonierung des pAdTrack-sh wurden je 50 µM der noch als Einzelstrang vorliegenden DNA-Oligonukleotid-Matrize in einen Reaktionsansatz mit speziellem Annealingpuffer gegeben. Durch 4-minütiges Erhitzten der Lösung auf 95°C wurde die Sekundärstruktur der Einzelstränge denaturiert. Nach Abkühlen des Ansatzes auf RT bildeten die beiden komplementären Fragmente ein doppelsträngiges Oligonukleotid. Da pAdTrack-Vektoren keinen H1-Promotor besitzen, wurde zunächst der Vektor pTER+ als Zwischenvektor gewählt. Dieser Vektor verfügt über eine spezielle Klonierungskassette, die es ermöglicht, ein beliebiges Insert einzuklonieren, um dann im nächsten Schritt das Insert mit H1-Promoter wieder aus dem Vektor herauszuschneiden. Dazu wurden 300 ng BglII/HindIII linerarisierter Vektor mit 2 µl einer 5 nM Lösung dopppelsträngiger Oligonukleotid-Matritze ligiert. Nach Transformation von *E.coli* (XL10-Gold, Stratagene) mit dem Ligationsprodukt, wurde die Klonierungskassette mittels EcoRI-Verdaus aus dem Vektor geschnitten. Das Insert wurde über Agarosegelelektrophorese aufgereinigt und die überhängenden Enden der EcoRI-Schnittstelle mit Hilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt. Im letzten Schritt wurde schließlich der pAdTrack-Vektor durch EcoRV-Verdau linearisiert und die Enden des Vektors durch Zugabe der CIAP dephosphoryliert. Für die anschließende Ligation wurden 530 ng des Vektors und 160 ng des Inserts eingesetzt. Positive Klone wurden auf Kanamycin-haltigen LB-Agarplatten selektiert und zusätzlich durch Restriktionsanalyse überprüft.

4.4 Proteinbiochemische Methoden

4.4.1 Proteingewinnung und Probenvorbereitung für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Proteingewinnung wurden die Zellen mit PBS gespült, in einer adäquaten Menge kaltem GST-Fishpuffer abgeschabt und das erhaltene Homogenat für 2 min mit 16'000 g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 4x SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und entstandenes Kondenswasser abzentrifugiert. Bei längerer Lagerung wurden die Überstände in flüssigem N_2 schockgefroren und bei -60°C aufbewahrt.

4.4.2 Protein-Konzentrationsbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mittels der Methode nach Bradford durchgeführt (Bradford 1976). Die Proben sowie die Proteinstandardreihe (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2,0 µg BSA) wurden in Triplikaten in einer Mikrotiterplatte in einem Volumen von 50 µL vorbereitet. Das Bradford-Reagenz (Biorad) wurde vor der Messung 1 : 4 in dest. H_2O verdünnt und jeweils 200 µL zu den Proben gegeben. Die entstandene Farbveränderung wurde in einem Spektralphotometer bei 595 nm gemessen und die Proteinkonzentration anhand einer Standardreihe mathematisch ermittelt.

4.4.3 SDS-PAGE

Die SDS-PAGE wurden in einer „Mini Protean II“-Apparatur (Biorad) bei 200V durchgeführt um Proteinlysate (30 - 100 µg) für die immunologische Detektion aufzutrennen. Es wurde ausschließlich die diskontinuierliche SDS-PAGE angewandt (Laemmli 1970), wobei das Sammelgel mit einem Acrylamid/Bisacrylamid-Anteil von 5% verwendet wurde, während die Trenngele je nach zu untersuchendem Protein einen variablen Anteil von 6-15% des Gemischs enthielten (Sambrook *et al*., 1989). Anhand eines Molekulargewichtsstandards „Roti-Mark Standard“ (Roth) wurden die Größen der aufgetrennten Proteine ermittelt.

4.4.4 Western Blot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden im Nassblotverfahren (Blotkammer, Biorad) bei 100V auf eine Nirozellusemembran transferiert. Nach einer Transferzeit von durchschnittlich 1 h bzw. bei Proteinen mit einem Molekulargewicht größer als 200 kDa bis zu 2 h, wurden membrangebundene Proteine mit einer 0,2%igen Ponceau-S-Lösung reversibel angefärbt und dokumentiert (Imager, AlphaInnotech). Alle folgenden Wasch- und Inkubationsschritte wurden, falls nicht anders erwähnt, in TBST bei RT und auf einem Schüttler durchgeführt. Nach Entfärben

der Membran, wurden freie Bindestellen durch Inkubation (1h) mit einem synthetischen Blockierungsreagenz in H_2O (RotiBlock, Roth) überlagert. Überschüssiges Reagenz wurde von der Membran gewaschen und diese anschließend mit dem ersten Antikörper inkubiert (s. 4.1.5, Tabelle 1). Ungebundener Antikörper wurde nach der Inkubationszeit, durch dreimaliges Waschen für je 10 min, entfernt und die Membran dann für 45 min dem entsprechenden Sekundärantikörper inkubiert (s. 4.1.5, Tabelle 2). Nach drei weiteren Waschschritten für je 5 min erfolgte die Detektion der Primär-Sekundär-Antikörperkomplexe mit einem Chemolumineszenz-Substrat der Firma Roche (Lumi-Light-Plus). Die Signale wurden ebenfalls mit dem Imager (AlphaInnotech) dokumentiert.

4.4.5 Ko- bzw. Immunopräzipitation (IP)

Für die Ko- bzw. Immunopräzipitation wurden HEK-Zellen einer 6 cm Kulturschale transient transfiziert und für 48 h unter Serum reduzierten Bedingungen kultiviert. Die Zellen wurden dann gegebenenfalls stimuliert, mit PBS gewaschen und in 500 µL eiskaltem IP-Puffer abgeschabt. Der IP-Puffer wurde dazu kurz vor der Zelllyse mit $NaVO_4$ und PMSF versetzt. Das Homogenat wurde mit 16'000 g bei 4°C für 2 min zentrifugiert und 400 µL des Überstandes für die Immunopräzipitation eingesetzt. Das restliche Lysat wurde für Expressionskontrollen aufbewahrt. Die Proteinlösung wurde dann mit 7,5 µg anti-Flag-Antikörper und 50 µL äquilibrierter Protein-A-Sepharose für 2 h bei 4°C im Überkopfschüttler inkubiert. Im Fall einer Ko-IP wurde der Antikörper 1 h vor der Sepharose zu den Lysaten gegeben. Abschließend wurde die Protein A-Sepharose viermal mit 1 mL IP-Puffer gewaschen. Beim letzten Waschschritt wurden etwa 15 µL Puffer als Überstand gelassen und mit 5 µL Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die Proben wurden gut gemischt, für 2 min bei 16'000 g abzentrifugiert und für 5 min auf 95°C erhitzt. Der Überstand mit den denaturierten immunopräzipitierten Proteinen wurde mittels einer diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und immunologisch im Western Blot Verfahren nachgewiesen.

4.4.6 Pulldown-Assay

Aktivierte, GTP-gebundene monomere GTPasen binden mit einer sehr hohen Affinität an die GTPase-bindende Domäne (GBD) von Effektormolekülen. Diese Eigenschaft wird im Pulldown-Assay genutzt, um die Aktivierung von RhoA, Rac1 und Cdc42 in Zelllysaten zu bestimmen (Ren and Schwartz 2000; Benard and Bokoch 2002).

Zur Aufreinigung aktivierter GTPasen wurde die jeweilige Bindedomäne des Effektormoleküls als GST-Fusionsprotein in *E. coli* Rosetta™ Bakterien exprimiert und an Glutathion-Sepharose gekoppelt. Für Rac1-GTP wurde GST-PBD (p21 Bindedomäne von Pak1) verwendet, sowie GST-Rhotekin-RBD (Rho-Bindedomäne von Rhotekin) um RhoA-GTP nachzuweisen. Zur Herstellung der verwendeten GST-Fusionsproteine wurde die entsprechende GTPase-bindende

Domäne in den pGEX2T-Vektor kloniert, der für das entsprechende Protein zusammen mit einem Glutathion-S-Transferase-Fusionsanteil kodiert. Ausgehend von einer ü. N.- Kultur wurden 800 mL 2x YT Medium (100 µg/mL Ampicillin) angeimpft und bis zu einer OD (600 nm) von 0,6 bei 37°C und 250 rpm im Schüttler inkubiert. Dann wurde die Proteinsynthese durch Zugabe von 1 mM IPTG bei 25°C und 250 rpm für 1 h induziert. Anschließend wurden die Bakterien für 10 min mit 3'000 g bei 4°C abzentrifugiert, in 10 mL kaltem PBS resuspendiert und fünfmal für 30 s mit Ultraschall lysiert. Der Ansatz wurde für 10 min mit 20'000 g bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand zu 800 µL äquilibrierter Glutathion-Sepharose (Fastflow, Amersham Biosciences) gegeben. Das Bakterienlysat plus Glutathion-Sepharose wurde für 45 min schüttelnd auf Eis inkubiert und anschließend abzentrigugiert (2 min ,1'000 g, 4°C). Nach zwei Waschschritten mit je 50 mL kaltem PBS wurde die Proteinkonzentration der Präparation bestimmt. Die gekoppelte Gluthadion-Sepharose wurde anschließend in 50 µg Aliquots unterteilt, mit jeweils 100 µL Einfrierpuffer versetzt und bis zur Verwendung bei –60°C gelagert.

Für den Pulldown-Assay wurden entsprechend vorbehandelte Zellen bei 4°C im Kühlraum in 350-500 µl GST-Fish-Puffer pro Probe abgeschabt. Das Homogenat wurde anschließend für 2 min bei 16'000 g und 4°C abzentrifugiert und zunächst ein Teil des Überstands zur späteren Bestimmung des gesamten GTPase-Gehalts abgenommen. Der restliche Überstand wurde mit je einem Aliquot gekoppelter Gluthadion-Sepharose pro Probe für 1 h im Überkopfschüttler inkubiert. Die Ansätze wurden zweimal mit 1 mL GST-Fish-Puffer gewaschen und das Volumen auf eine für die SDS-PAGE adäquate Menge reduziert. Der Anteil an aktivierter GTPase wurde im Immunoblot evaluiert.

4.5 Zellbiologische Methoden

4.5.1 Verwendete permanente Zelllinien bzw. Primärzellen

Für die Kultivierung von HEK-293-, TSA- und Primärzellen wurde DMEM mit den entsprechenden Zusätzen (10 % FCS + 100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomicin + 2 mM Glutamin) der Firma Sigma verwendet. Neonatale Rattenkardiomyozyten wurden zusätzlich mit BrdU (3 mg/mL) kultiviert.

Zelltyp	Wachstums-bedingungen	Platten-beschichtung	Anwendung	Transfektions-reagenz/ Adenovirus
HEK-293 (humane embryonale Nierenzellen: adenoviral transformiert)	37°C, 5 % CO_2	keine	Luziferase-Assay, Pulldown-Assay, Immunpräzipitation, Generierung und Amplifikation von Adenoviren	PolyFect
TSA (humane embryonale Nierenzellen: SV40 transformiert)	37°C, 5 % CO_2	Kollagen (45 µg/mL in PBS)	Luziferase-Assay, Pulldown-Assay, Immunpräzipitation	PolyFect
NRCM	37°C, 5 % CO_2	Kollagen (45 µg/mL in PBS) bzw. Kollagenbedampfung (21,5 µg in 30% EtOH)	Luziferase-Assay, Pulldown-Assay, Aktinzytoskelett-Färbung ^{3}[H]-Leucin-Einbau GFP-Assay	TransFast, adenoviral
NRCF	37°C, 5 % CO_2	keine	Pulldown-Assay	adenoviral

* HEK-293- und TSA-Zellen werden im Folgenden als HEK-Zellen bezeichnet.

Tab. 7**: Verwendete permanente Zelllinien bzw. Primärzellen**.

4.5.2 Passagieren von Zellkulturen

Die permanenten Zelllinien bzw. Primärzellen wurden in dem entsprechenden Wachstumsmedium kultiviert und in einem Inkubationsschrank in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre bei 37°C und 5 % CO_2 inkubiert. Zelllinien wurden bei 80 % Konfluenz und Primärzellen (kardiale Fibroblasten) bei 100 % Konfluenz passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und anschließend mit 3-4 mL/10 cm Schale Trypsin-EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Nach Ablösen der Zellen vom Schalenboden wurde der Verdau durch Zugabe von Komplettmedium gestoppt. Die Zellen wurden zur Vereinzelung mehrfach resuspendiert und dann entweder abzentrifugiert (RT, 2 min, 150 g) oder

direkt auf neue Zellkulturschalen verteilt. Die abzentrifugierten Zellen wurden in der gewünschten Menge Komplettmedium aufgenommen und ausgesät. Zur Beschichtung wurden Zellkulturschalen vor dem Ausplattieren der Zellen mit 45 µg/mL Kollagen in PBS gespült. Die verwendeten Medien und Lösungen wurden vor Gebrauch in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt.

4.5.3 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Zur dauerhaften Aufbewahrung wurden Zelllinien in einem Gemisch aus DMEM, 10 % FCS und 10 % DMSO bei -80°C tiefgefroren. Dazu wurden die Zellen trypsinisiert, durch Auf- und Abziehen in einer 10 mL Pipette vereinzelt und bei RT für 2 min mit 150 g abzentrifugiert. Das Zellpellet einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale wurde mit 1 mL Einfriermedium resuspendiert und in ein Kryoröhrchen gegeben. Anschließend wurden die Zellen bei -80°C schonend heruntergekühlt.

Beim Auftauen wurden die Zellen so kurz wie nur möglich mit dem toxischen Einfriermedium in Kontakt belassen. Die Kryoröhrchen, welche die eingefrorenen Zellen enthielten, wurden dazu im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und die Zellen sofort in eine vorbereitete, mit Wachstumsmedium gefüllte Zellkulturflasche überführt. Nach erfolgter Adhärenz der Zellen wurde das Wachstumsmedium gewechselt.

4.5.4 Transiente Transfektion von Zelllinien

Für die transiente Transfektion der HEK-Zellen mit Plasmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz „PolyFect Transfection Reagent“ von Qiagen verwendet (Tab. 8) und das Protokoll nach Herstellerangaben durchgeführt. Zellen wurden entweder im adhärenten Zustand oder direkt nach der Aussaat in Suspension transfiziert.

Größe der Zellkultur-schale	Zellzahl	Gesamt-volumen an Medium auf Zellen* (mL)	Plas mid-DNA (µg)	End-volumen der gelösten DNA** (µL)	Volumen des PolyFect Reagenz (µL)	Zugege-benes Medium zu den Zellen* (mL)	Zugege-benes Medium zu PolyFect/ DNA Komplex* (mL)
96-well Platte	$3{,}7 \times 10^4$	0,12	0,125	20	1,25	0,1	-
12-well Platte	$3{,}0 \times 10^5$	1,5	1,0	50	10	0,75	0,3
6-well Platte	$6{,}0 \times 10^5$	3,0	2,0	100	20	1,5	0,6
6 cm Schale	$1{,}2 \times 10^6$	5,0	4,0	150	40	3,0	1,0

* 0,5 % FCS in DMEM (100 U/mL Penicillin und 0,1 mg/mL Streptomicin + 2 mM Glutamin)
** DMEM ohne FCS und Penicillin, Streptomycin, Glutamin

Tab. 8: Parameter für die transiente Plasmid-DNA Transfektion von HEK-Zellen mit PolyFect-Transfektionsreagenz**.**

4.5.5 Adenovirale Infektion von Primärzellen

Bei der adenoviralen Infektion von Primärzellen wurde das Wachstumsmedium von den Zellen abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gespült. Anschließend wurde eine adäquate Menge an serumfreien Medium mit dem jeweiligen rekombinanten Adenovirus gemischt und auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 24 - 72 h mit den Adenoviren inkubiert. NRCM wurden mit einer MOI (Multiplizität der Infektion) von 10-20 und NRCF mit einer MOI von 150 infiziert. Die Infektionseffizienz der Zellen betrug etwa 80 - 100 %.

4.5.6 SRF/SRE-Luziferase-Assay in HEK-Zellen

Zur Quantifizierung aktivierter GTPasen wurde der „Dual-Luciferase Reporter Assay“ von Promega verwendet (Hill *et al.* 1995). Dabei wurden die Zellen mit zwei verschiedenen Reportergenplasmiden ko-transfiziert. Die Aktivität des Effektors SRF, der an die Promotorregion SRE bindet, wurde über die Transkription und folglich Aktivität einer SRE-abhängigen Luziferase detektiert (pSRE.L Plasmid, Dr. J. Mao, Dr.D. Wu, University of Rochester, Rochester, NewYork, USA). Das zweite Reportergenplasmid diente als Kontrolle und kodierte für eine Luziferase, die an den konstitutiv aktiven Herpes Simplex Thymidin Kinase (HSV-TK)-Promotor gekoppelt war (pRL-TK-Plasmid von Promega).

Für den Assay wurden HEK-Zellen einer 96-well Platte in Suspension mit insgesamt 125 ng Plasmid-DNA in Duplikaten transient transfiziert (4.5.4). Der Anteil an Reportergenplasmid betrug dabei 25 ng und setzte sich aus sechs Anteilen pSRE.L und einem Anteil pRL.TK zusammen. Nach einer Inkubationszeit von 24 – 48 h wurde die Aktivierung der SRE gekoppelten Luziferase und der Luziferase des Kontrollvektors nach Herstellerangaben aus demselben Lysat bestimmt. Dazu wurden die Zellen in 25 µL Puffer pro Vertiefung unter Schütteln lysiert und je nach Transfektionseffizienz wurden 1 µL bis 10 µL des Lysats zu Messung eingesetzt und mit je 25 µL der Substratpuffer versetzt. Die Luziferaseaktivität in den Proben wurde mit dem Multilabel Reader EnVision (Perkin Elmer) in speziellen weißen 96-well Platten (Perkin Elmer) bestimmt und als Quotient SRE/ HSV-TK (relative Luziferaseaktivität) dargestellt.

4.5.7 Luziferase-Assay in NRCM

Für die Luziferase-Experimente in Kardiomyozyten wurden der Luziferase gekoppelte Promotor pα.s.-Aktin verwendet: Die Transfektion der Zellen mit den Luziferaseexpression-Plasmiden erfolgte ohne den üblichen konstitutiv aktiven Kontrollvektor pRL.TK (s. 4.5.6) und wurde mit den Reagenzien des „Dual-Luciferase Reporter Assay“ von Promega durchgeführt.

Für die Experimente wurden Kardiomyozyten in 24-well Platten (2 x 10^6 Zellen/Platte) nach Herstellerprotokoll (TransFast™, Promega) mit einer Ratio von 1:1 (1 µg DNA zu 3 µL Reagenz pro Vertiefung) in serumfreien Medium transfiziert. Nach der erforderlichen Inkubationszeit (1 h) wurden die Zellen für 24 h bzw. 48 h stimuliert, in 100 µL Puffer lysiert und 25 µL des Lysats zur

Messung eingesetzt. Es wurden 25 µL Substratlösung zugegeben und die Aktivität im Multilabel Reader EnVision (Perkin Elmer) bestimmt.

4.5.8 Färbung des Aktin-Zytoskeletts

Für die Färbung des Aktin-Zytoskeletts wurden NRCM (1 x 10^6 Zellen) einer 24-well Platte benutzt oder NRCF bis zu einer Konfluenz von 50 % in 24-well Platten kultiviert. Die Zellen wurden für 24- 72 h in serumfreien Medium kultiviert, gegebenenfalls mit rekombinanten Adenovirus infiziert und stimuliert. Für die Fixierung wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit 3 % PFA inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 0,05%igem Triton X-100 für 3 min permeabilisiert, wieder mit PBS gewaschen und dann für 1 h mit 0,5 % BSA in PBS blockiert. Die Färbung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte durch Inkubation mit 1 µg/mL TRITC-Phalloidin in 0,5 % BSA in PBS ü. N. im Dunkeln. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit ausreichend PBS überschichtet und bis zur Dokumentation bei 4°C gelagert. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Fluoreszenzmikroskop der Firma Olympus.

4.5.9 GFP-Expressionsassay

Der GFP-Expressionsassay beruht auf der Tatsache, dass sich die Aktivität des cmv-Promotors durch Stimulation verstärken lässt und diente daher der Messung der allgemeinen Proteinexpressions-Aktivität in Kardiomyozyten. Dazu wurden NRCM einer 24-well Platte (2 x 10^6 Zellen) mit rekombinatem AdGFP in serumfreien Medium infiziert. Nach 24 h erfolgte die Stimulation und nach weiteren 24 h wurden die Zellen in 100 µl passivem Lysepuffer (Dual Luciferase Assay, Promega) unter Schütteln für 10 min lysiert. Es wurden je 10 µL Lysat in 90 µL H_2O verdünnt und die absolute Fluoreszenz der Probe in einer schwarzen 96-well Platte mit dem Multilabel Reader EnVision (Perkin Elmer) bestimmt.

4.5.10 ^{3}[H]-Leucin-Einbau

Der ^{3}[H]-Leucineinbau dient der Messung der allgemeinen Proteinexpressions-Aktivität einer Zelle und wird daher als Maß für die Induktion von Hypertrophie in Kardiomyozyten verwendet.
Dazu wurden NRCM einer 12-well Platte (4 x 10^6 Zellen) auf serumfreies Medium umgestellt, gegebenenfalls mit Adenovirus infiziert und stimuliert. Nach 24 h wurde ^{3}[H]-Leucin (1 µCi/mL) zugegeben und die Zellen für weitere 24 h kultiviert. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen und Zellproteine mit je 1 mL 10 % TCA pro Vertiefung bei 4°C für mindestens 5 h gefällt. Die Proben wurden dann erneut zweimal mit PBS gewaschen und die gefällten Zellproteine mittels mit 0,01 % SDS versetztem 1 N NaOH für 2h bei 37°C wieder in Lösung

gebracht. Anschließend wurden 300 µL pro Probe mit 3 mL Szintillationsflüssigkeit gemischt und für je 4 min gemessen.

4.5.11 Bestimmung der Apoptoserate in NRCM

Für die Bestimmung der Apoptoserate wurde der „Caspase-Glo® 3/7“ von Promega verwendet. Für die Experimente wurden Kardiomyozyten einer 96-well Platte (1 x 10^6 Zellen/Platte) in serumfreiem Medium für 24 h mit den jeweiligen Agonisten/ Inhibitoren inkubiert und anschließend der Versuch nach Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden die Zellen für 1,5 h mit dem Kaspase-Substrat inkubiert und anschließend die Chemolumineszenz der Proben im Multilabel Reader EnVision (Perkin Elmer) bestimmt.

4.5.12 Zytotoxizität-Assay

Der Zytotoxizität-Assay gibt Aufschluss über das Redox-Potential der Zellen und damit über die Viabilität sich nicht-teilender Zellen. Dazu wird lösliches MTT (gelb) in die Kultur gegeben, welches von zellulären Enzymen, wie NADH/NADPH-Oxidasen und der Succinatdehydrogenase zu unllöslichem Formazan (blau) umgesetzt wird (Berrigde et al. 1996).
Für die Experimente wurden Kardiomyozyten einer 24-well Platte (2 x 10^6 Zellen/Platte) in serumfreiem Medium für 24 h mit den jeweiligen Agonisten/ Inhibitoren inkubiert. Anschließend wurde für 1h mit 0,5 mg/mL MTT zu den Zellen gegeben. Nach zwei Waschritten mit PBS erfolgte die Lyse in je 200 µL 0,4 N HCl/Isopropanol. Die Absorption der Proben wurde bei 580 nm mittels Photometer (Titertek Multiscan MCC/340) bestimmt.

4.5.13 Isolierung von neonatalen Rattenkardiomyozyten und kardialen Fibroblasten

Für die Präparation der beiden Primärzelltypen wurden neonatale Ratten im Alter von ein bis drei Tagen verwendet. Die Isolierung der Herzen erfolgte unter sterilen Bedingungen, wobei pro Ansatz ca. 25 Tiere verwendet wurden. Nach Dekaptierung wurde den Tieren durch einen Schnitt der Brustkorb geöffnet, das Herz entnommen und in eiskalten Präparationspuffer überführt. Die Herzen wurden dann von Vorhöfen und Aortenresten befreit und zerkleinert. Das Gewebe wurde in eine Zellkulturflasche gegeben, der Präparationspuffer abgezogen und 15 mL Verdaulösung zugegeben. Anschließend wurde der Ansatz für 15 min bei 37°C im Wasserbad schüttelnd inkubiert. Der Überstand des ersten Verdaus wurde verworfen und das Gewebe erneut unter gleichen Bedingungen mit 15 mL Verdaulösung inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Überstand abgenommen, in ein Röhrchen mit 4 mL 37°C warmen FCS pipettiert und die Zellen für 5 min bei 600 g und RT abzentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 4 mL FCS resuspendiert und bis zum Ende der Zellisolierung im Brutschrank gelagert. Die Verdauschritte wurden so lange wiederholt bis sich das Gewebe aufgelöst hatte. Während der Präparation wurde das Volumen

der Verdaulösung sukzessive verringert und die Zellvereinzelung durch gelegentliches Resuspendieren unterstützt. Nach dem letzten Verdau wurde die gesamte Suspension aus der Zellkulturflasche entnommen und durch ein Zellsieb pipettiert. Schließlich wurden alle Verdaus vereinigt und die Suspension erneut für 5 min bei 600 g und RT abzentrifugiert. Die präzipitierten Zellen wurden in Komplettmedium resuspendiert, noch ein weiteres Mal durch ein Zellsieb pipettiert und auf zwei 10 cm Schalen ausgesät. Nach einer Inkubationzeit von 2,5 h wurden die noch in Suspension vorliegenden Kardiomyozyten von den schon adhärenten Fibroblasten getrennt und in BrdU-haltigem (30 µg/mL) Komplettmedium ausgesät. Die Beschichtung der Zellkulturschalen für die Kardiomyozytenkultivierung erfolgte entweder durch Bedampfung des Materials mit einer kollagenhaltigen wässrigen Ethanollösung (24-well und 12–well Platten) oder durch Spülen mit kollagenhaltigen PBS (6-well Platten und 6 cm Schalen). Die Zellen wurden dann für zwei bis drei Tage bis zur Adhärenz kultiviert und anschließend für die Experimente verwendet.

5. Ergebnisse

1. Teil

5.1 p63RhoGEF als Mediator der $G\alpha_{q/11}$-vermittelten RhoA-Aktivierung

5.1.1 Vergleich von p63RhoGEF und LARG in der Signaltransduktion heterotrimerer G-Proteine

Die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren p63RhoGEF und LARG zeichnen sich durch eine gemeinsame Eigenschaft aus. Beide Proteine sind, laut einschlägiger Publikationen, trotz ihrer unterschiedlichen Struktur Mediatoren der $G\alpha_{q/11}$-Protein-vermittelten RhoA-Aktivierung (Booden *et al.* 2002; Lutz *et al.* 2005). Im Gegensatz zu p63RhoGEF, verfügt LARG neben dem typischen DH/PH-Tandemmotiv zusätzlich über eine PDZ- und eine RGS-Domäne. (Abb. 5.1). Auf Grund seiner Struktur wird LARG der p115RhoGEF-Familie zugeordnet, deren Aktivierung kanonisch über $G\alpha_{12/13}$-Proteine erfolgt.

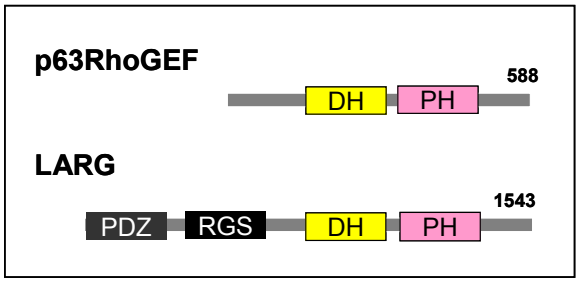


Abb. 5.1: Schematische Darstellung der Proteindomänen von p63RhoGEF und LARG. Abkürzungen: DH (Dbl-homolog), PH (Pleckstrin-homolog), RGS (Regulator of g-protein signalling)

Ein Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Aktivierung von p63RhoGEF und LARG zu charakterisieren. Hierfür wurden die basalen Eigenschaften beider Proteine verglichen. Dazu wurde zum einen die für RhoA, Rac1 und Cdc42 beschrieben SRF-Aktivierung in einem Reportergenassay (Hill *et al.* 1995) quantifiziert und zum anderen aktives RhoA mittels der spezifischen Effektorbindestelle von Rhotekin aus den Lysaten gefällt (Ren *et al.* 1999; Benard and Bokoch 2002). Dabei zeigte sich eine vergleichbare, signifikante Basalaktivität für beide Austauschfaktoren, sowohl in der SRF-Aktivierung (Abb. 5.2 A) als auch in der Aktivierung von RhoA (Abb. 5.2 B).

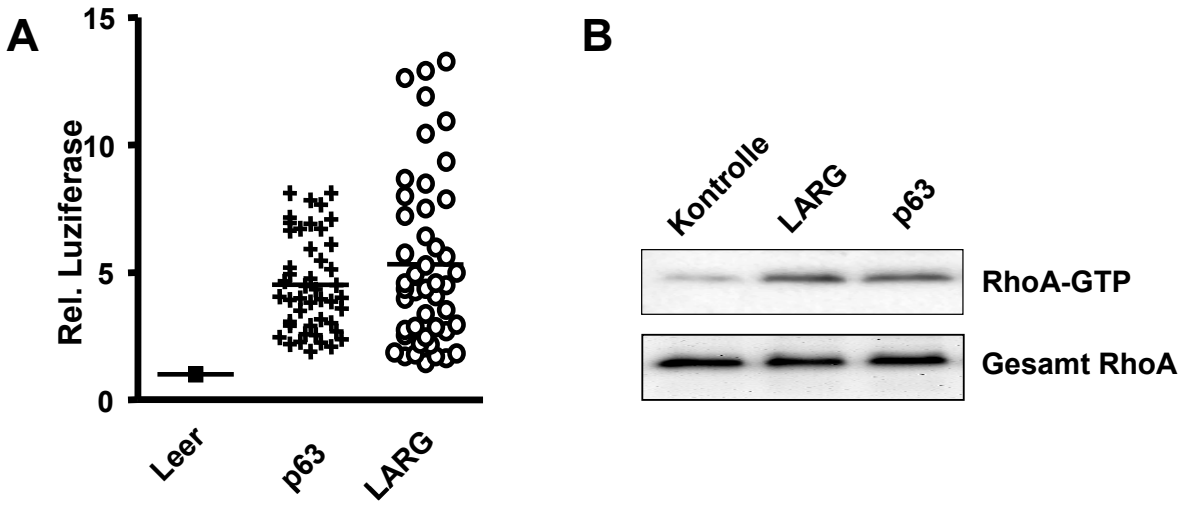


Abb. 5.2: Vergleich der basalen SRF-Aktivierung und der basalen RhoA-Aktivierung von p63RhoGEF und LARG. (A) Vergleich der basalen GEF-Aktivität im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK und mit 100 ng pCMV-Tag (Leer), 50 ng p63-pCMV-Tag oder 50 ng LARG-pCMV-Tag pro Vertiefung ko-transfiziert. Die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase wurde 48 h nach der Transfektion ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=42 ±SEM). (B) Vergleich der basalen GEF-Aktivität im Pulldown-Assay. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit 2 µg pCMV-Tag, p63-pCMV-Tag oder LARG-pCMV-Tag transfiziert, nach 48 h wurde aktives RhoA-GTP aus der Probe gefällt und das Präzipitat im Westernblot ausgewertet. Parallel wurde der Gesamtgehalt von RhoA in den Proben bestimmt.

Vergleich der p63RhoGEF und LARG-vermittelten, GPCR-abhängigen SRF-Aktivierung

Um die sowohl für p63RhoGEF als auch für LARG beschriebene Aktivierung durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCR) direkt zu vergleichen, wurden beide GEFs jeweils mit dem vorwiegend $G\alpha_{12/13}$-gekoppelten Thromboxan-A_2-Rezeptor (TXA_2R) (Offermanns *et al.* 1994; Klages *et al.* 1999) und dem primär $G\alpha_{q/11}$-gekoppelten Histamin-H_1-Rezeptor (H_1R) (Li *et al.* 1995) ko-transfiziert und die Aktivierung des SRF analysiert. In Übereinstimmung mit der präferentiellen Kopplung an $G\alpha_{12/13}$-Proteine, führte im Fall des TXA_2R nur die Ko-Expression von LARG zu einer synergistischen Aktivierung des SRF in den mit dem TXA_2R-Agonisten U46619 stimulierten Proben (Abb 5.3, links). Im Gegensatz dazu zeigte die Ko-Expression des H_1R sowohl mit LARG als auch mit p63RhoGEF eine synergistische Aktivierung des SRF in Anwesenheit des Rezeptoragonisten Histamin. (Abb 5.3, rechts). Bei der Auswertung zeigte sich außerdem, dass nur p63RhoGEF in der Lage ist, die bekannte konstitutive Aktivität des H_1R (Bakker *et al.* 2000) zu einer verstärkten SRF-Aktivierung zu amplifizieren. Diese Experimente lieferten daher einen ersten Hinweis auf die unterschiedliche Aktivierung beider RhoGEFs.

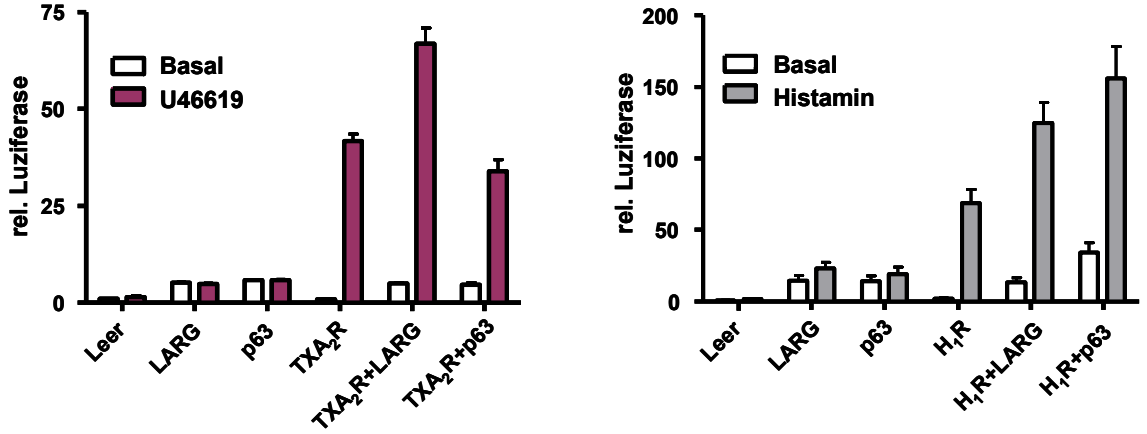


Abb. 5.3: Einfluss von p63RhoGEF und LARG auf die SRF-Aktivierung $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$-gekoppelter Rezeptoren. Vergleich der Rezeptor-vermittelten GEF-Aktivität im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK und mit 25 ng Rezeptor-pcDNA, 50 ng GEF-pCMV-Tag oder 100 ng pCMV-Tag (Leer) pro Vertiefung ko-transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit 100 µM Histamin bzw. 200 nM U46619 stimuliert und nach weiteren 24 h wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen mit n=8±SEM (H_1R, links) und n=4±SEM (TXA_2R, rechts). Abkürzungen: H_1R (Histamin-H_1-Rezeptor), TXA_2R (Thromboxan-A_2-Rezeptor)

Um die beobachtete Verstärkung der konstitutiven Aktivität des H_1-Rezeptors durch p63RhoGEF zu verifizieren, wurden beide GEFs jeweils mit dem Rezeptor ko-transfiziert und die Proben anschließend für 24h mit dem inversen H_1R-Agonisten Mepyramin (Fitzsimons *et al.* 2004) behandelt. Die Auswertung des SRE-abhängigen Luziferase-Assays zeigte wieder eine Amplifikation der konstitutiven Rezeptoraktivität durch p63RHoGEF, welche durch die Applikation von Mepyramin inhibiert wurde (Abb. 5.4). Die Expression von LARG hatte dagegen keinen Einfluss auf die Aktivität des unstimulierten Rezeptors.

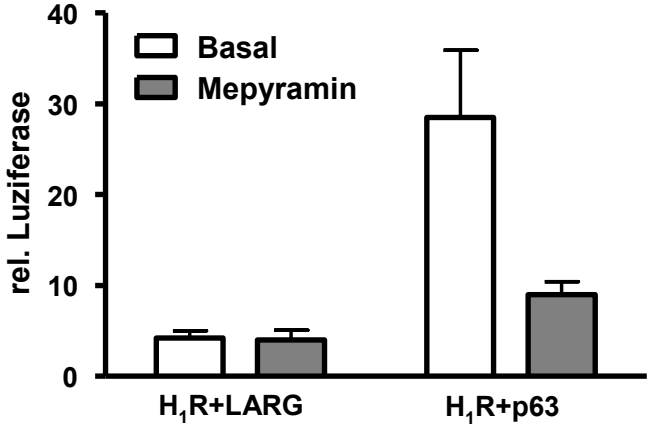


Abb. 5.4: Einfluss von p63RhoGEF und LARG auf die SRF-Aktivierung des unstimulierten H_1-Rezeptors. Vergleich der GEF-Aktivität vermittelt durch den unstimulierten H_1-Rezeptor im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK und mit 25 ng H_1R-pcDNA, und 50 ng GEF-pCMV-Tag pro Vertiefung ko-transfiziert. Die Zellen wurden 24h nach Transfektion mit 10 µM Mepyramin behandelt und nach weiteren 24 h wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=6±SEM). Abkürzungen: H_1R (Histamin-H_1-Rezeptor)

Zur weiteren Analyse der funktionellen Interaktion zwischen den beiden Austauschfaktoren und dem H_1R wurde die SRF-Aktivierung in Abhängigkeit steigender Histaminkonzentrationen untersucht (Abb. 5.5 A). Die Konzentrations-Wirkungsbeziehung zeigte in allen drei Fällen einen sigmoidalem Verlauf. Dabei wurden bei Ko-transfektion von p63RhoGEF bzw. LARG um ca. 1,7fach (LARG) bis 2,2fach (p63RhoGEF) erhöhte E_{max}-Werte im Vergleich zur alleinigen Expression des Rezeptors beobachtet. Die Normalisierung der Kurven zeigte, dass die Austauschfaktoren keinen direkten Einfluss auf die Abhängigkeit der Rezeptor-induzierten SRE-Aktivierung ausübten. Die EC_{50}-Werte der Kurven in Gegenwart von p63RhoGEF oder LARG stimmten mit dem für die alleinige H_1R-Expression berechneten EC_{50}-Wert überein. (Abb. 5.5 B). Die Berechnung der relativen Stimulation zeigte außerdem, dass die beiden GEFs sich nicht in ihrer Aktivierbarkeit durch den Agonist-stimulierten Rezeptor unterscheiden.

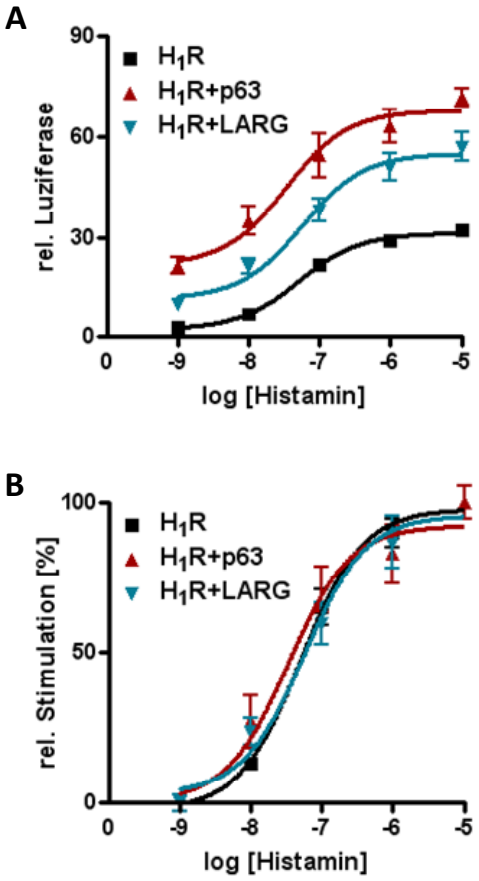
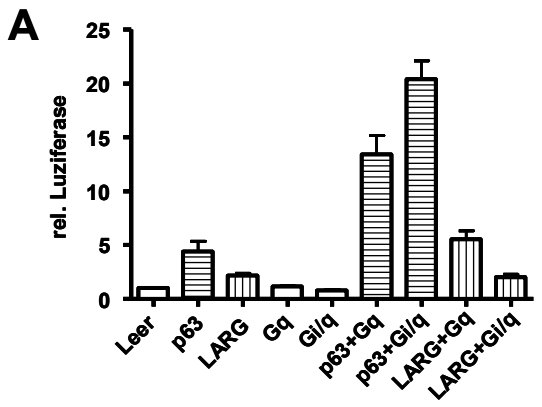
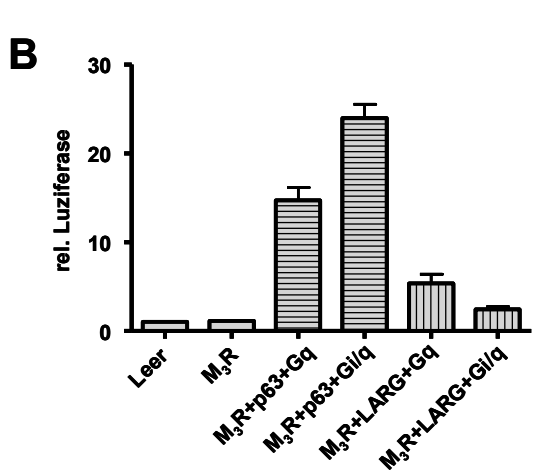
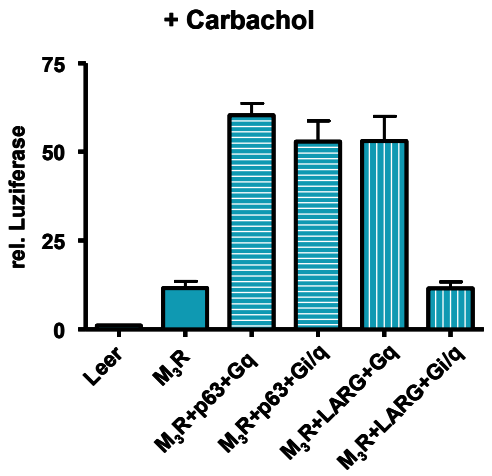


Abb. 5.5: Einfluss von p63RhoGEF und LARG auf die H_1R-vermittelte SRF-Aktivierung in Abhängigkeit der Histaminkonzentration. (A) Vergleich der GEF-Aktivität bei steigender Histaminkonzentration im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK und mit 25 ng H_1R-pcDNA, 50 ng GEF-pCMV-Tag oder 100 µg pcDNA (Kontrolle) pro Vertiefung ko-transfiziert. Die Zellen wurden 24h nach Transfektion mit 1 nM-10 µM Histamin stimuliert und nach weiteren 24 h wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=8-12±SEM). (B) Normalisierte Konzentrationskurve, 0% entspricht dem niedrigsten Messwert, 100% entsprechen dem höchsten Messwert. Abkürzungen: H_1R (Histamin-H_1-Rezeptor)

Da anhand der bisher gewonnenen Daten kein Unterschied in der Signalübertragung des aktivierten Rezeptors auf p63RhoGEF oder LARG festzustellen war, sollte deren Interaktion mit $G\alpha_q$ näher analysiert werden. Dazu wurde die SRF-Aktivierung einer $G\alpha_q$-Mutante, $G\alpha_{i/q}$, bei der die ersten 28 Aminosäuren durch die entsprechende $G\alpha_i$-Sequenz ausgetauscht worden sind, mit der Aktivierung des $G\alpha_q$-Wildtyps verglichen. Hierbei zeigte sich, dass p63RhoGEF, nicht aber LARG, in der Lage war, die basale Aktivität beider $G\alpha_q$-Varianten zu amplifizieren (Abb. 5.6 A). Sowohl die basale als auch die Agonist-induzierte Aktivierung von $G\alpha_{i/q}$ nach Stimulation des muskarinischen Acetylcholin M_3-Rezeptors (M_3R) mit Carbachol führte zu einer Verstärkung der SRF-Aktivität in Gegenwart von p63RhoGEF, während die Expression von LARG keine weitere Zunahme bewirkte (Abb. 5.6). Ähnliche Befunde wurden nach Expression der ebenfalls $G\alpha_{q/11}$-gekoppelten Rezeptoren Angiotensin II Typ1-Rezeptor (AT_1R) und des H_1R beobachtet.







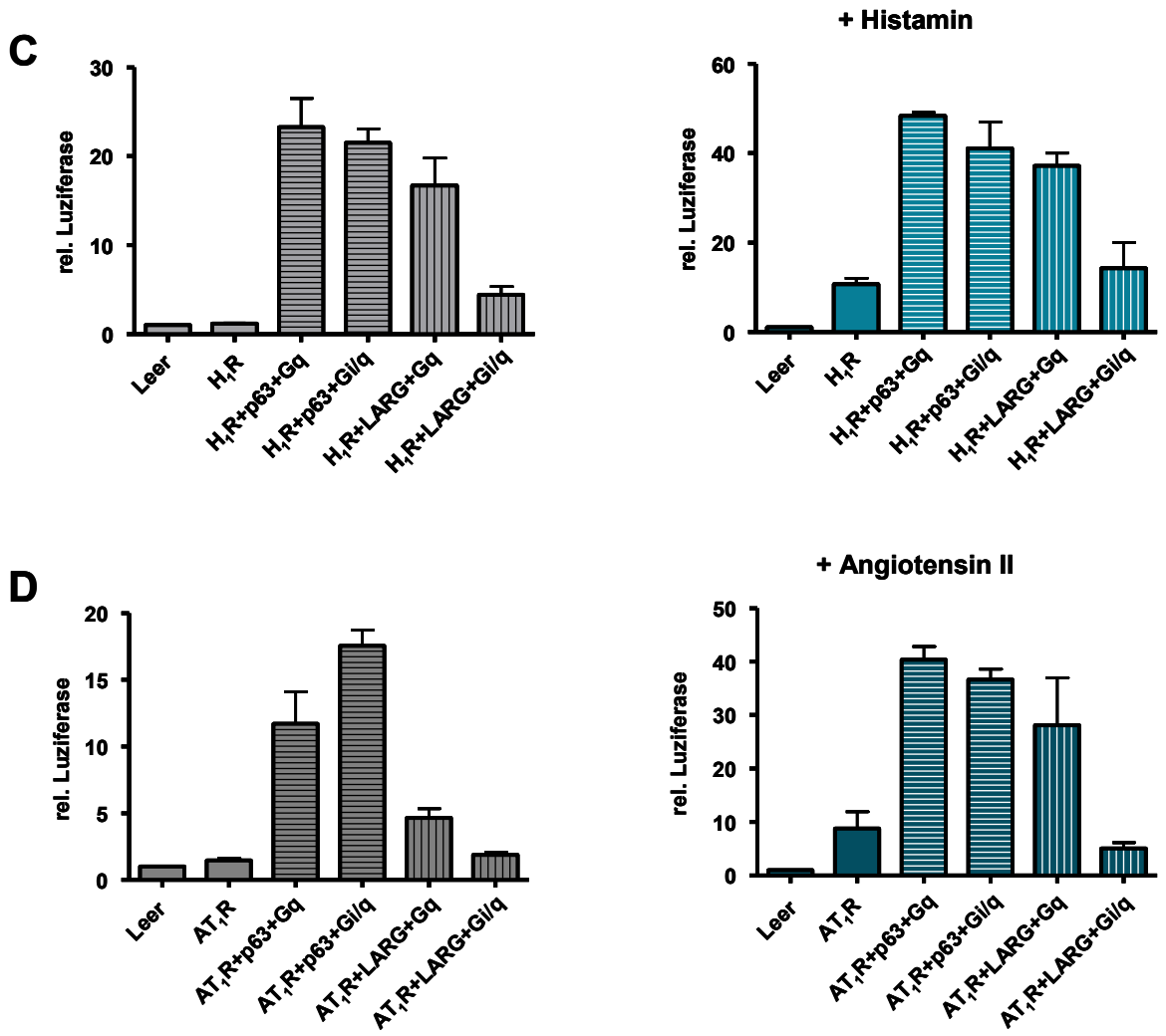


Abb. 5.6: Interaktion von p63RhoGEF und LARG mit $G\alpha_{i/q}$ in der Rezeptor-vermittelte SRF-Aktivierung. Vergleich der GEF-Aktivität bei der Rezeptor-vermittelten Signalübertragung durch $G\alpha_q$ bzw. der Mutante $G\alpha_{i/q}$ im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK und mit 15 ng Rezeptor-pcDNA, 30 ng GEF-pCMV-Tag, 30 ng Gα-pcDNA oder 100 ng pcDNA (Leer) pro Vertiefung ko-transfiziert. Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion mit dem jeweiligen Rezeptoragonisten (Carbachol: 1 mM, Histamin: 100 µM, Agiotensin II: 1 µM) stimuliert und nach weiteren 24 h wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=4-6±SEM). (A) Basale, entkoppelte Aktivität der beiden GEFs und beider $G\alpha_q$-Proteine. (B), (C), (D) Signalübertragung verschiedener $G\alpha_q$-gekoppelter Rezeptoren, unstimuliert (links) und stimuliert (rechts). Abkürzungen: AT_1R (Agiotensin II Typ1 Rezeptor), H_1R (Histamin-H_1-Rezeptor-1), M_3R (muskarinischer Acetylcholin M_3 Rezeptor).

Analyse der funktionellen und physikalischen Interaktion von LARG mit konstitutiv aktiven Gα-Proteinen

Da p63RhoGEF und LARG unterschiedliche Eigenschaften in der Interaktion mit der Mutante $G\alpha_{i/q}$ aufzeigten, wurde mittels Ko-Immunpräzipitation untersucht, ob eine direkte, nachweisbare Bindung zwischen LARG und Gα-Proteinen stattfindet. Dazu wurden HEK-Zellen mit jeweils einer konstitutiv aktiven Mutante von $G\alpha_q$ ($G\alpha_q$RC) oder $G\alpha_{12}$ ($G\alpha_{12}$QL) mit den Austauschfaktoren ko-

transfiziert. Während $G\alpha_q$RC zusammen mit p63RhoGEF, wie bereits publiziert (Lutz *et al.* 2005), aus dem Zelllysat gefällt werden konnte, war in den mit LARG ko-transfizierten Präzipitaten weder $G\alpha_q$ noch $G\alpha_{12}$ detektierbar (Abb. 5.7).

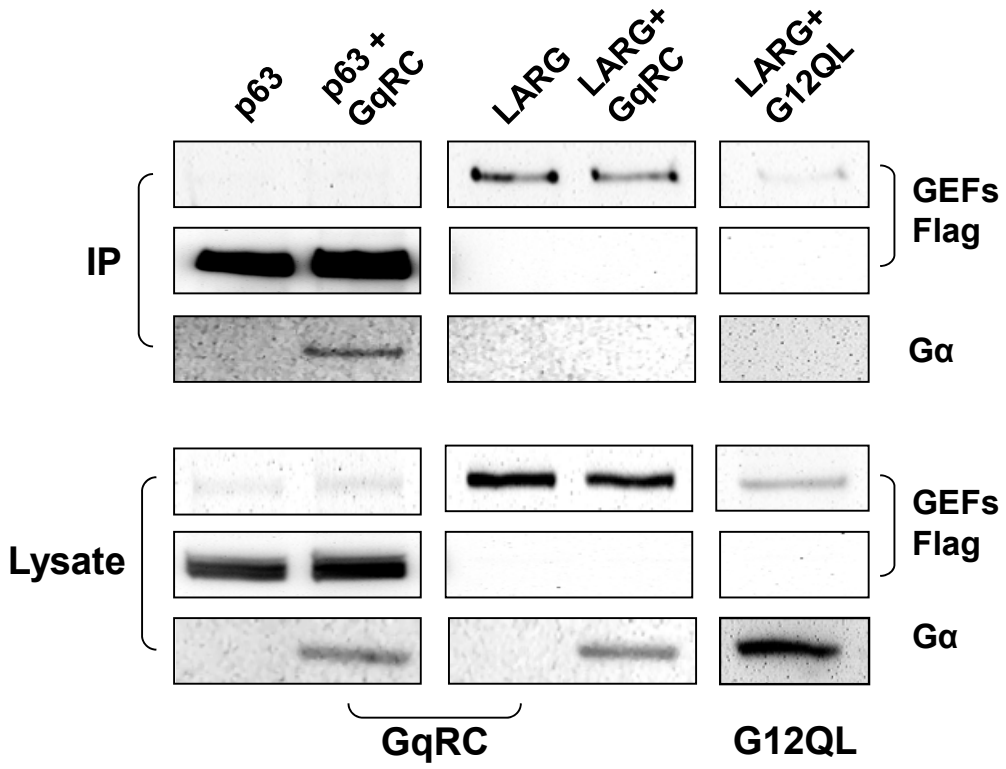


Abb. 5.7: Interaktion von p63RhoGEF und LARG mit konstitutiv aktiven Gα-Mutanten in der Ko-Immunpräzipitation. Vergleich der GEF-Interaktion mit konstitutiv aktiven Gα-Mutanten in der Ko-Immunpräzipitation. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit 1 µg GEF-pCMV-Tag und 1 µg Gα-pcDNA ko-transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion in IP-Puffer lysiert und mit je 8 µg anti-Flag Antikörper und 50 µL ProteinA-Sepharose für 4h inkubiert. Präzipitat und Lysat wurden im Westernblot auf gefällte GEFs und Gαs untersucht. Parallel wurde die Expression der transfizierten Komponenten in den Lysaten analysiert.

Um nun die Frage zu klären, ob LARG folglich überhaupt in der Lage ist das Aktivierungspotential konstitutiv aktiver Gα-Proteine zu vermitteln, wurden die konstitutiv aktiven Mutanten von $G\alpha_q$, $G\alpha_{12}$ und $G\alpha_{13}$ zusammen mit LARG exprimiert und der Einfluss der Ko-Expression auf die Aktivierung des SRF untersucht. Wie in Abbildung 5.8 zu sehen ist, kam es bei keiner der getesteten Kombinationen von LARG und dem jeweiligem Gα-Protein zu einer synergistischen Aktivierung. Alle Mutanten zeigten eine sehr hohe Eigenaktivität (ca. 100fach), die durch die Ko-Expression von LARG nicht verstärkt werden konnte.

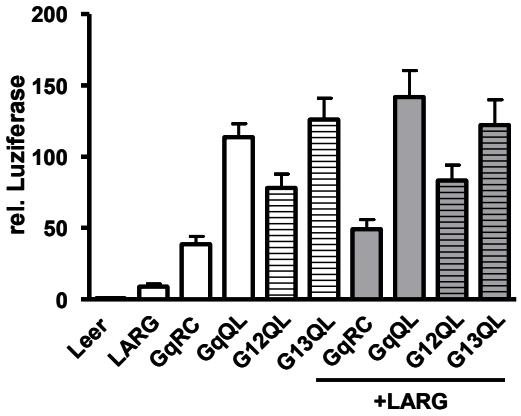


Abb. 5.8: Einfluss von LARG auf die durch konstitutiv aktive Gα-Mutanten vermittelte SRF-Aktivierung. Vergleich der Aktivität von LARG durch verschiedene konstitutiv aktive Gα-Mutanten im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 12,5 ng LARG-pCMV-Tag und 12,5 ng Gα-pcDNA oder 100 ng pcDNA (Leer) pro Vertiefung ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=4-10±SEM).

Einfluss der PDZ-Domäne auf die Aktivierbarkeit durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren

Da in der hier gezeigten Untersuchung für LARG bisher weder eine physikalische Interaktion mit Gα-Proteinen noch eine direkte Wechselwirkung mit G-Protein gekoppelten Rezeptoren nachgewiesen werden konnte, sollte die Eigenschaft der LARG-Aktivierung anhand der LARG-Mutante LARG-ΔPDZ näher analysiert werden. PDZ-Domänen dienen der Stabilisierung großer Proteinkomplexe indem sie an spezifische Peptidsequenzen innerhalb anderer Proteine binden (Sheng and Sala 2001). Welche Rolle diese Domäne bei der Aktivierung von PDZ-GEFs spielt ist allerdings noch ungeklärt. Bisher publizierte Daten belegen einerseits eine direkte Interaktion zwischen PDZ-Domäne und Rezeptor (Perrot *et al.* 2002) zeigen aber auch eine durch ΔPDZ.-Mutanten medierte RhoA-Aktierung (Booden *et al.* 2002). In Abbildung 5.9 ist die Domänenstruktur von LARG und dessen trunkierte Mutante LARG-ΔPDZ schematisch dargestellt.

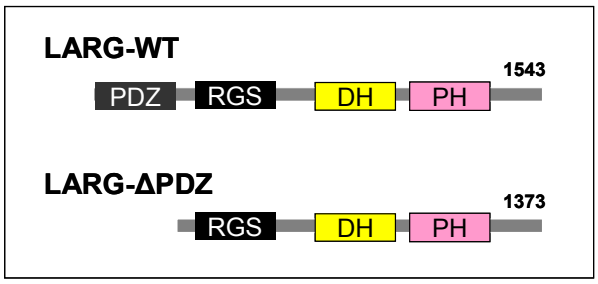


Abb. 5.9: Schematische Darstellung der Proteindomänen von LARG und der Deletionsmutante LARG-ΔPDZ. Abkürzungen: DH (Dbl-homolog), PH (Pleckstrin-homolog), RGS (Regulator of g-protein signaling)

Um die SRF-Aktivierung von LARG-WT und LARG-ΔPDZ zu vergleichen, wurden beide GEFs zunächst mit den konstitutiv aktiven Mutanten $G\alpha_q$RC und $G\alpha_{12}$QL ko-transfiziert. Wie erwartet, hatte die Ko-Expression von LARG-WT keinen verstärkenden Effekt auf die SRF-Aktivierung der Gα-Mutanten. Anders das Resultat der ΔPDZ-Mutante in Kombination mit $G\alpha_q$RC. Hier zeigte die Auswertung eine überadditive SRF-Aktivierung (ca. 1,3fach), die sich aber als nicht signifikant erwies und zudem durch die erhöhte Expression des GEFs zu erklären wäre (Abb. 5.10, rechts). Auf die $G\alpha_{12}$-Aktivierung hatte LARG-ΔPDZ dagegen keinen Einfluss (Abb. 5.10, links).

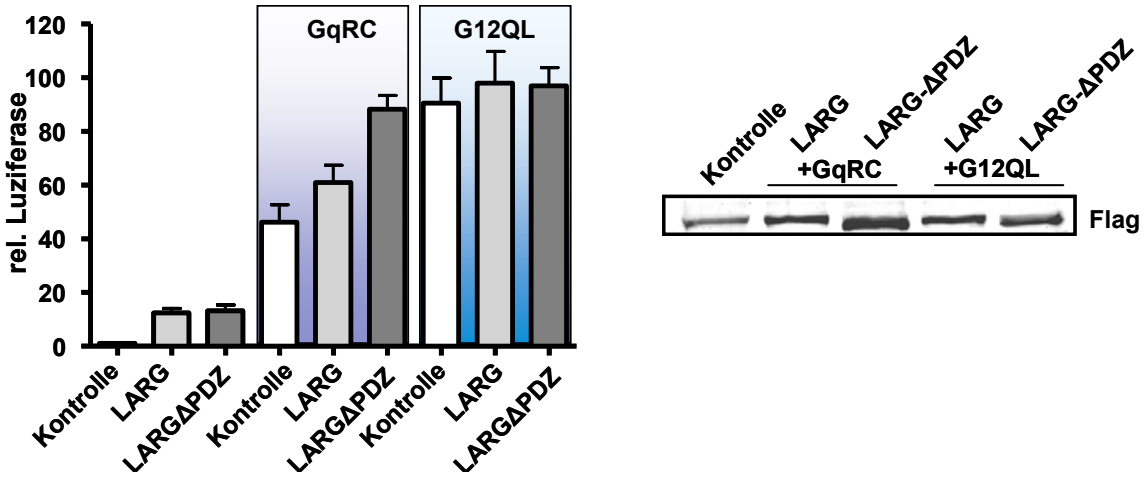
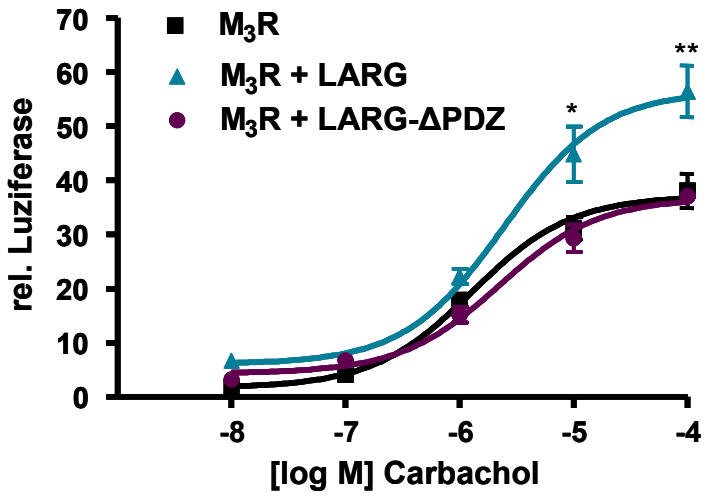


Abb. 5.10: Einfluss von LARG-ΔPDZ auf die durch konstitutiv aktive Gα-Mutanten vermittelte SRF-Aktivierung. Vergleich der Aktivität von LARG und LARGΔPDZ durch verschiedene konstitutiv aktive Gα-Mutanten im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 12,5 ng GEF-pCMV-Tag und 12,5 ng Gα-pcDNA oder 100 ng pcDNA (Leer) pro Vertiefung ko-transfiziert. 48h nach Transfektion wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=8±SEM). *Rechts*: Expressionskontrollen

Zur weiteren Charakterisierung der LARG-ΔPDZ-Aktivierung wurden HEK-Zellen mit dem $G\alpha_q$-gekoppelten M_3R und jeweils mit LARG-ΔPDZ bzw. LARG-WT ko-transfiziert und die SRF-Aktivierung in Abhängigkeit steigender Carbacholkonzentrationen analysiert. Abbildung 5.11 zeigt die graphische Auswertung der konzentrationsabhängigen Rezeptoraktivierung ohne und mit ko-exprimiertem LARG-WT (A) bzw. LARG-ΔPDZ (B). Dabei führte die Ko-Expression von LARG-WT in Anwesenheit von 10–100 µM des Agonisten zu einer signifikanten Signalverstärkung, während die Mutante LARG-ΔPDZ weder einen inhibitorischen, noch einen verstärkenden Einfluss auf die Rezeptor-vermittelte SRF-Aktivierung ausübte.



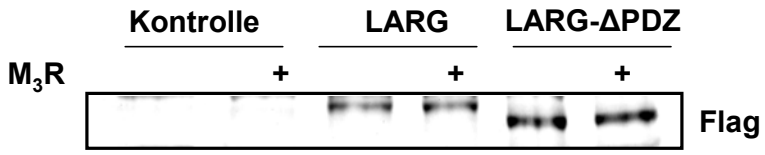


Abb. 5.11: Einfluss von LARG-ΔPDZ auf die Rezeptor-vermittelte SRF-Aktivierung. Vergleich der Rezeptor-vermittelten Aktivierung von LARG und LARG-ΔPDZ im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 6,25 ng M_3R-pcDNA, 12,5 ng GEF-pCMV-Tag oder 100 ng pcDNA (Leer) pro Vertiefung ko-transfiziert. Die Zellen wurden 24h nach Transfektion mit 1 mM Carbachol stimuliert und nach weiteren 24h wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=6±SEM).*Statistik*: t-Test, ungepaart, P<0,05.*Rechts*: Expressionskontrolle. Abkürzungen: M_3R (muskarinischer Acetylcholin M_3 Rezeptor).

Analyse putativer Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in p63RhoGEF und LARG

Neben den in Abbildung 5.1 dargestellten Proteindomänen wurden mittels hoch stringenter Suche innerhalb des Programms „Motif Scan“ für p63RhoGEF und LARG zusätzlich putative Tyrosin-Phosporylierungsstellen festgestellt. Bei LARG befinden sich diese Phosphorylierungsstellen in der DH-Domäne (Y814) und am C-Terminus des Proteins (Y1524), während p63RhoGEF über eine Phosphorylierungsstelle in der DH-Domöne verfügt (Y163). Daten zur Phosphorylierung von LARG und deren Rolle in der RhoA-Aktivierungskaskade wurden bereits publiziert, allerdings mit kontroverser Aussage (Taya *et al.* 2001; Chikumi *et al.* 2002a). Um zu überprüfen, ob p63RhoGEF oder LARG im Rahmen ihrer Aktivierung phosphoryliert werden, wurden HEK-Zellen jeweils mit den beiden Austauschfaktoren transfiziert und entweder mit 20 % (v/v) Serum oder mit 100 µM Histamin stimuliert. Die GEFs wurden anschließend mittels Immunpräzipitation aus den Zelllysaten gefällt und die Präzipitate auf die potentielle Tyrosin-Phosphorylierung mittels Westernblot analysiert (Abb. 5.12). Unter den gegebenen Voraussetzungen konnte keine Phosphorylierung der GEFs detektiert werden,

während in den als Positivkontrolle aufgetragenen, EGF-stimulierten HEK-Zelllysaten Tyrosin-Phosphorylierungen anderer Signalproteine, wie z.B. Src, nachzuweisen waren.

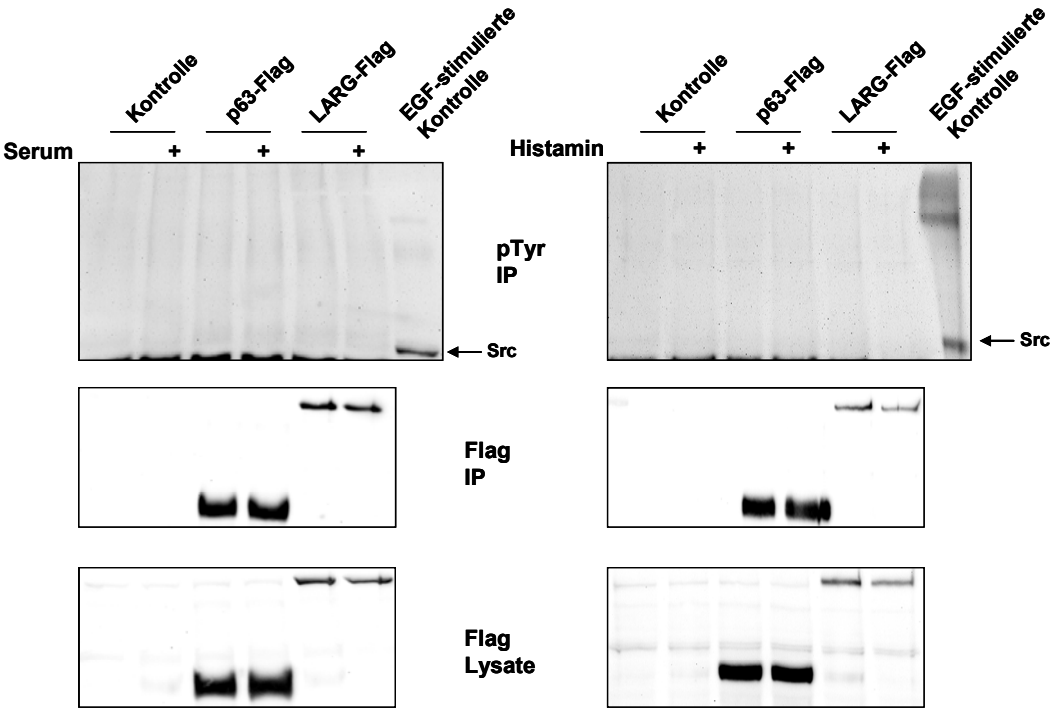


Abb. 5.12: Analyse putativer Tyrosin-Phosphorylierungsstellen von p63RhoGEF und LARG in der Immunpräzipitation. Immunpräzipitation von p63RhoGEF und LARG in stimulierten HEK-Zellen. Zellen einer 6well-Platte wurden mit 2 µg pCMV-Tag, 2 µg p63-pCMV-Tag oder 2 µg LARG-pCMV-Tag transfiziert und nach 48 h für entweder 10 min mit 20 % (v/v) Serum (links) oder für 4 min mit 100 µM Histamin (rechts) stimuliert. Zellen wurden in IP-Puffer abgeschabt und mit je 8 µg anti-Flag Antikörper und 50 µL ProteinA-Sepharose für 4h inkubiert. Präzipitate wurden zuerst auf Tyr-Phosphorylierung überprüft, sowie die Spezifität des Antikörpers anhand kommerzieller Positivkontrollen getestet. Anschließend wurden IP auf gefällte GEFs und parallel die GEF-Expression in den Lysaten überprüft. Abkürzungen: Tyr (Tyrosin)

5.1.2 Charakterisierung der Interaktionsstelle zwischen $G\alpha_q$ und p63RhoGEF durch Mutationsanalyse

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die für p63RhoGEF bereits etablierte, direkte Bindung an $G\alpha_q$ genauer zu analysieren. Die Auflösung der Kristallstruktur des $G\alpha_{i/q}$ /p63/RhoA-Komplexes (Abb. 5.13; (Lutz *et al.* 2007)) ergab dabei erste genauere Einsichten bezüglich der in die $G\alpha_q$-p63-Bindung involvierten Proteinsequenzen. Im Rahmen der Röntgenstrukturanalyse konnte das C-terminale Ende der PH-Domäne von p63RhoGEF, im Folgenden als PH-Extension bezeichnet, als potentielle $G\alpha_q$-Interaktionsstelle determiniert werden. Um die Bindung zwischen $G\alpha_q$ und p63RhoGEF näher zu charakterisieren, wurden basierend auf der Kristallanalyse zunächst drei ΔN/ΔC-trunkierte Mutanten des Proteins hergestellt. Die verwendeten Mutanten zeichneten sich durch eine intakte DH-Domäne aus, lediglich das C-terminale Ende der PH-Domäne wurden sukzessive um je 10 Amniosäuren gekürzt (-502, -492, -482).

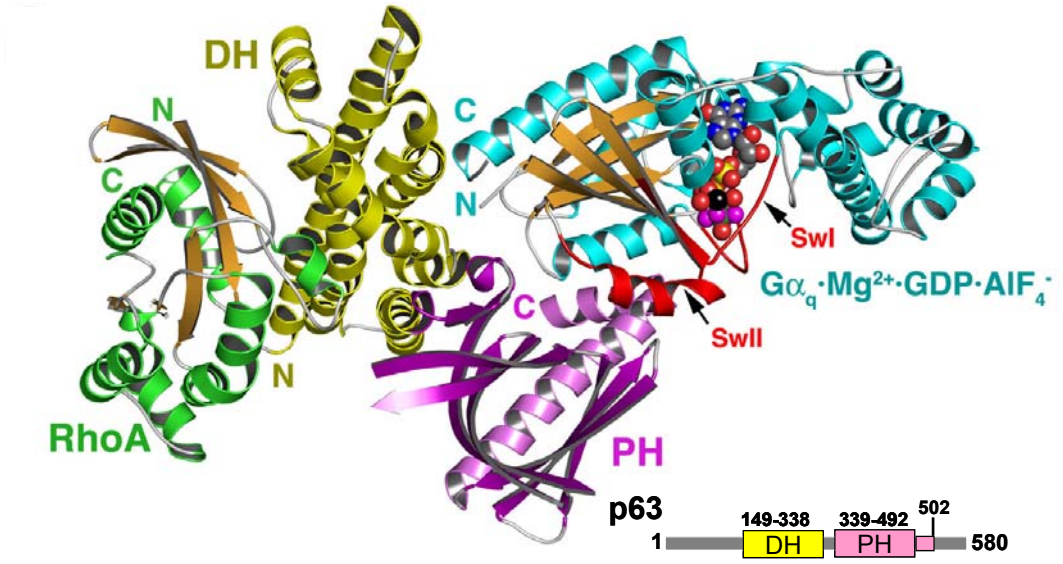


Abb. 5.13: Strukturmodel des RhoA-p63-$G\alpha_q$-Komplexes. Interaktion zwischen PH-Domäne plus PH-Extension (pink) von p63RhoGEF und $G\alpha_{i/q}$ (rot/blau), sowie der DH-Domäne (gelb) und RhoA (grün) (aus: *Science, 2007*). Unten rechts im Bild befindet sich die schematische Darstellung der Proteindomänen von p63RhoGEF. Abkürzungen: AlF_4^- (Aluminiumfluorid), C (C-Terminus), DH (Dbl-homolog), GDP (Guanosindiphosphat), Mg (Magnesium), N (N-Terminus), PH (Plextrin-homolog), SwI, II (switch I, II)

Einfluss trunkierter p63-Mutanten auf die $G\alpha_q$-Bindungseffizienz

Welche Rolle die deletierten Aminosäure-Sequenzen bei der p63-$G\alpha_q$-Bindung spielen, wurde zunächst anhand der Mutante p63-149-502 bzw. p63-149-482 im Vergleich zum Volllängenprotein untersucht. Dazu wurde in HEK-Zellen jeweils die p63-Fragmente oder p63FL sowie konstitutiv aktives $G\alpha_q$RC überexprimiert. Abbildung 5.14 zeigt das Ergebnis einer Ko-Immunpräzipitation. Bei einer ähnlich effizienten Präzipitation der p63-Varianten nahm die $G\alpha_q$-Bindungseffizienz mit zunehmender Deletion von p63RhoGEFsukzessive ab.

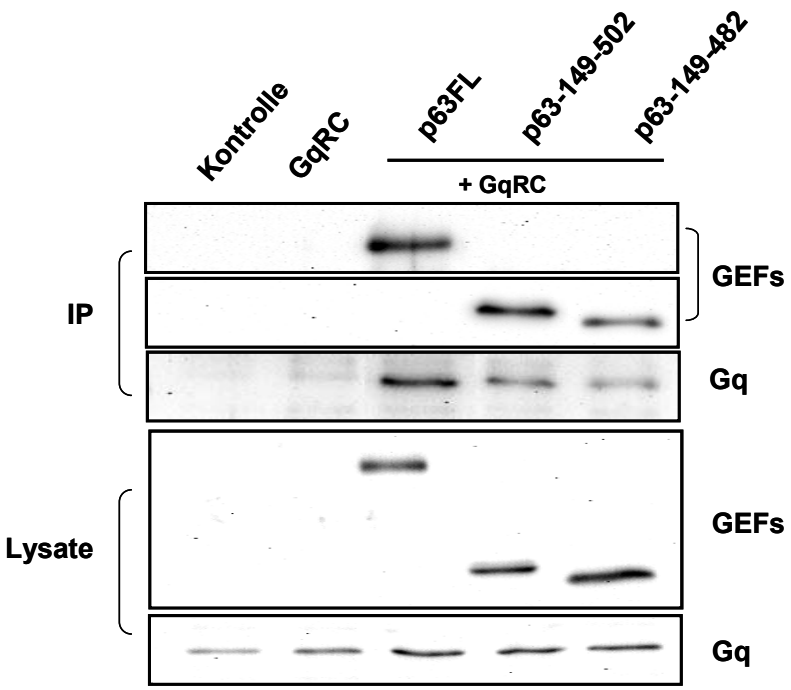


Abb. 5.14: Interaktion zwischen $G\alpha_q$RC und trunkierter p63-Mutanten in der Ko-Immunpräzipitation. Vergleich der $G\alpha_q$-Bindungseffizienz von p63FL mit den Deletionsmutaten p63-149-502 und p63-149-492 in einer Ko-Immunpräzipitation. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit 2 µg pcDNA oder mit je 1 µg konstitutiv aktivem $G\alpha_q$RC und 1 µg GEF-pCMV-Tag ko-transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen in IP-Puffer abgeschabt und mit je 8 µg anti-cmyc Antikörper und 50 µL ProteinA-Sepharose für 4h inkubiert. Präzipitate wurden auf gefälltes $G\alpha_q$RC und auf gefällte GEFs im Westernblot untersucht. Parallel wurde die Expression der einzelnen transfizierten Komponenten im Lysat analysiert. Abkürzungen: p63FL (p63-Volllängenprotein).

Einfluss trunkierter p63-Mutanten auf die SRF/RhoA-Aktivierung

Da die bisher untersuchten trunkierten Mutanten p63-149-482 und p63-149-502 weniger effizient mit $G\alpha_q$ interagierten, wurde im nächsten Schritt die Auswirkungen dieser reduzierten Bindungseffizienz auf die Signaltransduktion zu RhoA bzw. zum SRF untersucht. Neben den bereits in der Ko-Immunpräzipitation getesteten Mutanten wurde auch das Fragment p63-149-492 eingesetzt, welches noch über eine intakte PH-Domäne verfügt, inklusive der vollständigen PH-Extension. HEK-Zellen wurden mit den entsprechenden Mutanten, p63FL und konstitutiv aktivem $G\alpha_q$RC bzw. M_3R ko-transfiziert. Aktiviertes RhoA-GTP wurde dann im Rahmen eines Effektor-Pulldown-Assays aus dem Zelllysat gefällt und die Präzipitate im Westernblot analysiert (Abb. 5.15). Dabei zeigte nur die Mutante p63-149-482 sowohl in der $G\alpha_q$RC-vermittelten RhoA-Aktivierung (Abb. 5.15 A) als auch in der Rezeptor-vermittelten Aktivierung (Abb. 5.15 B) eine abgeschwächte RhoA-Aktivierung im Vergleich zu den übrigen p63-Varianten.

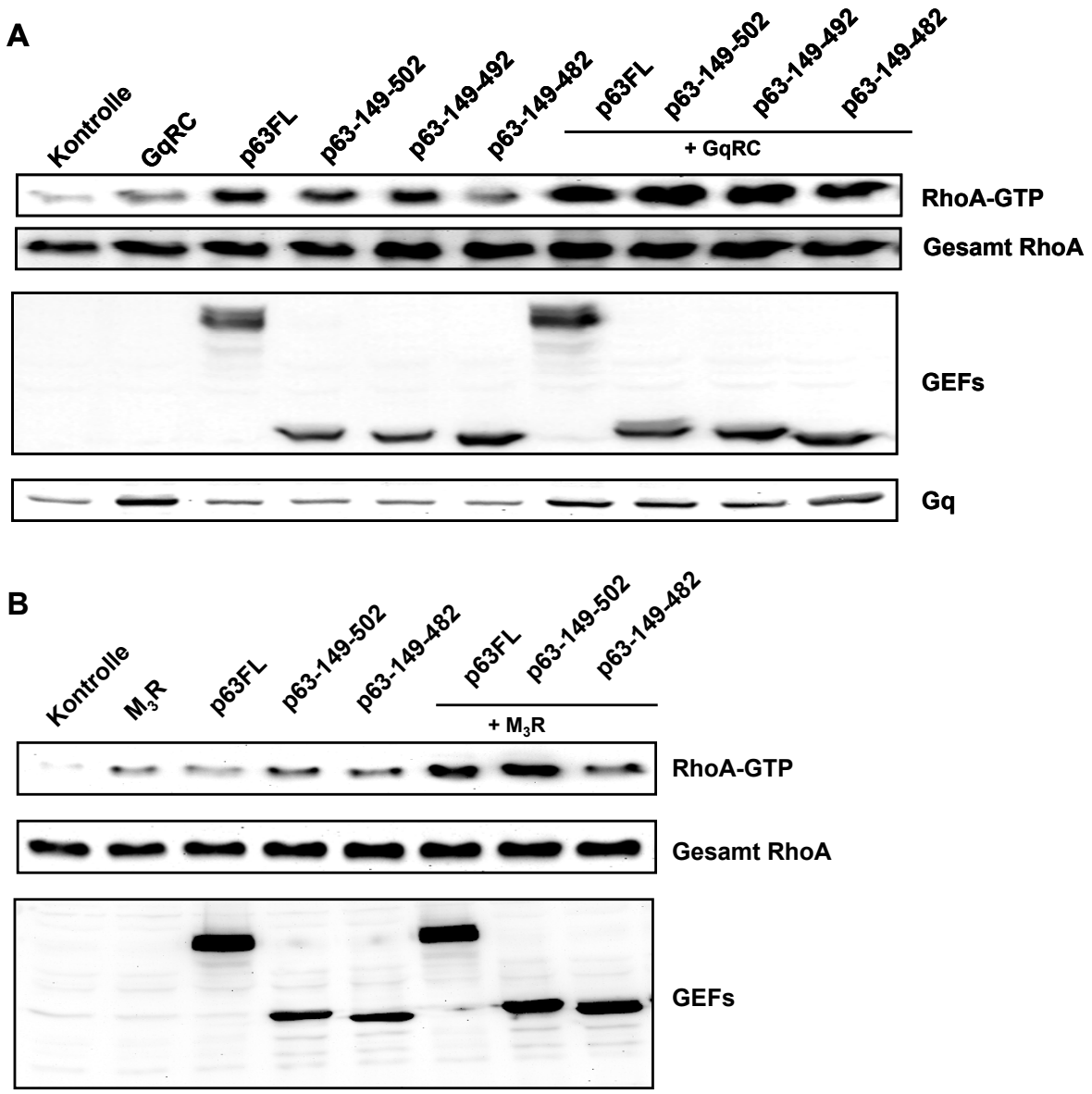


Abb. 5.15: RhoA-Aktivierung trunkierter p63-Mutanten im Pulldown-Assay. Vergleich der RhoA-Aktivierung von p63FL mit der Aktivierung der trunkierten Mutanten p63-149-502. p63-149-492 und p-149-482 im Pulldown-Assay. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit 2 µg pcDNA oder mit 1 µg GEF-pCMV-Tag und entweder 1 µg $G\alpha_q$RC-pcDNA oder 1 µg M_3R-pcDNA ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen (A) direkt in PD-Puffer abgeschabt oder (B) zuvor für 3 min mit 1 mM Carbachol stimuliert und mit 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST für 1 h inkubiert. Präzipitate, sowie Lysate wurden im Westernblot auf RhoA untersucht und zusätzlich die Expression der transfizierten Komponenten im Lysat analysiert. Abkürzungen: M_3R (muskarinischer Acetylcholin M_3- Rezeptor), p63FL (p63-Volllängenprotein).

Das Aktivierungspotential der Fragmente p63-149-482 und p63-149-502 wurden anschließend im SRE-abhängigen Reportergen-Assay quantifiziert. Dazu wurden jeweils steigende DNA-Mengen der Mutanten- und des Volllängenkonstrukts mit $G\alpha_q$RC ko-exprimiert und die SRF-Aktivierung ausgewertet (Abb. 5.16 A). Die resultierenden Kurven zeigten eine Reduktion in der Aktivierbarkeit beider p63-Fragmente im Vergleich zum Volllängenprotein. Für p63-149-502 wurden ca. 50 % und für p63-149-482 ca. 25 % der für p63FL bestimmten maximalen SRF-Aktivierung erreicht. Zur weiteren Analyse der physikalischen Interaktion zwischen trunkierten

p63-Mutanten und $G\alpha_q$ wurden Mutanten verwendet, denen zusätzlich ein Teil DH-Domäne fehlte und diese somit keine katalytische Aktivität mehr aufwiesen. Es handelt sich dabei um Varianten der dominant negativen Mutante p63ΔN (p63-295-580), welche sich inhibitorisch auf die $G\alpha_q$-vermittelte RhoA-Aktivierung auswirkt (Lutz *et al.* 2005). Abbildung 5.16 B zeigt die Inhibition der Rezeptor-vermittelten SRF-Aktivierung durch p63ΔN bzw. durch die beiden verkürzten Mutanten. Die Auswertung ergab eine von der transfizierten DNA-Menge abhängige Inhibitionskurve, wobei nur die Mutante p63-295-502 eine mit p63ΔN (p63-295-580) vergleichbare Inhibition der SRF-Aktivierung aufwies. Die Ko-Expression von p63-295-482 dagegen bewirkte eine Hemmung von ca. 50 %.

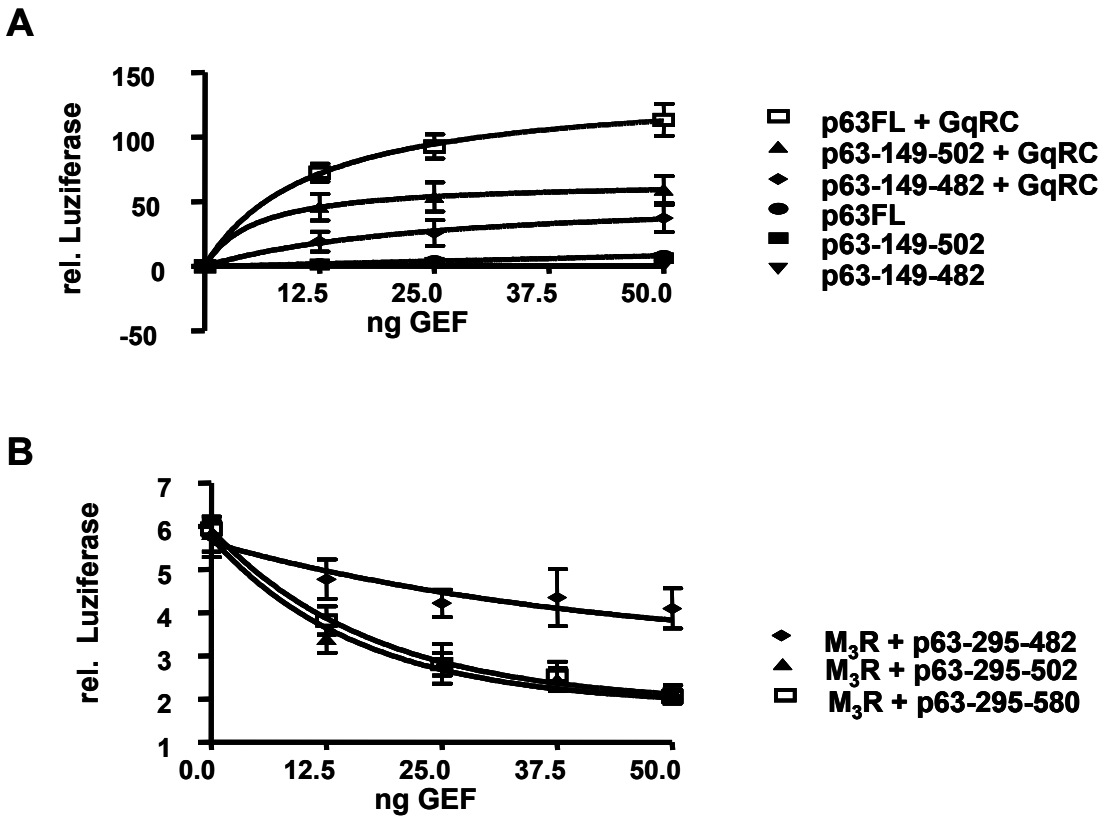


Abb. 5.16: Konzentrationsabhängiger Einfluss von p63ΔN/ΔC-Mutanten auf die SRF-Aktivierung. Vergleich der Konzentrationsabhängigen SRF-Aktivierung verschiedener p63-Deletationsmutanten im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 6,25 ng M_3R-pcDNA oder 12,5 ng $G\alpha_qRC$-pcDNA und mit 12,5-50 ng GEF-pCMV-Tag pro Vertiefung ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (A) Entkoppelte SRF-Aktivierung: (n=6±SEM). (B) Inhibition der Rezeptor-vermittelten SRF-Aktivierung durch p63ΔN-Varianten (n=6±SEM). Abkürzungen: M_3R (muskarinischer Acetylcholin M_3 Rezeptor), p63FL (p63-Volllängenprotein).

5.1.3 Verifizierung der Interaktionsoberflächen von p63RhoGEF und $G\alpha_q$ mittels Punktmutation

Da aufgrund der geringen Auflösung (3 Å) der Röntgenstrukturanalyse einzelne Aminosäuren innerhalb des Proteinkomplexes nicht identifizierbar waren, wurden zur weiteren Analyse der $G\alpha_q$-p63 Interaktion Punktmutagenesen durchgeführt. Hierzu wurden in dem als Kontaktoberfläche determinierten DH/PH-Bereich der trunkierten Mutante p63-149-502 einzelne Aminosäuren mutiert.

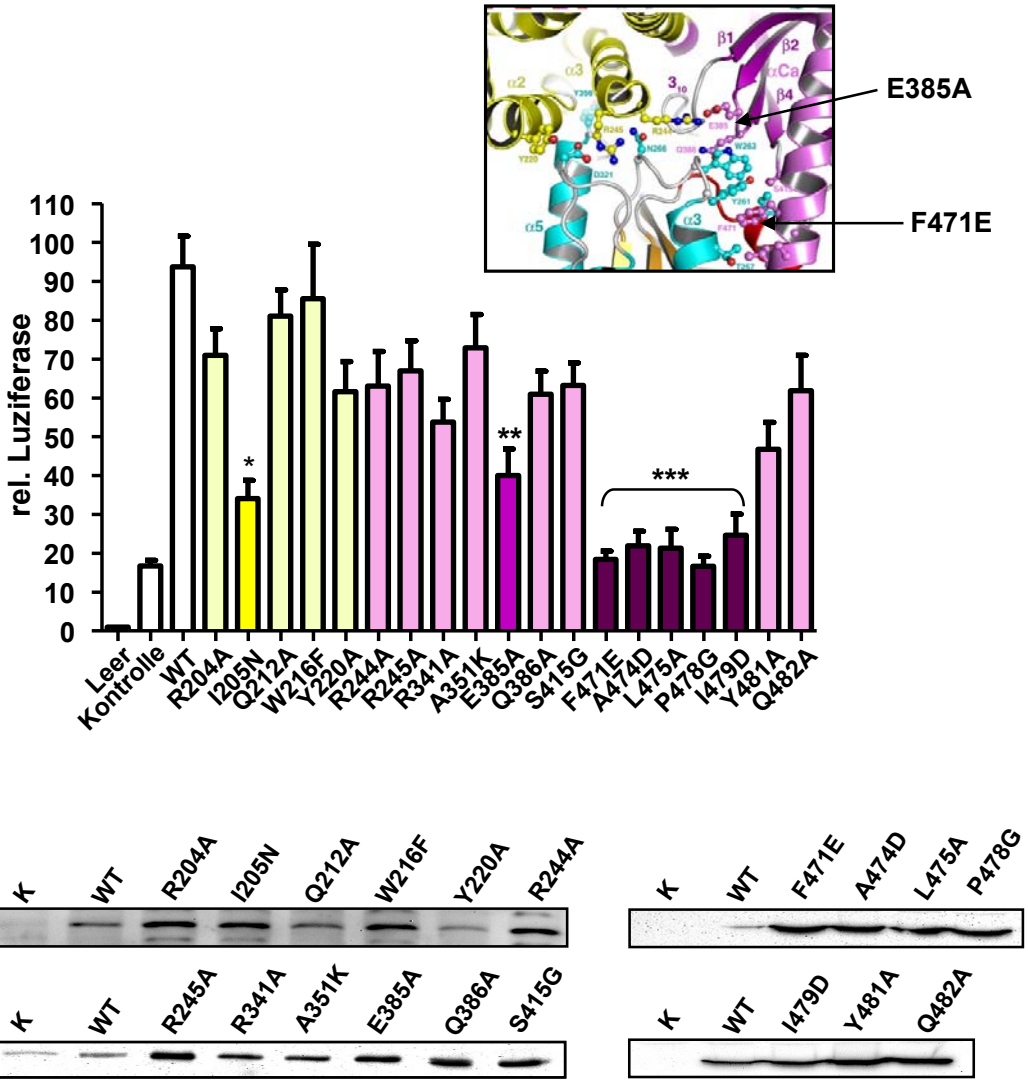


Abb. 5.17: Einfluss von Punktmutationen in der DH/PH-Domäne von p63RhoGEF auf die $G\alpha_q$RC-vermittelte SRF-Aktivierung. Vergleich von p63-Punktmutanten der DH-Domäne (gelb unterlegt) und PH-Domäne (pink unterlegt) im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 50 ng $G\alpha_q$RC-pcDNA, 50 ng GEF-pcmVTag oder 100 ng pcmVTag pro Vertiefung ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=6±SEM), *Unten*: Expressionskontrollen. *Oben rechts*: Ausschnitt des RhoA-p63-$G\alpha_q$-Strukturmodells (aus *Science, 2007*) *Statistik*: „Dunn's multiple comparison test" gegen WT (Prism). Abkürzungen: DH (Dbl-homolog), PH (Plextrin-homolog);*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001

Abbildung 5.17 zeigt die $G\alpha_q$RC-vermittelte SRF-Aktivierung der p63-149-502-Varianten im Vergleich zur Wildtypsequenz. Zur Veranschaulichung ist außerdem ein Ausschnitt der mutierten Region aus dem RhoA/p63-149-502/$G\alpha_q$-Strukturmodell eingefügt. Bezüglich der Mutationen in der DH-Domäne (R204A-Y220A) zeigte nur die Mutante I205N eine signifikante Reduktion der SRF-Aktivierung im Vergleich zur Wildtypsequenz. Im Bereich der PH-Punktmutationen konnten die Mutanten F471E bis I479D die $G\alpha_q$-vermittelte SRF-Aktivierung überhaupt nicht mehr amplifizieren, während für die Mutante E385A eine signifikante Reduktion von ca. 70 % detektiert wurde.

Um die Rolle von $G\alpha_q$ in der $G\alpha_q$-p63-Interaktion näher zu charakterisieren, wurden in der für die Bindung essentielle α3-Helix von $G\alpha_{i/q}$ verschiedene Punktmutationen eingebracht. Die $G\alpha_{i/q}$-Mutanten wurden entweder mit dem p63-Volllängenprotein oder mit p63-149-508 in HEK-Zellen ko-exprimiert und der potentielle Funktionsverlust bezüglich der Interaktion mit p63RhoGEF im SRE-abhängigen Reportergen-Assay analysiert. Bei Ko-Expession der Mutanten mit p63FL konnte eine tendenzielle Reduktion in der Aktivierung im Fall der Mutante $G\alpha_{i/q}$-A253K festgestellt werden, die sich aber als nicht signifikant erwies (Abb. 5.18 A). Der gemessene Effekt war ausgeprägter bei Interaktion der $G\alpha_{i/q}$-Mutanten mit dem p63-Fragment p63-149-502. Hier zeigten die Mutanten $G\alpha_{i/q}$-A253K, $G\alpha_{i/q}$-T257E $G\alpha_{i/q}$-W263D eine deutliche, signifikante Reduktion in der SRF-Aktivierung (Abb. 5.18 B).

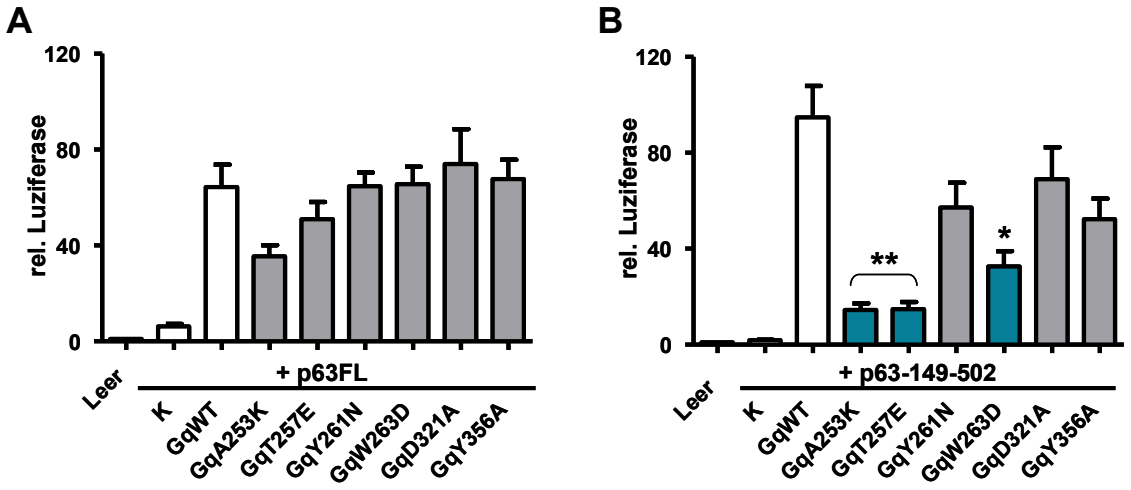


Abb. 5.18:Einfluss von $G\alpha_{i/q}$-α3-Helix-Mutanten auf die p63RhoGEF abhängige SRF-Aktivierung. Vergleich von $G\alpha_q$-Mutanten im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 50 ng $G\alpha_q$-pcDNA, 50 ng GEF-pCMV-Tag oder 100 ng pCMV-Tag pro Vertiefung ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (A) Aktivierung des Vollängenproteins durch $G\alpha_q$-Mutanten (n=8±SEM). (B) Aktivierung der trunkierten Mutante p63-149-502 durch die $G\alpha_q$-Mutanten (n=6±SEM).*Statistik:* „Dunn's multiple comparison test" gegen WT (Prism);*p<0,05, **p<0,01.

5.1.4 Analyse der $G\alpha_q$-abhängigen Aktivierung der beiden p63RhoGEF-Homologe Duet und Trio

p63RhoGEF weist Sequenzhomologien zu zwei weiteren Austauschfaktoren, Duet und Trio, auf (Souchet *et al.* 2002). In Abbildung 5.19 ist die Proteindomänenstruktur der drei verwandten GEFs abgebildet. Die wesentlich komplexeren Proteine Duet und Trio verfügen neben dem Rho-spezifischen DH/PH-Tandemmotiv über weitere funktionelle Domänen, Trio verfügt über eine Rac-1 spezifische DH1/PH1-Domäne, eine SH3-Domäne, eine Immunglobolin-ähnliche Domäne und eine Kinase-Domäne, Duet besitzt zusätzlich eine Immunglobolin-ähnliche Domäne, eine F-Domäne und eine Kinase-Domäne. Ob Duet und Trio ebenfalls eine $G\alpha_q$-induzierte RhoA-Aktivierung vermitteln war bisher nicht bekannt. Ein erster Hinweis auf eine mögliche Interaktion mit $G\alpha_q$ läßt sich allerdings aus den konservierten Sequenzen im Bereich der für p63RhoGEF postulierten $G\alpha_q$-Bindestelle ableiten. Die homologen Sequenzen umfassen die PH-Extension (470-485) von p63RhoGEF, sowie Postion 437 innerhalb der PH-Domäne. Wie in Abbildung 5.19 gezeigt, sind diese Sequenzbereiche im Fall von Trio auch zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert, während keine Übereinstimmungen zu anderen Austauschfaktoren der Dbl-Familie, wie z.B. Dbs nachgewiesen werden konnten. Auf diesem Sequenzvergleich basierend wurden für die folgenden Experimente neben den Volllängenproteinen auch die p63-149-502 äquivalenten Fragmente Duet-219-558 und Trio-1894-2232 verwendet.

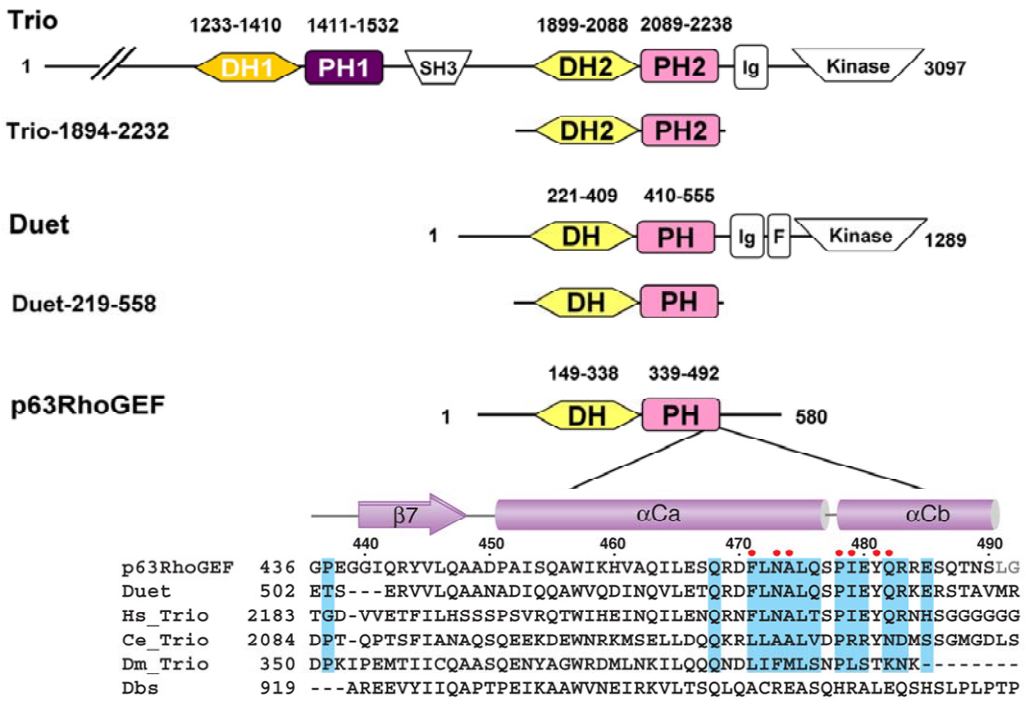


Abb. 5.19: Schematische Darstellung der Proteindomänen von Trio, Duet und p63. Neben dem typischen Rho-spezifischen DH-PH-Tandemmotiv (DH2-PH2 in Trio) weisen die dargestellten GEFs stark konservierte Regionen in der für p63 etablierten Gαq-Bindedomäne auf. Außerdem dargestellt sind die der Deletionsmutante p63-149-502 äuqivalenten Sequenzen von Trio (Trio-1894-2232) und Duet (Duet-219-558). Abkürzungen: DH (Dbl-homolog), Ig (Immunglobolin-ähnlich), PH (Pleckstrin-homolog), SH3 (Src-homolog)

Charakterisierung der potentiellen $G\alpha_q$-Bindung von Duet und Trio

Die Fragmente und Volllängenproteine von Duet und Trio wurden zunächst im Rahmen einer Ko-Immunpräzipitation auf ihre potentielle $G\alpha_q$-Bindung untersucht. Dazu wurden die jeweiligen Duet-, Trio- und p63-Varianten zusammen mit konstitutiv aktivem $G\alpha_q$RC in HEK-Zellen ko-exprimiert und ihre Interaktion per Ko-Immunpräzipitation analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Fragmente von Duet und Trio (Abb. 5.20 A) als auch die Volllängenproteine (Abb. 5.20 B) mit $G\alpha_q$ interagieren, die Effizienz war jedoch niedriger als bei p63RhoGEF.

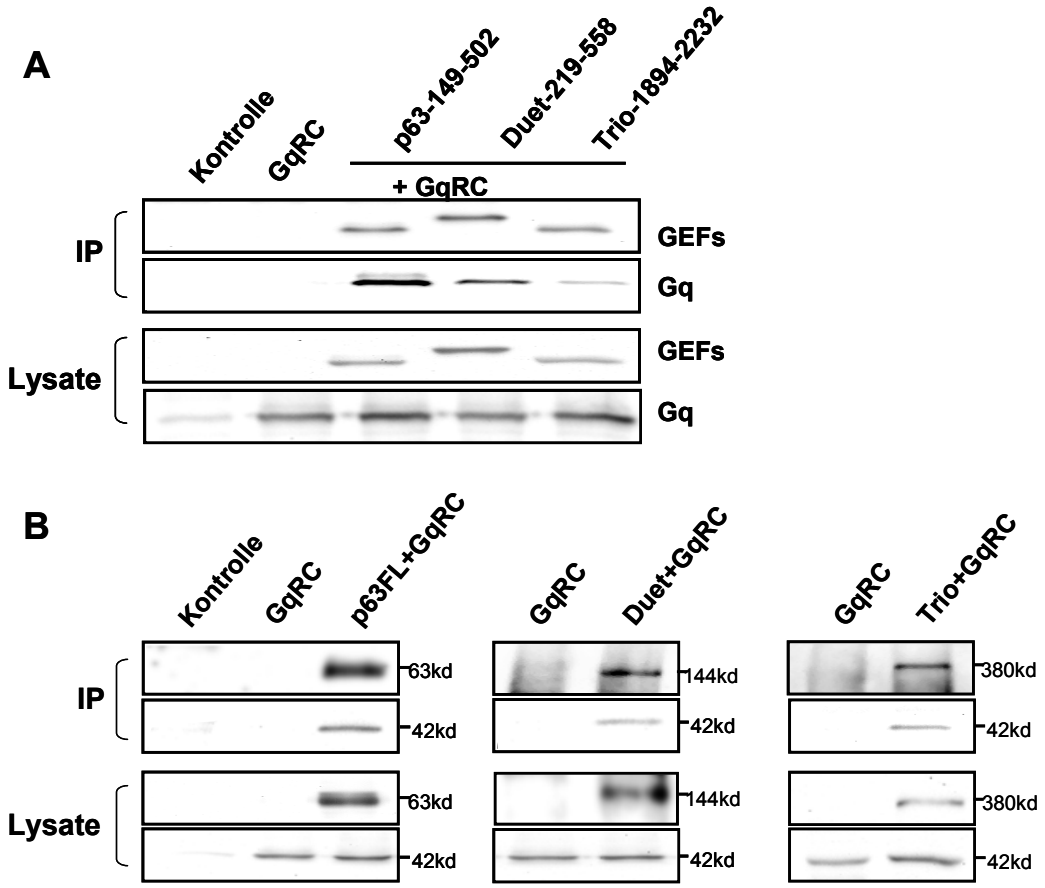
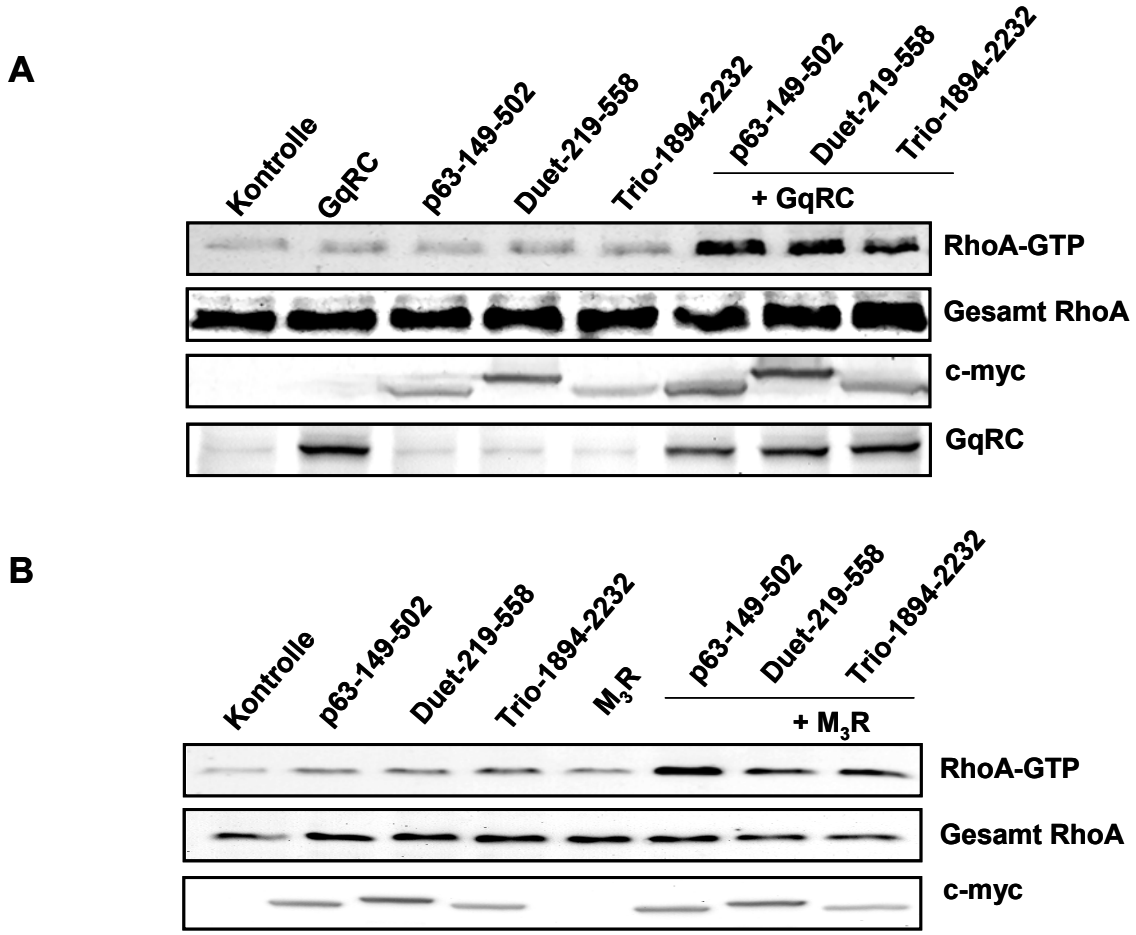


Abb. 5.20: Interaktion von Duet und Trio mit $G\alpha_q$RC in der Ko-Immunpräzipitation. Vergleich der $G\alpha_q$-Bindung von p63, Duet und Trio in einer Ko-Immunpräzipitation. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit 1 µg GEF-pCMV-Tag, 1 µg $G\alpha_q$RC-pcDNA oder 2 µg pcDNA (Kontrolle) transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion in IP-Puffer lysiert und mit je 8 µg anti-cmyc Antikörper bzw. 8 µg EGFP-Antikörper und 50 µL ProteinA-Sepharose für 4 h inkubiert. Präzipitate wurden im Westernblot auf gefällte GEFs und gefälltes $G\alpha_q$ untersucht. Parallel wurde die Expression der transfizierten Komponenten in den Lysaten analysiert. (A) Trunkierte Mutanten. (B) Volllängenprotein

Analyse des Einflusses von Duet und Trio auf die $G\alpha_q$-vermittelten RhoA- und SRF-Aktivierung

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die für Duet und Trio etablierte $G\alpha_q$-Bindung auch zu einer RhoA-Aktivierung in den transfizierten Zellen führte. Dazu wurden die Fragmente p63-149-502, Duet-219-558 und Trio-1894-2232 jeweils mit konstitutiv aktivem $G\alpha_q$RC bzw. mit dem M_3R

ko-exprimiert und RhoA-GTP durch Effektor-Pulldown-Assays bestimmt. Dieser experimentelle Ansatz demonstrierte, dass durch Ko-Expression aller drei GEFs die $G\alpha_q$RC-vermittelte RhoA-Aktivierung gesteigert werden konnte, wobei Trio, im Vergleich zu p63RhoGEF und Duet, die schwächste Aktivierung bewirkte (Abb. 5.21 A). Ähnlich verhielt es sich auch bei der Rezeptor-vermittelten RhoA-Aktivierung durch den M_3R, wobei hier die Protein-Fragmente von Duet und Trio eine schwächere Aktivierung bewirkten als p63-149-502 (Abb. 5.21B). Zur Quantifizierung der im Pulldown gezeigten GEF-Aktivität wurde die Fähigkeit der verschiedenen Protein-Fragmente den SRF zu aktivieren untersucht. Hierfür wurden diese mit $G\alpha_q$RC, M_3R oder H_1R ko-exprimiert (Abb 5.21C). Die Auswertung der $G\alpha_q$RC-vermittelten SRF-Aktivierung zeigte ein vergleichbares Ergebnis wie schon die Analyse der direkten RhoA-Aktivierung, eine äquivalente SRF-Aktivierung der Fragmente p63-149-502 und Duet-218-558, während weniger Aktivierung in den mit Trio-1894-2232 ko-transfizierten Proben detektiert wurde. In der Rezeptor-vermittelten SRF-Aktivierung war im Falle des M_3R kein signifikanter Unterschied zwischen den GEFs festzustellen, während bei Ko-Expression des H_1R, Trio-1894-2232 im Vergleich zu p63-149-502 und Duet-219-558 sich als weniger effizient erwies.



C

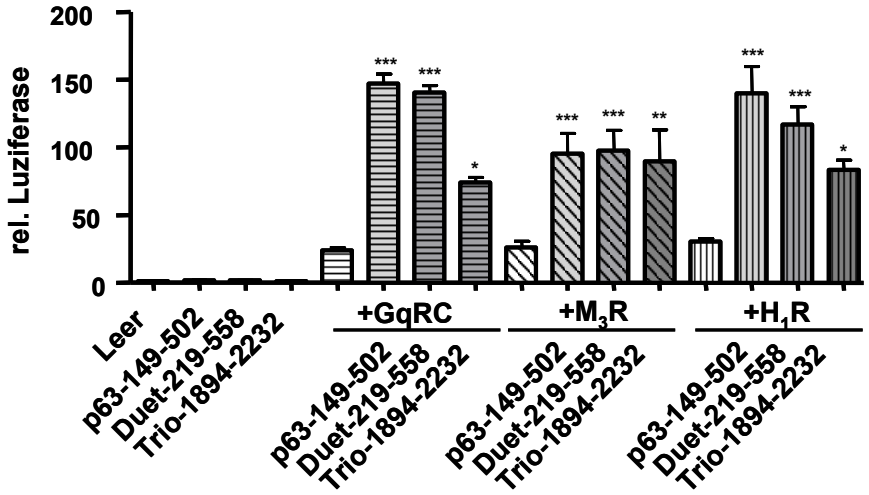


Abb. 5.21: Analyse $G\alpha_q$-vermittelte Aktivierung trunkierter Duet- und Trio-Mutanten. Vergleich der RhoA-Aktivierung der trunkierten Mutanten von p63, Duet und Trio. (A), (B) RhoA-Aktivierung im Pulldown-Assay. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit entweder 1 µg $G\alpha_q$RC-pcDNA oder 1 µg M_3R-pcDNA, 1 µg GEF-pCMV-Tag, oder 2 µg pCMV-Tag transfiziert und 48 h nach Transfektion entweder direkt ($G\alpha_q$RC) oder nach Stimulation mit Carbachol (3 min, 1 mM) in PD-Puffer abgeschabt. Lysate wurden mit 50 µg Sepharose-gekoppeltem GST-Rhotekin für 1 h inkubiert. Präzipitat und Lysat wurden im Westernblot auf RhoA untersucht. Parallel wurde die Expression der transfizierten Komponenten in den Lysaten analysiert. (C) SRF-Aktivierung im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 50 ng $G\alpha_q$-pcDNA oder 25 ng Rezeptor-pcDNA, 50 ng GEF-pCMV-Tag oder 100 ng pCMV-Tag (Leer) pro Vertiefung ko-transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die entsprechenden Proben mit entweder 1 mM Carbachol oder 100 µM Histamin stimuliert und nach weiteren 24 h die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen n=4-14±SEM. *Statistik*: Dunn's Multiple Comparison Test (GqRC), Bonferroni's Multiple Comparison Test (M_3R, H_1R) (Prism);*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

Um die Frage zu klären, ob die Volllängenproteine von Duet und Trio eine den Fragmenten vergleichbare RhoA-Aktivierung vermitteln, wurde ihre Aktivität analysiert und mit p63FL verglichen. Dazu wurden die Austauschfaktoren jeweils mit dem M_3R ko-exprimiert und ihre direkte RhoA-Aktivierung im Rahmen eines Effektor-Pulldown-Assays untersucht (Abb. 5.22 A). Die Auswertung zeigte eine Rezeptor-vermittelte, synergistische RhoA-Aktivierung im Falle aller drei GEFs, wobei für Duet und Trio eine schwächere Aktivierung als für p63RhoGEF detektiert wurde. Zur Quantifizierung der im Pulldown bestimmten RhoA-Aktivierung, wurde zusätzlich das Aktivierungspotential der GEFs bezüglich des SRF analysiert. Dazu wurden jeweils p63RhoGEF, Duet und Trio mit entweder konstitutiv aktivem $G\alpha_q$RC, M_3R oder H_1R ko-exprimiert (Abb. 5.22 B). Es konnte auch hier nachgewiesen werden, dass eine Überexpression von Duet und Trio zu einer verstärkten SRF-Aktivierung führte, wobei die Ko-Expression von $G\alpha_q$RC- in einer vergleichbaren Aktivität von p63RhoGEF und Duet resultierte, während Trio wiederum die

schwächste Aktivierung bewirkte. Im Gegensatz dazu zeigte Duet die effektivste SRF-Aktivierung im Falle der Ko-Expression sowohl des M_3R als auch des H_1R. p63RhoGEF und Trio induzierten eine vergleichar schwächere Aktivierung des SRF.

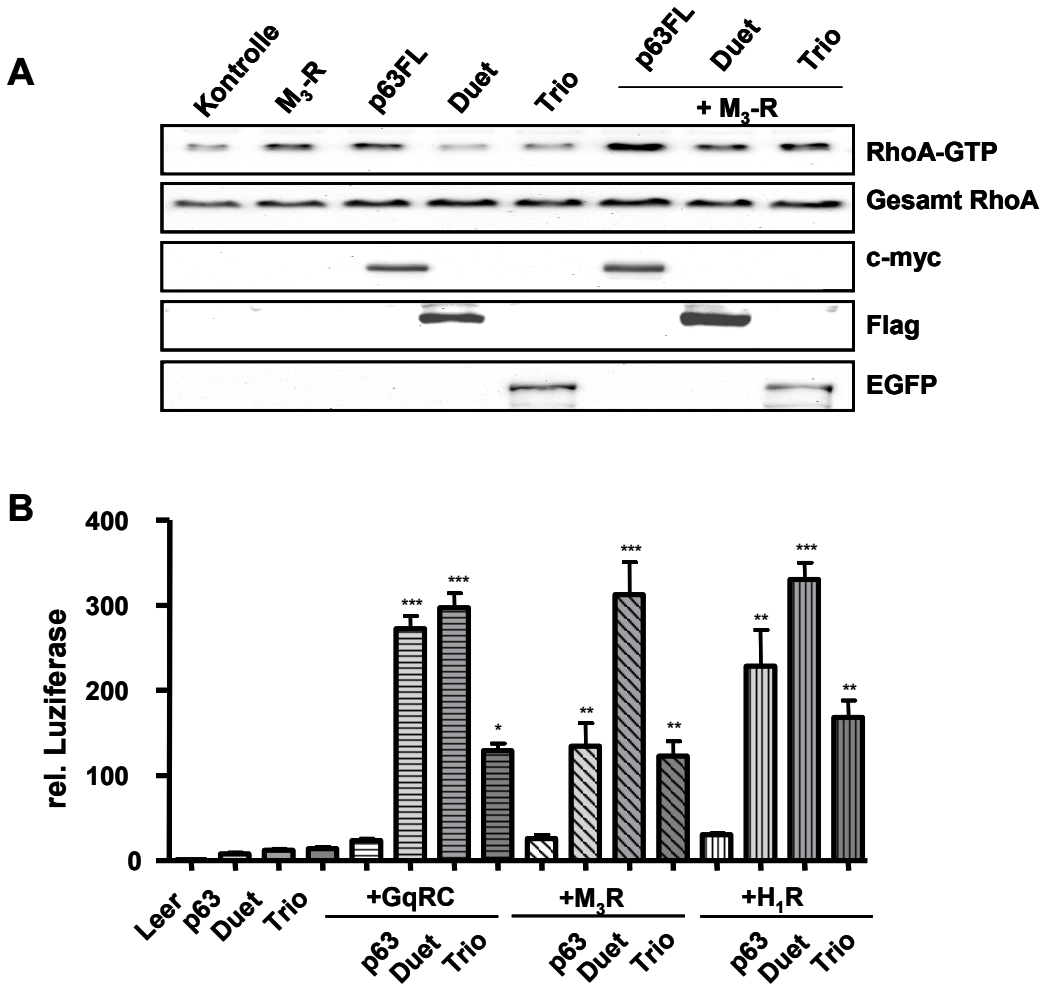


Abb. 5.22: $G\alpha_q$-vermittelte Aktivierung der Volllängenproteine Duet und Trio. Vergleich der RhoA-Aktivierungskapazität der Volllängenproteine p63, Duet und Trio. (A) RhoA-Aktivierung im Pulldown-Assay. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit 1µg M_3R-pcDNA, 1 µg GEF-pCMV-Tag bzw. Trio-pEGFP-C1, oder 2 µg pCMV-Tag transfiziert und 48 h nach Transfektion nach 3 min Stimulation mit 1 mM Carbachol in PD-Puffer abgeschabt. Lysate wurden mit 50 µg Sepharose-gekoppeltem GST-Rhotekin für 1 h inkubiert. Präzipitat und Lysat wurden im Westernblot auf RhoA untersucht. Parallel wurde die Expression der transfizierten Komponenten in den Lysaten analysiert. (B) SRF-Aktivierung im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 50 ng $G\alpha_q$-pcDNA oder 25 ng Rezeptor-pcDNA, 50 ng GEF-pCMV-Tag bzw. Trio-pEGFP-C1 oder 100 ng pCMV-Tag (Leer) pro Vertiefung ko-transfiziert. 24h nach Transfektion wurden die entsprechenden Proben mit entweder 1 mM Carbachol oder 100 µM Histamin stimuliert und nach weiteren 24 h die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen n=6-14±SEM. *Statistik*: Dunn's Multiple Comparison Test;*p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001.

5.1.5 Das *C.elegans* Ortholog von Trio (Unc73) in der $G\alpha_q$-vermittelten Signaltransduktion

Der Invertebrat *C.elegans* mit seinen ca. 1000 Genen exprimiert zahlreiche Mediatoren der G-Protein-mediierten Signalkaskaden. Die Signalwege der $G\alpha_q$/$G\alpha_o$-Orthologe EGL-30 und GOA-1 übernehmen dabei wichtige regulatorische Funktionen in der Fortpflanzung und im Bewegungsverhalten des Wurms (Williams *et al.* 2007). Die $G\alpha_q$-vermittelte Signaltransduktion über das PLCβ-Ortholog EGL-8 und Diacylglycerin führt dabei z.B. zu einer erhöhten Motilität in *C.elegans*, während GOA-1 sich inhibitorisch auswirkt (Abb. 5.23). In *C.elegans* können Kandidatengene in beiden Signalwegen nach zufälliger, chemischer Mutagenese anhand des veränderten Verhaltensmusters (Phänotypisierung) identifiziert werden. Eine der Mutationen, ce362, die in einer Bewegungsabnahme resultierte, war eine Mutation von Unc73, dem Trio-Ortholog von *C.elegans*. Ob Unc73 in der $G\alpha_q$ oder der $G\alpha_o$-Signalkaskade eine Rolle spielt, war bisher unbekannt. Unc73 wird in 8 Splice-Varianten exprimiert, wobei die Variante Unc73E ein Ortholog von p63RhoGEF darstellt. Das Ortholog wird im Folgenden als Trio 309 Ce bezeichnet (Abb. 5.24). Mit Hilfe von Trio 309 Ce sollte deshalb die Frage geklärt werden, ob das Protein Teil der $G\alpha_q$-Signalkaskade ist und ob diese Signaltransduktion zu einer RhoA-Aktivierung in *C.elegans* führt.

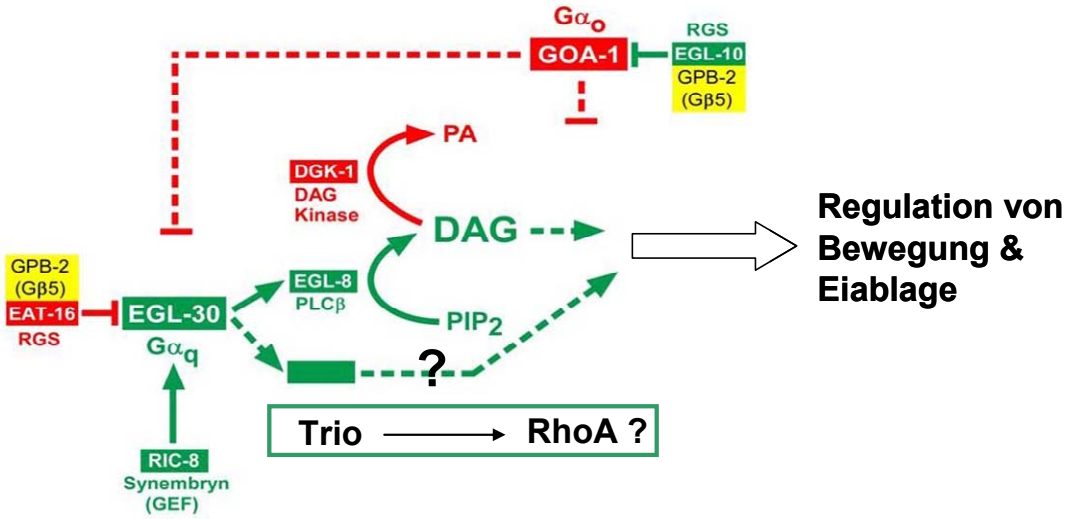


Abb. 5.23: Schematische Darstellung des $G\alpha_q$/$G\alpha_o$-Signalwegs in *C.elegans*. Abkürzungen: DAG (Diacylglycerin), PLCβ (Phospholipase β), PIP_2 (Phosphoinositoldiphosphat), RGS (Regulator of g-protein signalling)
Aus: *Genes & Development, 2007*

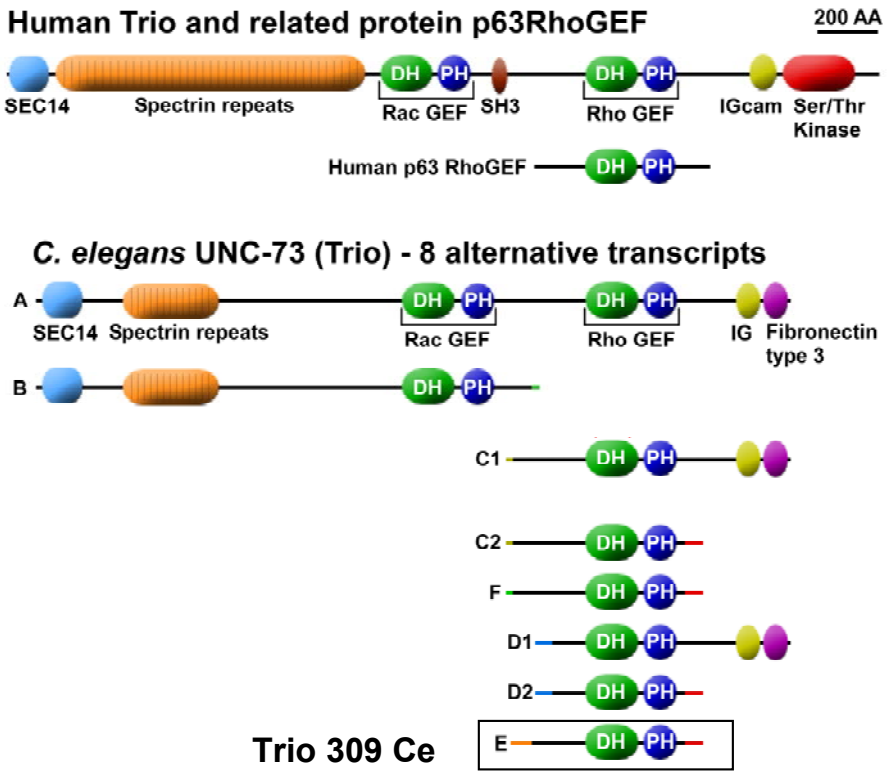


Abb. 5.24: Schematische Darstellung der Proteindomänen von humanem Trio, seinem Ortholog Unc73 und dessen Splice-Varianten in *C.elegans*. Ein Vergleich zwischen Trio Ce, Trio hs und p63 hs. Abkürzungen: Ce (C.elegans) DH (Dbl-homolog), IG (Immunglobolin-ähnlich), PH (Plextrin-homolog), SH3 (Scr-Homolog)
Aus: *Genes & Development, 2007*

Dazu wurde zunächst Trio 309 Ce und das konstitutiv aktive EGL-30 ($G\alpha_q$QL Ce) in HEK-Zellen ko-exprimiert und die beiden Proteine durch eine Ko-Immunpräzipitation auf ihre potentielle Interaktion analysiert. Wie in Abbildung 5.25 A zu sehen ist, konnte $G\alpha_q$QL Ce zusammen mit Trio 309 Ce aus dem Zelllysat gefällt werden. Im nächsten Schritt wurde deshalb untersucht, ob die Interaktion zwischen Trio 309 Ce und $G\alpha_q$ Ce zur Aktivierung von RhoA führt. Die Fällung von RhoA-GTP aus entsprechend transfizierten HEK-Zelllysaten wies eine basale Aktivität von Trio 309 Ce nach, die bei Ko-Expression mit $G\alpha_q$QL Ce in einer deutlich verstärkten RhoA-Aktivierung resultierte. Die Ko-Expression von Trio 309 Ce mit konstitutiv aktivem $G\alpha_o$QL Ce hatte dagegen keinen Einfluss auf die Aktivität des Austauschfaktors (Abb. 5.25 B). Um die Effektivität der $G\alpha_q$-vermittelten RhoA-Aktivierung zu quantifizieren, wurden Trio 309 Ce und das zu Trio-1894-2232 äquivalente Fragment, Trio 310 Ce bezüglich ihrer Fähigkeit SRF zu aktivieren untersucht. Trio 309 Ce, Trio 310 Ce und ihre humanen Ortholge Trio Hs (Homo sapiens) und Trio-1894-2232 wurden entsprechend mit humanen $G\alpha_q$QL, $G\alpha_q$QL Ce und $G\alpha_o$QL Ce in HEK-Zellen ko-exprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von $G\alpha_q$QL Hs und $G\alpha_q$QL Ce durch alle vier GEFs verstärkt werden konnte. $G\alpha_o$QL Ce war nicht in der Lage eine SRF-Aktivierung zu induzieren (Abb 5.25 C).

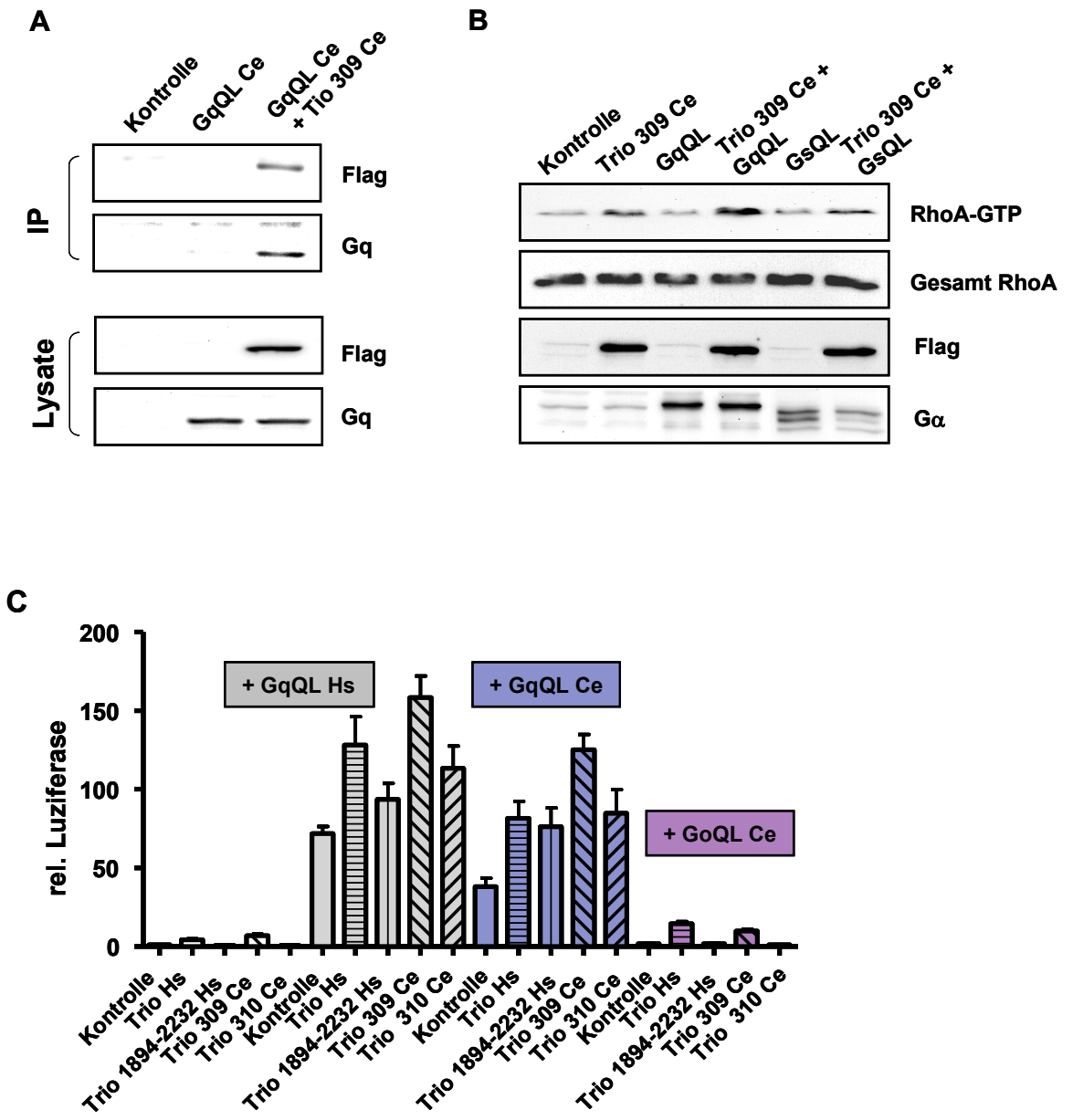


Abb. 5.25: $G\alpha_q$-Bindung und $G\alpha_q$-vermittelte Aktivierung von Trio Ce. (A) Interaktion zwischen Trio 309 Ce und $G\alpha_q$QL Ce in einer Ko-Immunpräzipitation. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit 1 µg Trio 309 Ce-pcmVTag, 1 µg $G\alpha_q$QL Ce-pcDNA oder 2 µg pcDNA transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion in IP-Puffer lysiert und mit je 8 µg anti-Flag Antikörper und 50 µL ProteinA-Sepharose für 4 h inkubiert. Präzipitat und Lysat wurden im Westernblot auf gefälltes Trio 309 Ce und $G\alpha_q$QL Ce untersucht. Parallel wurde die Expression der transfizierten Komponenten in den Lysaten analysiert. (B) RhoA-Aktivierung im Pulldown-Assay. HEK-Zellen einer 6well-Platte wurden mit 1 µg Trio 309 Ce, 1 µg Gα Ce-pcDNA oder 2 µg pCMV-Tag transfiziert und 48 h nach Transfektion in PD-Puffer abgeschabt. Lysate wurden mit 50 µg Sepharose-gekoppeltem GST-Rhotekin für 1 h inkubiert. Präzipitat und Lysat wurden im Westernblot auf RhoA untersucht. Parallel wurde die Expression der transfizierten Komponenten im Lysat analysiert. (C) SRF-Aktivierung im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 50 ng Gα-pcDNA, 50 ng GEF-pCMV-Tag oder 100 ng pCMV-Tag (Leer) pro Vertiefung ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen n=6±SEM.

Abschließend wurde untersucht, ob die Mutante Trio 310 IN noch in der Lage ist, die $G\alpha_q$-abhängige SRF-Aktivierung zu vermitteln. Trio 310 IN, in der eine Mutation des Isoleucin 310 zu Asparagin vorliegt, entspricht der Originalmutation ce362 in *C.elegans*. Außerdem ist die Mutante das Ortholog der Punktmutante p63-149-502-I205N, die in vorangegangenen Experimenten (5.1.3) bereits einen Funktionsverlust von ca. 75% bezüglich der SRF-Aktivierung gezeigt hatte. Zur Quantifizierung des Aktivierungspotentials von Trio 310 IN im Vergleich zur Wildtypsequenz, wurden beide Protein-Fragmente zusammen mit $G\alpha_q$QL Ce bzw. $G\alpha_q$QL Hs in HEK-Zellen ko-exprimiert. Die Auswertung des SRE-abhängigen Reportergen-Assays bestätigte den durch die Mutation verursachten Funktionsverlust der Mutante ce362 (Abb. 5.26).

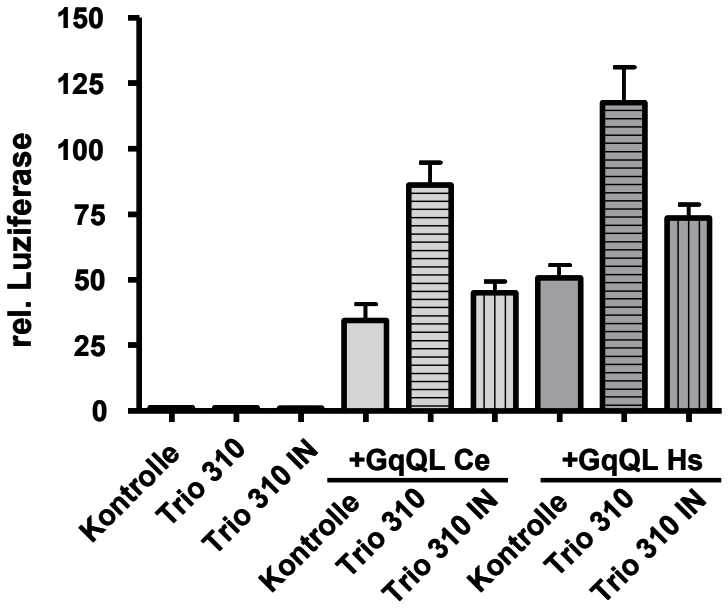


Abb. 5.26: Einfluss der MutanteTrio 310 IN auf die $G\alpha_q$-vermittelte SRF-Aktivierung. Ein Vergleich zwischen der SRF-Aktivierung der trunkierten Mutante Trio 310 und der trunkierten Punktmutante Trio 310 IN im SRE-abhängigen Reportergen-Assay. HEK-Zellen einer 96well-Platte wurden mit 21,7 ng pSRE.L, 3,3 ng des Kontrollplasmids pRL.TK, 50 ng $G\alpha_q$QL-pcDNA, 50 ng GEF-pCMV-Tag oder 100 ng pCMV-Tag pro Vertiefung ko-transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde die Aktivität der SRE-abhängigen und der Kontrollplasmid-Luziferase ermittelt. Die Messdaten wurden auf die Kontroll-Luziferase normalisiert und in Relation zu den Werten des Leervektors aufgetragen (n=6±SEM).

2. Teil

5.2 Charakterisierung der GPCR-vermittelten RhoGTPase-Aktivierung in kardialen Primärzellen

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die G-Protein-abhängige Aktivierung der RhoGTPasen RhoA und Rac1 bezüglich ihrer Rolle bei der Entstehung der kardialen Hypertrophie untersucht. Als Modellsystem dienten Kardiomyozyten (NRCM) und kardiale Fibroblasten (NRCF), die aus neonatalen Rattenherzen isoliert wurden. Die Analyse basierte dabei zum einen auf Veröffentlichungen zur Rolle der beiden GTPasen als Mediatoren in der Hypertrophie-Entwicklung (Brown *et al.* 2006) und zum anderen auf die bereits seit längerem postulierte Rolle von $G\alpha_q$ als potentem Induktor dieses pathologischen Prozesses (D'Angelo *et al.* 1997; Mende *et al.* 2001).

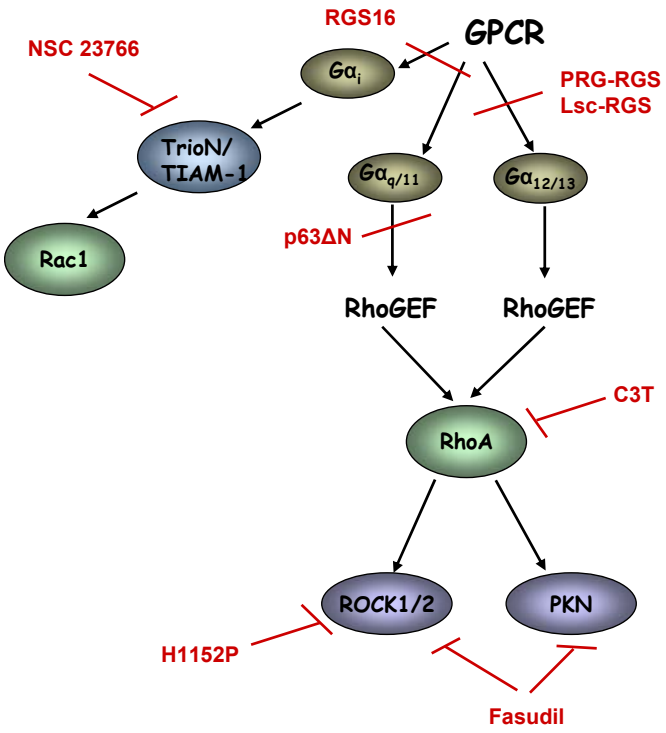


Abb. 5.27: Inhibitoren der GPCR-vermittelten, RhoGTPase-abhängigen Zellantwort. Abkürzungen: C3T (C3 Transferase), GPCR (g-protein coupled receptor), Lsc-RGS (LscRhoGEF-RGS-Domäne). PKN (Proteinkinase N), PRG-RGS (PDZRhoGEF-RGS-Domäne), RGS (regulator of g-protein signalling), ROCK1/ 2 (Rho-abhägige Kinase 1/ 2), TIAM-1 (T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1)

Zur genauen Charakterisierung der durch GPRCs vemittelten Zellantwort bekannter Hypertrophie-induzierender Agonisten wurden spezifische Inhibitoren verwendet, die zu einer direkten (C3T) oder indirekten Hemmung der RhoA- bzw. Rac1-Aktivierung führen. Die indirekte Hemmung hatte dabei entweder die Inaktivierung potentiell beteiligter Gα-Proteine (RGS16,

p63ΔN, PRG-RGS, Lsc-RGS) oder die Inaktivierung potentiell beiteiligter GEFs (NSC 23766) zum Ziel. Der Schwerpunkt dieser Analyse lag dabei auf einer möglichen Aktivierung des $G\alpha_q$-RhoA-ROCK/PKN-Signalwegs lag, daher wurde zusätzlich der Einfluss des ROCK1/ 2-Inhibitors H1152P und des ROCK1/ 2/ PKN-Inhibitors Fasudil auf die GPCR-induzierte zelluläre Hypertrophie untersucht (Abb. 5.27).

5.2.1 Analyse der endogenen RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten

Im ersten Schritt wurde die endogene RhoA-Aktivierung durch die Hypertrophie-induzierenden Rezeptoragonisten Endothelin-1 (ET-1) und Phenylephrin (PE) (Nakagawa *et al.* 1995) untersucht. Sowohl die Endothelin-Rezeptoren ($ET_{A/B}R$) als auch α_1-adrenerge Rezeptoren (α_1-AR) sind als $G\alpha_{q/11}$- und $G\alpha_{12/13}$- gekoppelt publiziert (Hoshijima *et al.* 1998; Gohla *et al.* 1999; Maruyama *et al.* 2002). Im Vergleich zu ET-1 und PE wurden außerdem Angiotensin II (AT II) und Noradrenalin (NA) als weiterer Agonist des α_1-AR in Anwesenheit des β-adrenergen Antagonisten Atenolol eingesetzt. Alle Agonisten induzierten eine RhoA-Aktivierung, wobei ET-1 die stärkste Aktivierung bewirkte (Abb. 5.28).

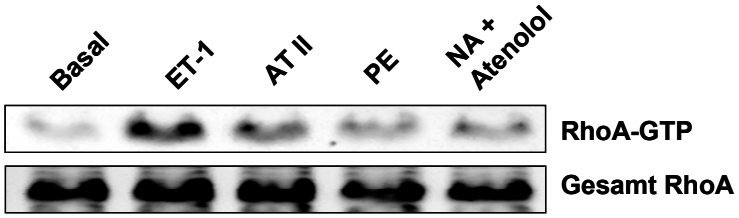


Abb. 5.28: Endogene RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten. Analyse der endogenen RhoA-Aktivierung im Rahmen eines Effektor-Pulldown-Assays. NRMC wurden 72 h nach der Präparation für 48 h serumfrei kultiviert und anschließend für 30 s mit 100 nM ET-1, 1 µM AT II, 100 µM PE oder 100 µM NA + 10 µM Atenolol stimuliert. Zellen wurden in 500 µl GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt und Lysate jeweils mit 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST für 1 h inkubiert. Präzipitate, sowie Lysate wurden mittels Westernblot analysiert. Abkürzungen: AT II (Angiotensin II), ET-1 (Endothelin-1), NA (Noradrenalin), PE (Phenylephrin)

Um zu analysieren, ob die ET-1 und PE induzierte RhoA-Aktivierung über $G\alpha_{q/11}$- oder $G\alpha_{12/13}$-Proteine vermittelt wird, wurden p63ΔN und die RGS-Domäne von PDZ-RhoGEF (PRG-RGS) mittels adenoviraler Konstrukte in Kardiomyozyten über-exprimiert. Wie in Abbildung 5.29 zu sehen ist, verursachte sowohl die Über-Expression des $G\alpha_q$-Inhibitors p63ΔN als auch des $G\alpha_{12/13}$-Inhibitors PRG-RGS eine Hemmung der ET-1- und PE-induzierten RhoA-Aktivierung. Dies deutete auf eine Beteiligung beider Gα-Proteine an der $ET_{A/B}R$- und α_1-AR-induzierten RhoA-Aktivierung in NRCM hin.

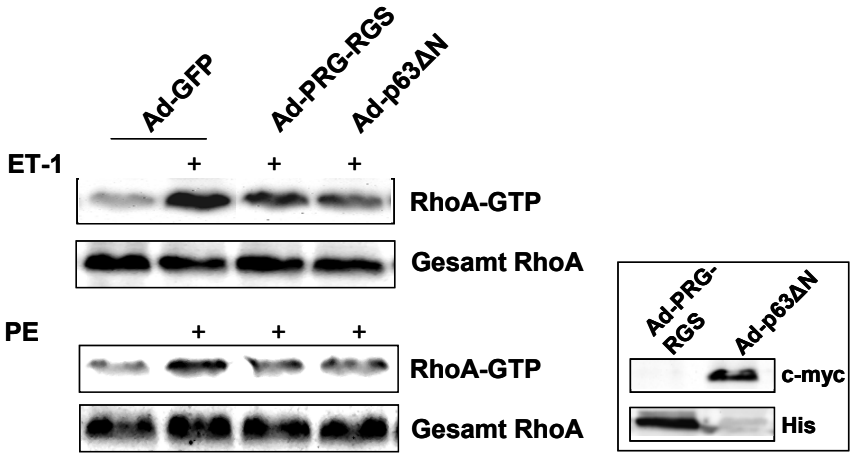


Abb. 5.29: Analyse der ET-1 und PE induzierten, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$-abhängigen RhoA-Aktivierung. Analyse der $G\alpha_{q/11}$- und $G\alpha_{12/13}$-Abhängigkeit der ET-1 bzw. PE induzierten RhoA-Aktivierung im Rahmen eines Effektor-Pulldown-Assays. NRMC wurden 72 h nach der Präparation entweder mit Ad-PRG-RGS, Ad-p63ΔN oder Ad-GFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 100 nM ET-1 bzw. 100 µM PE für 30 s stimuliert und anschließend in 500 µL GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt. Lysate wurden für 1 h mit je 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST inkubiert und Präzipitate bzw. Lysate im Westernblot analysiert. *Insertion*: Expressionskontrolle der adenoviralen Konstrukte. Abkürzungen: Ad (Adenovirus), ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin), PRG-RGS (PDZRhoGEF-RGS-Domäne), RGS (regulator of G protein signalling)

Um die Effizienz beider Agonisten bezüglich der Aktivierung quantitativ zu vergleichen, wurden die einzelnen Effektor-Pulldown-Assays mittels Pixelanalyse ausgewertet und aktives RhoA in Bezug zum gesamten RhoA-Gehalt des jeweiligen Lysates gesetzt. Die Auswertung der Analyse zeigt eine vergleichbare, signifikante RhoA-Aktivierung, die im Fall beider Agonisten ca. das 2-fache des basalen Wertes betrug (Abb. 5.30).

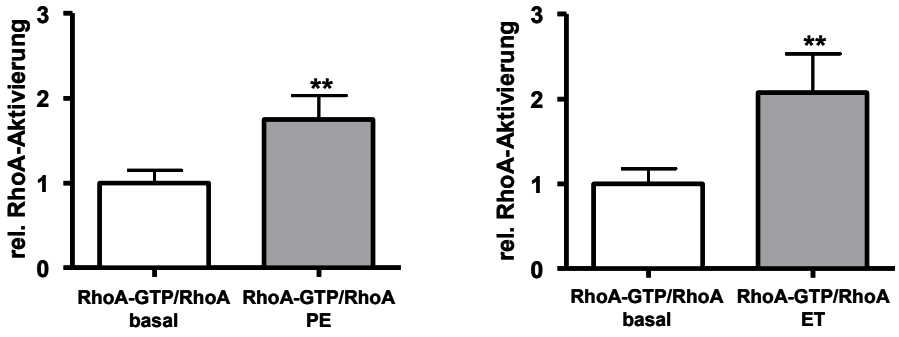


Abb. 5.30: Quantitative Analyse der ET-1- und PE-induzierten RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten. Pixelauswertung der im Westernblot analysierten PE (links) und ET-1 (rechts) induzierten RhoA-Aktivierung. Zur Auswertung wurde das Verhältnis von RhoA-GTP zu gesamt RhoA ermittelt und auf den Mittelwert des basalen RhoA-GTP/RhoA-Ratios normalisiert. Die Signifikanz der jeweiligen Stimulation wurde mittels gepaarten T-Tests berechnet. PE: n=15±SEM, P=0,035; ET-1: n=26±SEM, P=0,030. Abkürzungen: ET (Endothelin-1), PE (Phenylephrin)

5.2.2 Expression von p63RhoGEF in kardialem Gewebe

Da sich sowohl die ET-1- als auch die PE-induzierte RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten als partiell $G\alpha_q$-abhängig erwiesen hatte, sollte im nächsten Schritt eine mögliche Beteiligung des spezifischen $G\alpha_q$-Mediators p63RhoGEF innerhalb dieser Signalkaskade untersucht werden. In der ersten Publikation zu p63RhoGEF wurde dessen Expression als primär in Herz und Gerhin (Souchet *et al.* 2002) postuliert. Anhand histologischer Schnitte in adulten und neonatalen Rattenherzen konnte die kardiale Expression von p63RhoGEF bestätigt werden, wobei nicht nur in Kardiomyozyten, sondern auch in kardialen Fibroblasten, glatten Muskelzellen der Gefäße und im Endothel eine Expression nachgewiesen werden konnte (Abb. 5.31).

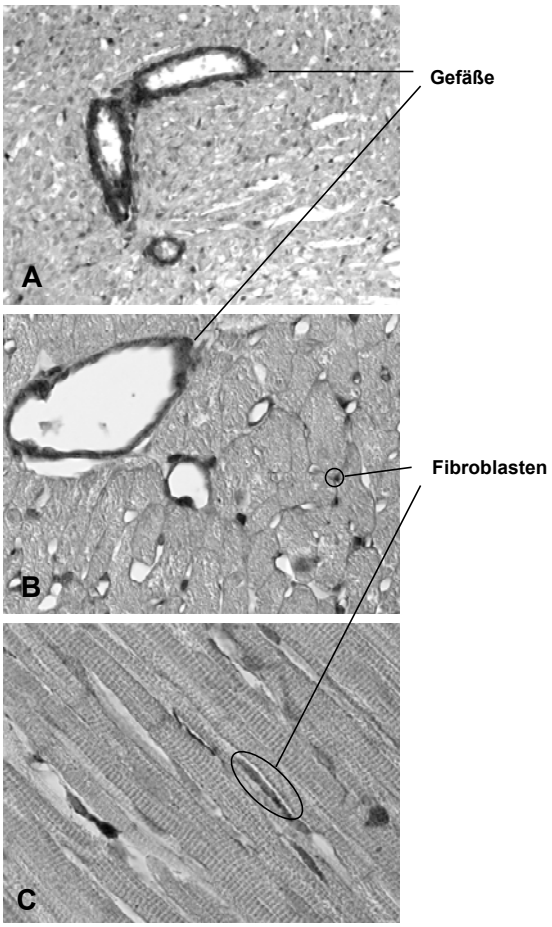


Abb. 5.31: Expression von p63RhoGEF in kardialem Gewebe. Immunhistochemische Färbung von Gewebsschnitten aus neonatalen und adulten Rattenherzen mit einem spezifischen p63-Antikörper (A) Neonatales Rattenherz im Querschnitt, 20 x 10 fach. (B) Adultes Rattenherz im Querschnitt, 60 x 10 fach (C) Adultes Rattenherz im Längsschnitt, 60 x 10 fach.
In Zusammenarbeit mit Dr. Martin Thomas, Frankfurt

5.2.3 Charakterisierung der p63RhoGEF-abhängigen RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten

Zunächst wurde untersucht, ob eine Überexpression von $G\alpha_q$ und p63RhoGEF zu einer RhoA-Aktivierung von RhoA in Kardiomyozyten führt. Dazu wurden die beiden Proteine mittels adenoviraler Konstrukte in den Zellen exprimiert und die resultierende Aktivierung durch einen

Effektor-Pulldown-Assay analysiert. Auch in NRCM führte die Über-Expression von p63RhoGEF zu einer Zunahme der basalen RhoA-Aktivierung. Die Über-Expression von $G\alpha_q$ zeigte per se wenig Effekt, war aber in der Lage die Aktivierung von RhoA in Gegenwart von p63RhoGEF deutlich zu verstärken (Abb. 5.32).

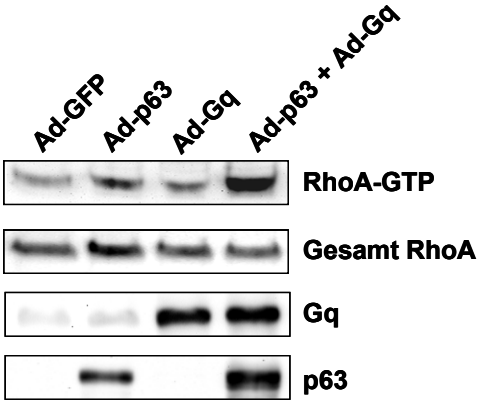


Abb. 5.32: RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten induziert durch die Über-Expression von $G\alpha_q$ und p63RhoGEF. Analyse der $G\alpha_q$-vermittelten, p63RhoGEF-abhängigen RhoA-Aktivierung im Effektor-Pulldown-Assay. NRMC wurden 72 h nach der Präparation mit Ad-p63RhoGEF, Ad-$G\alpha_q$ oder Ad-GFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in 500 µL GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt und Lysate für 1 h mit je 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST inkubiert. Präzipitate bzw. Lysate wurden mittels Westernblot analysiert. Abkürzungen: Ad (Adenovirus)

p63RhoGEF war ebenfalls in der Lage die $G\alpha_q$PCR-induzierte RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten zu verstärken. Wie in Abbildung 5.33 gezeigt, führten die Über-Expression des Austauschfaktors und die anschließende Stimulation der Zellen mit ET-1 bzw. PE zu einer deutlichen Verstärkung der Agonist-induzierten RhoA-Aktivierung.

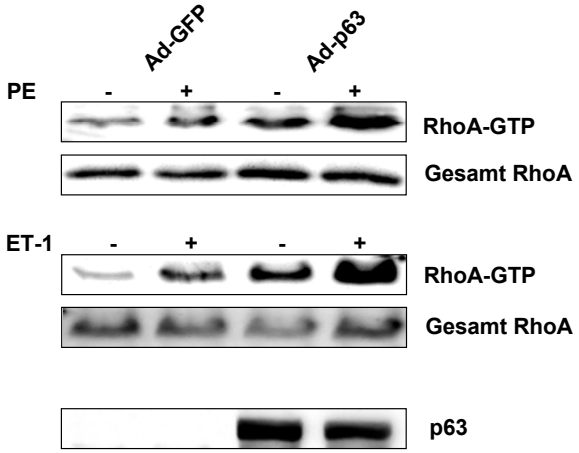


Abb. 5.33: ET-1 und PE induzierte RhoA-Aktivierung in p63RhoGEF über-exprimierenden Kardiomyozyten. Analyse der p63RhoGEF-abhängigen RhoA-Aktivierung im Effektor-Pulldown-Assay. NRMC wurden 72 h nach der Präparation mit für Ad-p63RhoGEF oder Ad- GFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert. Nach 48 h wurden die Zellen entweder mit 100 nM ET-1 oder 100 µM PE für 30 s stimuliert und anschließend in 500 µL GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt. Lysate wurden dann für 1 h mit je 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST inkubiert und Präzipitate bzw. Lysate mittels Westernblot analysiert. Abkürzungen: Ad (Adenovirus), ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin).

Um schließlich die Beteiligung des endogenen p63RhoGEF an der $G\alpha_q$-vermittelten RhoA-Aktivierung nachzuweisen, wurde die Translation der RNA mittels short hairpin-RNA (sh-RNA) in Kardiomyozyten inhibiert. Die Zellen wurden dann mit ET-1 oder PE stimuliert und die resultiernde RhoA-Aktivierung analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass die partiellle Depletion von p63RhoGEF zu einer Hemmung der ET-1-induzierten RhoA-Aktivierung führt. Sie hatte aber keinen Einfluss auf die Aktivierung nach Stimulation mit PE (Abb. 5.34).

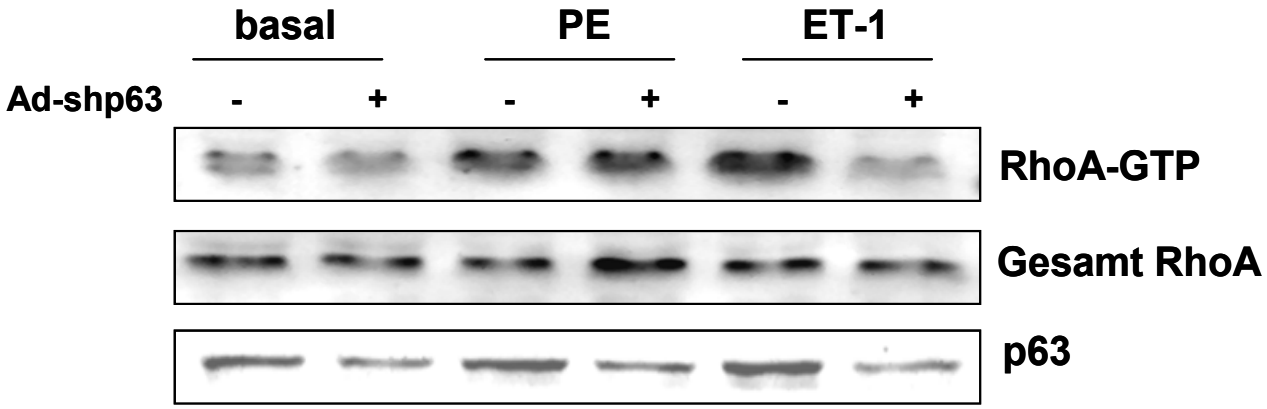


Abb. 5.34: Einfluss von p63RhoGEF Knockdown auf die ET-1 und PE induzierten RhoA-Aktivierung. Analyse der p63RhoGEF-abhängigen RhoA-Aktivierung im Effektor-Pulldown-Assay. NRCM wurden 72 h nach der Präparation mit Ad-shp63RhoGEF oder Ad-shGFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen entweder mit 100 nM ET-1 oder 100µM PE für 30s stimuliert und anschließend in 500 µL GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt. Lysate wurden dann für 1h mit je 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST inkubiert und Präzipitate bzw. Lysate mittels Westernblot analysiert. Abkürzungen: Ad (Adenovirus), ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin), sh (short hairpin)

.

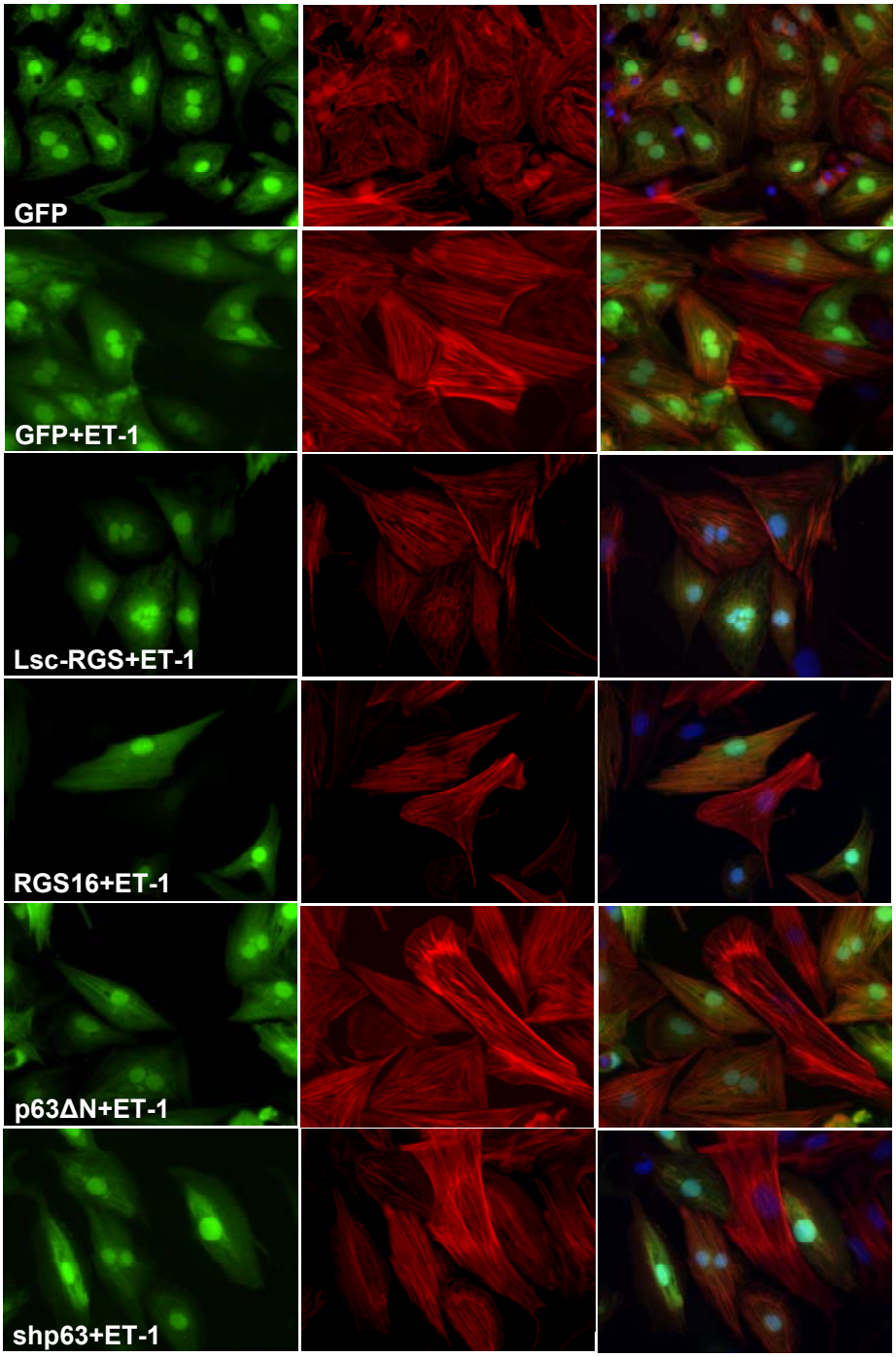


Abb. 5.35: ET-1 induzierte Stressfaserbildung. NRCM wurden 72 h nach der Präparation mit entsprechenden Adenoviren (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 100 nM ET-1 stimuliert und für weitere 48 h inkubiert. Die Färbung des Aktin-Zytoskeletts erfolgte mit TRITC-Phalloidin (1 µg/µL). Abkürzungen: Ad (Adenovirus), GFP (grün fluoreszierendes Protein) ET-1 (Endothelin-1), RGS (regulator of g-protein signalling), sh (short hairpin)

Da bereits beschrieben wurde, dass aktiviertes RhoA auch in NRCM zur Stressfaserbildung führt (Aoki *et al.* 1998; Taylor *et al.* 1999; de Jonge *et al.* 2007), wurde die Auswirkungen der beiden Agonisten ET-1 und PE auf die Organisation des Aktinzytoskeletts ebenfalls untersucht. Dazu wurden die Aktinpolymere der Zellen mittels TRITC-Phalloidin angefärbt. Die Stimulation mit ET-1

induzierte die Bildung von Stressfasern, welche sowohl durch die Inhibition von $G\alpha_{12/13}$-Proteinen (Lsc-RGS) als auch durch die Inhibition der $G\alpha_{q/11}$-medierten RhoA-Aktivierung (RGS16/p63ΔN) unterdrückt werden konnte. Die partielle Depletion von p63RhoGEF zeigte schließlich, dass p63RhoGEF an der ET-1 induzierten, $G\alpha_{q/11}$-RhoA abhängigen Stressfaserbildung in NRCM beteiligt ist (Abb.5.35).

5.2.3 Untersuchung zur Beteiligung von RhoA und Rac1 an der Ausbildung hypertropher Reaktionen in Kardiomyozyten

Um die Frage zu klären, ob die bisher gezeigte ET-1- bzw. PE-induzierte RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten eine Rolle bei der Entstehung der zellulären Hypertrophie spielt, wurde in den folgenden Experimenten die für hypertrophe Zellen charakteristische, verstärkte Proteinsynthese anhand des ^{3}[H]-Leucin-Einbaus quantitativ analysiert. Hierzu wurden zunächst beide Agonisten bezüglich ihres Potentials zelluläre Hypertrophie zu induzieren verglichen. Dabei zeigte sich, dass ET-1 nur eine schwache Hypertrophie-Antwort in NRMC auslöst, während PE eine Verstäkung der Proteinsynthese um ca. 30% induzierte (Abb. 5.36). Zur weiteren Charakterisierung der kardialen Hypertrophie wurde daher nur der PE-abhängige ^{3}[H]-Leucin-Einbau näher analysiert.

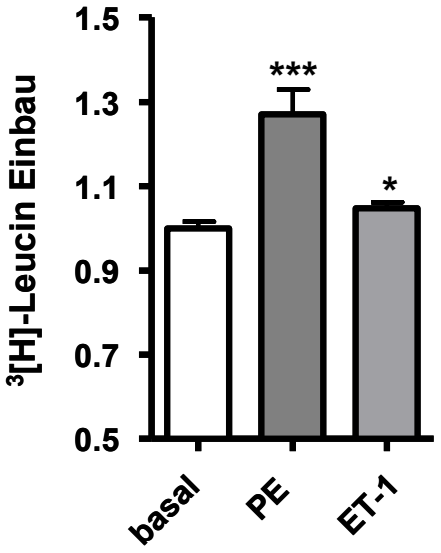


Abb. 5.36: Vergleich des ET-1 und PE induzierten Leucin-Einbaus in Kardiomyozyten. NRMC einer 6well-Platte wurden 72 h nach der Präparation unter serumfreien Bedingungen weiterkultiviert und parallel mit entweder 100 nM ET-1 oder 100 µM PE stimuliert. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 1 µCi/mL ^{3}[H]-Leucin und nach weiteren 24 h wurden die Zellproteine mittels 2 mL/Vertiefung 10 % TCA bei 4°C gefällt. Die in je 1 mL 0,1N NaOH resolubilisierten Proben wurden anschließend im Szintillationszähler analysiert, n=21±SEM. *Statistik:* ungepaarter t-Test (Prism). Abkürzungen: ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin).

Im nächsten Schritt wurde mittels Überexpression der bereits erwähnten adenoviralen Konstrukte RGS16, p63ΔN und PDZ-RGS untersucht, welche der α_1-AR-gekoppelten G-Proteine an der Induktion der Proteinsynthese beteiligt sind. Die Inhibition von G_i- und $G_{q/11}$-Proteinen durch Über-Expression von RGS16 unterdrückten den PE-abhängigen ³[H]-Leucin-Einbau nahezu vollständig (Abb. 5.38 A). Dagegen hatte die Inhibition von $G\alpha_{12/13}$ und $G\alpha_{q/11}$-vermittelter Signalwege durch Über-Expression von PRG-RGS bzw. p63ΔN keinen Einfluss auf die PE-induzierte Proteinsynthese (Abb. 5.37 B).

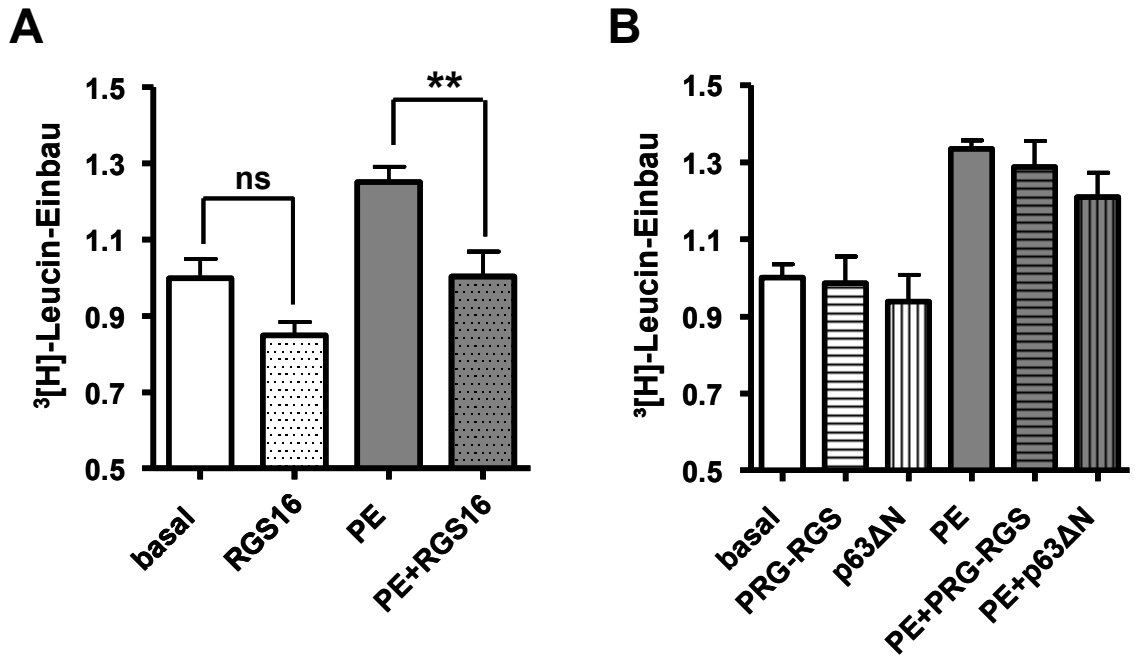


Abb. 5.37: Analyse der Rolle von $G\alpha_i$, $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_{12/13}$ bezüglich des PE induzierten Leucin-Einbaus. Analyse der G-Protein-Abhängigkeit des PE induzierten Leucin-Einbaus in NRCM. Zellen einer 6well-Platte wurden 72 h nach der Präparation mit Ad-RGS16, Ad-PRG-RGS, Ad-p63ΔN oder Ad-GFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert und parallel mit 100 µM PE stimuliert. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 1 µCi/ mL ³[H]-Leucin und nach weiteren 24 h wurden die Zellproteine mittels 2 mL/Vertiefung 10 % TCA bei 4°C gefällt. Die in je 1 mL 0,1N NaOH resolubillisierten Proben wurden anschließend im Szintillationszähler analysiert. (A) $G\alpha_i/G\alpha_{q/11}$-Inhibition n=6±SEM. (B) $G\alpha_{q/11}$ bzw. $G\alpha_{12/13}$-Inhibition n=9±SEM. *Statistik:* Bonferroni's Multiple Comparism (Prism), **p<0,01. Abkürzungen: PE (Phenylephrin), PRG-RGS (PDZRhoGEF-RGS-Domäne), RGS (regulator of G protein signalling)

Weitere Experimente zur Rolle von RhoA in der kardialen Proteinsynthese bestätigten die bereits gewonnenen Daten. Weder eine direkte Inhibition von RhoA durch Inaktivierung mittels einer zellgängigen Variante der C3-ADP-Ribosylierungstransferase (Aktories *et al.* 1992), noch die Inhibition der Effektoren ROCK1/2 und PKN durch H1152P bzw. Fasudil führten zu einer Reduktion des PE-induzierten ³[H]-Leucin-Einbaus (Abb. 5.38).

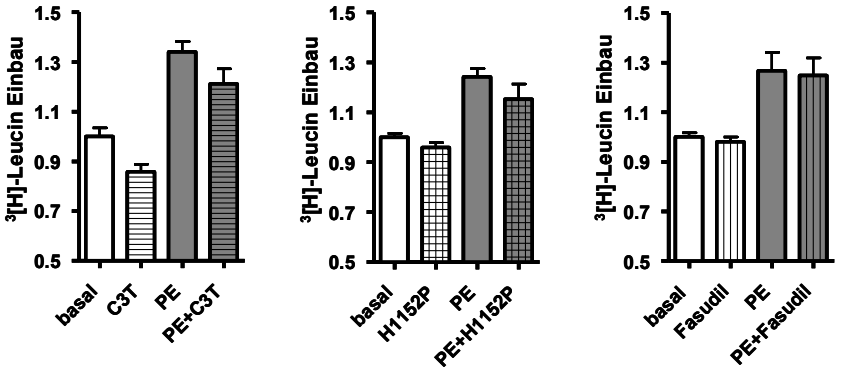


Abb. 5.38: Einfluss von C3T, H1152P und Fasudil auf den PE induzierten Leucin-Einbau. Analyse der Rho-, ROCK und PKN-Abhängigkeit bezüglich des PE induzierten Leucin-Einbaus in NRCM. Zellen einer 6well-Platte wurden 72 h nach der Präparation im Fall von C3T mit je 400 ng/mL C2-Transporter und 200 ng/mL C2/C3-Toxin für 12 h unter serumfreien Bedingungen vorbehandelt, während die Zugabe von 100 µM PE parallel 5 nM H1152P bzw. 10 µM Fasudil erfolgte. Nach 24 h wurde1 µCi/mL ³[H]-Leucin appliziert und nach weiteren 24 h wurden die Zellproteine mittels 2 mL/Vertiefung 10 % TCA bei 4°C gefällt. Die in je 1 mL 0,1N NaOH resolubilisierten Proben wurden anschließend im Szintillationszähler analysiert. C3T: n=6-9±SEM, H1152P: n=12±SEM, Fasudil: n=3±SEM. Abkürzungen: C3T (C3 Transferase), PE (Phenylephrin).

Um RhoA als Mediator auszuschließen, wurde zusätzlich der Einfluss von über-exprimiertem p63RhoGEF auf den PE-induzierten ³[H]-Leucin-Einbau untersucht. Die daraus resultierende Verstärkung der RhoA-Aktivierung (vgl. 5.3.2) hatte dabei keine Verstärkung der zellulären Proteinsynthese zur Folge (Abb. 5.39).

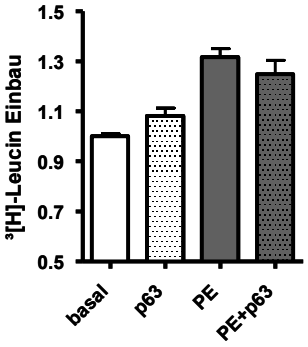


Abb. 5.39: Einfluss von über-exprimiertem p63RhoGEF auf den PE induzierten Leucin-Einbau. Analyse des Einflusses von p63RhoGEF auf den PE induzierten Leucin-Einbau in NRCM. Zellen einer 6well-Platte wurden 72 h nach der Präparation mit Ad-p63RhoGEF oder Ad-GFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert und parallel mit 100µM PE stimuliert. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 1 µCi/ mL ³[H]-Leucin und nach weiteren 24 h wurden die Zellproteine mittels 2 mL / Vertiefung 10 % TCA bei 4°C gefällt. Die in je 1 mL 0,1N NaOH resolubillisierten Proben wurden anschließend im Szintillationszähler analysiert, n=13-15±SEM. Abkürzungen: PE (Phenylephrin).

Um dieses Ergebnis durch eine alternative Methode abzusichern, wurde die Agonist-induzierten Proteinsynthese durch die Messung eines einzelnen Proteins quantifiziert. Die Datenerhebung basierte dabei auf der Transkriptionsrate des cmv- Promotors, welcher unter anderem vier NFκB- und fünf CREB-Bindestellen besitzt (Prosch *et al.* 2000; He and Weber 2004). Der Transkriptionsfaktor NFκB ist dabei als Mediator in der Hypertrophie beschrieben (Brown *et al.* 2006). Für die folgenden Experimente wurde deshalb die cmv-getriebene EGFP-Expression nach adenoviraler Infektion anhand der Fluoreszenz-Zunahme bestimmt. Analog zu den ³[H]-Leucin-Versuchen wurde zunächst das Aktivierungspotential der Agonisten PE und ET-1 verglichen. In Übereinstimmung mit bisher gewonnenen Daten zeigte die Auswertung eine starke Induktion der EGFP-Expression bei Stimulation der Zellen mit PE (ca. 350 %) und eine vergleichsweise schwache, aber quantifizierbare Induktion von ca. 25 % im Fall von ET-1 (Abb. 5.40).

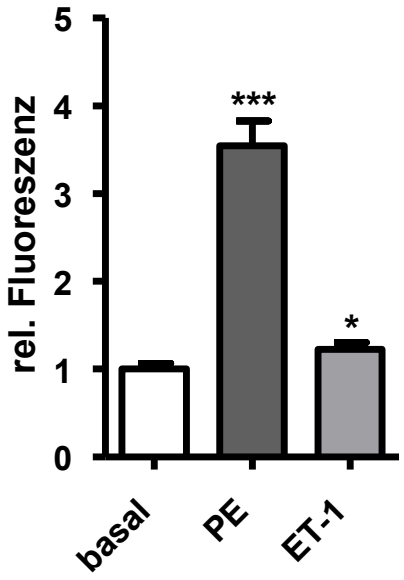


Abb. 5.40: ET-1 vs. PE: Vergleich der ET-1 und PE induzierten Aktivität des cmv-Promotors. Vergleich der ET-1 und PE induzierten cmv-Promotoraktivität in mit Ad-GFP infizierten NRCM. Zellen einer 24well-Platte wurden 72 h nach der Präparation mit Ad-GFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert und parallel mit entweder 100 µM PE oder 100 nM ET-1 stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen lysiert und die Fluoreszenz der Proben bestimmt, n=12±SEM. *Statistik:* ungepaarter t-Test (Prism). Abkürzungen: ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin).

Im nächsten Schritt wurde die bereits publizierte Rolle des $G\alpha_q$-Effektors Phospholipase C als Mediator der kardialen Hypertrophie untersucht. Es zeigte sich ein durch den PLC-Inhibitor U73122 verursachter, basaler Anstieg der EGFP-Expression (Abb 5.41, rechts), so dass erst die Normierung der Daten auf die entsprechenden Basalwerte in Gegenwart des Inhibitors eine Reduktion sowohl der ET-1-induzierten (ca. 100 %) als auch der PE-induzierten (ca. 50 %) EGFP-Expression verdeutlichte (Abb. 5.41, links).

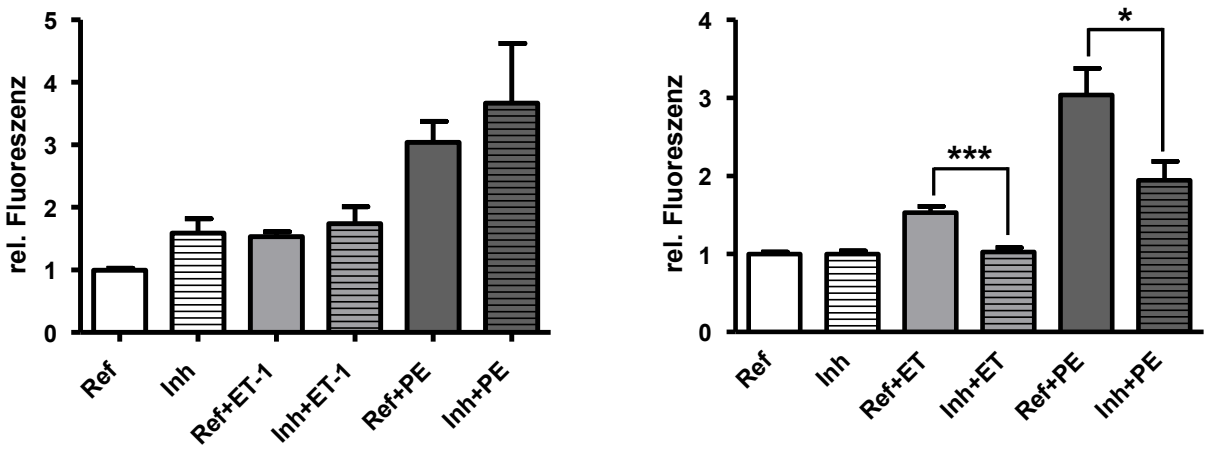


Abb. 5.41: Einfluss des PLC-Inhibitors U73122 auf die PE-induzierte Aktivität des cmv-Promotors Analyse der PLC-vermittelten, PE induzierten cmv-Promotoraktivität in NRCM. Zellen einer 24well-Platte wurden 72 h nach der Präparation mit Ad-GFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert und parallel entweder 5 µM der Referenz U73343 oder 5 µM des PLC-Inhibitors U73122 appliziert. Nach 1 h erfolgte die Stimulation mit 100 nM ET-1 bzw. 100 µM PE und nach weiteren 24 h wurden die Zellen in 100 µL Lysepuffer/Vertiefung lysiert und die Fluoreszent der Proben bestimmt. *Links*: Originaldaten. *Rechts*: Die mit U73122 behandelten Proben wurden auf die Basalwerte des Inhibitors normalisiert und die Signifikanz der Hemmung mittels ungepaarten t-Test (Prism) *p<0,05, **p<0,01, n=16±SEM. Abkürzungen: ET-1 (Endothelin-1), Inh (Inhibitor), PE (Phenylephrin), PLC (Phospholipase C), Ref (Referenz)

Da durch den PLC-Inhibitor ein Einfluss eines $G\alpha_{q/11}$–mediierten Signalweges auf die Agonist-induzierte Promotoraktivität belegt werden konnte, sollte eine mögliche Beteiligung der Effektoren ROCK1/2 und PKN erneut untersucht werden. In Übereinstimmung mit den bereits aus den Leucin-Versuchen gewonnenen Daten konnte weder für PE noch für ET-1 ein Einfluss der ROCK1/2 oder PKN-Inhibitioren bezüglich der EGFP-Expression detektiert werden (Abb. 5.42).

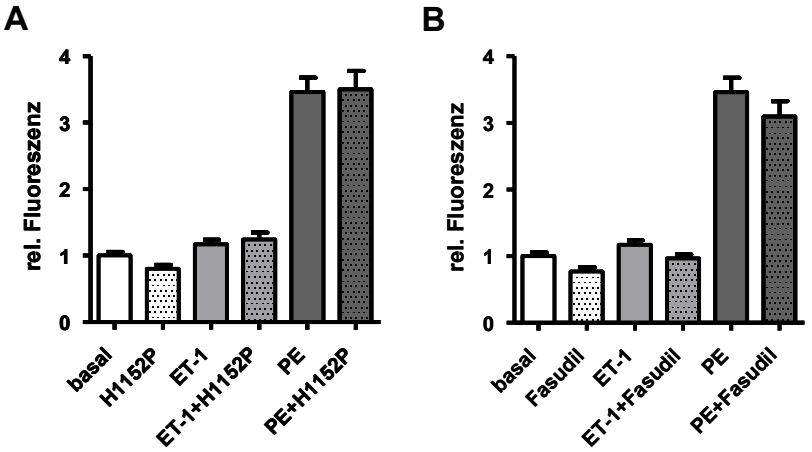


Abb. 5.42: Einfluss von H1152P und Fasudil auf die ET-1 bzw. PE-induzierte cmv-Promotoraktivität. Analyse der ROCK bzw. PKN-Abhängikeit der PE induzierten cmv-Promotoraktivität in NRCM. Zellen einer 24well-Platte wurden 72 h nach der Präparation mit Ad-GFP (MOI 20) unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert und parallel entweder mit (A) 5 nM H1152P oder (B) 10 µM Fasudil behandelt und mit 100 nM ET-1 bzw. 100 µM Pe stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen in 100 µL Lysepuffer/Vertiefung lysiert und anschließend die Fluoreszenz der Proben bestimmt, n=16±SEM. Abkürzungen: ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin).

Da die bisherigen Daten, abgesehen von der ET-1-induzierten Stressfaserbildung, keine weitere Aussage zur physiologischen Rolle der Agonist-induzierten RhoA-Aktivierung ermöglichten, wurde im nächsten Schritt die für kardiale Hypertrophie typische Expression embryonaler Gene exemplarisch anhand der Skelettmuskel-α-Aktin (s.-α-Aktin)-Transkription untersucht (Karns *et al.* 1995; Nelson *et al.* 2005). In Übereinstimmung mit den bisher gewonnenen Daten zeigte die s.-α-Aktin-Transkription eine PE-abhängige, um ca. 2,5 fach verstäkte Aktivierung, während ET-1 eine schwächere Aktivierung (ca. 1,5 fach) induzierte. In beiden Fällen konnte die stimulierte Promotor-Aktivität durch H1152P nicht reduziert werden (Abb. 5.43).

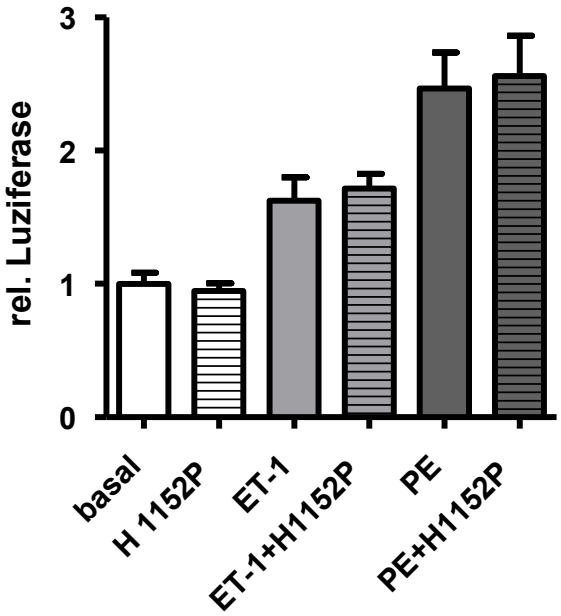


Abb. 5.43: Einfluss von Fasudil und H1152P auf die ET-1- und PE-induzierte Aktivität des s.-α-Aktin-Promotors. Zellen einer 24well-Platte wurden 72 h nach der Präparation mit je 1 µg ps.α-Actin.L/Vertiefung unter serumfreien Kulturbedingungen infiziert. Nach 1 h wurde entweder 5 nM H1152P oder 10 µM Fasudil appliziert und Zellen parallel mit 100 nM ET-1 bzw. 100 µM Pe stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen in 100 µL Lysepuffer/ Vertiefung lysiert und anschließend die Luziferase-Aktivität in den Proben bestimmt, n=20±SEM. Abkürzungen: ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin).

Da innherhalb der Leucin-Versuchsreihe die Überexpression von RGS16 zu einer Reduktion der PE-induzierten Proteinexpression geführt hatte, sollte im nächsten Schritt untersucht werden, ob die potentielle G_i-abhängige Aktivierung von Rac1 an diesem Prozess beteiligt ist. Dazu wurde Leucin-Einbau, sowie cmv-Transkription in Zellen untersucht, die mit dem Rac1-GEF-Inhibitor NSC 23766 behandelt wurden (Gao *et al.* 2004). NSC 23766 reduzierte in beiden experimentellen Ansätzen die PE-induzierte Proteinsynthese um ca. 30 % (Abb. 5.44 A/B).

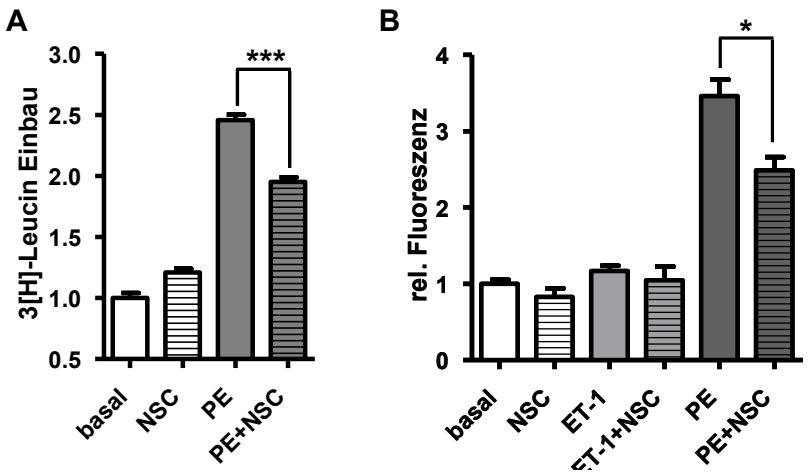


Abb. 5.44: Einfluss von NSC 23766 auf die PE induzierte Transkiption. Analyse des Einflusses von NSC 23766 auf die PE bzw. ET-1 induzierte Transkription in NRCM. (A) Einfluss von NSC 23766 auf den PE induzierten Leucin-Einbau. Zellen einer 24well Platte wurden 72 h nach der Präparation unter serumfreien Kulturbedingungen mit 12,5 µM NSC behandelt und parallel mit 100 µM PE stimuliert. Nach 24 h erfolgte die Zugabe von 1 µCi/ mL ³[H]-Leucin und nach weiteren 24 h wurden die Zellproteine mittels 2 mL/ Vertiefung 10 % TCA bei 4°C gefällt. Die Proteine wurden dann in je 1 mL 0.1 N NaOH resolubillisiert und anschließend im Szintillationszähler analysiert, n=11±SEM. (B) Einfluss von NSC 23766 auf die ET-1 und PE induzierte cmv -Promotoraktivität. Zellen einer 24well-Platte wurden 72 h nach der Präparation mit 25 µM NSC behandelt und parallel entweder mit 100 nM ET-1 oder 100 µM PE stimuliert. Nach 24 h wurden die Zellen in 100 µL Lysepuffer/ Vertiefung lysiert und anschließend die Fluoreszenz der Proben bestimmt, n=16±SEM. *Statistik*: (A) Bonferroni's Multiple Comparism Test (Prism). (B) Dunn's Multiple Comparism Test (Prism), *p<0,05, ***p<0,001. Abkürzungen: ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin).

Neben der Erhöhung der allgemeinen Proteinsyntheserate wurde in einem weiteren Versuchsansatz die Expression des spezifischen Hypertrophie-Markers ANP untersucht. Dabei konnte der bereits plublizierte ET-1- bzw. PE-induzierte Anstieg der ANP-Expression (Thorburn *et al.* 1997; Kuwahara *et al.* 1999; Yue *et al.* 2000) bestätigt werden. Bei beiden Agonisten erwies sich diese Induktion als Rac1-abhängig und wurde durch die ROCK1/2 bzw. PKN- Inhibitoren nicht beeinflusst. (Abb. 5.45)

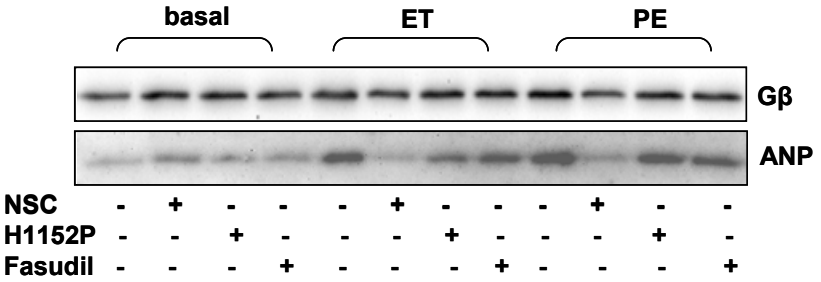


Abb. 5.45: Analyse der ET-1 und PE induzierten ANP-Expression. Analyse des Einflusses von Rac1-, ROCK- und PKN-Inhibitoren auf die ET-1 und PE induzierte ANP-Expression in NRCM. Zellen einer 12well-Platte wurden 72 h nach Präparation unter serumfreien Bedingungen für 24 h kultiviert und dann mit 100 nM ET-1 oder 100 µM PE stimuliert. Parallel wurden die Zellen jeweils mit entweder 25 µM NSC 23766, 5 nM H1152P oder 10 µM Fasudil behandelt. Nach weiteren 24 h wurden die Zellen in 200 µL GST-Fish-Puffer abgeschabt und Lysate im Westernblot analysiert. Abkürzungen: ANP (atrial naturetic protein), ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin)

5.2.4 Analyse der endogenen Rac1-Aktivierung in Kardiomyozyten

Da mit den bisher gewonnenen Daten die Aktivierung von Rac1 in Zusammenhang mit der Induktion zellulärer Hypertrophie gebracht werden konnte, sollte im nächsten Schritt diese Aktivierung sowie die Eigenschaften des RacGEF-Inhibitors NSC 23766 näher charakterisiert werden. Zunächst wurde untersucht, ob die Agonisten ET-1, PE und Carbachol in der Lage waren, Rac1 zu aktivieren. In Übereinstimmung mit publizierten Daten (Clerk *et al.* 2001) konnte eine Rac1-Aktivierung in allen drei Fällen detektiert werden, wobei nur die bereits beschriebene TIAM-1-abhängige, Carbachol-induzierte Rac1-Aktivierung (Vogt *et al.* 2007) durch NSC 23766 inhibiert werden konnte (Abb. 5.46).

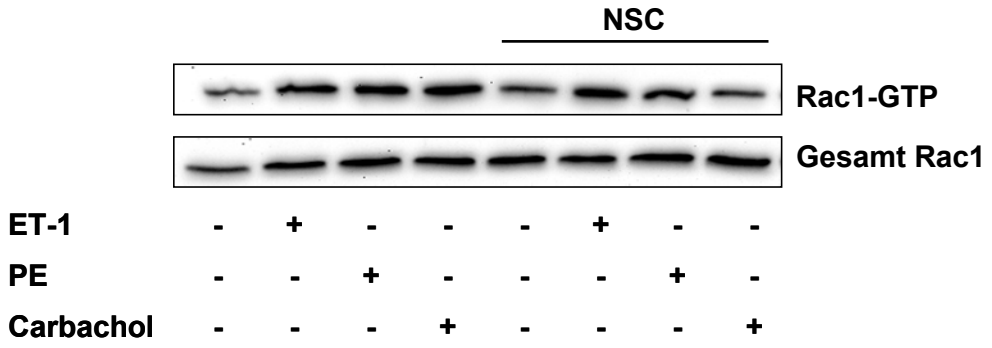


Abb. 5.46: Einfluss von NSC 23766 auf die kurzzeitige Rac1-Aktivierung. Analyse der endogenen Rac1-Aktivierung im Rahmen eines Effektor-Pulldown-Assays. NRMC wurden 72 h nach der Präparation für 48 h serumfrei kultiviert, für 1 h mit 50 µM NSC 23766 inkubiert und anschließend für 1:30 min mit 100 nM ET-1, 100 µM PE oder 1 mM Carbachol stimuliert. Zellen wurden in 500 µl GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt und Lysate jeweils mit 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST für 1 h inkubiert. Präzipitate, sowie Lysate wurden mittels Westernblot analysiert. Abkürzungen: ET-1 (Endothelin-1), PE (Phenylephrin)

5.2.5 Zytotoxizität der verwendeten Agonisten und Inhibitoren

In den folgenden Versuchen sollte die Frage geklärt werden, ob die Agonisten ET-1 und PE sowie die verwendeten Inhibitoren NSC 23766, H1152P und Fasudil zytotoxische Eigenschaften zeigen. Dazu wurden NRCM analog zu den bisher durchgeführten Experimenten für 24 h mit den genannten Substanzen inkubiert und anschließend Apoptose-Induktion sowie das Redoxpotential in den Zellen bestimmt. Die Auswertung der Kaspase-Aktivität zeigte, dass ET-1 sowie alle eingesetzten Inhibitoren eine Steigerung in der Apoptoserate von ca. 20 % verursachten. Die Kombination von ET-1 und Inhibitoren führte dabei nicht zu einem additiven oder synergistischen Effekt. Im Gegensatz dazu konnte kein Anstieg in der Kaspase-Aktivität bei Inkubation der Zellen mit PE detektiert werden. Die Stimulation mit PE konnte sogar die durch die Inhibitoren induzierte Apoptose reduzieren (Abb. 5.49 A). Bezüglich des Redoxpotentials induzierten beide Agonisten eine tendentielle Verstärkung um ca. 10 – 15 %. Im Fall der Inhibitoren verursachte nur NSC

23677 eine Reduktion, die sich aber als nicht signifikant erwies. Dieser Effekt konnte durch die Kombination mit PE teilweise kompensiert werden (Abb. 5.47 B).

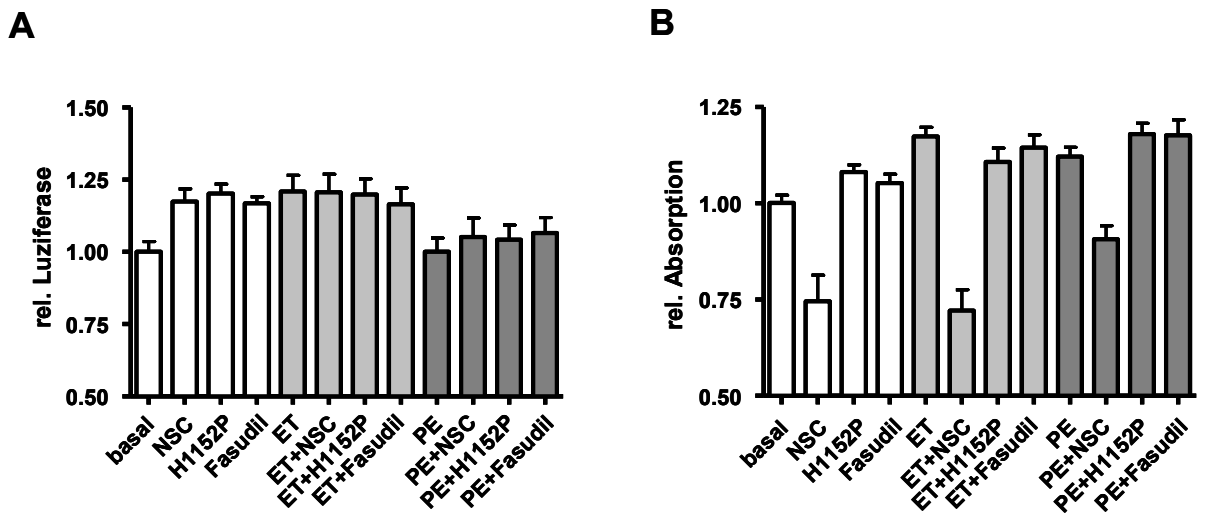


Abb. 5.47: Auswirkungen von Stimulation und Inhibition auf Apoptose und Redoxpotential in NRCM. Agonist- und Inhibitor-induzierte Kaspase 3/7-Aktivität und MTT-Reduktion in NRCM. NRCM wurden 72 h nach der Präparation unter serumfreien Kulturbedingungen für 24 h entweder mit 25 µM NSC 23766, 5 nM H1152P oder 10 µM Fasudil behandelt und mit 100 nM ET-1 bzw. 100 µM PE stimuliert. (A) Bestimmung der Kaspase 3/7-Aktivität mittels Apoptose-Kit (Promega). Zellen einer 96well-Platte wurden für 1:30 h mit der entsprechenden Luziferase inkubiert und anschließend deren Aktivität bestimmt, n=22±SEM. (B) Bestimmung des Redoxpotentials. Zellen einer 24well-Platte wurden für 1 h mit 0,5 mg/ ml MTT inkubiert, in 200 µl HCl/Isopropanol lysiert und anschließend die Absorption bei 570 nm bestimmt n=12±SEM. Abkürzungen: ET (Endothelin-1), PE (Phenylephrin)

5.2.7 Analyse der endogenen RhoA-Aktivierung in kardialen Fibroblasten

Neben Kardiomyozyten spielen kardiale Fibroblasten in der pathologischen Hypertrophie eine entscheidende Rolle. Publikationen der letzten Jahre belegen, dass Fibroblasten durch Proliferation, Differenzierung und Fibrose maßgeblich an der Entwicklung zur dekompensatorischen Hypertrophie beteiligt sind (Baudino *et al.* 2006).

Die im Rahmen der Wundheilung bzw. Fibrose postulierte Differenzierung kardialer Fibroblasten zu Myofibroblasten (Tomasek *et al.* 2002) gab den Anlass, die Expression von Glattmuskel-Aktin (sm-Aktin) in diesen Zellen zu überprüfen. In Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten konnte gezeigt werden, dass die Expression des Myofibroblasten-Markers verstärkt wurde, je länger sich die Zellen in der *in vitro* Kultur und damit außerhalb des Gewebes befanden (Abb. 5.48). Um den physiologischen Phänotyp der kardialen Fibroblasten weitgehend zu erhalten, wurden die Zellen für die folgenden Experimente in den Passagen P1 und P2 verwendet.

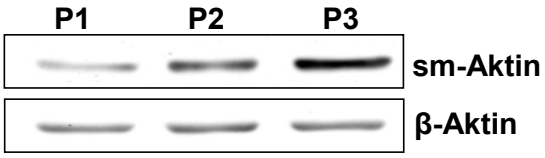


Abb. 5.48: Differenzierung von NRCF in der Zellkultur NRCF (P1-3) wurden bis zur Konfluenz kultiviert und anschließend in 400 µL GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt. Lysate wurden mittels Westernblot analysiert. Abkürzungen: P (Passage), sm (smooth muscle)

Zunächst wurde das RhoA-Aktivierungspotential Hypertrophie-assoziierter Rezeptoragonisten wie Bradykinin, ATP und Angiotensin II (AT II) im Rahmen eines Effektor-Pulldownassays analysiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass sowohl die Stimulation mit ATP als auch mit AT II zu einer Aktivierung von RhoA in den Zellen führte (Abb. 5.49).

Abb. 5.49: Endogene RhoA-Aktivierung in NRCF. Analyse der endogenen RhoA-Aktivierung im Rahmen eines Effektor-Pulldown-Assays. NRCF (P2) wurden bis zur Konfluenz kultiviert, für 48 h in 0,5 % Serum weiterkultiviert und anschließend für 30 s mit 1 µM Bradykinin, 20 µM ATP oder 1 µM AT II stimuliert. Zellen wurden in 500 µl GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt und Lysate jeweils mit 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST für 1 h inkubiert. Präzipitate, sowie Lysate wurden mittels Westernblot analysiert. Abkürzungen: AT II (Angiotensin II)

Da AT II ein allgemein anerkannter, wichtiger Mediator der pathologischen Veränderungen in kardialem Gewebe ist, wurde zunächst überprüft, ob die AT II-induzierte RhoA-Aktivierung über $G\alpha_{q/11}$- oder $G\alpha_{12/13}$-Proteine vermittelt wird. Dazu wurden die Konstrukte von p63RhoGEF, p63ΔN, sowie Lsc-RGS mittels adenoviraler Infektion in den Zellen exprimiert. Die Überexpression von p63RhoGEF führte zu einer Verstärkung der AT II-induzierten Aktivierung von RhoA. Die Inhibition von $G\alpha_{q/11}$ durch p63ΔN hatte den vollständigen Verlust der RhoA-Aktivierung zur Folge. Dagegen hatte die Überexpression des $G\alpha_{12/13}$-spezifischen Inhibitors Lsc-RGS keinen Einfluss auf die AT II-induzierte RhoA-Aktivierung (Abb. 5.50).

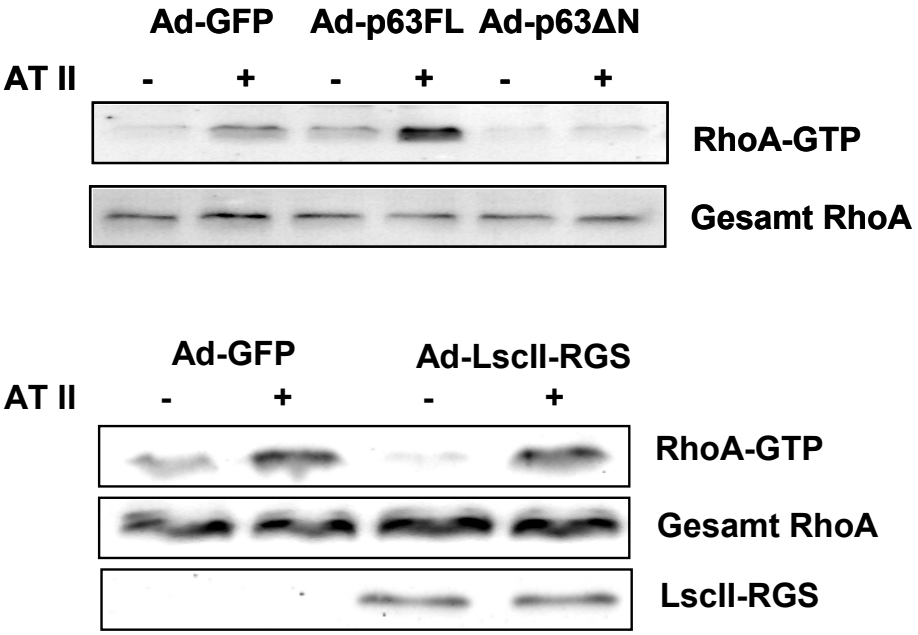


Abb. 5.50: Analyse der AT II-induzierten, $G\alpha_{q/11}$- und $G\alpha_{12/13}$-abhängigen RhoA-Aktivierung. Analyse der $G\alpha_{q/11}$- und $G\alpha_{12/13}$-Abhängigkeit der AT II induzierten RhoA-Aktivierung im Rahmen eines Effektor-Pulldown-Assays. NRCF (P2) wurden bis zur Konfluenz kultiviert und entweder mit Ad-LscII-RGS, Ad-p63ΔN, Ad-p63FL oder Ad-GFP (MOI 150) in 0,5 % Serum infiziert. Nach 24 h wurden die Zellen mit 1 µM AT II 30 s stimuliert und anschließend in 500 µL GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt. Lysate wurden für 1 h mit je 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST inkubiert und Präzipitate bzw. Lysate im Westernblot analysiert. Abkürzungen: Ad (Adenovirus), AT II (Angiotensin II), RGS (regulator of g protein signaling).

Da p63RhoGEF auch in kardialen Fibroblasten exprimiert wird (Abb. 5.31), wurde im Folgenden untersucht, ob die AT II-induzierte RhoA-Aktivierung durch diesen Austauschfaktor mediiert wird. Der Effektor-Pulldownassay in Abbildung 5.51 zeigt, dass die Depletion von p63RhoGEF zu einem vollständigen Verlust der AT II-abhängigen RhoA-Aktivierung in kardialen Fibroblasten führte.

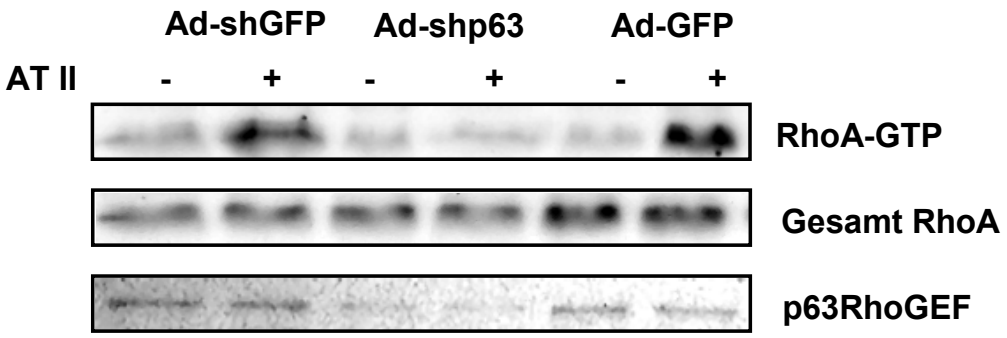


Abb. 5.51: Einfluss von p63RhoGEF Knockdown auf AT II-induzierte RhoA-Aktivierung. Analyse der p63RhoGEF-abhängigen RhoA-Aktivierung im Effektor-Pulldown-Assay. NRCF (P2) wurden bis zur Konfluenz kultiviert und entweder mit Ad-shp63, Ad.shGFP oder Ad-GFP (MOI 150) in 0,5 % Serum infiziert. Nach 72 h wurden die Zellen mit 1 µM AT II 30 s stimuliert und anschließend in 500 µL GST-Fishpuffer pro 6 cm Schale abgeschabt. Lysate wurden für 1 h mit je 50 µg Sepharose-gekoppeltem Rhotekin-GST inkubiert und Präzipitate bzw. Lysate im Westernblot analysiert. Abkürzungen: Ad (Adenovirus), AT II (Angiotensin II), sh (small hairpin)

6. Diskussion

Monomere GTPasen der Rho-Familie spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation einer Vielzahl von verschiedenen zellulären Prozessen. Neben der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts, kontrollieren RhoGTPasen als zentrale Mediatoren Prozesse wie Proliferation, Genexpression und Apoptose (Mackay and Hall 1998; Pruitt and Der 2001; Coleman and Olson 2002).

Ziel dieser Arbeit war es, anhand des Guaninnukleotid-Austauschfaktors p63RhoGEF, die biochemischen Eigenschaften der $G\alpha_{q/11}$-induzierten RhoA-Aktivierung zu charakterisieren und die physiologische Bedeutung dieses Signalwegs im Modell der kardialen Hypertrophie zu untersuchen.

6.1 p63RhoGEF

6.1.1. p63RhoGEF und LARG sind Mediatoren der $G\alpha_{q/11}$-abhängigen RhoA-Aktivierung mit unterschiedlichen Eigenschaften

Der direkte Vergleich zwischen p63RhoGEF und LARG bestätigte zum einen, dass beide Ausstauschfaktoren als Mediatoren in der $G\alpha_{q/11}$-abhängigen Rho-Aktivierung agieren (Booden *et al.* 2002; Lutz *et al.* 2005), zeigte aber auch, dass die Proteine sich bezüglich ihres Aktivierungsmechanismus deutlich unterscheiden. Während beide GEFs die Stimulation der primär $G\alpha_{q/11}$-gekoppelten Rezeptoren H_1R, M_3R und AT_1R zu einer vergleichbaren SRF-Aktivierung amplifizierten, ließ sich in der Interaktion mit dem unstimulierten H_1R der erste Unterschied zwischen p63RhoGEF und LARG etablieren. Im Gegensatz zu LARG war p63RhoGEF in der Lage, die konstitutive Aktivität des Rezeptors in eine SRF-Aktivierung umzusetzen, während kein Unterschied zwischen den GEFs in der Agonist-induzierten, Konzentrations-abhängigen Aktivierung festzustellen war. Die Beobachtung, dass GPCRs sich in einem dynamischen Gleichgewicht zwischen einem inaktivem und mehreren aktiven Zuständen befinden können, wurde sowohl für den β_2-adrenergen Rezeptor als auch für den Serotonin-4-(5-HT_4)-Rezeptor publiziert und es wird angenommen, dass die unterschiedlichen Konformationen auch zu einer Aktivierung differenzierter, intrazellulärer Signalkaskaden führen (Bhattacharya *et al.* 2008; Pellissier *et al.* 2009). Die Konformation des Agonist-freien, aber aktiven Rezeptors scheint sich daher von der Liganden-gebundenen Konformation zu unterscheiden, so dass eine, wenn auch geringe, Aktivierung von $G\alpha_{q/11}$-Proteinen möglich ist, die für eine Aktivierung von p63RhoGEF ausreicht aber keine Interaktion mit LARG zulässt. Die Rezeptor-unabhängige Aktivierung von p63RhoGEF wurde auch durch die Tatsache untermauert, dass p63RhoGEF im Gegensatz zu LARG in der Lage war, die basale $G\alpha_q$-Aktivität deutlich zu verstärken. Die Daten stehen damit im Einklang mit bisher veröffentlichten Resultaten, in welchen eine direkte

Interaktion zwischen p63RhoGEF und konstitutiv aktiven $G\alpha_{q/11}$-Proteinen gezeigt werden konnte und diese Interaktion zu einer synergistischen RhoA/SRF-Aktivierung in entsprechend transfizierten HEK-Zellen führte (Lutz *et al.* 2005).

Anhand des chimerischen Proteins $G\alpha_{i/q}$ konnte gezeigt werden, dass beide Proteine verschiedene Interaktionsoberflächen innerhalb von $G\alpha_q$-aufweisen. Im Gegesatz zu LARG war p63RhoGEF in der Lage, die Rezeptor-induzierte Aktivierung sowohl über $G\alpha_q$-WT als auch über die Mutante $G\alpha_{i/q}$ zu vermitteln. Die Daten lassen vermuten, dass neben den „switch"-Regionen der Gα-Untereinheit, die klassischerweise als Effektor-Interaktionsstellen gesehen werden (Sprang 1997), der N-Terminus von $G\alpha_q$ für die Aktivierung von LARG notwendig ist. Diese Beobachtung wird von verschiedenen Publikationen unterstützt, in welchen der Aminoterminus von Gα-Proteinen eine spezifische Erkennungssequenz darstellt, die Lokalisation, Effektor-Bindung und Rezeptorspezifität beeinflussen kann (Wedegaertner *et al.* 1995; Hepler *et al.* 1996; Kostenis *et al.* 1997; Oldham and Hamm 2008). So konnte beispielsweise eine Interaktion zwischen N-Terminus und Effektor an der $G\alpha_q$-vermittelten Aktivierung der PLC β1 demonstriert werden (Hepler *et al.* 1996).

Die hier gezeigten Befunde lassen zudem den Schluss zu, dass eine Aktivierung von $G\alpha_q$ bzw. von $G\alpha_{12}$ alleine nicht ausreichend ist, um eine Aktivierung von LARG zu induzieren. In den Versuchen konnte weder eine physikalische, noch eine funktionelle Interaktion zwischen LARG und den jeweiligen konstitutiv aktiven Gα-Mutanten belegt werden. Veröffentlichungen zu diesem Thema sind kontrovers und eine funktionelle Interaktion zwischen LARG und aktivierten $G\alpha_q$- bzw. $G\alpha_{12/13}$ ist bisher nur einmal publiziert (Booden *et al.* 2002). In anderen Publikationen wurde zwar eine physikalische Interaktion des Volllängenproteins mit Proteinen der $G\alpha_{12/13}$-Familie gezeigt, die funktionellen Daten, die eine Interaktion nahelegen, bezogen sich aber lediglich auf die isolierte RGS-Domäne (Fukuhara *et al.* 2001; Chikumi *et al.* 2002b). Im Fall der $G\alpha_{q/11}$-Familie konnten nur Chikumi und Mitarbeiter eine physikalische Interaktion mit LARG per IP nachweisen, wobei allerdings keine funktionellen Daten zu dieser Interaktion erhoben wurden.

Eindeutige Belege lassen sich dagegen für die funktionelle Bedeutung der PDZ-Domäne in der Rezeptor-vermittelten Aktivierung von LARG finden. So wurde z.B. eine direkte Interaktion zwischen der PDZ-Domäne von LARG und den Rezeptoren Plexin-B und IGF-1 publiziert, die zu einer Aktivierung von RhoA in den entsprechend transfizierten Zellsystemen führte (Taya *et al.* 2001; Aurandt *et al.* 2002; Perrot *et al.* 2002). Die in dieser Arbeit gemachte Beobachtung, dass die Deletionsmutante LARG-ΔPZD nicht mehr in der Lage ist durch den stimulierten M_3R-Rezeptor aktiviert zu werden, lässt daher eine Aktivierung von LARG durch $G\alpha_{q/11}$ nur bei Kontakt mit dem Rezeptor über die PDZ-Domäne vermuten. Ähnliche Befunde wurden auch für die $G\alpha_{q/11}$/ $G\alpha_{12/13}$ gekoppelten Lysophosphatidsäure (LPA)-Rezeptoren LPA_1 und LPA_2 publiziert, deren Agonist-induzierte RhoA-Aktivierung durch die Überexpression der PDZ-Domäne von PDZ-RhoGEF bzw. LARG vollständig inhibiert werden konnte, während die Überexpression der RGS-Domänen nur zu einer partiellen Inhibition führten (Yamada *et al.* 2005). Die für die Proteine der

p115RhoGEF-Familie etablierte Bindung an $G\alpha_{12/13}$-Proteine über die RGS-Domäne der GEFs scheint daher für die Interaktion mit $G\alpha_{q/11}$ nicht zutreffend zu sein. Dieser Befund wird von den meisten Publikationen unterstützt, in welchen weder eine physikalische, noch eine funktionale Interaktion von LARG-RGS und Proteinen der $G\alpha_{q/11}$-Familie festgestellt werden konnte (Chikumi *et al.* 2002a).

In den durchgeführten Versuchen konnte außerdem gezeigt werden, dass der N-Terminus von LARG keinen Bestandteil einer intramolekularen Inhibitorsequenz darstellt. Weder in der Basalaktivität noch in der Interaktion mit konstitutiv aktiven Gα-Mutanten ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen LARG-ΔPZD und der Wiltypsequenz erkennen. Dieser Befund ist in Übereinstimmung mit bisher veröffentlichten Daten, in welchen eine solche Inhibition mit dem C-Terminus des Proteins assoziiert wurde (Chikumi *et al.* 2004). Ein anderer etablierter Mechanismus zur Regulation der GEF-Aktivität ist die Aufhebung einer intramolekularen Inhibition durch Phosphorylierungen (Schmidt and Hall 2002). Obwohl LARG und p63RhoGEF über solche putativen Phosphorylierungsstellen verfügen, konnte weder eine Histamin- noch eine Serum-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung der beiden GEFs detektiert werden. Auch hier liefert die Literatur kontroverse Daten. Während Taya und Mitarbeiter keine IGF_1R-induzierte Tyrosin-Phosporylierung in der Aktivierung von LARG feststellen konnten, wurde von Chikumi und Mitarbeitern eine, wenn auch indirekte, LARG-Aktivierung über die fokale Adhäsionskinase (FAK) postuliert. Über die lokale, kontrollierte Aktivierung von p63RhoGEF ist dagegen noch wenig bekannt. Vergleiche zwischen der Aktivität der isolierten DH-Domäne und des DH-PH-Tandenmotivs lassen vermuten, dass die PH-Domäne eine autoinhibitorische Sequenz darstellt, die möglicherweise durch die Bindung an aktiviertes $G\alpha_q$ die Oberfläche der DH-Domäne zur Interaktion mit RhoA freigibt (Lutz *et al.* 2007; Rojas *et al.* 2007). Zudem konnte in einer kürzlich veröffentlichten Studie eine negative Regulation durch die MAPK MLK3 (mixed lineage kinase 3) gezeigt werden, die durch direkte Bindung die Aktivität des GEFs inhibiert (Swenson-Fields *et al.* 2008).

Die endogene Bedeutung der hier untersuchten $G\alpha_{q/11}$-vermittelten RhoA-Aktivierung konnte im physiologischen Teil dieser Arbeit zumindest für p63RhoGEF belegt werden. Ob die für LARG etablierte Signalkaskade von ähnlicher zellulärer Relevanz ist, bleibt dagegen abzuwarten.

6.1.2. Der C-Terminus der PH-Domäne von p63RhoGEF ist essentiell für die Interaktion mit $G\alpha_{q/11}$

Die bereits bekannte, direkte Interaktion zwischen p63RhoGEF und Proteinen der $G\alpha_{q/11}$-Familie konnte schließlich durch die Auflösung der Kristallstruktur des $G\alpha_{i/q}$/p63/RhoA-Komplexes endgültig bestätigt werden (Lutz *et al.* 2005; Lutz *et al.* 2007). Basierend auf der Analyse des Kristalls und Interaktionsstudien mit p63-Fragmenten, wurde das C-terminale Ende der PH-Domäne (PH-Extension) von p63RhoGEF als die potentielle Interaktionsoberfläche determiniert (Lutz *et al.* 2007). Ein Vergleich der Bindungseffizienz zwischen Volllängenprotein, dem für die

Kristallisation verwendeten Fragment p63-149-502 und der kürzeren Variante p63-149-482, zeigte eine mit der Sequenzlänge korrelierende Abnahme in der $G\alpha_q$-Interaktion und lässt daher vermuten, dass neben der „PH-Extension“ noch weitere Aminosäuren an der Komplexbildung beteiligt sind. Diese Beobachtung konnte durch funktionelle Analysen bestätigt werden, in welchen beide Fragmente eine Reduktion in ihrem Aktivierungspotential zeigten, die entsprechend bei p63-149-482 wesentlich ausgeprägter war als bei p63-149-502. Die Bedeutung der Aminosäuren 482-502 in der Stabilisierung des p63-$G\alpha_q$-Komplexes konnte zusätzlich durch Kompetitionsversuche belegt werden, in welchen nur dass Fragment p63-285-502 in der Lage war, eine mit der dominant negativen Mutante p63ΔN gleichwertige Inhibition von Effektoren einer konstitutiv aktiven $G\alpha_q$-Mutante hervorzurufen.

Die Analyse von Punktmutationen in der Sequenz von p63-149-502 zeigte schließlich, dass der Kernbereich der p63RhoGEF-$G\alpha_q$-Interaktion die Aminosäuren 474-481 umfasst. Mutationen in diesem Sequenzabschnitt führten zu einem völligen Funktionsverlust des Proteins. In Übereinstimmung mit der Arbeit von Rojas und Mitarbeitern belegen die Daten, dass die „PH-Extension“ den essentiellen Bestandteil der Interaktion darstellt, zeigen aber auch, dass andere Aminosäuren aufgrund ihrer räumlichen Anordnung zur Stabilisierung des Komplexes beitragen. Dies lässt sich besonders am Funktionsverlust durch die Mutation in Aminosäure (AA) E385A (Glutamat zu Alanin) verdeutlichen, die sich zwar ca. 100 AA N-terminal der eigentlichen Kern-Bindestelle befindet, in der Kristallstruktur aber deutlich mit diesem Bereich assoziiert ist. Auch die DH-Domäne scheint bei der Stabilisation der p63-$G\alpha_q$-Bindung eine Rolle zu spielen. Mutationen in der durch die Röngenstrukturanalyse determinierten DH-$G\alpha_{i/q}$-Interaktionsoberfläche zeigten z.B. einen signifikanten Funktionsverlust durch Mutation in Aminosäure I205N (Isoleucin zu Asparagin).

Die Interaktionsoberfläche von $G\alpha_{i/q}$ mit p63RhoGEF, umfasst die Strukturen α2-β4 und α3-β5 sowie die dazwischenliegenden Effektorschleifen, „switchII“ und „swichIII“ (Lutz *et al.* 2007). Punktmutationen in der α3-Helix von $G\alpha_{i/q}$ führten zu eine signifikanten Reduktion in der Aktivierung von p63-149-502, während sich nur eine tendenzielle Änderung in der Interaktion mit dem p63-Volllängenprotein nachweisen ließ. Diese Beobachtung untermauert erneut die These, dass neben der gezeigten Kern-Binderegion oder einzelner Aminosäueren wie AA E385A und AA I205N, weitere C-oder N-terminale Bereiche an einer Stabilisierung des $G\alpha_q$/p63/RhoA-Komplexes beteiligt sind.

6.1.3. p63RhoGEF, Duet und Trio zeigen die gleichen Eigenschaften in ihrer Interaktion mit $G\alpha_{q/11}$ und in der $G\alpha_{q/11}$-abhängigen RhoA-Aktivierung

Das C-Terminale, Rho-spezifische DH/PH-Tandemmotiv der beiden GEFs Kalirin/Duet und Trio weist große Sequenzhomologien zu p63RhoGEF auf. Dies zeigt sich besonders in der 100 % Konservierung der „PH-Extension“ (Lutz *et al.* 2007; Rojas *et al.* 2007). Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass beide GEFs, analog zu p63RhoGEF, direkt mit aktivierten Proteinen der $G\alpha_{q/11}$-

Familie interagieren und diese Interaktion zu einer Aktivierung von RhoA in entsprechend transfizierten Zellen führt. Diese Beobachtung konnte sowohl durch die p63-149-502 äquivalenten Fragmente Duet-219-558 und Trio-1894-2232 als auch durch Verwendung der Volllängenproteine belegt werden. Interessanterweise zeigte Trio dabei die geringste physikalische und funktionelle Interaktion mit der konstitutiv aktiven $G\alpha_q$-Mutante, während kein signifikanter Unterschied zwischen p63RhoGEF und Trio in der Rezeptor-vermittelten Aktivierung festgestellt werden konnte. Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Rojas und Mitarbeitern in Zusammehang mit dem Fragment TrioC-DH-Extension publiziert. Diese Befunde lassen daher vermuten, dass die Aktivierung von Trio weiteren Regulationsmechanismen unterliegt (Rojas *et al.* 2007).

Die biochemischen Daten von Trio, Kalirin/Duet und p63RhoGEF belegen, dass diese drei Dbl-RhoGEFs, ähnlich der p115RhoGEF-Familie, aufgrund von Sequenzhomologie und Funktion eine eigene Dbl-Subfamilie repräsentieren.

6.1.4. Das *C. elegans* Ortholog von Trio (Unc73) ist ein Mediator der $G\alpha_q$ (Egl30)-vermittelten RhoA-Aktivierung

Im Gegensatz zu Vertebraten verfügen Invertebraten wie *C.elegans* oder *Drosophila* über nur ein Ortholog aus der p63RhoGEF-Familie, das Multidomänen-RhoGEF Trio. In C.elegans wird Trio in mehren Splicevarianten exprimiert, wobei die Variante Unc73E, welche nur das Rho-spezifische C-terminale DH/PH-Tandemmotiv enthält, das strukturelle Äquivalent zu p63RhoGEF darstellt. In Mutationsstudien zur Charakterisierung der $G\alpha_q$-Signalkaskade in *C.elegans* wurde von Williams und Mitarbeitern die RhoGEF-Domäne des Trio-Orthologs Unc73 als ein potentieller Mediator identifiziert. Da in *C.elegans* der $G\alpha_q$ (Egl30)-vermittelte Phänotyp durch die $G\alpha_o$ (Goa1)-Signalkaskade antagonisiert wird, war zunächst unklar, ob es sich bei diesem Protein um einen Inhibitor des $G\alpha_o$- oder um einen Effektor der $G\alpha_q$-Signalwegs handelt. Die biochemische Analyse der Splicevariante Unc73E (Trio 309 Ce), belegte sowohl eine physikalische als auch eine funktionelle Interaktion mit $G\alpha_q$ (Egl30), wobei Trio 309 Ce, sowie das Trio-1894-2232 äuqivalente Fragment Trio 310 Ce ausschließlich als Mediatoren der $G\alpha_q$ (Egl30)-abhängigen RhoA-Aktivierung agierten und keine Interaktion mit $G\alpha_o$ (Goa1) festgestellt werden konnte. Zusätzlich zeigte das auf der Orginalmutation unc73(ce362) in C.elegans basierende Fragment Trio 310IN einen mit dem Ortholog p63-149-503-I205N vergleichbaren Funktionsverlust in der Aktivierung. Dieser Befund unterstützt nicht nur die These zur Bedeutung dieser Aminosäure in der Stabilisierung der $G\alpha_q$-RhoGEF-Interaktion, sondern lässt vermuten, dass die humanen RhoGEFs Kalirin/Duet und p63RhoGEF ihren Ursprung in Duplikationen des unc73-Gens haben. Eine ähnliche These wurde auch von McPherson und Mitarbeitern vetreten, die mittels Divergenzstudien postulierten, dass humanes Kalirin und Trio aus dem gleichen Gen hervorgegangen sind (McPherson *et al.* 2002). Zusammen mit der Arbeit von Williams und Mitarbeitern zeigen die hier erhobenen Daten daher, dass die $G\alpha_q$-vermittelte RhoA-Aktivierung

einen evolutionär hoch konservierten Signalweg darstellt, der in *C.elegans* eine der PLCβ (Egl8)-Aktivierung gleichwertige Bedeutung in der Koordiantion vitaler, physiologischer Prozesse aufweist (Williams *et al.* 2007).

6.2 GPCR-vermittelte Aktivierung der monomeren GTPasen RhoA und Rac1 in kardialen Primärzellen

6.2.1 Die ET-1 und PE-induzierte RhoA-Aktivierung in Kardiomyozyten wird von $G\alpha_{q/11}$- und $G\alpha_{12/13}$-Proteinen vermittelt

Die Analyse der mit der Enstehung kardialer Hypertrophie assoziierten GPCRs $ET_{A/B}R$, α_1AR und AT_1R bestätigte, dass eine Stimulation dieser Rezeptoren die Aktivierung von RhoA in neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRCM) induziert. Während in den meisten Publikationen entweder eine direkte oder indirekte Abhängigkeit von $G\alpha_{q/11}$ -Proteinen postuliert wurde, sind nur wenige Untersuchungen zur $G\alpha_{12/13}$-Kopplung dieser Rezeptoren bekannt. So konnte beispielsweise von Maruyama und Mitarbeitern gezeigt werden, dass die α_1AR-induzierte Transkription der c-Jun NH2-terminalen Kinase (JNK) in NRCM sowohl über $G\alpha_{q/11}$ als auch über $G\alpha_{12/13}$ vermittelt wird. (Maruyama *et al.* 2002), während Kilts und Mitarbeiter in atrialem humanem Gewebe die GTP-Beladung beider Proteinfamilien nach Stimulation mit AT II bzw ET-1 belegten, die im Fall von AT II zu einer Translokation von p115RhoGEF an die Plasmamembran führte (Kilts *et al.* 2007). Während in keiner der beiden Arbeiten dabei eine $G\alpha_q$-abhängige Aktivierung von Rho nachgewiesen wurde, konnte hier mittels der spezifischen Inhibitoren p63ΔN und PRG-RGS gezeigt werden, dass die ET-1 und PE-induzierte RhoA-Aktivierung in NRCM über Proteine der $G\alpha_{q/11}$- und der $G\alpha_{12/13}$-Familien vermittelt wird. In Übereinstimmung mit den von Clerk und Mitarbeitern veröffentlichten Daten handelt es sich dabei um eine schnelle, nach bereits 15-30 s messbare Antwort, die daher eine direkte G-Protein-vermittelte Aktivierung entsprechender RhoGEFs vermuten lässt. Die Beobachtung unterstreicht die publizierte Mehrfachkopplung der hier untersuchten Rezeptoren (Gohla *et al.* 2000; Maruyama *et al.* 2002; Snabaitis *et al.* 2005) und die Komplexität ET-1 bzw. PE-induzierter Signalkaskaden. Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus der Tatsache, dass in NRMC sowohl α_1-adrenerge Rezeptoren als auch ET-Rezeptoren in verschiedenen Subtypen exprimiert werden und diese möglicherweise unterschiedliche Eigenschaften in ihrer G-Protein-Kopplung aufweisen. So konnte eine Kopplung an $G\alpha_{q/11}$ und $G\alpha_i$ für $\alpha_{1B}AR$ gezeigt werden, aber nicht für $\alpha_{1A}AR$. Ähnlich verhält es sich mit den Subtypen ET_AR und ET_BR, wobei nur der ET_AR neben der Kopplung an $G\alpha_{q/11}$ mit Proteinen der $G\alpha_i$- und der $G\alpha_{12/13}$-Familie zu interagieren scheint (Gohla *et al.* 1999; Woodcock *et al.* 2008).

6.2.2 Die ET-1 induzierte, $G\alpha_{q/11}$-abhängige Stressfaserbildung in Kardiomyozyten benötigt die Aktivierung von p63RhoGEF

Die Aktivierung von RhoA führt zur Bildung von Aktinstressfasern und fokalen Adhäsionen in verschiedenen Zelltypen und dieser Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts, sowie auf die Bildung sarkomerer Strukturen konnte auch für NRCM gezeigt werden (Aoki *et al.* 1998; Taylor *et al.* 1999; de Jonge *et al.* 2007). Dabei wurde in der Mehrheit der Publikationen eine Verbindung zwischen RhoA und Aktinpolymerization anhand der Inhibitoren C3-Transferase und ROCK etabliert. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten zeigen, dass die ET-1-induzierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts über zwei verschiedene Signalwege reguliert wird, der $G\alpha_{12/13}$ und der $G\alpha_{q/11}$-abhängigen RhoA-Aktivierung. Zudem führte die Depletion des kardial exprimierten, $G\alpha_{q/11}$-abhängigen Ausstauschfaktors p63RhoGEF zu einer Reduktion sowohl in der kurzfristigen ET-1 abhängigen RhoA-Aktivierung als auch in der Organisation des Aktinzytoskeletts. Im Gegensatz dazu konnte keine Verbindung zwischen p63RhoGEF und der PE-induzierten RhoA-Aktivierung festgestellt werden. Es ist daher wahrscheinlich, dass diese Aktivierung durch die GEFs Trio, Duet oder LARG vermittelt wird, deren Transkripte neben p63RhoGEF ebenfalls in kardialem Gewebe nachzuweisen sind (Daten nicht gerzeigt). Obwohl PE im Vergleich zu ET-1 als der potentere Agonist in der Induktion kardialer Hypertrophie gilt, wird die PE-induzierte RhoA-Aktivierung in NRCM als weniger effektiv beschrieben (Clerk *et al.* 2001; Brown *et al.* 2006). Diese Interpretation konnte durch die hier durchgeführten Experimente bestätigt werden, in welchen zudem PE keinen Einfluss auf die Organisation des Aktinzytoskeletts zeigte (Daten nicht gezeigt). Die Funktion der PE-induzierten RhoA-Aktivierung in NRMC bleibt daher unklar und es ist zu vermuten, dass die Aktivierung in der in diesem Zusammenhang beschriebenen MAPK-abhängigen Gentranskription wie z.B. durch die Transkriptionsfaktoren GATA-4 und JNK eine Rolle spielt (Charron *et al.* 2001; Maruyama *et al.* 2002).

6.2.3 Die PE/ET-1-induzierte Hypertrophie wird über $G\alpha_{q/11}$/PLC und $G\alpha_i$/Rac vermittelt

Die Charakterisierung der PE/ET-1-abhängigen Hypertrophie in NRCM bestätige, dass beide Agonisten an der Induktion klassischer Hypertrophie-Indikatoren wie der erhöhten Proteinsynthese und der Expression embryonaler Gene beteilligt sind. Zudem zeigte sich, dass PE sowohl die Proteinbiosynthese als auch die NFκB/CREB-abhängige und die α.s.Aktin-Promotor-regulierte Gentranskription deutlich stärker induzierte als ET-1. Mehrere Publikationen, in welchen z.B. ein direkter Vergleich zwischen α_1AR und $ET_{A/B}$R-vermittelter Proteinsynthese bzw. die PE bzw. ET-1-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors GATA-4 untersucht wurde (Ponicke *et al.* 1999; Charron *et al.* 2001), berichten ähnliche Befunde. Die Expression des Hypertrophie-Markers ANP dagegen wurde in Übereinstimmung mit bereits publizierten Daten

von beiden Agonisten gleich stark induziert (Thorburn *et al.* 1997; Kuwahara *et al.* 1999; Yue *et al.* 2000).

Mit Hilfe der Überexpression von RGS16 konnten die Proteine der $G\alpha_{q/11}$- und der $G\alpha_i$-Familie als primäre Mediatoren der PE-induzierten Proteinsynthese identifiziert werden. Dagegen war eine Beteiligung von $G\alpha_{12/13}$ nicht erkennbar. Ähnliche Befunde wurden auch von Tamirisa und Mitarbeitern publiziert, die durch Verwendung des $G\alpha_{q/11}/G\alpha_i$-Inhibitors RGS4 eine vollständige Reduktion der PE-induzierten Hypertrophie erreichten (Tamirisa *et al.* 1999). Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten legen nahe, dass der $G\alpha_{q/11}$-abhängige Anteil der erhöhten Proteinsyntheserate über den PLCβ-Signalweg ohne Beteiligung einer Aktivierung von RhoA erfolgt. Weder die direkte Hemmung von RhoA durch die C3-Transferase, noch eine Inhibition der Effektoren ROCK und PKN führte zu einer signifikanten Reduktion der PE-induzierten Proteinsynthese. Zudem hatte eine verstärkte RhoA-Aktivierung, die durch Überexpression von p63RhoGEF auftrat, keinen Einfluss. Diese Daten konnten durch die wesentlich ausgepägtere, PE-induzierte Transkription von EGFP unter der Kontrolle des NFκB/CREB-abhängigen cmv-Promotors bestätigt werden. Diese war ebenfalls durch Inhibition der PLCβ hemmbar, während die ROCK/PKN-Inhibitoren wiederum keinen Einfluss zeigten. Die Spezifität der Regulation des cmv-Promotors durch die Transkriptonsfaktoren NFkB und CREB (cAMP response element binding protein) wurde bereits von mehren Arbeitsgruppen nachgewiesen (Prosch *et al.* 2000; He and Weber 2004) und konnte in dieser Arbeit durch Stimulation mit dem β-adrenergen Agonisten Isoprenalin bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls in Übereinstimmung mit den Daten zur Proteinbiosynthese und der EGFP-Expression, wurde weder in der PE-induzierten Transkription des s.-α-Aktin-Promotors noch in der ANP-Expression eine signifikante Reduktion durch Applikation der ROCK/PKN-Inhibitoren erreicht. Die ET-1-induzierte Transkription von EGFP unter der Kontrolle des cmv-Promotors war ebenfalls abhängig von der Aktivierung der PLCβ. Auch hier ließ sich keine Reduktion durch die ROCK/PKN-Inhibitoren beobachten. Die Daten unterstreichen damit die in vielen Publikationen postulierte Dominanz der $G\alpha_{q/11}$/PLCβ-Aktivierung in der Enstehung kardialer Hypertrophie, die sich durch verschiedene transgene Mausmodelle belegen lässt. So konnte durch die kardiale Überexpression von Calcineurin eine delatative Hypertrophie induziert werden, während die Überexpression von RhoA keine Zunahme der ventrikulären Masse zur Folge hatte. Ebenso hatte die Depletion eines Allels des RhoA-Effektors ROCK keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung einer kardialen Hypertrophie (Molkentin *et al.* 1998; Sah *et al.* 1999; Rikitake *et al.* 2005). Zudem konnte in anderen Arbeiten gezeigt werden, dass die der PLCβ nachgeschaltete PKC an der Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2 (extracellular regulated kinase) beteiligt ist (Marquardt *et al.* 1994), deren zentrale Rolle in der Enstehung kardialer Hypertrophie in vielen Publikationen belegt wurde (Clerk and Sugden 2004; Snabaitis *et al.* 2005; Heineke and Molkentin 2006). So konnte z.B. auch eine Reduktion der PE-bzw. ET-1-induzierten hypertrophen Zellantwort in dem in dieser Arbeit verwendeten

Modell kultuvierter NRCM durch Inhibition des ERK1/2-Signalwegs erreicht werden (Yue *et al.* 2000).

Da hier nur die klassischen Hypertrophie-Indikatoren untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, dass die Aktivierung von RhoA andere Faktoren der Genexpression beeinflusst oder an der Regulation der Kontraktilität bzw. der elektro-mechanischen Kopplung in Kardiomyozyten eine Rolle spielt. So zeigt die ET-1-abhängige RhoA-Aktivierung Einfluss auf die Ausbildung sarkomerer Strukturen. Die nachgewiesene Interaktion zwischen RhoA und K^+- bzw. L-Typ-Ca^{2+}-Kanälen (Cachero *et al.* 1998; Yatani *et al.* 2005) zusammen mit der Beobachtung dass Mäuse, die RhoA Kardiomyozyten-spezifisch überexprimieren, eine Bradykardie entwickeln (Sah *et al.* 1999) deutet auf einen Zusammenhang zwischen RhoA-Aktivierung und elektrischer Erregung hin.

Die in dieser Arbeit vorgelegten Analysen zur PE/ET-1-abhängigen Signalkaskade lassen dagegen den Schluss zu, dass die monomere GTPase Rac1 eine wesentlich größere Rolle bei der Induktion des hypertrophen Phänotyps spielt. So konnte ein Teil der PE-induzierten Zunahme der Proteinsynthese durch den RacGEF-Inhibitor NSC23766 unterdrückt werden. Auch die Expression des Hypertrophie-Markers ANP erwies sich sowohl im Fall von PE als auch von ET-1 als Rac1-abhängig. Da sich die PE-induzierte Proteinsynthese auch als partiell PLCβ-abhängig gezeigt hat und nur die Applikation des $G\alpha_i/G\alpha_q$-Inhibitors RGS16 zu einer vollständigen Reduktion führte, könnte eine $G_i\beta\gamma$-vermittelte Aktivierung von Rac1 beteiligt sein. Die Aktivierung von Rac1 über $G_i\beta\gamma$/ PI3K und dem RacGEF TIAM-1 wurde in unserer Arbeitsgruppe für NRMC bereits beschrieben (Vogt *et al.* 2007). Ähnliche Ergebnisse lassen sich auch in anderen Arbeiten finden, in welchen eine Abhängigkeit von $G\alpha_q$ und $G_i\beta\gamma$ in der PE/ET-1-induzierten ANP/MLC-Expression (Tamirisa *et al.* 1999) sowie in der Aktivierung von ERK1/2 postuliert wurde (Arai *et al.* 2003; Snabaitis *et al.* 2005). Ein Zusammenhang zwischen ET-1, Rac1 und ERK1/2-Phosphorylierung konnte ebenfalls gezeigt werden, die genauen Mechanismen dieser Aktivierung sind allerdings noch unklar (Clerk *et al.* 2001). Weitere Unterstützung zur Bedeutung von Rac1 in der kardialen Hypertrophie bieten Untersuchungen der dominant negativen bzw. konstitutiv aktiven Mutante, die entsprechend einen inhibierenden Einfluss auf den durch PE-induzierten Phänotyp bzw. einen induzierenden Einfluss auf die ANP-Expression zeigten (Zechner *et al.* 1997; Pracyk *et al.* 1998). Zudem konnte im Gegensatz zum RhoA-Mausmodell eine, wenn auch transiente, Induktion kardialer Hypertrophie in kardial Rac1-überexprimierenden transgenen Mäusen beobachtet werden (Sussman *et al.* 2000).

Erstaunlicherweise zeigen NRCM selbst unter serumfreien Kulturbedingungen eine hohe basale Rac1-Aktivierung, die möglicherweise autrokin bzw. parakrin durch die stets in der Kultur auftretende Kontamination mit Fibroblasten (3-5 %) induziert sein könnte. Der in dieser Arbeit verwendete RacGEF-Inhibitor NSC23766 wurde entwickelt, um die potentielle GEF-Bindetasche innerhalb von Rac1 zu blockieren. Die Spezifität des Inhibitors konnte bisher allerdings nur für TIAM-1 und die N-terminalen DH/PH-Domäne von Trio (TrioN) etabliert werden (Gao *et al.* 2004),

so dass eine verbleibende Aktivierung durch RacGEFs, die andere Interaktionsoberflächen aufweisen nicht ausgeschlossen werden kann. Diese könnte erklären, warum weder ein Einfluss auf die basale, noch auf die kurzfristige Rac1-Aktivierung durch die Applikation von NSC23766 festgestellt werden konnte. Dagegen ließ sich die Carbachol-induzierte Rac1-Aktivierung unter gleichen Versuchsbedingungen deutlich inhibieren die, wie in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden konnte, über muskarinische M_2-Rezeptoren, $G_i\beta\gamma$ und den Austauschfaktor TIAM-1 vermittelt wird (Vogt *et al.* 2007). An der für hypertrophe Antworten benötigten, länger anhaltenden, PE bzw. ET-1 induzierte Rac1-Aktivierung könnten allerdings wiederum TIAM-1 bzw. das zu mindestens auf mRNA in NRCM nachweisbare Trio beteiligt sein.

6.2.4 Phenylephrin: Pro-survival?

Die Untersuchungen zur Zytotoxizität der Agonisten ET-1 und PE sowie der Inhibitoren H1152P, Fasudil und NSC23766 zeigten, dass ET-1 und die verwendeteten Inhibitoren die Apoptoserate in Kardiomyozyten um etwa 20 % erhöhen können. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von PE nicht zu einer Induktion, sondern sogar zu einer Kompensation des durch die Inhibitoren verursachten Zelltods. In der Literatur lassen sich einige Belege finden, die zur Klärung dieses Effekts beitragen. So konnten z.B. Del Re und Mitarbeiter zeigen, dass die Überexpression von konstitutiv aktivem RhoA zwar zu einer Aktivierung des mitochondrialen Apoptose-Signalwegs führt, die eigentliche DNA-Fragmentierung aber durch zusätzliche Stimulation mit PE inhibiert wurde (Del Re *et al.* 2007). In weiteren Untersuchungen postulierte diese Arbeitsgruppe schließlich, dass die Agonist-induzierte Aktivierung von RhoA/ROCK über die Aktinzytoskelett-Reorganisation zur Phosphorylierung von Akt führt und damit zur Protektion der Zellen beiträgt (Del Re *et al.* 2008). Wie in dieser Arbeit gezeigt, sind jedoch die Effekte der ET-1-induzierten Aktivierung von RhoA auf die Aktinzytoskellet-Reorganisation deutlich ausgeprägter als die von PE: Dies spricht gegen die Annahme, dass die über diesen Weg ausgelöste Aktivierung von Akt der entscheidende Mediator ist. Als alternative Signalwege werden in der Literatur auch die $G_i\beta\gamma$-abhängige Aktivierung von Akt sowie die Transaktivierung von RTKs durch Stimulation von α_1AR angegeben (Heineke and Molkentin 2006; Woodcock *et al.* 2008).

6.2.5 Angiotensin II-induzierte RhoA-Aktivierung in kardialen Fibroblasten wird durch p63RhoGEF vermittelt

Myokardiales Remodelling, das nach einem Myokardinfarkt bzw. durch anhaltende Druck- und Volumenbelastung auftritt, gilt als wichtigste Ursache der Herzinsuffizienz. Die Deregulation Fibroblasten-abhängiger Wundheilungsprozesse ist eine der Hauptursachen der dabei auftretenden maladaptiven Hypertrophie. Dabei stehen vor allem die durch das lokal sezernierte Peptidhormon Angiotensin II-vermittelten Signalkaskaden im Vordergrund (Yamazaki *et al.* 1999; Rosenkranz 2004). Analysen in transgenen Mäusen, die nur noch über ein intaktes Allel des

Effektors ROCK1 verfügen, legen eine mögliche Rolle der Aktivierung von RhoA bei der Entstehung der Fibroblasten-abhängigen Fibrose nahe (Rikitake *et al.* 2005). Die Daten dieser Arbeit belegen, dass AT II zu einer starken RhoA-Aktivierung in isolierten kardialen Fibroblasten (CF) führt. Obwohl der AT_1R sowohl als $G\alpha_{q/11}$ als auch als $G\alpha_{12/13}$-gekoppelt beschrieben wurde (Gohla *et al.* 2000), konnte hier gezeigt werden, dass diese Aktivierung in CF nahezu vollständig über $G\alpha_{q/11}$ -Proteine vermittelt wird. Die Depletion des endogen, in CF exprimierten p63RhoGEF verursachte die vollständige Unterdrückung der AT II-induzierten RhoA-Aktivierung. Es ist deshalb naheliegend anzunehmen, dass diese Signalkaskade in kardialen Fibroblasten von wichtiger Bedeutung sein könnte. Eine weitergehende Untersuchung ist allerdings im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr möglich.

6.3 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte belegt werden, dass die Guaninnukleotid-Austauschfaktoren p63RhoGEF, Trio, Kalirin/Duet und LARG als Mediatoren in der $G\alpha_{q/11}$-vermittelten RhoA-Aktivierung agieren. Während für Trio eine zentrale Rolle in der Physiologie von C.elegans etabliert wurde, konnte dieser evolutionär hoch konservierte Signalweg in Mammalia bisher noch nicht in ein physiologisches oder pathologisches Modell integriert werden. Im hier untersuchten klassischen Modell der kardialen Hypertrophie scheint die $G\alpha_{q/11}$-vermittelte Aktivierung von RhoA im Vergleich zu anderen Signalwegen in Kardiomyozyten nur eine untergeordnete Rolle zu spielen. Die Untersuchung der potentiellen Auswirkungen auf Kontraktion bzw. elektromechanische Kopplung würden Versuche am isolierten Organ oder im Tiermodell erfordern. Ein vielversprechender Ansatz scheint dagegen die Analyse der Bedeutung, der AT II-induzierten RhoA-Aktivierung in kardialen Fibroblasten. Dieser Signalweg könnte eine entscheidende Rolle in der kardialen Pathophysiologie spielen, dessen Einfluss sich anhand von Fibrose-Indikatoren wie TGFβ-Expression, Kollagenproduktion, Proliferation und Differenzierung untersuchen lässt. Da Fibroblasten in Abhängigkeit parakriner Faktoren die kardiale Homöostase kontrollieren, würde eine Ko-Kultur mit Kardiomyozyten weitere Einsichten bezüglich der Funktion ATII-induzierter Signalkaskaden bieten. Die potentiellen Auswirkungen der ATII-induzierten RhoA-Aktivierung auf die maladaptive Hypertrophie könnten zudem in konditionellen, p63RhoGEF-defizienten Tiermodell unter Hypertrophie-induzierenden Bedingungen untersucht und mit dem bereits beschriebenen Phänotyp der haplodefizienten ROCK1-Mäuse verglichen werden.

7. Literaturverzeichnis

Adams, J. W., Y. Sakata, M. G. Davis, V. P. Sah, Y. Wang, S. B. Liggett, K. R. Chien, J. H. Brown and G. W. Dorn, 2nd (1998) Enhanced Galphaq signaling: a common pathway mediates cardiac hypertrophy and apoptotic heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 10140-5.

Akiyama, S. K. (1996) Integrins in cell adhesion and signaling. *Hum Cell*. **9**, 181-6.

Aktories, K., U. Braun, S. Rosener, I. Just and A. Hall (1989) The rho gene product expressed in E. coli is a substrate of botulinum ADP-ribosyltransferase C3. *Biochem Biophys Res Commun*. **158**, 209-13.

Aktories, K., C. Mohr and G. Koch (1992) Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. *Curr Top Microbiol Immunol*. **175**, 115-31.

Aktories, K., G. Schmidt and I. Just (2000) Rho GTPases as targets of bacterial protein toxins. *Biol Chem*. **381**, 421-6.

Aoki, H., S. Izumo and J. Sadoshima (1998) Angiotensin II activates RhoA in cardiac myocytes: a critical role of RhoA in angiotensin II-induced premyofibril formation. *Circ Res*. **82**, 666-76.

Arai, K., Y. Maruyama, M. Nishida, S. Tanabe, S. Takagahara, T. Kozasa, Y. Mori, T. Nagao and H. Kurose (2003) Differential requirement of G alpha12, G alpha13, G alphaq, and G beta gamma for endothelin-1-induced c-Jun NH2-terminal kinase and extracellular signal-regulated kinase activation. *Mol Pharmacol*. **63**, 478-88.

Arber, W. (1978) Restriction endonucleases. *Angew Chem Int Ed Engl*. **17**, 73-9.

Aspenstrom, P., A. Fransson and J. Saras (2004) Rho GTPases have diverse effects on the organization of the actin filament system. *Biochem J*. **377**, 327-37.

Aurandt, J., H. G. Vikis, J. S. Gutkind, N. Ahn and K. L. Guan (2002) The semaphorin receptor plexin-B1 signals through a direct interaction with the Rho-specific nucleotide exchange factor, LARG. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99**, 12085-90.

Bakker, R. A., K. Wieland, H. Timmerman and R. Leurs (2000) Constitutive activity of the histamine H(1) receptor reveals inverse agonism of histamine H(1) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*. **387**, R5-7.

Bar-Sagi, D. and J. R. Feramisco (1986) Induction of membrane ruffling and fluid-phase pinocytosis in quiescent fibroblasts by ras proteins. *Science*. **233**, 1061-8.

Baudino, T. A., W. Carver, W. Giles and T. K. Borg (2006) Cardiac fibroblasts: friend or foe? *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **291**, H1015-26.

Benard, V. and G. M. Bokoch (2002) Assay of Cdc42, Rac, and Rho GTPase activation by affinity methods. *Methods Enzymol*. **345**, 349-59.

Bernards, A. and J. Settleman (2004) GAP control: regulating the regulators of small GTPases. *Trends Cell Biol*. **14**, 377-85.

Berstein, G., J. L. Blank, D. Y. Jhon, J. H. Exton, S. G. Rhee and E. M. Ross (1992) Phospholipase C-beta 1 is a GTPase-activating protein for Gq/11, its physiologic regulator. *Cell*. **70**, 411-8.

Bhattacharya, S., S. E. Hall, H. Li and N. Vaidehi (2008) Ligand-stabilized conformational states of human beta(2) adrenergic receptor: insight into G-protein-coupled receptor activation. *Biophys J*. **94**, 2027-42.

Bishop, A. L. and A. Hall (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J*. **348 Pt 2**, 241-55.

Boguski, M. S. and F. McCormick (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. **366**, 643-54.

Booden, M. A., D. P. Siderovski and C. J. Der (2002) Leukemia-associated Rho guanine nucleotide exchange factor promotes G alpha q-coupled activation of RhoA. *Mol Cell Biol*. **22**, 4053-61.

Bourne, H. R., D. A. Sanders and F. McCormick (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. **349**, 117-27.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. **72**, 248-54.

Brown, J. H., D. P. Del Re and M. A. Sussman (2006) The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res*. **98**, 730-42.

Brown, R. D., S. K. Ambler, M. D. Mitchell and C. S. Long (2005) The cardiac fibroblast: therapeutic target in myocardial remodeling and failure. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **45**, 657-87.

Buchsbaum, R. J., B. A. Connolly and L. A. Feig (2003) Regulation of p70 S6 kinase by complex formation between the Rac guanine nucleotide exchange factor (Rac-GEF) Tiam1 and the scaffold spinophilin. *J Biol Chem*. **278**, 18833-41.

Byers, H. R. and K. Fujiwara (1982) Stress fibers in cells in situ: immunofluorescence visualization with antiactin, antimyosin, and anti-alpha-actinin. *J Cell Biol*. **93**, 804-11.

Cachero, T. G., A. D. Morielli and E. G. Peralta (1998) The small GTP-binding protein RhoA regulates a delayed rectifier potassium channel. *Cell*. **93**, 1077-85.

Chai, J. and A. S. Tarnawski (2002) Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. *J Physiol Pharmacol*. **53**, 147-57.

Charron, F., G. Tsimiklis, M. Arcand, L. Robitaille, Q. Liang, J. D. Molkentin, S. Meloche and M. Nemer (2001) Tissue-specific GATA factors are transcriptional effectors of the small GTPase RhoA. *Genes Dev*. **15**, 2702-19.

Cherfils, J. and P. Chardin (1999) GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. **24**, 306-11.

Chien, K. R., K. U. Knowlton, H. Zhu and S. Chien (1991) Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J*. **5**, 3037-46.

Chikumi, H., A. Barac, B. Behbahani, Y. Gao, H. Teramoto, Y. Zheng and J. S. Gutkind (2004) Homo- and hetero-oligomerization of PDZ-RhoGEF, LARG and p115RhoGEF by their C-terminal region regulates their in vivo Rho GEF activity and transforming potential. *Oncogene*. **23**, 233-40.

Chikumi, H., S. Fukuhara and J. S. Gutkind (2002a) Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem*. **277**, 12463-73.

Chikumi, H., J. Vazquez-Prado, J. M. Servitja, H. Miyazaki and J. S. Gutkind (2002b) Potent activation of RhoA by Galpha q and Gq-coupled receptors. *J Biol Chem*. **277**, 27130-4.

Clerk, A., F. H. Pham, S. J. Fuller, E. Sahai, K. Aktories, R. Marais, C. Marshall and P. H. Sugden (2001) Regulation of mitogen-activated protein kinases in cardiac myocytes through the small G protein Rac1. *Mol Cell Biol*. **21**, 1173-84.

Clerk, A. and P. H. Sugden (2004) Signaling through the extracellular signal-regulated kinase 1/2 cascade in cardiac myocytes. *Biochem Cell Biol*. **82**, 603-9.

Coleman, M. L. and M. F. Olson (2002) Rho GTPase signalling pathways in the morphological changes associated with apoptosis. *Cell Death Differ*. **9**, 493-504.

Conklin, B. R., Z. Farfel, K. D. Lustig, D. Julius and H. R. Bourne (1993) Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq alpha to that of Gi alpha. *Nature*. **363**, 274-6.

Coso, O. A., H. Teramoto, W. F. Simonds and J. S. Gutkind (1996) Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J Biol Chem*. **271**, 3963-6.

Cox, A. D. and C. J. Der (2002) Ras family signaling: therapeutic targeting. *Cancer Biol Ther*. **1**, 599-606.

Cox, D., P. Chang, Q. Zhang, P. G. Reddy, G. M. Bokoch and S. Greenberg (1997) Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med*. **186**, 1487-94.

Cryer, D. R., R. Eccleshall and J. Marmur (1975) Isolation of yeast DNA. *Methods Cell Biol*. **12**, 39-44.

D'Angelo, D. D., Y. Sakata, J. N. Lorenz, G. P. Boivin, R. A. Walsh, S. B. Liggett and G. W. Dorn, 2nd (1997) Transgenic Galphaq overexpression induces cardiac contractile failure in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**, 8121-6.

de Jonge, H. W., D. H. Dekkers, A. B. Houtsmuller, H. S. Sharma and J. M. Lamers (2007) Differential Signaling and Hypertrophic Responses in Cyclically Stretched vs Endothelin-1 Stimulated Neonatal Rat Cardiomyocytes. *Cell Biochem Biophys*. **47**, 21-32.

Deaton, R. A., C. Su, T. G. Valencia and S. R. Grant (2005) Transforming growth factor-beta1-induced expression of smooth muscle marker genes involves activation of PKN and p38 MAPK. *J Biol Chem*. **280**, 31172-81.

Debant, A., C. Serra-Pages, K. Seipel, S. O'Brien, M. Tang, S. H. Park and M. Streuli (1996) The multidomain protein Trio binds the LAR transmembrane tyrosine phosphatase, contains a protein kinase domain, and has separate rac-specific and rho-specific guanine nucleotide exchange factor domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **93**, 5466-71.

Del Re, D. P., S. Miyamoto and J. H. Brown (2007) RhoA/Rho kinase up-regulate Bax to activate a mitochondrial death pathway and induce cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem*. **282**, 8069-78.

Del Re, D. P., S. Miyamoto and J. H. Brown (2008) Focal adhesion kinase as a RhoA-activable signaling scaffold mediating Akt activation and cardiomyocyte protection. *J Biol Chem*. **283**, 35622-9.

Diekmann, D., A. Abo, C. Johnston, A. W. Segal and A. Hall (1994) Interaction of Rac with p67phox and regulation of phagocytic NADPH oxidase activity. *Science*. **265**, 531-3.

Dillon, S. T., E. J. Rubin, M. Yakubovich, C. Pothoulakis, J. T. LaMont, L. A. Feig and R. J. Gilbert (1995) Involvement of Ras-related Rho proteins in the mechanisms of action of Clostridium difficile toxin A and toxin B. *Infect Immun*. **63**, 1421-6.

Dorn, G. W., 2nd and J. H. Brown (1999) Gq signaling in cardiac adaptation and maladaptation. *Trends Cardiovasc Med*. **9**, 26-34.

Downes, G. B. and N. Gautam (1999) The G protein subunit gene families. *Genomics*. **62**, 544-52.

Doyle, D. A., A. Lee, J. Lewis, E. Kim, M. Sheng and R. MacKinnon (1996) Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ. *Cell*. **85**, 1067-76.

Eva, A. and S. A. Aaronson (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature*. **316**, 273-5.

Fahimi-Vahid, M., N. Gosau, C. Michalek, L. Han, K. H. Jakobs, M. Schmidt, N. Roberts, M. Avkiran and T. Wieland (2002) Distinct signaling pathways mediate cardiomyocyte phospholipase D stimulation by endothelin-1 and thrombin. *J Mol Cell Cardiol*. **34**, 441-53.

Fitzsimons, C. P., F. Monczor, N. Fernandez, C. Shayo and C. Davio (2004) Mepyramine, a histamine H1 receptor inverse agonist, binds preferentially to a G protein-coupled form of the receptor and sequesters G protein. *J Biol Chem*. **279**, 34431-9.

Fukuhara, S., H. Chikumi and J. S. Gutkind (2001) RGS-containing RhoGEFs: the missing link between transforming G proteins and Rho? *Oncogene*. **20**, 1661-8.

Fukuhara, S., C. Murga, M. Zohar, T. Igishi and J. S. Gutkind (1999) A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem*. **274**, 5868-79.

Gallagher, E. D., S. Gutowski, P. C. Sternweis and M. H. Cobb (2004) RhoA binds to the amino terminus of MEKK1 and regulates its kinase activity. *J Biol Chem*. **279**, 1872-7.

Gao, Y., J. B. Dickerson, F. Guo, J. Zheng and Y. Zheng (2004) Rational design and characterization of a Rac GTPase-specific small molecule inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **101**, 7618-23.

Garcia-Mata, R. and K. Burridge (2007) Catching a GEF by its tail. *Trends Cell Biol*. **17**, 36-43.

Gershengorn, M. C. and R. Osman (2001) Minireview: Insights into G protein-coupled receptor function using molecular models. *Endocrinology*. **142**, 2-10.

Gohla, A., S. Offermanns, T. M. Wilkie and G. Schultz (1999) Differential involvement of Galpha12 and Galpha13 in receptor-mediated stress fiber formation. *J Biol Chem*. **274**, 17901-7.

Gohla, A., G. Schultz and S. Offermanns (2000) Role for G(12)/G(13) in agonist-induced vascular smooth muscle cell contraction. *Circ Res*. **87**, 221-7.

Graf, R., R. Mattera, J. Codina, T. Evans, Y. K. Ho, M. K. Estes and L. Birnbaumer (1992) Studies on the interaction of alpha subunits of GTP-binding proteins with beta gamma dimers. *Eur J Biochem*. **210**, 609-19.

Graham, F. L., J. Smiley, W. C. Russell and R. Nairn (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. **36**, 59-74.

Hackam, D. J., O. D. Rotstein, A. Schreiber, W. Zhang and S. Grinstein (1997) Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fcgamma receptors in macrophages. *J Exp Med*. **186**, 955-66.

Hall, A. (1998) Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science*. **279**, 509-14.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*. **166**, 557-80.

Hart, M. J., A. Eva, D. Zangrilli, S. A. Aaronson, T. Evans, R. A. Cerione and Y. Zheng (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J Biol Chem*. **269**, 62-5.

Hart, M. J., X. Jiang, T. Kozasa, W. Roscoe, W. D. Singer, A. G. Gilman, P. C. Sternweis and G. Bollag (1998) Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science*. **280**, 2112-4.

He, B. and G. F. Weber (2004) Synergistic activation of the CMV promoter by NF-kappaB P50 and PKG. *Biochem Biophys Res Commun*. **321**, 13-20.

He, T. C., S. Zhou, L. T. da Costa, J. Yu, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1998) A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 2509-14.

Heineke, J. and J. D. Molkentin (2006) Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **7**, 589-600.

Hepler, J. R., G. H. Biddlecome, C. Kleuss, L. A. Camp, S. L. Hofmann, E. M. Ross and A. G. Gilman (1996) Functional importance of the amino terminus of Gq alpha. *J Biol Chem*. **271**, 496-504.

Hill, C. S., J. Wynne and R. Treisman (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell*. **81**, 1159-70.

Hines, W. A. and A. Thorburn (1998) Ras and rho are required for galphaq-induced hypertrophic gene expression in neonatal rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol*. **30**, 485-94.

Hoshijima, M., V. P. Sah, Y. Wang, K. R. Chien and J. H. Brown (1998) The low molecular weight GTPase Rho regulates myofibril formation and organization in neonatal rat ventricular myocytes. Involvement of Rho kinase. *J Biol Chem*. **273**, 7725-30.

Jacinto, A. and L. Wolpert (2001) Filopodia. *Curr Biol*. **11**, R634.

Jacoby, E., R. Bouhelal, M. Gerspacher and K. Seuwen (2006) The 7 TM G-protein-coupled receptor target family. *ChemMedChem*. **1**, 761-82.

Jaffe, A. B. and A. Hall (2005) Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **21**, 247-69.

Jones, G. E., W. E. Allen and A. J. Ridley (1998) The Rho GTPases in macrophage motility and chemotaxis. *Cell Adhes Commun*. **6**, 237-45.

Just, I., G. Fritz, K. Aktories, M. Giry, M. R. Popoff, P. Boquet, S. Hegenbarth and C. von Eichel-Streiber (1994) Clostridium difficile toxin B acts on the GTP-binding protein Rho. *J Biol Chem*. **269**, 10706-12.

Just, I., M. Wilm, J. Selzer, G. Rex, C. von Eichel-Streiber, M. Mann and K. Aktories (1995) The enterotoxin from Clostridium difficile (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem*. **270**, 13932-6.

Karns, L. R., K. Kariya and P. C. Simpson (1995) M-CAT, CArG, and Sp1 elements are required for alpha 1-adrenergic induction of the skeletal alpha-actin promoter during cardiac myocyte hypertrophy. Transcriptional enhancer factor-1 and protein kinase C as conserved transducers of the fetal program in cardiac growth. *J Biol Chem*. **270**, 410-7.

Katzav, S., D. Martin-Zanca and M. Barbacid (1989) vav, a novel human oncogene derived from a locus ubiquitously expressed in hematopoietic cells. *EMBO J*. **8**, 2283-90.

Kilts, J. D., S. S. Lin, J. E. Lowe and M. M. Kwatra (2007) Selective activation of human atrial Galpha12 and Galpha13 by Galphaq-coupled angiotensin and endothelin receptors. *J Cardiovasc Pharmacol*. **50**, 299-303.

Kimura, K., M. Ito, M. Amano, K. Chihara, Y. Fukata, M. Nakafuku, B. Yamamori, J. Feng, T. Nakano, K. Okawa, A. Iwamatsu and K. Kaibuchi (1996) Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science*. **273**, 245-8.

Klages, B., U. Brandt, M. I. Simon, G. Schultz and S. Offermanns (1999) Activation of G12/G13 results in shape change and Rho/Rho-kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in mouse platelets. *J Cell Biol*. **144**, 745-54.

Knowlton, K. U., M. C. Michel, M. Itani, H. E. Shubeita, K. Ishihara, J. H. Brown and K. R. Chien (1993) The alpha 1A-adrenergic receptor subtype mediates biochemical, molecular, and morphologic features of cultured myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*. **268**, 15374-80.

Kostenis, E., M. Y. Degtyarev, B. R. Conklin and J. Wess (1997) The N-terminal extension of Galphaq is critical for constraining the selectivity of receptor coupling. *J Biol Chem*. **272**, 19107-10.

Kostenis, E., F. Y. Zeng and J. Wess (1998) Functional characterization of a series of mutant G protein alphaq subunits displaying promiscuous receptor coupling properties. *J Biol Chem*. **273**, 17886-92.

Kourlas, P. J., M. P. Strout, B. Becknell, M. L. Veronese, C. M. Croce, K. S. Theil, R. Krahe, T. Ruutu, S. Knuutila, C. D. Bloomfield and M. A. Caligiuri (2000) Identification of a gene at 11q23 encoding a guanine nucleotide exchange factor: evidence for its fusion with MLL in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **97**, 2145-50.

Kozasa, T., X. Jiang, M. J. Hart, P. M. Sternweis, W. D. Singer, A. G. Gilman, G. Bollag and P. C. Sternweis (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science*. **280**, 2109-11.

Kuwahara, K., Y. Saito, O. Nakagawa, I. Kishimoto, M. Harada, E. Ogawa, Y. Miyamoto, I. Hamanaka, N. Kajiyama, N. Takahashi, T. Izumi, R. Kawakami, N. Tamura, Y. Ogawa and K. Nakao (1999) The effects of the selective ROCK inhibitor, Y27632, on ET-1-induced hypertrophic response in neonatal rat cardiac myocytes--possible involvement of Rho/ROCK pathway in cardiac muscle cell hypertrophy. *FEBS Lett*. **452**, 314-8.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680-5.

Li, H., N. H. Choe, D. T. Wright and K. B. Adler (1995) Histamine provokes turnover of inositol phospholipids in guinea pig and human airway epithelial cells via an H1-receptor/G protein-dependent mechanism. *Am J Respir Cell Mol Biol*. **12**, 416-24.

Li, Z., J. H. Paik, Z. Wang, T. Hla and D. Wu (2005) Role of guanine nucleotide exchange factor P-Rex-2b in sphingosine 1-phosphate-induced Rac1 activation and cell migration in endothelial cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **76**, 95-104.

Lutz, S., A. Freichel-Blomquist, Y. Yang, U. Rumenapp, K. H. Jakobs, M. Schmidt and T. Wieland (2005) The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *J Biol Chem*. **280**, 11134-9.

Lutz, S., A. Shankaranarayanan, C. Coco, M. Ridilla, M. R. Nance, C. Vettel, D. Baltus, C. R. Evelyn, R. R. Neubig, T. Wieland and J. J. Tesmer (2007) Structure of Galphaq-p63RhoGEF-RhoA complex reveals a pathway for the activation of RhoA by GPCRs. *Science*. **318**, 1923-7.

Machesky, L. M. and R. H. Insall (1998) Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. **8**, 1347-56.

Mackay, D. J. and A. Hall (1998) Rho GTPases. *J Biol Chem*. **273**, 20685-8.

Mallavarapu, A. and T. Mitchison (1999) Regulated actin cytoskeleton assembly at filopodium tips controls their extension and retraction. *J Cell Biol*. **146**, 1097-106.

Manser, E., H. Y. Huang, T. H. Loo, X. Q. Chen, J. M. Dong, T. Leung and L. Lim (1997) Expression of constitutively active alpha-PAK reveals effects of the kinase on actin and focal complexes. *Mol Cell Biol*. **17**, 1129-43.

Marinissen, M. J., M. Chiariello and J. S. Gutkind (2001) Regulation of gene expression by the small GTPase Rho through the ERK6 (p38 gamma) MAP kinase pathway. *Genes Dev*. **15**, 535-53.

Marquardt, B., D. Frith and S. Stabel (1994) Signalling from TPA to MAP kinase requires protein kinase C, raf and MEK: reconstitution of the signalling pathway in vitro. *Oncogene*. **9**, 3213-8.

Maruyama, Y., M. Nishida, Y. Sugimoto, S. Tanabe, J. H. Turner, T. Kozasa, T. Wada, T. Nagao and H. Kurose (2002) Galpha(12/13) mediates alpha(1)-adrenergic receptor-induced cardiac hypertrophy. *Circ Res*. **91**, 961-9.

McCudden, C. R., M. D. Hains, R. J. Kimple, D. P. Siderovski and F. S. Willard (2005) G-protein signaling: back to the future. *Cell Mol Life Sci*. **62**, 551-77.

McDonell, M. W., M. N. Simon and F. W. Studier (1977) Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. *J Mol Biol*. **110**, 119-46.

McKinsey, T. A. and D. A. Kass (2007) Small-molecule therapies for cardiac hypertrophy: moving beneath the cell surface. *Nat Rev Drug Discov*. **6**, 617-35.

McPherson, C. E., B. A. Eipper and R. E. Mains (2002) Genomic organization and differential expression of Kalirin isoforms. *Gene*. **284**, 41-51.

Mende, U., A. Kagen, A. Cohen, J. Aramburu, F. J. Schoen and E. J. Neer (1998) Transient cardiac expression of constitutively active Galphaq leads to hypertrophy and dilated cardiomyopathy by calcineurin-dependent and independent pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **95**, 13893-8.

Mende, U., C. Semsarian, D. C. Martins, A. Kagen, C. Duffy, F. J. Schoen and E. J. Neer (2001) Dilated cardiomyopathy in two transgenic mouse lines expressing activated G protein alpha(q): lack of correlation between phospholipase C activation and the phenotype. *J Mol Cell Cardiol*. **33**, 1477-91.

Miki, H., S. Suetsugu and T. Takenawa (1998) WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J*. **17**, 6932-41.

Milligan, G. and E. Kostenis (2006) Heterotrimeric G-proteins: a short history. *Br J Pharmacol*. **147 Suppl 1**, S46-55.

Molkentin, J. D. and G. W. Dorn, 2nd (2001) Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy. *Annu Rev Physiol*. **63**, 391-426.

Molkentin, J. D., J. R. Lu, C. L. Antos, B. Markham, J. Richardson, J. Robbins, S. R. Grant and E. N. Olson (1998) A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell*. **93**, 215-28.

Nakagawa, O., H. Itoh, M. Harada, Y. Komatsu, T. Yoshimasa and K. Nakao (1995) Gene regulation of brain natriuretic peptide in cardiocyte hypertrophy by alpha1-adrenergic stimulation. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl*. **22**, S183-5.

Nelson, T. J., R. Balza, Jr., Q. Xiao and R. P. Misra (2005) SRF-dependent gene expression in isolated cardiomyocytes: regulation of genes involved in cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*. **39**, 479-89.

Nie, Z., D. S. Hirsch and P. A. Randazzo (2003) Arf and its many interactors. *Curr Opin Cell Biol*. **15**, 396-404.

Nishida, M., S. Tanabe, Y. Maruyama, S. Mangmool, K. Urayama, Y. Nagamatsu, S. Takagahara, J. H. Turner, T. Kozasa, H. Kobayashi, Y. Sato, T. Kawanishi, R. Inoue, T. Nagao and H. Kurose (2005) G alpha 12/13- and reactive oxygen species-dependent activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase by angiotensin receptor stimulation in rat neonatal cardiomyocytes. *J Biol Chem*. **280**, 18434-41.

Nobes, C. D. and A. Hall (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell*. **81**, 53-62.

Nobes, C. D. and A. Hall (1999) Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J Cell Biol*. **144**, 1235-44.

Offermanns, S., K. L. Laugwitz, K. Spicher and G. Schultz (1994) G proteins of the G12 family are activated via thromboxane A2 and thrombin receptors in human platelets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **91**, 504-8.

Ohashi, K., T. Hosoya, K. Takahashi, H. Hing and K. Mizuno (2000) A Drosophila homolog of LIM-kinase phosphorylates cofilin and induces actin cytoskeletal reorganization. *Biochem Biophys Res Commun*. **276**, 1178-85.

Oldham, W. M. and H. E. Hamm (2008) Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **9**, 60-71.

Olofsson, B. (1999) Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal*. **11**, 545-54.

Paterson, H. F., A. J. Self, M. D. Garrett, I. Just, K. Aktories and A. Hall (1990) Microinjection of recombinant p21rho induces rapid changes in cell morphology. *J Cell Biol*. **111**, 1001-7.

Pellissier, L. P., J. Sallander, M. Campillo, F. Gaven, E. Queffeulou, M. Pillot, A. Dumuis, S. Claeysen, J. Bockaert and L. Pardo (2009) Conformational toggle switches implicated in basal constitutive and agonist-induced activated states of 5-hydroxytryptamine-4 receptors. *Mol Pharmacol*. **75**, 982-90.

Perona, R., S. Montaner, L. Saniger, I. Sanchez-Perez, R. Bravo and J. C. Lacal (1997) Activation of the nuclear factor-kappaB by Rho, CDC42, and Rac-1 proteins. *Genes Dev*. **11**, 463-75.

Perrot, V., J. Vazquez-Prado and J. S. Gutkind (2002) Plexin B regulates Rho through the guanine nucleotide exchange factors leukemia-associated Rho GEF (LARG) and PDZ-RhoGEF. *J Biol Chem*. **277**, 43115-20.

Pollard, T. D., L. Blanchoin and R. D. Mullins (2001) Actin dynamics. *J Cell Sci*. **114**, 3-4.

Ponicke, K., I. Heinroth-Hoffmann, K. Becker, B. Osten and O. E. Brodde (1999) Gq/11-coupled receptors and protein synthesis in rat cardiomyocytes: role of Gi-proteins and protein kinase C-isozymes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. **360**, 301-8.

Popoff, M. R., E. Chaves-Olarte, E. Lemichez, C. von Eichel-Streiber, M. Thelestam, P. Chardin, D. Cussac, B. Antonny, P. Chavrier, G. Flatau, M. Giry, J. de Gunzburg and P. Boquet (1996) Ras, Rap, and Rac small GTP-binding proteins are targets for Clostridium sordellii lethal toxin glucosylation. *J Biol Chem*. **271**, 10217-24.

Pracyk, J. B., K. Tanaka, D. D. Hegland, K. S. Kim, R. Sethi, Rovira, II, D. R. Blazina, L. Lee, J. T. Bruder, I. Kovesdi, P. J. Goldshmidt-Clermont, K. Irani and T. Finkel (1998) A requirement for the rac1 GTPase in the signal transduction pathway leading to cardiac myocyte hypertrophy. *J Clin Invest*. **102**, 929-37.

Prosch, S., C. E. Wendt, P. Reinke, C. Priemer, M. Oppert, D. H. Kruger, H. D. Volk and W. D. Docke (2000) A novel link between stress and human cytomegalovirus (HCMV) infection: sympathetic hyperactivity stimulates HCMV activation. *Virology*. **272**, 357-65.

Pruitt, K. and C. J. Der (2001) Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer Lett*. **171**, 1-10.

Ren, X. D., W. B. Kiosses and M. A. Schwartz (1999) Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J*. **18**, 578-85.

Ren, X. D. and M. A. Schwartz (2000) Determination of GTP loading on Rho. *Methods Enzymol*. **325**, 264-72.

Ridley, A. J. and A. Hall (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell*. **70**, 389-99.

Ridley, A. J., H. F. Paterson, C. L. Johnston, D. Diekmann and A. Hall (1992) The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell*. **70**, 401-10.

Ridley, A. J., M. A. Schwartz, K. Burridge, R. A. Firtel, M. H. Ginsberg, G. Borisy, J. T. Parsons and A. R. Horwitz (2003) Cell migration: integrating signals from front to back. *Science*. **302**, 1704-9.

Riento, K. and A. J. Ridley (2003) Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **4**, 446-56.

Rikitake, Y., H. H. Kim, Z. Huang, M. Seto, K. Yano, T. Asano, M. A. Moskowitz and J. K. Liao (2005) Inhibition of Rho kinase (ROCK) leads to increased cerebral blood flow and stroke protection. *Stroke*. **36**, 2251-7.

Rogers, J. H., P. Tamirisa, A. Kovacs, C. Weinheimer, M. Courtois, K. J. Blumer, D. P. Kelly and A. J. Muslin (1999) RGS4 causes increased mortality and reduced cardiac hypertrophy in response to pressure overload. *J Clin Invest*. **104**, 567-76.

Rojas, R. J., M. E. Yohe, S. Gershburg, T. Kawano, T. Kozasa and J. Sondek (2007) Galphaq directly activates p63RhoGEF and Trio via a conserved extension of the Dbl homology-associated pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. **282**, 29201-10.

Rosenkranz, S. (2004) TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling. *Cardiovasc Res*. **63**, 423-32.

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

Rossman, K. L., C. J. Der and J. Sondek (2005) GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **6**, 167-80.

Rumenapp, U., M. Asmus, H. Schablowski, M. Woznicki, L. Han, K. H. Jakobs, M. Fahimi-Vahid, C. Michalek, T. Wieland and M. Schmidt (2001) The M3 muscarinic acetylcholine receptor expressed in HEK-293 cells signals to phospholipase D via G12 but not Gq-type G proteins: regulators of G proteins as tools to dissect pertussis toxin-resistant G proteins in receptor-effector coupling. *J Biol Chem*. **276**, 2474-9.

Sadoshima, J. and S. Izumo (1997) The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*. **59**, 551-71.

Sah, V. P., M. Hoshijima, K. R. Chien and J. H. Brown (1996) Rho is required for Galphaq and alpha1-adrenergic receptor signaling in cardiomyocytes. Dissociation of Ras and Rho pathways. *J Biol Chem*. **271**, 31185-90.

Sah, V. P., S. Minamisawa, S. P. Tam, T. H. Wu, G. W. Dorn, 2nd, J. Ross, Jr., K. R. Chien and J. H. Brown (1999) Cardiac-specific overexpression of RhoA results in sinus and atrioventricular nodal dysfunction and contractile failure. *J Clin Invest*. **103**, 1627-34.

Sah, V. P., T. M. Seasholtz, S. A. Sagi and J. H. Brown (2000) The role of Rho in G protein-coupled receptor signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. **40**, 459-89.

Sakata, Y., B. D. Hoit, S. B. Liggett, R. A. Walsh and G. W. Dorn, 2nd (1998) Decompensation of pressure-overload hypertrophy in G alpha q-overexpressing mice. *Circulation*. **97**, 1488-95.

Sander, E. E. and J. G. Collard (1999) Rho-like GTPases: their role in epithelial cell-cell adhesion and invasion. *Eur J Cancer*. **35**, 1905-11.

Schmidt, A. and A. Hall (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*. **16**, 1587-609.

Schmitz, A. A., E. E. Govek, B. Bottner and L. Van Aelst (2000) Rho GTPases: signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*. **261**, 1-12.

Sekine, A., M. Fujiwara and S. Narumiya (1989) Asparagine residue in the rho gene product is the modification site for botulinum ADP-ribosyltransferase. *J Biol Chem*. **264**, 8602-5.

Sells, M. A., U. G. Knaus, S. Bagrodia, D. M. Ambrose, G. M. Bokoch and J. Chernoff (1997) Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol*. **7**, 202-10.

Sheng, M. and C. Sala (2001) PDZ domains and the organization of supramolecular complexes. *Annu Rev Neurosci*. **24**, 1-29.

Siderovski, D. P. and F. S. Willard (2005) The GAPs, GEFs, and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *Int J Biol Sci*. **1**, 51-66.

Snabaitis, A. K., A. Muntendorf, T. Wieland and M. Avkiran (2005) Regulation of the extracellular signal-regulated kinase pathway in adult myocardium: differential roles of G(q/11), Gi and G(12/13) proteins in signalling by alpha1-adrenergic, endothelin-1 and thrombin-sensitive protease-activated receptors. *Cell Signal*. **17**, 655-64.

Snow, B. E., L. Antonio, S. Suggs, H. B. Gutstein and D. P. Siderovski (1997) Molecular cloning and expression analysis of rat Rgs12 and Rgs14. *Biochem Biophys Res Commun*. **233**, 770-7.

Souchet, M., E. Portales-Casamar, D. Mazurais, S. Schmidt, I. Leger, J. L. Javre, P. Robert, I. Berrebi-Bertrand, A. Bril, B. Gout, A. Debant and T. P. Calmels (2002) Human p63RhoGEF, a novel RhoA-specific guanine nucleotide exchange factor, is localized in cardiac sarcomere. *J Cell Sci*. **115**, 629-40.

Sprang, S. R. (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annu Rev Biochem*. **66**, 639-78.

Strathmann, M. and M. I. Simon (1990) G protein diversity: a distinct class of alpha subunits is present in vertebrates and invertebrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 9113-7.

Sugden, P. H. and A. Clerk (2005) Endothelin signalling in the cardiac myocyte and its pathophysiological relevance. *Curr Vasc Pharmacol*. **3**, 343-51.

Sussman, M. A., S. Welch, A. Walker, R. Klevitsky, T. E. Hewett, R. L. Price, E. Schaefer and K. Yager (2000) Altered focal adhesion regulation correlates with cardiomyopathy in mice expressing constitutively active rac1. *J Clin Invest*. **105**, 875-86.

Swenson-Fields, K. I., J. C. Sandquist, J. Rossol-Allison, I. C. Blat, K. Wennerberg, K. Burridge and A. R. Means (2008) MLK3 limits activated Galphaq signaling to Rho by binding to p63RhoGEF. *Mol Cell*. **32**, 43-56.

Takai, Y., T. Sasaki and T. Matozaki (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. **81**, 153-208.

Tamirisa, P., K. J. Blumer and A. J. Muslin (1999) RGS4 inhibits G-protein signaling in cardiomyocytes. *Circulation*. **99**, 441-7.

Taya, S., N. Inagaki, H. Sengiku, H. Makino, A. Iwamatsu, I. Urakawa, K. Nagao, S. Kataoka and K. Kaibuchi (2001) Direct interaction of insulin-like growth factor-1 receptor with leukemia-associated RhoGEF. *J Cell Biol*. **155**, 809-20.

Taylor, J. M., M. M. Macklem and J. T. Parsons (1999) Cytoskeletal changes induced by GRAF, the GTPase regulator associated with focal adhesion kinase, are mediated by Rho. *J Cell Sci*. **112 (Pt 2)**, 231-42.

Thorburn, J., S. Xu and A. Thorburn (1997) MAP kinase- and Rho-dependent signals interact to regulate gene expression but not actin morphology in cardiac muscle cells. *EMBO J*. **16**, 1888-900.

Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier and R. A. Brown (2002) Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **3**, 349-63.

Valencia, A., M. Kjeldgaard, E. F. Pai and C. Sander (1991) GTPase domains of ras p21 oncogene protein and elongation factor Tu: analysis of three-dimensional structures, sequence families, and functional sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88**, 5443-7.

Vetter, I. R. and A. Wittinghofer (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science*. **294**, 1299-304.

Vogt, A., S. Lutz, U. Rumenapp, L. Han, K. H. Jakobs, M. Schmidt and T. Wieland (2007) Regulator of G-protein signalling 3 redirects prototypical Gi-coupled receptors from Rac1 to RhoA activation. *Cell Signal*. **19**, 1229-37.

Vogt, S., R. Grosse, G. Schultz and S. Offermanns (2003) Receptor-dependent RhoA activation in G12/G13-deficient cells: genetic evidence for an involvement of Gq/G11. *J Biol Chem*. **278**, 28743-9.

Wall, M. A., B. A. Posner and S. R. Sprang (1998) Structural basis of activity and subunit recognition in G protein heterotrimers. *Structure*. **6**, 1169-83.

Watanabe, N., T. Kato, A. Fujita, T. Ishizaki and S. Narumiya (1999) Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat Cell Biol*. **1**, 136-43.

Wedegaertner, P. B., P. T. Wilson and H. R. Bourne (1995) Lipid modifications of trimeric G proteins. *J Biol Chem*. **270**, 503-6.

Weis, K. (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*. **112**, 441-51.

Weiss, B., A. Thompson and C. C. Richardson (1968) Ezymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VII. Properties of the enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. *J Biol Chem*. **243**, 4556-63.

Welch, H. C., W. J. Coadwell, L. R. Stephens and P. T. Hawkins (2003) Phosphoinositide 3-kinase-dependent activation of Rac. *FEBS Lett*. **546**, 93-7.

Wennerberg, K., K. L. Rossman and C. J. Der (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci*. **118**, 843-6.

Wettschureck, N., H. Rutten, A. Zywietz, D. Gehring, T. M. Wilkie, J. Chen, K. R. Chien and S. Offermanns (2001) Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Galphaq/Galpha11 in cardiomyocytes. *Nat Med*. **7**, 1236-40.

Wieland, T. and C. Mittmann (2003) Regulators of G-protein signalling: multifunctional proteins with impact on signalling in the cardiovascular system. *Pharmacol Ther*. **97**, 95-115.

Williams, S. L., S. Lutz, N. K. Charlie, C. Vettel, M. Ailion, C. Coco, J. J. Tesmer, E. M. Jorgensen, T. Wieland and K. G. Miller (2007) Trio's Rho-specific GEF domain is the missing Galpha q effector in C. elegans. *Genes Dev*. **21**, 2731-46.

Woodcock, E. A., X. J. Du, M. E. Reichelt and R. M. Graham (2008) Cardiac alpha 1-adrenergic drive in pathological remodelling. *Cardiovasc Res*. **77**, 452-62.

Xu, X., W. Zeng, S. Popov, D. M. Berman, I. Davignon, K. Yu, D. Yowe, S. Offermanns, S. Muallem and T. M. Wilkie (1999) RGS proteins determine signaling specificity of Gq-coupled receptors. *J Biol Chem*. **274**, 3549-56.

Yamada, T., Y. Ohoka, M. Kogo and S. Inagaki (2005) Physical and functional interactions of the lysophosphatidic acid receptors with PDZ domain-containing Rho guanine nucleotide exchange factors (RhoGEFs). *J Biol Chem*. **280**, 19358-63.

Yamazaki, T., I. Komuro and Y. Yazaki (1999) Role of the renin-angiotensin system in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol*. **83**, 53H-57H.

Yanazume, T., K. Hasegawa, H. Wada, T. Morimoto, M. Abe, T. Kawamura and S. Sasayama (2002) Rho/ROCK pathway contributes to the activation of extracellular signal-regulated kinase/GATA-4 during myocardial cell hypertrophy. *J Biol Chem*. **277**, 8618-25.

Yatani, A., K. Irie, T. Otani, M. Abdellatif and L. Wei (2005) RhoA GTPase regulates L-type Ca2+ currents in cardiac myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. **288**, H650-9.

Yue, T. L., J. L. Gu, C. Wang, A. D. Reith, J. C. Lee, R. C. Mirabile, R. Kreutz, Y. Wang, B. Maleeff, A. A. Parsons and E. H. Ohlstein (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy. *J Biol Chem*. **275**, 37895-901.

Zechner, D., D. J. Thuerauf, D. S. Hanford, P. M. McDonough and C. C. Glembotski (1997) A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in myocardial cell growth, sarcomeric organization, and cardiac-specific gene expression. *J Cell Biol*. **139**, 115-27.

Zeng, W., X. Xu, S. Popov, S. Mukhopadhyay, P. Chidiac, J. Swistok, W. Danho, K. A. Yagaloff, S. L. Fisher, E. M. Ross, S. Muallem and T. M. Wilkie (1998) The N-terminal domain of RGS4 confers receptor-selective inhibition of G protein signaling. *J Biol Chem*. **273**, 34687-90.

Zerial, M. and H. McBride (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **2**, 107-17.

Zheng, Y., D. Zangrilli, R. A. Cerione and A. Eva (1996) The pleckstrin homology domain mediates transformation by oncogenic dbl through specific intracellular targeting. *J Biol Chem*. **271**, 19017-20.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich herzlichst all jenen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Thomas Wieland für die Vergabe des Themas und die Aufnahme in seinen Arbeitskreis und für sein stetes Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Hilgenfeldt für seine Bereitschaft, diese Arbeit zu begutachten und vor der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Heidelberg zu vertreten.

Frau Dr. rer. nat. Susanne Lutz für die kompetente Betreuung dieser Arbeit, ihre fachliche und persönliche Unterstützung, die stete Diskussionsbereitschaft und die vielen neuen Ideen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ein herzliches Dankeschön an meine Laborkollegen Andreas Vogt, Marion Mohl, Javier Carbajo, Julia Rauch, Christina Würtz und unsere „Außendienstler“ Issam Abu-Taha und Nadine Wolf für die kollegiale und freundschaftliche Zusammenarbeit und die gegenseitige moralische Unterstützung.

Unseren Praktikanten, Medizindoktoranden und Diplomanden Stefan, Yang, Petra, Olga, Kolja, Gesine, Dennis, Franca, Akos, Jessie und Kornelius für ihren Beitrag zu einem abwechslungsreichen Laboralltag und einer produktiven und netten Arbeitsatmosphäre.

Weiterhin möchte ich mich bei Doris Baltus, Anna Hahn, Tina Stefan-Schnatz, Stefania Alexa, Zenon Baraniak, Heinz Scheffel, Heike Rauscher, Karola Wittig, Tina Schummer, Simone Höger und Irene Rupprecht für ihre Hilfe, Unterstützung und das angenehme Arbeitsklima während meiner Dissertation bedanken.

Herrn Dr. phil. nat. Martin Thomas danke ich für die Durchführung der immunohistologischen Färbungen.

Ein ganz besonderer Dank geht an Brian Bednarek, meine Familie und Freunde, auf deren Unterstützung ich immer zählen konnte.