

# INAUGURAL – DISSERTATION

Zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht – Karls – Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
**Diplom-Biochemiker Mario Berger**  
aus Morsbach/Sieg

Heidelberg im Herbst 2005

# **Die Rolle des G-Protein- Regulators RGS5 in der Karzinogenese und im Kreislaufsystem**

Gutachter:

Prof. Dr. rer. nat. Günter J. Hämmerling  
Prof. Dr. med. Bruno Kyewski

Angefertigt in der  
Abteilung Molekulare Immunologie  
(Leiter: Professor G. J. Hämmerling)  
im  
Deutschen Krebsforschungszentrum  
Heidelberg

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift sind bereits veröffentlicht:

Mario Berger, Gabriele Bergers, Bernd Arnold, Günter J. Hämmerling und Ruth Ganss (2005). Regulator of G Protein Signaling 5 induction in pericytes coincides with active vessel remodeling during neovascularization. Blood 2005 Feb 1; Band 105 (3):1094-1101

Meinen Eltern und  
meiner Großmutter Franziska

### **When Earth's Last Picture Is Painted**

When Earth's last picture is painted and the tubes are twisted and dried,  
When the oldest colours have faded, and the youngest critic has died,  
We shall rest, and, faith, we shall need it -- lie down for an aeon or two,  
Till the Master of All Good Workmen shall put us to work anew.  
And those that were good shall be happy; they shall sit in a golden chair;  
They shall splash at a ten-league canvas with brushes of comets' hair.  
They shall find real saints to draw from -- Magdalene, Peter, and Paul;  
They shall work for an age at a sitting and never be tired at all!

And only The Master shall praise us, and only The Master shall blame;  
And no one shall work for money, and no one shall work for fame,  
But each for the joy of the working, and each, in his separate star,  
Shall draw the Thing as he sees It for the God of Things as They are!

Rudyard Kipling (1892)  
L'Envoi To "The Seven Seas"

## Danksagungen

Zunächst möchte ich mich herzlich bei Günter J. Hämmerling bedanken, der mich in den vergangenen fast vier Jahren mit Anregungen unterstützt hat, sich immer die Zeit nahm, „dringende“ Fragen zu erörtern und mir die Möglichkeit gab, in seiner Abteilung diese Arbeit zu verfassen. Besonders freue ich mich, dass er mir die Chance gab, an Kongressen und der FEBS Summer School teil zu nehmen, um einen Blick hinter die Mauern des DKFZ zu werfen und einen „live“-Eindruck von der aktuellen Forschung in anderen Universitäten und Instituten zu gewinnen. Ruth Ganss danke ich für die Überlassung des Themas, die Betreuung meiner Doktorarbeit und den „journalistisch-wissenschaftlichen“ Rat beim Schreiben dieser Arbeit („Glück auf“ in „Down Under“). Ebenso möchte ich mich bei meinen Kollegen in der Abteilung Molekulare Immunologie bedanken, insbesondere bei meinen „Tischnachbarn“ Natalio Garbi, Simone Stahl und Thilo Oelert, sowie bei Jörg Striegler und Jens Derbinski für die stete Diskussionsbereitschaft, Unterstützung und Anteilnahme (wenn wieder einmal wissenschaftliche Hypothesen sich verflüchtigten oder experimentelle Planung und Durchführung nicht kongruent verliefen). Natalio Garbi bin ich zudem sehr dankbar für die geduldige Vermittlung proteinchemischer Arbeitstechniken und der FACS-Analyse. Herzlich danken möchte ich ebenso Ludmila Umansky und Christine Schmitt für die Mitarbeit und „technische“ Unterstützung. Danke, dass ihr mein Chaosmanagement (meist) verkraftet habt. An dieser Stelle möchte ich mich recht herzlich bedanken bei Gerd Moldenhauer für die freundliche und ausdauernde Beantwortung unzähliger Fragen, für die Generierung und Reinigung des RGS5-Antikörpers und für die kostenfreie Lieferung von Antikörpern aller Spezifitäten. Sabine Schmitt danke ich für ihre kontinuierlich-freundliche Unterstützung und Günter Küblbeck gleichsam für die Vermittlung molekularbiologischer Tipps und Tricks. Beiden, sowie Ruth Ganss, danke ich außerdem für die Etablierung der RGS5-Knock-out-Maus. Herbert Spring, Manuel Scheuermann und Klaus Hexel danke ich für den technischen Support und die Durchführung der Konfokalmikroskopie bzw. der FACS-Sortierung.

Ebenso danke ich den Mitarbeitern der Abteilung Stefan Offermanns im Pharmakologischen Institut der Universität Heidelberg: Nina Wettschureck und Antonia Sassmann für die Hypertrophie-Experimente, Zoltán Benyó und Belá Horváth für die Organbadexperimente und Angela Wirth für die Blutdruckmessungen. Insbesondere danke ich Nina Wettschureck und Angela Wirth für die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit. Für die kritische Durchsicht und Diskussionsbereitschaft möchte ich mich ebenso herzlich bei Jens Derbinski und Simone Stahl, sowie Özen Sercan (DKFZ), bedanken. Meiner Freundin Fei Bao (Louisiana State University/LSU, Shreveport, LA, USA) danke ich für die Hilfe bei der Interpretation verschiedener Histologien und der Arbeitsgruppe Gröne für die Durchführung der histologischen Analyse.

Für ihre Diskussionsbereitschaft in Bezug auf die Funktion von Adenylatzyklen und RGS2 bedanke ich mich bei Carmen W. Dessauer (University of Texas, Department of Pharmacology, Houston, USA). Michael Greenwood und Gael Jean-Baptiste (McGill University, Montreal, Kanada) danke ich für die Durchführung eines RGS5-Western Blots und zahlreiche Diskussionen zum Thema „RGS5“. Bei Steven Song (University of California at San Francisco/UCSF, USA) bedanke ich mich für die technischen Hinweise und Diskussionen zur Isolierung von Perizyten. Gabriele Bergers (UCSF) danke ich für die Kollaboration und die Mitwirkung an der Erstellung des „Blood“-Manuskriptes. Vielen Dank auch an Paul R. Albert (Ottawa Health Research Institute, University of Ottawa, Kanada) für die Bereitstellung des Gi3(QL)-Plasmids und Sunanda Babu (Barbara Davis Center, Denver, Colorado, USA) für die großzügige Bereitstellung eines Hybridoms. Herzlichen Dank an Bruno Kyewski und Günter Hämmerling (beide DKFZ), sowie Stephan Frings und Thomas Rausch (Universität Heidelberg), für die bereitwillige Übernahme des Gutachtens/der Prüfung!

An dieser Stelle möchte ich Jörg Striegler, Jana Gäbler, sowie Jens und Daniela Derbinski sehr danken für ihre Freundschaft und stete Unterstützung auch an weniger guten Tagen. Ich bin glücklich, euch in Heidelberg kennen gelernt zu haben! Auch Kathrin Sonza-Reorda werde ich immer dankbar sein für ihre Freundschaft. Meiner persönlichen Unternehmens- und Jobberaterin Christine Schneider ein herzlicher Dank für ihren Einsatz und ihre Freundschaft!! Diese Arbeit wäre wohl nicht entstanden, wenn meine ehemalige Professorin, Kathryn Haskins (University of Colorado Health Sciences Center, Denver, Colorado, USA) nicht den Grundstein dafür gelegt hätte und mir die Möglichkeit gab, in die Immunologie „einzusteigen“. Seitdem hat mich Katie Haskins fortwährend bestärkt, diesen Weg weiter zu gehen und mich dabei nicht beirren zu lassen. Auch für die persönliche Unterstützung und Teilnahme an meiner Arbeit bin ich ihr sehr dankbar. Brian de Souza (Royal Free and University College, London) danke ich für die unglaublich nette Praktikumsbetreuung. Heinz Loigge danke ich dafür, dass er mir Facetten des Lebens gezeigt hat, die ich vorher nicht zu betrachten gewagt habe und mit half, Wege zu beschreiten, die ich allein nie gegangen wäre. Danke für Deine Geduld und alles andere!

Allen anderen, die ich hier nicht namentlich erwähnen konnte und die mich auf meinem Weg begleitet haben: ein herzliches Dankeschön! Zum Schluss möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, meinen Eltern, Annelotte und Horst Berger und meiner Großmutter, Franziska Schneider. Auch wenn ich es vielleicht nicht immer zum Ausdruck bringen konnte, bin ich euch unendlich dankbar für eure uneingeschränkte Unterstützung und eure Liebe. Vor 10 Jahren, als ich in Bochum mein Studium begann, hätte ich mir nicht träumen lassen, dass ich das Studium irgendwann mit einer Promotion abschließen würde – ohne euch wäre ich nie soweit gekommen. Danke!

# INHALT

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Tumoren entgehen der immunologischen Erkennung.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Die Rolle des Tumorstromas für die immunologische Nichterkennung.....	2
1.1.2	RIP1Tag5-Mäuse (RT5) als Modell für autochthones Tumorwachstum.....	4
1.1.3	Die Angiogenese ist für zelluläres Wachstum essentiell.....	5
1.1.4	Tumorangiogenese – Die Gefäßneubildung während des Tumorwachstums.....	6
1.1.5	Die Durchbrechung der intrinsischen Tumorbarriere.....	8
<b>1.2</b>	<b>Die RGS-Familie der G-Protein-Regulatoren.....</b>	<b>9</b>
1.2.1	Regulator of G Protein Signaling 5 (RGS5).....	11
	A. Die Organverteilung von RGS5.....	11
	B. Der Mechanismus der RGS5-Aktivität.....	12
	C. RGS5 in der Pathogenese von Krankheiten.....	13
1.2.2	Funktionelle Aufklärung von RGS-Molekülen mit Hilfe transgener Tiere.....	13
<b>2</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>15</b>
<b>3.1</b>	<b>Materialien.....</b>	<b>15</b>
3.1.1	Allgemeine Chemikalien, Puffer und Medien.....	15
3.1.2	Materialien für die Arbeit mit Hefen.....	17
3.1.3	Oligonukleotide.....	19
3.1.4	Plasmide.....	21
3.1.5	Primärantikörper und Sekundärreagenzien.....	21
3.1.6	Eukaryontische Zellen.....	22
3.1.7	Mäuse.....	22
<b>3.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>22</b>
3.2.1	Animpfen von Bakterienkulturen.....	22
3.2.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli.....	23
3.2.3	Quantifizierung von Nukleinsäuren durch Spektrometrie.....	23
3.2.4	DNA-Restriktionsspaltung.....	23
3.2.5	Auftrennung von DNA in der Gelelektrophorese und DNA-Isolierung.....	23
3.2.6	Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	24
3.2.7	Ligation von DNA-Enden.....	24
3.2.8	Herstellung hitzekompetenter Bakterien.....	24
3.2.9	Transformation von E. coli.....	25
3.2.10	Isolierung von RNA und cDNA-Synthese.....	25
3.2.11	„Polymerase Chain Reaction“ (PCR).....	26
3.2.12	Northern Blotting.....	28
3.2.13	Nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung (ISH).....	29

<b>3.3</b>	<b>Zellbiologische und immunologische Methoden.....</b>	<b>32</b>
3.3.1	Transfektion eukaryontischer Zellen mit Fugene6 <sup>TM</sup> .....	32
3.3.2	Einbettung von Organproben für die Histologie .....	32
3.3.3	Immunfluoreszenz .....	33
3.3.4	Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung .....	34
3.3.5	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse) .....	34
<b>3.4</b>	<b>Biochemische Methoden .....</b>	<b>35</b>
3.4.1	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford .....	35
3.4.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
3.4.3	Coomassie Färbung .....	36
3.4.4	Autoradiographie/Fluorographie .....	36
3.4.5	Western Blotting .....	36
3.4.6	In-vitro-Proteinexpression mit Retikulozytenlysaten.....	38
3.4.7	Bestimmung der Stabilität von RGS5 in Retikulozytenlysaten .....	38
3.4.8	Metabolische Markierung in cos7-Zellen zur Bestimmung der Stabilität von RGS5 .....	38
3.4.9	Herstellung von rekombinanten His-Tag-Proteinen (RGS5) .....	39
3.4.10	Herstellung von rekombinanten GST-Proteinen (UCK und AC3).....	41
3.4.11	Affinitätschromatographische Reinigung von Kaninchenserum.....	42
3.4.12	Koimmunpräzipitation (Ko-IP) zur Detektion von RGS5-Bindungspartnern.....	43
3.4.13	Immunpräzipitation mit rekombinanten Proteinen an Glutathionbeads.....	44
3.4.14	Konventionelle Immunpräzipitationen.....	44
3.4.15	Herstellung von Organextrakten .....	45
3.4.16	Markierung von Antikörpern mit Allophycocyanin (APC) .....	45
3.4.17	Yeast-2-Hybrid-Screening mittels des Matchmaker Two-Hybrid System 3 <sup>TM</sup> .....	46
<b>3.5</b>	<b>Tierexperimentelle Arbeiten .....</b>	<b>52</b>
3.5.1	Isolierung von Langerhans'schen Inseln und Insulinomen .....	52
3.5.2	Setzen von Hautwunden.....	53
3.5.3	Immunisierung mit rekombinantem RGS5 .....	53
3.5.4	Adoptiver T-Zell-Transfer.....	53
<b>4</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>55</b>
<b>4.1</b>	<b>Studien zur Rolle von RGS5 in der Angiogenese .....</b>	<b>55</b>
4.1.1	Induktion von RGS5 in RIP1Tag5-Tumoren während der Neovaskularisierung .....	55
4.1.2	Korrelation von RGS5-Expression und Angiogenesepotential in Astrozytomen .....	56
4.1.3	Perizyten-spezifische Expression von RGS5.....	58
4.1.4	Induktion der RGS5-Expression in den Perizyten während der Tumorentwicklung ..	59
4.1.5	RGS5-Expression bei der physiologischen Angiogenese .....	61
4.1.6	Kinetik der RGS5-Expression im Verlauf einer Tumorthherapie.....	63
<b>4.2</b>	<b>Studien zur Lokalisation und Stabilität von RGS5.....</b>	<b>64</b>
4.2.1	Herstellung rekombinanter RGS-Fusionsproteine .....	64
4.2.2	Generierung von RGS5-spezifischen Antikörpern.....	64
4.2.3	Die Stabilität von RGS5 <i>in vivo</i> .....	67
4.2.4	Intrazelluläre Lokalisation von RGS5.....	70
<b>4.3</b>	<b>Identifizierung von RGS5-Interaktionspartnern durch 2-Hybrid-Screening .....</b>	<b>72</b>
4.3.1	Das Yeast-2-Hybrid Screening-Verfahren .....	72
4.3.2	Etablierung von Koimmunpräzipitationssystemen zur Überprüfung von Protein-Interaktionen .....	78
4.3.3	Prüfung der Interaktion durch Immunpräzipitation.....	79

<b>4.4</b>	<b>Die RGS5-Knock-out-Maus .....</b>	<b>85</b>
4.4.1	Generierung einer RGS5-defizienten Maus („RGS5-Knock-out“)	85
4.4.2	Geburtenrate und histologische Befunde .....	85
4.4.3	Einfluss von RGS5 auf die Blutdruckregulation .....	90
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>94</b>
<b>5.1</b>	<b>Studien zur Rolle von RGS5 in der Angiogenese .....</b>	<b>94</b>
5.1.1	RGS5 in der Tumorangio-genese .....	94
	A. RGS5 markiert Perizyten in der Tumorangio-genese .....	94
	B. Eine mögliche Rolle von RGS5 bei der Migration von perivaskulären Zellen .....	95
	C. Die Induktion von RGS5 könnte druckabhängig sein .....	96
	D. Die Bedeutung von RGS5 in der Tumorthera-pie .....	97
5.1.2	RGS5 markiert die physiologische Angiogenese .....	98
<b>5.2</b>	<b>Studien zur Lokalisation und Stabilität von RGS5 .....</b>	<b>100</b>
5.2.1	Subzelluläre Lokalisierung von RGS5 .....	100
5.2.2	Die Bestimmung von endogenem RGS5 .....	101
	A. Die Stabilität von RGS5: .....	101
	B. Die niedrige endogene Expression von RGS5: .....	102
<b>5.3</b>	<b>Identifizierung von RGS5-Interaktionspartnern .....</b>	<b>103</b>
5.3.1	Die Spezifität von RGS-Molekülen .....	103
5.3.2	Stärken und Schwächen verschiedener Protein-Interaktionssysteme .....	104
5.3.3	Warum war die Detektion nicht möglich? .....	105
5.3.4	Reale und nichtreale Bindungspartner .....	107
<b>5.4</b>	<b>Die RGS5-Knock-out-Maus .....</b>	<b>108</b>
5.4.1	Die RGS5-Defizienz verursacht Gefäßanomalien .....	108
5.4.2	RGS5 ist an der Blutdruckregulation beteiligt .....	109
5.4.3	RGS5 - ein antihypertrophischer Faktor in den Gefäßen? .....	111
5.4.4	Adenylatzyklase 3 – eine physiologische Interaktion mit RGS5? .....	112
<b>5.5</b>	<b>Synopsis .....</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>133</b>
<b>A N H A N G</b>	<b>.....</b>	<b>136</b>

## Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Funktion von RGS5 in der Karzinogenese und bei der Blutdruckregulation. Wir definieren den G-Protein-Regulator RGS5 als neuen Perizytenmarker in einem murinen  $\beta$ -Zellkarzinom-Modell. Während der Tumorentwicklung wird RGS5 in einer PDGFR $\beta^+$ -Perizytensubpopulation zeitgleich mit der Gefäßneubildung induziert. RGS5 kennzeichnet eine unreife Perizytenform, die ein therapeutisch relevantes Angriffsziel in der Antiangiogenesetherapie darstellt. Die Expression von RGS5 erfolgt auch in normalen Geweben, in denen eine aktive Gefäßneubildung stattfindet. Dies wird im Granulationsgewebe subkutaner Hautwunden, als auch im Ovar demonstriert. Die Angiogeneseabhängigkeit der RGS5-Expression wird weiterhin in therapierten Tumoren gezeigt. So wird RGS5 in soliden Tumoren im Verlauf einer Tumorthherapie mit der Hemmung der Angiogeneseprozesse herunterreguliert, wobei gleichzeitig eine Normalisierung der Tumorgefäßstruktur stattfindet. Die Expression von RGS5 korreliert daher nicht nur mit dem Einschalten der Angiogenese, sondern auch mit ihrem Ausschalten. Die RGS5-Induktion in Tumorperizyten verdeutlicht, dass nicht nur Endothelzellen während der Tumorangiogenese molekulare Veränderungen erfahren, sondern dass Perizyten gleichsam diesem Wandel unterworfen sind. Sie sind damit für die Tumorthherapie außerordentlich bedeutsam.

Die RGS5-Menge wird auf der Transkriptionsebene und über die Degradationsrate reguliert. Wir demonstrieren, dass RGS5 *in vivo* sehr instabil ist und schnell über den proteasomabhängigen „N-End“-Weg abgebaut wird. Zudem wird RGS5 in äußerst geringen Mengen endogen exprimiert. Die präzise Koordination der Synthese- und Abbauraten ermöglicht eine schnelle Adaptation in einer wechselnden Mikroumgebung, wie dies während der Tumorentwicklung der Fall ist. Durch 2-Hybridscreening identifizieren wir unter anderem die Adenylatzyklase 3, die in vaskulären SMC ebenso wie RGS5 Hauptwege der Proliferation, Migration und Kontraktion inhibiert. Möglicherweise wird der Gefäßtonus, der durch die Kontraktion der SMC bestimmt wird, synergistisch durch RGS5 und die Adenylatzyklase gesteuert.

Tumorgefäße in RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren unterscheiden sich grundlegend von RGS5-positiven Tumorgefäßen. Sie erscheinen „normalisiert“ und ähneln Normalgefäßen oder Gefäßen in therapierten Tumoren. In Abwesenheit von RGS5 wird infolgedessen ein Normalisierungsprozess induziert. Als Teil einer neuen Antiangiogenesetherapie ist die Normalisierung gegenwärtig von großem Interesse. RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere weisen Plazentadefekte und eine verzögerte Gefäßneubildung während der Wundheilung auf. Das Fehlen von RGS5 ist von einer erhöhten prä- und postnatalen Sterblichkeit begleitet, die mit den beobachteten Gefäßanomalien in Zusammenhang stehen könnte. Erstmals zeigen wir, dass RGS5 an der Relaxation der Widerstandsgefäße, sowie an der NO-vermittelten Relaxation der Aorta, beteiligt ist. Wir vermuten, dass RGS5 für die Gefäßintegrität wesentlich ist und eine wohlmöglich kritische Rolle bei der Regulation des Blutflusses spielt.

## Summary

The goal of my thesis was to elucidate the role of the G protein inhibitor RGS5 in carcinogenesis and blood pressure regulation. We have identified RGS5 as a novel pericyte marker in a murine  $\beta$ -cell carcinoma model. RGS5 is specifically induced in the vasculature of pre-malignant lesions during the “angiogenic switch” and is further elevated in tumor vessels. RGS5 marks an immature pericyte subpopulation, which represents a therapeutically relevant target for anti-angiogenic therapy. An elevated RGS5 level is not limited to tumor angiogenesis but is similarly observed in normal tissues that undergo active vessel remodeling, such as granulation tissue during subcutaneous wound healing or female reproductive tissues during ovulation. The close association of angiogenic activity and RGS5 expression is furthermore demonstrated in solid tumors that undergo therapy. Here antitumor therapy, which reverses the tumor vasculature to an almost normal morphology, results in downregulation of RGS5. Concurrently with this vessel normalization process, angiogenesis is inhibited. Thus, RGS5 expression correlates not only with the onset of angiogenesis but also with its termination. The pericyte-specific induction indicates that pericytes, like endothelial cells, change during tumor progression, making them a novel target in tumor therapy.

The amount of RGS5 on a per-cell basis is tightly controlled at the transcriptional level, and furthermore, at the protein level via its degradation. We show that RGS5 is short-lived *in vivo* and is readily degraded by the proteasome-dependent ‘N-end rule pathway’. In addition, RGS5 is expressed at very low levels endogenously. The accurate coordination of its rate of synthesis and degradation therefore ensures a quick adaptation to a changing microenvironment, such as is the case during tumor development. We discovered that adenylate cyclase 3 (AC3) interacts with RGS5 in yeast cells by 2-hybrid screening. In vascular SMC, AC3 and RGS5 control major signaling pathways leading to proliferation, migration and contraction. Hence, we anticipate that RGS5 and AC3 synergistically regulate vessel tone.

In RGS5<sup>-/-</sup>-mice, tumor vessels differ considerably from RGS5-positive tumor vessels in that they appear normalized, resembling normal vessels or vessels in regression tumors after therapy. Thus, in the absence of RGS5 the induction of vessel normalization is triggered. At present, normalization is of particular interest since it is a prerequisite for new anti-angiogenic strategies. Furthermore, RGS5<sup>-/-</sup>-mice reveal placental defects and show a delayed neovessel formation during wound healing. RGS5-deficiency also leads to increased pre- and postnatal lethality possibly due to vessel anomalies. We show here for the first time that relaxation of the resistance vasculature is partly controlled by RGS5. In addition, *ex vivo* isometric tension measurements reveal that RGS5 accelerates NO-mediated relaxation of aortic rings. We predict that RGS5 is essential for vessel integrity and is furthermore implicated in regulating blood flow and hemostasis.

# 1 Einleitung

## 1.1 TUMOREN ENTGEHEN DER IMMUNOLOGISCHEN ERKENNUNG

Durch Deletion oder Inaktivierung von molekularen „Wächtern des Genoms“, wie etwa p53, sind Krebszellen genetisch instabil (Pardoll, 2003). Eine Vielzahl von tumorspezifischen Antigenen (Neoantigenen) wird daher kontinuierlich durch somatische Mutationen generiert. Zudem werden häufig verschiedene Selbst-Antigene überexprimiert, so dass Tumorzellen mitunter eine hohe Antigenität aufweisen können. Tumoren sind oft von Lymphozyten infiltriert, werden jedoch trotz ihrer Antigenität und der Anwesenheit potentiell tumorreaktiver Lymphozyten nur in Ausnahmefällen abgestoßen (Yu et al., 2005; Boon und van der Bruggen., 1996; Rosenberg, 1999). Viele Faktoren können während der Priming- und Effektorphase der Immunantwort dazu beitragen, dass Tumoren nicht immunologisch erkannt werden. Naive tumorreaktive T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten (DLK) erkennen Tumorantigene, die in der Hauptsache von aktivierten dendritischen Zellen (DZ) kreuzpräsentiert werden (*crosspresentation*). Sind in dieser Primingphase nur unzureichende Mengen Antigen vorhanden, resultiert ein Status der immunologischen Ignoranz, wobei Tumorantigene für das Immunsystem gewissermaßen unsichtbar sind. Die Antigenpräsentierung durch unreife DZ induziert stattdessen Toleranz, d.h. eine Nichtreaktivität, gegenüber dem Antigen. Viele Tumoren verhindern daher eine effiziente T-Zell-Aktivierung, indem sie mit der DZ-Aktivierung interferieren, den Transport von antigenexprimierenden Zellen zu den Lymphknoten blockieren oder nur geringe Mengen des Tumorantigens exprimieren (Spiotto et al., 2003; Spiotto et al., 2002; Ochsenbein et al., 2001). Die Effizienz des T-Zell-Primings wird weiterhin auch von der Frequenz der spezifischen T-Zellen und der Affinität des T-Zell-Rezeptors (TZR) für den Tumorantigen-MHC-Komplex bestimmt (Overwijk et al., 2003; Spiotto et al., 2003). Es wird angenommen, dass in der Effektorphase eine ungenügende (zytotoxische) T-Zell-Aktivität für das Fehlen einer Tumorabstoßung verantwortlich ist (Spiotto et al., 2004; Ganss et al., 2002). Beispielsweise wurden T-Zellen aus Tumoren isoliert, die *in vitro* lytische Aktivität aufwiesen und daher offensichtlich *in vivo* durch Antigen aktiviert worden waren, jedoch keine Tumorabstoßung herbeiführen konnten (Prevost-Blondel et al., 1998). Nakagomi et al. führten eine mangelnde Effektorfunktion auf Defekte in der Signaltransduktion zurück, da in Krebs-Patienten die TZR-Signalgebung in tumorinfiltrierenden T-Zellen, nicht jedoch in T-Zellen im peripheren Blut, gestört war (Nakagomi et al., 1993). Zytotoxische T-Zell (kurz: CTL, *cytotoxic T lymphocyte*)-Antworten können im tumortragenden Wirt durch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>-Suppressorzellen unterdrückt werden (Yu et al., 2005; Mullen et al., 1985). Selbst wenn eine funktionale CTL-Antwort eingeleitet wird, gelingt vielen Tumoren oftmals durch Verlust des entsprechenden Tumorantigens dem immunologischen Angriff zu entkommen (Spiotto et al., 2004).

### 1.1.1 Die Rolle des Tumorstromas für die immunologische Nichterkennung

Viele Studien belegen inzwischen, dass im Tumor eine spezielle Mikroumgebung geschaffen wird, die zur Vermeidung der immunologischen Zerstörung beiträgt. Eines der besten Beispiele ist das Phänomen der „begleitenden Tumormunität“ (*concomitant tumor immunity*). Hierbei bewirkt ein Primärtumor eine systemische Immunität, ohne selbst eliminiert zu werden. Dagegen werden syngene Tumorzellen, die an anderer Stelle implantiert werden, abgestoßen (Gorelik, 1983; Turk et al., 2004). Die Immunogenität von Tumoren und gleichzeitig ihre Therapierbarkeit sinkt mit der Zunahme an Tumorstroma (Ganss et al., 2004). Mehrere Gruppen zeigten, dass Tumorzellen eine Immunantwort auslösen können, solange sie nicht von Stromazellen umgeben sind (Spiotto et al., 2002; Ochsenbein et al., 1999). So induzierten Sarkomzellen nach Injektion als Zellsuspension eine starke Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und wurden infolgedessen abgestoßen; transplantierte solide Tumorfragmente derselben Zelllinie wurden jedoch ignoriert und lösten keine CTL-Antwort aus (Ochsenbein et al., 1999).

Parenchymzellen und maligne Zellen in soliden Tumoren sind in ein Stroma eingebettet, das aus inflammatorischen Zellen (Makrophagen, DZ, Granulozyten), vaskulären Zellen (Endothelien, Perizyten), Fibroblasten und Extrazellulärmatrix besteht. Stromazellen bilden das Blutgefäßsystem, sorgen für eine mechanische Stabilität, produzieren unter anderem Wachstumsfaktoren und stellen den Fluss von Nährstoffen und Abfallprodukten sicher (Kammertoens et al., 2005; Spiotto et al., 2003). Prämaligene Zellen können durch Stromazellen unter Kontrolle gehalten werden. An einem bestimmten Punkt der Entwicklung von Krebszellen wird jedoch eine inflammatorische Antwort ausgelöst, die zur Rekrutierung neuer Stromazellen und zu Veränderungen im Stroma selbst führen. In der Folge wird das Tumorwachstum gefördert (Blankenstein, 2005; Wiseman und Werb, 2002; Tlsty und Hein, 2001). So löst z.B. der Verlust der TGF $\beta$ -Signalgebung in Stromafibroblasten epitheliale Neoplasien aus (Bhowmick et al., 2004). Ebenso scheinen Stromazellen die Immunerkennung von Tumoren zu blockieren, indem sie etwa die DZ-Reifung verhindern (Gabrilovich et al., 1996; Wang et al., 2004).

Durch Modulation des Stromazellkompartiments kann eine immunologisch vermittelte Abstoßung herbeigeführt werden. Schuler et al. demonstrierten, dass die Aktivierung von Stromafibroblasten durch IL-4 für die Eliminierung von Transplantationstumoren im immunkompetenten Wirt ausreichend war (Schuler et al., 2003). IL-4-aktivierte Fibroblasten schienen hier die Gefäßneubildung durch Angiogenese zu inhibieren, so dass vermutlich eine unzureichende Versorgung der Tumoren in einer Abstoßung resultierte. Blankenstein und Mitarbeiter untersuchten die Rolle von  $\gamma$ -Interferon ( $\gamma$ -IFN) bei der Abstoßung von Transplantationstumoren. Interessanterweise korrelierte die Wirksamkeit von adoptiv transferierten, tumorspezifischen CTL weit besser mit ihrer Fähigkeit,  $\gamma$ -IFN zu produzieren, als mit ihrer direkten Zytotoxizität auf Tumorzellen (Becker et al., 2001; Blankenstein, 2005).  $\gamma$ -IFN wird von CTL und CD4<sup>+</sup>-Th1-T-Zellen nach Antigenstimulation produziert. Knock-out-

Studien zeigten, dass Tumorstromazellen (Endothelzellen) durch  $\gamma$ -IFN moduliert werden. Dies führte zur Inhibition der Angiogenese, schädigte die Tumorgefäße und förderte daher indirekt die Zerstörung des Tumors (Qin et al., 2003; Ibe et al., 2001). Im Gegensatz zu Perforin, dem Effektormolekül der CTL-vermittelten Zytotoxizität, war  $\gamma$ -IFN immer zur Tumorabstoßung erforderlich (Blankenstein und Qin 2003; Seki et al., 2002; Qin et al., 2003). Makrophagen, eine weitere Stromazellpopulation, können in Gegenwart von IL-10 ebenso zur Beseitigung von Tumoren beitragen. Eine hohe intratumorale IL-10-Konzentration verhindert die Infiltration von Makrophagen (Richter et al., 1993). Da Makrophagen jedoch eine wichtige Funktion in der Angiogenese erfüllen, scheint die Tumorabstoßung auch in diesem Fall durch eine defekte Neovaskularisierung herbeigeführt zu sein (Blankenstein, 2005; Richter et al., 1993; Polverini und Leibovich, 1984; Huang et al., 1996). Die Beispiele zeigen, dass neben direkten „Kill“-Mechanismen (wie Perforin) eine Anzahl von Zytokinen (IL-4,  $\gamma$ -IFN, IL-10) zur Tumoreliminierung beiträgt, indem diese auf verschiedene Stromazellen im Tumor einwirken und die Gefäßneubildung negativ beeinflussen.

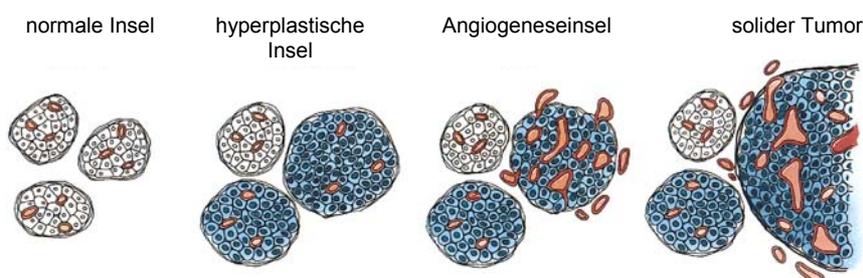
Um die Barrierefunktion des Tumorstromas zu brechen, exprimierten Schreiber und Mitarbeiter das kostimulierende Molekül LIGHT auf Fibrosarkomzellen. In Abwesenheit von LIGHT entwickelten sich solide Tumoren, während die Expression von LIGHT eine Reihe von Zytokinen (CCL21, IP-10, Mig) und Adhäsionsmolekülen (MAdCAM-1) im Stroma induzierte. Infolgedessen konnten naive T-Zellen in den Tumor eintreten, dort aktiviert werden und die Abstoßung des Tumors auslösen (Yu et al., 2004). Auch eine Steigerung der Tumorantigenexpression führte in einem anderen Modell zur Tumorabstoßung. Die höhere Antigenverfügbarkeit im Tumor erhöhte die Kreuzpräsentation durch Tumorstromazellen (DZ?) in den DLK und führte zur Überwindung der immunologischen Ignoranz (Spiotto et al., 2002). Kreuzpräsentierende Stromazellen wurden nach Aktivierung von zytotoxischen Zellen selbst eliminiert. Durch die Zerstörung der Stromazellstrukturen wurden gleichzeitig Tumorzellen beseitigt, die der direkten Erkennung durch CTL entkommen waren („bystander elimination“) (Spiotto et al., 2004; Spiotto und Schreiber, 2005). Die Schädigung des Tumorstromas scheint daher notwendig für die vollständige Zerstörung von Tumoren zu sein.

In den meisten Studien, die eine immuntherapeutische Tumoreliminierung zum Ziel haben, wurden Transplantationstumoren (siehe oben) verwendet oder die Tumorbildung chemisch (Willimsky und Blankenstein, 2000) induziert. Mit einer Therapie wurde meist in frühen Stadien der Tumorentwicklung begonnen. Ein therapeutischer Erfolg bei einer niedrigen Tumorlast bedeutet jedoch nicht, dass solide, stromareiche Tumoren in gleichem Maß auf die Therapie ansprechen. Die Translation dieser Therapieansätze in die klinische Anwendung war daher bisher nur von mäßigem Erfolg (Bremers und Parmiani, 2000). Transgene Tiere, die autochthone Tumoren entwickeln, spiegeln vermutlich die Entwicklung von humanen Tumoren aufgrund ihrer Wachstumskinetik und des Gewebetropismus besser wider, als Transplantationstumoren. Dies wird daran deutlich, dass die

meisten Therapieansätze in transgenen Tiermodellen, wie im Menschen, nur präventiv wirksam sind oder lediglich das Tumorwachstum verlangsamen (Ganss et al., 2002; Garbi et al., 2004). Die Barrierefunktion des Tumorstromas wurde daher in unserer Gruppe an autochthonen  $\beta$ -Zell-Karzinomen (Insulinom) in RIP1Tag5-transgenen Mäusen untersucht.

### 1.1.2 RIP1Tag5-Mäuse (RT5) als Modell für autochthones Tumorwachstum

In RIP1Tag5-transgenen Mäusen (kurz: RT5-Mäuse) wird das Onkogen SV40-Tag (*Simian Virus 40 large T Antigen*) unter der Kontrolle des Insulinpromoters der Ratte (RIP, *rat insulin promoter*) exprimiert. SV40-Tag-exprimierende Zellen werden transformiert, indem das Onkogen an die Tumorsuppressorproteine p53 und Rb (Retinoblastom) bindet und diese inaktiviert (Blouw et al., 2003). Die Expression von SV40-Tag wird spezifisch in  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln im Pankreas induziert und beginnt in adulten, etwa 10 Wochen alten Tieren (Hanahan, 1985; Ganss und Hanahan, 1998). Über einen Zeitraum von 20 Wochen entwickeln sich 2% der etwa 400 Inseln zu hoch vaskularisierten, soliden Tumoren (Hanahan und Folkman, 1996). Im Alter von ca. 31 Wochen sterben die Tiere an einer Hypoglykämie aufgrund der hohen Insulinproduktion in den  $\beta$ -Zelltumoren (Ganss und Hanahan, 1998). Die Tumorbildung durchläuft definierte Stadien (Abbildung 1): In normalen Inseln sind zwar SV40-Tag-exprimierende  $\beta$ -Zellen vorhanden, jedoch zeigen sie keine gesteigerte Proliferation. Im ersten Entwicklungsabschnitt der Karzinogenese löst die Onkogenexpression in ca. 50% der Inseln eine fokale Hyperproliferation der  $\beta$ -Zellen aus (hyperplastische Inseln), die allerdings allein nicht zur Ausbildung von soliden Tumoren ausreicht. Im Alter von ca. 16 Wochen wird in einigen hyperplastischen Inseln die Gefäßneubildung (Angiogenese – siehe unten) induziert. Die Inseln werden in diesem Stadium daher als Angiogeneseinseln bezeichnet. Schließlich bildet ein Teil dieser Inseln durch Expansion der Tumormasse solide Tumoren aus (Ryschich et al., 2002; Hanahan und Folkman, 1996; Folkman et al., 1989; Teitelman et al., 1988).



**Abbildung 1: Die Entwicklung von RIPTag-Tumoren** (nach Hanahan and Folkman, 1996). Die Tumorentwicklung verläuft über diskrete Stadien: onkogenexprimierende Inseln, hyperplastische Inseln, Angiogeneseinseln und letztlich der hoch vaskularisierte solide Tumor.  $\beta$ -Inseln, in denen keine Proliferation stattfindet, sind nicht koloriert. Gefäße, bzw. die Gefäßneubildung in den Angiogeneseinseln, sind rot dargestellt.

Aufgrund der späten Expression von SV40-Tag sind RT5-transgene Tiere nicht tolerant gegenüber dem Neoantigen; präneoplastische Läsionen werden infolgedessen von SV40-Tag-spezifischen Lymphozyten infiltriert (Ganss et al., 1999). Diese Insulitis führt jedoch, ungeachtet der Anwesenheit selbstreaktiver T-Zellen, nie zur immunologischen Zerstörung der  $\beta$ -Inseln und zu einer Diabetes. Solide Tumoren sind frei von infiltrierenden Lymphozyten und entgehen einer tumorspezifischen Immunantwort. Weder eine erhöhte Frequenz tumorspezifischer T-Zellen, noch ein effizienteres T-Zell-Priming durch die Koexpression des kostimulatorischen Moleküls B7.1 und SV40-Tag (Ganss und Hanahan, 1998) oder adoptiv transferierte, *ex vivo* aktivierte tumorspezifische CD4<sup>+</sup>- oder CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Garbi et al., 2004) bewirkten eine Tumoreliminierung.

In RT5-Tieren können zu jedem Zeitpunkt der Tumorentwicklung funktionelle CTL-Effektorzellen generiert werden, wie durch Immunisierung mit SV40-Tag gezeigt werden konnte. Ein Antitumoreffekt dieser Vakzinierung war jedoch nur in frühen Tumorstadien wirksam. Die fehlende Tumoreliminierung beruht daher nicht auf einer systemischen Toleranzinduktion während der Karzinogenese (Garbi et al., 2004). Adoptiv transferierte, naive SV40-spezifische CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen wurden in RT5-Tieren aktiviert. Tumorantigen wurde daher während der gesamten Entwicklung in den pankreatischen Lymphknoten (kreuz)präsentiert (Ganss et al., 2002; Garbi et al., 2004). Ein defektes Priming tumorspezifischer Lymphozyten infolge zu geringer Antigenmengen in den Lymphknoten ist daher nicht wahrscheinlich. Dagegen ist die Extravasation bereits zu Beginn der Neovaskularisierung in Angiogeneseinseln stark eingeschränkt, da – wie durch Intravitalmikroskopiestudien nachgewiesen wurde – die Anzahl der an Endothelzellen haftenden Leukozyten deutlich erniedrigt ist (Ryschich et al., 2002). Daher scheinen die Veränderungen während der Tumorentwicklung maßgeblich dazu beizutragen, dass tumorspezifischen Lymphozyten der *Zugang* in den Tumor verwehrt wird. Eine der wohl einschneidendsten Veränderungen stellt das „Einschalten“ der Angiogenese dar, wobei eine ganze Batterie von Genen induziert bzw. reprimiert wird. So verändern sich Endothelzellen während der Tumorentwicklung und exprimieren Proteine, die typisch für Angiogenesegefäße sind (St. Croix et al., 2000; Griffioen et al., 1996). Die Bedeutung der Angiogenese für die Tumorentwicklung in RT5-Tieren wird daran deutlich, dass die Blockierung der Angiogeneseinduktion in prämaligen Läsionen die Bildung solider Tumoren verhindert (Bergers et al., 1999; Bergers et al., 2003). Im folgenden werden daher zunächst die Grundlagen der Angiogenese im Normalgewebe, anschließend der pathologischen Angiogenese im Tumor erläutert.

### **1.1.3 Die Angiogenese ist für zelluläres Wachstum essentiell**

Die Gefäßneubildung in einem bereits existierenden Gefäßnetzwerk wird als Angiogenese bezeichnet. Endothelzellen (EZ) bilden das Grundgerüst der Gefäße und gehören zu den langlebigsten Zellen außerhalb des Zentralnervensystems (Hanahan und Folkman, 1996). Aus diesem Grund ist das

Gefäßsystem im adulten Stadium in der Regel ruhend. Ausnahmen sind Phasen des aktiven Gefäßbaus im Granulationsgewebe während der Wundheilung oder in den weiblichen Fortpflanzungsorganen während des Menstruationszyklus oder einer Schwangerschaft. In der Embryonalentwicklung ist aufgrund des schnellen Wachstums eine hohe Angiogeneseaktivität für die Versorgung der Gewebe notwendig. Im Embryo wird zunächst ein primitives Netzwerk aus endothelialen Vorläuferzellen gebildet (Vaskulogenese). In der anschließenden Angiogenese wird das primäre Gefäßsystem ausgebaut, indem neue Gefäße durch Ausstülpung und Proliferation der Endothelschicht (Aussprossung oder *Sprout*) entstehen. Der Angiogeneseprozess wird durch ein Gleichgewicht von angiogenesehemmenden (angiostatischen) und -fördernden (proangiogenen) Faktoren kontrolliert und wird induziert, wenn proangiogene Faktoren, wie VEGF-A, bFGF und PDGF<sup>1</sup>, überwiegen. Um die neu gebildeten Gefäße bildet sich eine membranöse Schicht (Basalmembran) aus extrazellulärer Matrix. Im nachfolgenden Reifungsstadium werden Stützzellen (Perizyten (PZ), glatte Muskelzellen (SMC<sup>2</sup>)) rekrutiert. Während die großen Gefäße von einer oder mehreren Schichten von SMC umgeben werden, umhüllen Perizyten die kleineren Gefäße und Kapillaren (Morikawa et al., 2002; Zimmermann et al., 1923). Dabei wird das Netzwerk, gesteuert von einem komplexen Zusammenspiel von Faktoren, durch Verzweigung, Expansion und „Zurückschneiden“ („*Pruning*“) der Gefäße, den lokalen Bedürfnissen angepasst (Carmeliet, 2003; Jain, 2003). Schließlich entsteht ein hierarchisch aufgebautes Gefäßsystem, wobei bei größeren Gefäßen zwischen arteriolen oder venösen Gefäßen unterschieden wird. Diese Spezialisierung hängt ab von der Herkunft der Gefäßvorläuferzellen (Hirschi und Majesky, 2004; Carmeliet, 2000) bzw. kann *in situ* durch Stimulierung entsprechender endothelialer Rezeptoren (Notch, Neuropillin, Ephrin-B2-Rezeptor) induziert werden (Carmeliet, 2003; Yancopoulos et al., 2000). Die Kommunikation von Endothelzellen untereinander und mit ihren Nachbarn (PZ/SMC) trägt entscheidend zur Bildung stabiler Gefäße und zu deren Erhalt und Funktion bei. Beispielsweise wird über eine Kommunikation die Zellproliferation von Endothelien (über VEGF-A) oder Perizyten (über PDGF-BB) reguliert. Ebenso wird der Blutfluss bzw. die Gefäßkonstriktion (d.h. die Kontraktion der Gefäßmuskulatur) über die Zell-Zell-Kommunikation gesteuert (Carmeliet, 2003). Die Angiogenese ist ein wesentlicher Schritt in der Pathogenese zahlreicher Krankheiten, wie Krebs, Diabetes, Atherosklerose oder rheumatoider Arthritis (Gerhardt und Betsholtz, 2003; Carmeliet, 2003).

#### **1.1.4 Tumorangiogenese – Die Gefäßneubildung während des Tumorwachstums**

Tumorwachstum und Metastasierung sind auf eine Neubildung von Gefäßen angewiesen. So lösen beispielsweise Tumorfragmente selbst in der nichtvaskularisierten Cornea eine Neovaskularisierung aus (Gimbrone et al., 1972). Die Entwicklung der meisten Tumoren erfolgt zunächst ohne die Bildung

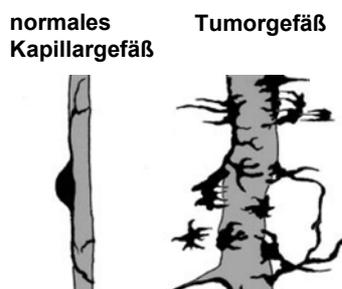
<sup>1</sup> VEGF = *vascular endothelial growth factor* (vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor); bFGF = *basic fibroblast growth factor*; PDGF = *platelet-derived growth factor*.

<sup>2</sup> engl.: *smooth muscle cells*

von neuen Blutgefäßen. Mit der Zunahme der Tumormasse steigen jedoch Nährstoff und O<sub>2</sub>-Bedarf an, so dass eine Gefäßneubildung erforderlich wird. Der Übergang in die Angiogenese phase (sog. „*Angiogenic Switch*“) stellt einen wesentlichen Schritt in der Karzinogenese dar. Dessen Blockierung ist daher ein entscheidender Ansatzpunkt in der Tumorthherapie. Die Angiogenese phase wird eingeleitet, wenn infolge der sinkenden O<sub>2</sub>-Konzentration im Tumor der Hypoxie-empfindliche Faktor (HIF; *hypoxia-inducible factor*) induziert wird. Dieser löst die Expression einer Reihe von Genen, wie der NO-Synthase und VEGF-A, aus (Pugh und Ratcliffe, 2003). NO (Stickstoffmonoxid) veranlasst zunächst die Dilatation der bestehenden Gefäße; im RT5-Tumor wird dies schon in frühen Angiogeneseinseln deutlich (Ryschich et al., 2002). VEGF-A hingegen ist der Schlüsselfaktor bei der Initiation der Gefäßneubildung und bewirkt die Proliferation von Endothelzellen und eine erhöhte Durchlässigkeit der Gefäße für Plasmaproteine („*leakiness*“). Gleichzeitig kommt es zur Degradation von Basalmembran und Extrazellulär matrix, wobei weitere Angiogenesefaktoren (u.a. VEGF-A, bFGF) freigesetzt werden. Endothelzellen wandern ins Tumorstroma ein und aus dem Blut ausgetretene Plasmaproteine schaffen eine provisorische Matrix für die Migration der Endothelzellen (Bergers und Benjamin, 2003; Jain, 2003). Proliferierende Endothelzellen bilden neue Gefäßspitzen und synthetisieren den chemotaktischen Faktor PDGF-BB, der seinerseits die Proliferation von Perizyten fördert und deren Migration entlang der Endothelaussprossung auslöst. PDGF-BB bindet dabei an den PDGFR $\beta$ -Rezeptor auf Perizyten (Hellstrom et al., 1999; Bergers und Benjamin, 2003). Im Normalgewebe wird der Ruhezustand durch eine präzise Kontrolle des Gleichgewichts von Angiogeneseinhibitoren und -aktivatoren sicher gestellt. Der Gefäßreifungsprozess setzt ein, wobei Endothelzellen einen dichtumschlossenen Hohlraum (Lumen) bilden und schließlich einen stabilen Ruhezustand einnehmen. Dabei stabilisieren Perizyten die Gefäße und vermitteln die Inhibition der Endothelproliferation. Im Tumor allerdings ist die Regulation beeinträchtigt und die Angiogenese prozesse können nicht mehr abgeschaltet werden. Infolgedessen werden kontinuierlich neue Gefäße (Neogefäße) gebildet (Bergers und Benjamin, 2003).

Im RT5-Modell und in anderen Tumoren unterscheidet sich die Morphologie von Tumor- und Normalgefäßen gravierend. Tumorgefäße sind unregelmäßig geformt, chaotisch und sind nicht in arterielle oder venöse Gefäße untergliedert. Stattdessen besitzen sie Eigenschaften von beiden Gefäßtypen. Außerdem sind die Gefäße undicht, so dass Hämorrhagien (Einblutungen, auch als *blood lakes* bezeichnet) und ein erhöhter interstitieller Druck resultieren. Weiterhin ist der normale Blutfluss im Tumor gestört (Ryschich et al., 2002; Bergers und Benjamin, 2003; Jain, 2003). Der normalerweise enge Kontakt von Endothelien und Perizyten ist in Tumoren gelöst (Benjamin et al., 1999; Morikawa et al., 2002; Jain, 2003). Trotz der lockeren Assoziation scheinen Tumorgefäße dennoch durch Perizyten stabilisiert zu werden. Dies wurde daran deutlich, dass solide RIPTag-Tumoren durch eine Blockade der Perizytenrekrutierung sehr viel sensitiver gegenüber dem Entzug von VEGF wurden (Bergers et al., 2003). Obwohl die molekularen Kontrollen der Gefäßanomalien nicht geklärt sind,

scheint ihre Ursache in einem Ungleichgewicht der Angiogenesefaktoren zu liegen (Bergers und Benjamin, 2003; Jain und Munn, 2000).



**Abbildung 2: Aufbau von Normalgefäßen und Tumorgefäßen (nach Morikawa et al. 2002).** Die schematische Skizze ist repräsentativ für Gefäße in RIPTag-Tumoren. In normalen Kapillaren ziehen sich Perizyten entlang der Gefäße und bilden dünne Fortsätze aus, die mit dem Endothelzellgefäß (hellgrau dargestellt) in engem Kontakt stehen. In Tumorgefäßen sind Perizyten dagegen nur locker mit Endothelzellen assoziiert und besitzen Fortsätze, die von den Gefäßen wegweisen (Morikawa et al., 2002)

### 1.1.5 Die Durchbrechung der intrinsischen Tumorbarriere

Während der Tumorentwicklung wird im RT5-Tumor mit der Einleitung der Angiogeneseprozesse eine charakteristische Mikroumgebung geschaffen. Dies spiegelt sich in morphologischen Anomalien der Tumorgefäße, einer gestörten Leukozyten-Anhaftung an den Endothelgefäßen (siehe oben) und dem zahlreichen Auftreten von Hämorrhagien wider. Letztendlich resultiert daraus, dass Lymphozyten aus soliden RT5-Tumoren ausgeschlossen werden. In dieser Arbeitsgruppe wurde demonstriert, dass die in der Angiogenese ausgelösten Veränderungen durch eine geeignete Antitumorthérapie reversibel sind (Ganss et al., 2002).

In RT5-Tieren konnte die Tumortoleranz durch Interferenz mit der Mikroumgebung gebrochen werden. Eine Bestrahlung (Ganss et al., 2002) oder systemische Verabreichung von CpG-ODN<sup>3</sup> (Garbi et al., 2004) erzeugte ein proinflammatorisches Tumormilieu, in den Endothelgefäßen wurden Adhäsionsmoleküle (VCAM, ICAM) hochreguliert und adoptiv transferierte Effektor-T-Zellen konnten in das Tumorstroma eintreten. Diese Immuntherapie war offensichtlich von der „Öffnung“ der Tumorgefäße durch Entzündungsprozesse abhängig und ermöglichte eine Eliminierung der soliden Tumoren nach massiver Infiltration (Garbi et al., 2004; Ganss et al., 2002). Die kombinierte Strahlen-/Immuntherapie löste eine Umbildung des Tumorgefäßsystems aus und führte zu einer Gefäßstruktur, die jener in normalen Geweben ähnelte. Dieser Prozess wurde daher als Gefäßnormalisierung bezeichnet (Ganss et al., 2002). Therapierte Tumoren wiesen weder die tumortypischen Lakunen (Hohlräume) oder Hämorrhagien auf, noch zeigten sie unregelmäßige Gefäßdurchmesser. Die

<sup>3</sup> CpG-ODN sind Cytosinphosphothioatguaninsequenzen, die Oligodeoxynukleotide enthalten und von Bacillus-Calmette-Guerin DNA abgeleitet sind. Es aktiviert u.a. antigenpräsentierende Zellen (z.B. fördert es die Reifung von DZ) oder NK-Zellen und unterstützt T-Zell-vermittelte Immunantworten (Garbi et al., 2004; Krieg et al., 2000; Krieg, 2003; Kawarada et al., 2001).

„Normalisierung“ wurde auf die Induktion proinflammatorischer und angiogenesehemmender Faktoren ( $\gamma$ -IFN, Mig, IP10 und TNF $\alpha$ ) durch Zellen der angeborenen Immunabwehr zurückgeführt (Ganss et al., 2002). Der Gefäßumbau und die Expression von Adhäsionsmolekülen beeinflussen vermutlich direkt die erhöhte Lymphozytenextravasation.

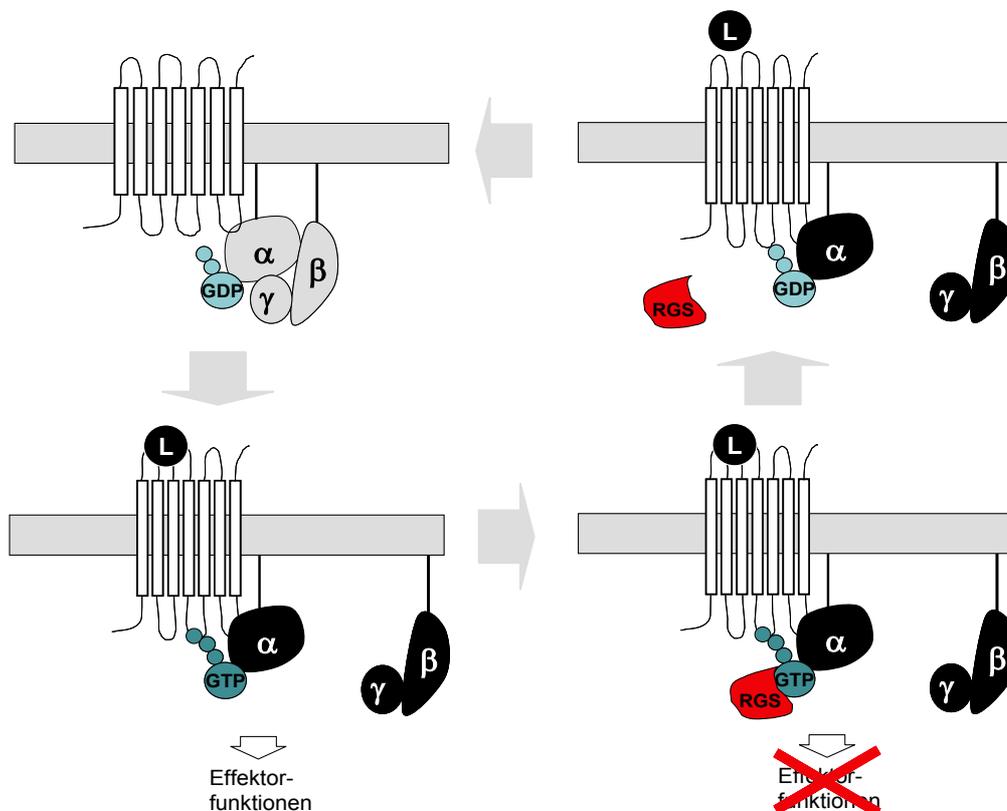
Es ist noch weitgehend unklar, welche molekularen Veränderungen in den Gefäßen ursächlich an dem progressiven Tumorwachstum oder der therapeutisch bedingten Regression beteiligt sind. Bisher wurde gezeigt, dass Endothelzellen im Laufe der Entwicklung „umprogrammiert“ werden (St.Croix et al., 2000) und eine neue Palette von potentiell therapeutisch relevanten Tumorantigenen exprimieren. Endothelzellen stellen somit zweifelsohne ein wichtiges Ziel in der Antitumortherapie dar. Neuere Daten belegen dies ebenso für Perizyten (Bergers et al., 2003). Im Zuge der molekularen Charakterisierung der Tumorgefäße im RT5-Tumormodell richteten wir unser Augenmerk auf eine neue Familie von G-Protein-Regulatoren, die RGS-Familie. Bereits vor Beginn dieser Arbeit war in dieser Arbeitsgruppe ein Molekül dieser Proteinfamilie, RGS5, in Tumorgefäßen identifiziert worden.

## 1.2 DIE RGS-FAMILIE DER G-PROTEIN-REGULATOREN

RGS-Proteine wurden erstmals in genetischen Studien in der Hefe entdeckt und dort als „Pheromon Desensitationsfaktor Sst2p“ bezeichnet. Eine Mutation von Sst2p hatte hier einen äußerst Pheromon-sensitiven Hefe-Phänotyp hervorgebracht. Es konnte gezeigt werden, dass Sst2p die Signaltransduktion über Gpa1, der  $\alpha$ -Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins in der Hefe, negativ regulierte (Dohlmann et al., 1995). Bei Studien in *Caenorhabditis elegans* wurde später ein Sst2p-Homologon entdeckt, welches ebenso G $\alpha$ -Untereinheiten inhibierte (Koelle und Horvitz, 1996). Nachfolgende Studien wiesen dann Sst2p-ähnliche Moleküle in einer Vielzahl von Spezies von Fungus bis Mensch nach. Die regulatorische Funktion dieser Molekülklasse auf G-Proteine gab der neuen Proteinfamilie der RGS-Proteine (*Regulator of G-Protein Signaling*) ihren Namen. Inzwischen sind über 30 Mitglieder der RGS-Familie entdeckt worden, die sich durch eine etwa 120 Aminosäure große semikonservierte Sequenz, die RGS-Domäne, auszeichnen (Lee und Adams, 1994; Berman et al., 1998; Dohlmann und Thorner, 1997; Hollinger und Hepler, 2002).

Heterotrimere G-Proteine kontrollieren eine Vielzahl von Signalwegen, die an Prozessen wie der kognitiven und sensitiven Wahrnehmung, der Zellproliferation, Zellmigration oder dem Zellwachstum beteiligt sind. Sie stellen damit die größte Proteinfamilie im Genom dar (Takeda et al., 2002). So sind alle Chemokinrezeptoren, der Photonenrezeptor Rhodopsin in der Retina oder Geruchsstoffrezeptoren im olfaktorischen Epithel der Nase, G-Protein-gekoppelt. Essentieller Bestandteil der Signalgebung ist

ein heptahelikaler Transmembranrezeptor, der auf der zytoplasmatischen Seite über eine Bindungsstelle für G-Proteine verfügt. Im inaktiven Zustand des Rezeptors ist ein Komplex aus  $G\alpha$ ,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit, sowie Guanosindiphosphat (GDP), fest mit dem Rezeptor verbunden (Abbildung 3). Bindet ein Ligand auf der extrazellulären Seite, kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, die daraufhin GDP freisetzt und die Bindung von GTP (Guanosintriphosphat) bewirkt. Der heterotrimere Komplex dissoziiert in  $G\alpha$  und  $\beta\gamma$ -Untereinheit, die unabhängig voneinander das Signal der Rezeptoraktivierung durch Interaktion mit Effektormolekülen, wie Adenylatzyklasten oder Phospholipasen, weitergeben. RGS-Moleküle binden aktivierte, GTP-gebundene  $G\alpha$ -Untereinheiten und beschleunigen deren intrinsische GTPase-Aktivität. In Gegenwart von RGS-Molekülen wird so die Deaktivierung des G-Proteins, die etwa 1 s dauern würde, 100- bis 300fach beschleunigt (Hollinger und Hepler, 2002). Der Mechanismus der Deaktivierung beruht auf der hydrolytischen Spaltung des GTP durch nukleophilen Angriff eines  $H_2O$ -Moleküls. Dabei sind Aminosäurereste in so genannten „switch“-Regionen der  $G\alpha$ -Untereinheiten an der Ausrichtung des Wassermoleküls beteiligt. Die katalytische Wirkung der RGS-Moleküle, als GAP Aktivität (*GTPase accelerating protein activity*) bezeichnet, ist primär auf die Stabilisierung der „switch“-Aminosäuren im Übergangszustand zurück zu führen (Tesmer et al., 1997; Berman et al., 1996).



**Abbildung 3: Prinzip der G-Protein-gekoppelten Signalgebung.** Im inaktiven Zustand (links oben) liegen G-Proteine als Komplex mit GDP vor. Die Ligandenbindung (links unten) bewirkt die Dissoziation des G-Proteins und dessen Aktivierung durch GTP-Bindung.  $G\alpha$  aktiviert daraufhin weitere Effektormoleküle (Gs z.B. aktiviert Adenylatzyklasten,  $Gq$  aktiviert u.a. die Phospholipase C (PLC)). RGS-Moleküle fördern die Inaktivierung (rechts unten) von  $G\alpha$ , wobei der Ausgangszustand mit der Reaggregation der Untereinheiten wieder hergestellt wird. L: Ligand;  $\alpha, \beta, \gamma$ : G-Protein-Untereinheiten

Pathologische Veränderungen, beispielsweise im Herz-Kreislauf-System, wurden in einigen Studien auf eine abnorme Expression verschiedener RGS-Moleküle infolge einer Fehlregulation der GPCR-Signalgebung zurück geführt. Da Herz-Kreislauf-Erkrankungen (wie Hypertonie, koronare Herzkrankheit, Schlaganfall, Infarkt) mit der höchsten Mortalität in der westlichen Welt verbunden sind, rücken auch RGS-Moleküle zunehmend in das Interesse der Forschung. Es wird angenommen, dass eine pharmakologische Modulation der RGS-Aktivität zur Therapie von Krankheiten beitragen könnte, die durch eine pathologische GPCR-Signalgebung gekennzeichnet sind (Mittmann et al., 2002). Die folgende Arbeit konzentriert sich auf das Molekül RGS5, das aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit RGS1, RGS2, RGS3, RGS4, RGS8, RGS12, RGS16 und RGS18 zur R4-Unterfamilie gerechnet wird (Ross und Wilkie, 2000). Mit Ausnahme der RGS-Sequenz und einer kurzen N-terminalen amphipathischen Helix, die vermutlich der Membranassoziation dient, besitzt keines der RGS-Moleküle der R4-Familie klassische Strukturdomänen. In den meisten RGS-Molekülen anderer Subfamilien treten dagegen eine Vielzahl von Domänen auf, wie beispielsweise GGL- (*G protein gamma subunit like*), RBD- (Rap1/2-Bindedomänen) oder PH (Pleckstrin-Homologie)-Domänen. Mit Ausnahme von RGS3 sind alle Mitglieder der R4-Familie sehr klein und besitzen nur eine kurze N-terminale Sequenz außerhalb der RGS-Domäne, die sie voneinander unterscheidet. Es wird daher angenommen, dass R4-RGS-Moleküle primär als G-Protein-Inhibitoren agieren (Hollinger und Hepler, 2002).

### **1.2.1 Regulator of G Protein Signaling 5 (RGS5)**

Koelle et al. untersuchten cDNA-Banken aus dem Gehirn mit Hilfe degenerierter Oligonukleotide in der PCR, um Gene im Säugergenom zu identifizieren, die ebenso wie RGS1 und RGS2 stark konservierte RGS-Domänen enthielten. Dabei wurden erstmals die cDNA-Sequenzen von RGS3 bis RGS11 isoliert (Koelle und Horvitz, 1996). RGS1 und RGS2 waren bereits zuvor von anderen Gruppen in aktivierten B-Zellen bzw. Monozyten entdeckt worden (Murphy und Norton, 1990; Siderovski et al., 1994). Seit Beginn dieser Dissertationsarbeit hat sich die Zahl der Publikationen über RGS5 mehr als verdoppelt. In der Zeit von 1996 bis heute sind mittlerweile rund 40 Veröffentlichungen erschienen – ein Beweis für das zunehmende Interesse an diesem G-Protein Regulator. Trotz intensiver Bemühungen in verschiedenen Forschungsbereichen ist bisher die physiologische Funktion von RGS5 im Zusammenspiel mit den anderen naheverwandten RGS-Molekülen weitestgehend ungeklärt geblieben.

#### **A. Die Organverteilung von RGS5**

Im Menschen wird RGS5 vor allem in der Aorta exprimiert, sowie in Darm, Magen, Herz, Nebenniere, Schilddrüse, Gehirn, Niere, Lunge und Skelettmuskel (Adams et al., 2000; Seki et al., 1998). Zwar scheint RGS5 im Organismus weit verbreitet zu sein, jedoch zeigten histologische

Analysen, dass die Expression meist auf bestimmte Regionen, im Gehirn z.B. nahezu ausschließlich auf die Hypothalamuskern und gliareiche Schichten im Hippocampus, fokussiert ist (Gold et al., 1997). Auf zellulärer Ebene wurde RGS5 in Kapillargefäßen und *in vitro* in primären Endothelzellen (HUVEC-Zellen) detektiert (Kirsch et al., 2001; Bell et al., 2001; Horrevoets et al., 1999). Neueren Berichten zufolge, die im Verlauf dieser Doktorarbeit erschienen sind, wird RGS5 im embryonalen ZNS (Zentralnervensystem) ausschließlich in Perizyten exprimiert (Bondjers et al., 2003). Die Genexpressionsanalyse von SMC aus Aorta oder Vena cava ergab, dass RGS5 um ein Vielfaches höher in der Aorta exprimiert wird (Adams et al., 2000). Kürzlich wurde RGS5 auch in arteriellen SMC, sowie in viszeralen SMCs im Embryo detektiert (Bondjers et al., 2003; Li et al., 2004). Im Herz scheint RGS5 nur in interstitiellen, fibroblastenähnlichen Zellen im Myokard und in ventrikulären Kardiomyozyten exprimiert zu sein (Kardestuncer et al., 1998). Zu Beginn dieser Arbeit schien die Expression von RGS5 vorwiegend in Endothelzellen und SMC lokalisiert zu sein. Eines unserer Ziele war daher, die genaue Lokalisation von RGS5 im RT5-Tumor zu klären.

### B. Der Mechanismus der RGS5-Aktivität

Der Mechanismus der RGS5-Regulation wurde in verschiedenen In-vitro-Systemen untersucht. Die Bindung von RGS5 an die  $G\alpha$ -Untereinheiten  $G_{i1-3}$ ,  $G_o$ ,  $G_q$ , jedoch nicht an  $G_s$  und  $G_{13}$ , in Gegenwart von GDP/Fluoraluminat<sup>4</sup> ist zweifelsfrei belegt (Zhou et al., 2001). Die GAP-Aktivität wurde bisher für  $G_{i1}$ ,  $G_o$  und  $G_q$  *in vitro* nachgewiesen (nicht  $G_s$  oder  $G_{12}$ ) und stimmt damit mit den Bindungsdaten überein (Cho et al., 2003). Die Rezeptorselektivität von RGS5 wurde nach Überexpression von RGS5 und/oder einem entsprechenden Rezeptor in Säugerzellen bestimmt. RGS5 inhibierte in diesen Systemen die Signalgebung über exogen eingeführte Sphingosin-1-phosphat-Rezeptoren (=EDG<sub>1</sub>) und Acetylcholinrezeptoren (M<sub>3</sub>-Typ). Zudem wurde die Signaltransduktion über endogene Rezeptoren für Angiotensin-II (AT<sub>1A</sub>R), Endothelin-1 (ET<sub>A</sub>) und PDGF-BB (PDGFR $\beta$ ) spezifisch durch RGS5 blockiert (Wang et al., 2002; Anger et al., 2004; Zhou et al., 2001; Cho et al., 2003). Mit Ausnahme der Rezeptortyrosinkinase PDGFR $\beta$  sind alle anderen Rezeptoren in der Regel über  $G_q$ -gekoppelt und sind vermutlich aus diesem Grund durch RGS5 regulierbar. Inwieweit diese Daten die physiologische Rezeptorkopplung von RGS5 wiedergeben, ist unklar, da bisher weder eine physische Interaktion von RGS5 mit einem dieser Rezeptoren, noch eine Funktion *in vivo* nachgewiesen wurde. Nichtsdestoweniger ist die potentielle Regulierbarkeit vasoaktiver Signalwege (Angiotensin, Endothelin, PDGF etc.) vor dem Hintergrund der Expression von RGS5 in Gefäßzellen interessant.

---

<sup>4</sup> Fluoraluminat (AlF<sub>4</sub><sup>-</sup>)/GDP-gebundenes  $G\alpha$  imitiert den Übergangszustand der GTP-Hydrolyse. Daher binden fast alle RGS-Moleküle *in vitro* sehr viel stärker an diesen Komplex, als an ihr physiologisches Substrat.

### C. RGS5 in der Pathogenese von Krankheiten

Die Modulation der RGS5-Expression wurde bisher mit der Pathogenese verschiedener Krankheiten in Verbindung gebracht. So war RGS5 in zerebralen Mikrogefäßen apoplexieanfälliger Ratten wesentlich geringer exprimiert als in Gefäßen aus nichtanfälligen Kontrolltieren. Der Schlaganfall resultiert dabei aus einem Defekt der die Blut-Gehirn-Schranke bildenden Gefäße und die Autoren vermuteten einen Zusammenhang zwischen RGS5-Expression und der Integrität der Barriere (Kirsch et al., 2001). Ein aktueller Bericht impliziert eine Rolle von RGS5 bei der Entstehung einer Atherosklerose<sup>5</sup>. In atherosklerotischen Arterien wurde RGS5 von medialen SMC exprimiert, war jedoch in SMC der Arterioskleroseplaques stark herunter reguliert (Li et al., 2004). Vermutlich ermöglicht der Verlust von RGS5 eine pathologische Proliferation von Plaque-SMC. RGS5 wurde auch in Nierentumoren detektiert. So war RGS5 im humanen Nierenzellkarzinom („*clear cell-RCC*“) im Vergleich zum normalen Nierenparenchymgewebe höher exprimiert (Rae et al., 2000). Dieser Befund war im Hinblick auf die Expression von RGS5 im RT5-Tumor von besonderem Interesse.

#### **1.2.2 Funktionelle Aufklärung von RGS-Molekülen mit Hilfe transgener Tiere**

Die Funktion von RGS5 *in vivo* ist, wie die der meisten RGS-Familienmitglieder, unbekannt. Ausnahmen sind jedoch RGS1, RGS2 und RGS9-1, deren Funktion durch *Knock-out*-Mäuse zum Teil aufgeklärt werden konnte. RGS9-1 beschleunigt die GAP-Aktivität der retinalen  $\alpha$ -Isoform Transduzin und ist daher essentiell in der Phototransduktion (Chen et al., 2000). RGS2 scheint bei dem „Ausschalten“ von Vasopressorsignalen<sup>6</sup> beteiligt zu sein, da RGS2-Knock-out-Mäuse einen basal erhöhten Blutdruck aufweisen (Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003). RGS1 schließlich spielt eine Rolle bei der Zielsteuerung von aktivierten B-Zellen (Han et al., 2005; Moratz et al., 2004). Die biologische Funktion von RGS4, dem nächsten „Verwandten“ von RGS5, ist ebenso nicht geklärt. Kürzlich wurden in der Literatur erstmals RGS4-Knock-out-Tiere erwähnt, die jedoch phänotypisch unauffällig waren (Grillet et al., 2005). Allerdings weisen Befunde aus RGS4-überexprimierenden transgenen Tieren auf eine Funktion von RGS4 im kardiovaskulären System hin. Hier war die Induktion einer Herzhypertrophie durch die RGS4-vermittelte chronische Hemmung von hypertrophischen Signalwegen blockiert (Rogers et al., 1999). Wir hoffen, dass die Charakterisierung von RGS5<sup>-/-</sup>-Mäusen (Kapitel 4.4) einen wesentlichen Beitrag dazu leisten wird, die In-vivo-Funktion von RGS5 zu verstehen.

---

<sup>5</sup> Diese arterielle Erkrankung wird primär durch die Schädigung des Gefäßendothels, z.B. durch chronisch hohe Cholesterinkonzentration im Blut, hervorgerufen. Dadurch wird ein von Endothelzellen, Monozyten und Makrophagen angeführter Entzündungsprozess in Gang gesetzt, der die Migration von SMCs von der Media in die Intima auslöst und dort die Proliferation der SMC bewirkt. Diese Gefäßläsionen entwickeln sich zu fibrinösen Plaques mit lipidreichen nekrotischen Kernen, die in das Gefäßlumen ragen und den Blutstrom hindern (Ross, 1999; Hao et al. 2003). Die Ruptur der Plaques kann zu Thrombosen, Myokardinfarkt und Schlaganfall führen (Glass und Witztum, et al. 2001).

<sup>6</sup> Vasopressoren lösen die Kontraktion der Gefäßmuskulatur aus

## 2 Zielsetzung

Die spezielle Mikroumgebung eines Tumors trägt entscheidend zu dessen Malignität bei. Im RIP1Tag5-Tumor wird die immunologische Tumorablewehr verhindert, da Lymphozyten im Lauf der Tumorentwicklung aus dem Tumor ausgeschlossen werden. Das zentrale Thema dieser Arbeitsgruppe ist es, die Mechanismen aufzuklären, die diesen Ausschluss bewirken. MikrokapillargefäÙe regulieren aktiv den Durchtritt von Zellen aus dem Blut in das Gewebe und erfahren während des Tumorstwachstums einschneidende Veränderungen. Sie stellen daher einen wichtigen Angriffspunkt für Tumorthapien dar. So wird beispielsweise durch Immuntherapie oder durch Gabe von Angiogeneseinhibitoren versucht die Tumortoleranz zu überwinden, indem die GefäÙe für Immunzellen/Therapeutika „geöffnet“ werden.

Um die Veränderungen während des Tumorstwachstums verfolgen und besser verstehen zu können, wurden in der Gruppe von Frau Dr. Ganss KapillargefäÙe aus normalen Langerhans'schen Inseln und TumorstblutgefäÙen auf molekularer Ebene miteinander verglichen. Die Genexpressionsanalyse ergab, dass RGS5 in den TumorstgefäÙen signifikant hochreguliert war. Die Funktion von RGS5 als G-Protein-Regulator ist mechanistisch bereits wiederholt untersucht worden. Dennoch ist die physiologische Aufgabe bisher weitgehend ungeklärt. Das Ziel dieser Arbeit war daher, (1.), die Charakterisierung von RGS5 im Hinblick auf dessen Expression und Regulation während der Karzinogenese in einem autochthonen Tumormodell (RIP1Tag5). Weiterhin sollte (2.) die subzelluläre Lokalisation von RGS5 mit Hilfe von Fusionsproteinen immunhistologisch analysiert werden. Um RGS5 auf Proteinebene nachzuweisen, sollten RGS5-spezifische Antikörper generiert werden. (3.) Spezifische Interaktionspartner von RGS5 sollten durch Yeast-2-Hybrid-Screening identifiziert werden, um zur Aufklärung der Spezifität dieses Moleküls beizutragen. (4.) Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war die Aufnahme funktionaler Studien mit Hilfe einer kürzlich in diesem Labor generierten RGS5-defizienten Maus. Da RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere erst in diesem Jahr (2005) für Experimente zur Verfügung standen, war in erster Linie die Funktion von RGS5 im Tumor und im Kreislaufsystem zu klären.

In dieser Arbeit wird RGS5 als ein neuartiger Tumormarker im murinen Insulinom definiert und charakterisiert. Aus klinischer Sicht ist die Kenntnis neuer Markerproteine bedeutsam, da sie neue Möglichkeiten eröffnet, die Tumorentwicklung zu verfolgen oder durch spezifische Interferenz sogar zu beeinflussen. Unsere Daten lassen eine in der Literatur bisher vernachlässigte Rolle von RGS5 im kardiovaskulären System vermuten. Die Charakterisierung von RGS5 könnte daher nicht nur in der Tumorthapie relevant sein, sondern auch neue Aspekte hinsichtlich der molekularen Aufklärung von Volkskrankheiten, wie der Hypertonie und dem Herzinfarkt, aufzeigen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 MATERIALIEN

##### 3.1.1 Allgemeine Chemikalien, Puffer und Medien

Soweit nicht anders angegeben wurden die Chemikalien von den Firmen Roche (Mannheim), Sigma-Aldrich/Fluka (Taufkirchen), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Invitrogen (Eggenstein), Becton-Dickenson (BD) Biosciences (Marken Difco und Clontech; Heidelberg) oder Roth (Karlsruhe) in Analyse-Qualität bezogen.

#### M E D I E N

##### LB Medium/Platten (pH 7,5)

1% (w/v) Bactotrypton (Difco); 0,5% (w/v) Bacto-Hefe Extrakt (Difco); 1% (w/v) NaCl; für Platten zusätzlich 2% (w/v) Select Agar (Invitrogen). Autoklavieren (12 psi, 121°C, 20 min) und nach Abkühlen auf etwa 50°C Antibiotika hinzufügen (Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml).

##### LSLB-Zeocin Medium/Platten (pH 7,5)

1% (w/v) Bactotrypton (Difco); 0,5% (w/v) Bacto-Hefe Extrakt (Difco); 0,5% (w/v) NaCl; 2% (w/v) Agar (nur für Platten). Autoklavieren (12 psi, 121°C, 20 min) und nach Abkühlen auf etwa 50°C Zeocin (25-50 µg/ml, Invitrogen) hinzufügen.

##### D-PBS (Dulbecco's phosphatgepufferte Kochsalzlösung, Gibco #21300)

0,1 g/l CaCl<sub>2</sub>; 0,2 g/l KCl; 0,2 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,049 g/l MgCl<sub>2</sub>; 8,0 g/l NaCl; 1,15 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

##### DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco #31600)

1 g/l D-Glukose; 110 mg/l Natriumpyruvat; 15 mg/l Phenolrot

*Anorganische Salze:* 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>; 200 mg/l CaCl<sub>2</sub>; 0,1 mg/l Fe(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O; 400 mg/l KCl; 97,67 mg/l MgSO<sub>4</sub>; 6,4 g/l NaCl; 125 mg/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O

*Aminosäuren:* 84 mg/l L-Arg; 62,77 mg/l L-Cys; 584 mg/l L-Gln, 30 mg/l L-Gly; 42 mg/l L-His, 105 mg/l L-Ile; 105 mg/l L-Leu; 146 mg/l L-Lys; 30 mg/l L-Met; 66 mg/l L-Phe; 42 mg/l L-Ser; 95 mg/l L-Thr; 16 mg/l L-Try; 104,18 mg/l L-Tyr-dinatrium; 94 mg/l L-Val

*Vitamine:* 4,0 mg/l D-Ca-Pantothenat; 4,0 mg/l Cholinchlorid; 4,0 mg/l Folsäure; 7,2 mg/l i-Inositol; 4,0 mg/l Nikotinamid; 4,0 mg/l PyridoxinHCl; 0,4 mg/l Riboflavin; 4,0 mg/l ThiaminHCl

##### DMEM "high Glucose" (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco #41965)

wie zuvor (Gibco #31600), jedoch: 4,5 g/l Glukose, kein Natriumpyruvat

## P U F F E R

### 50x Denhardt's

0,5% Ficoll (Type 400), 0,5% BSA (Kohn V), 0,5% Polyvinylpyrrolidon

### DEPC Wasser (RNase-frei)

Deionisiertes Wasser mit 0,1% (v/v) DEPC versetzen, über Nacht inkubieren und anschließend autoklavieren.

### 6x DNA Auftragspuffer

100 mM EDTA, pH 8,0; 20% (w/v) Ficoll 400; 0,25% (w/v) Bromphenolblau; 0,25% (w/v) Xylencyanol

### HEPES Puffer (pH 7,9)

6,7 mM KCl; 142 mM NaCl; 10 mM HEPES

### NaCl Lösung:

0,9% NaCl in H<sub>2</sub>O, autoklavieren.

### 1xPBS (pH 7,4)

137 mM (8,0 g/l) NaCl; 2,7 mM (0,2g/l) KCl ; 10 mM (2,68 g/l) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 1,37 mM 0,24 g/l) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 4% PFA Lösung (pH 7,5):

40 g/l Paraformaldehyd (Sigma) wurden in 1xPBS unter Erwärmen und Rühren gelöst, anschließend auf Eis gekühlt, mit NaOH auf einen pH-Wert von 7,5 gebracht und durch einen Faltenfilter filtriert. Die Lösung kann bei -20°C gelagert werden.

### 20x SSC (pH 7,0)

3M NaCl; 0,2M Trinatriumcitrat

### TAE Puffer (pH 8,0)

40 mM Tris-Acetat ; 2 mM EDTA

### 1xTBS

50 mM Tris HCl pH 7,4 ; 150 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O

TE Puffer (pH 8,0)

10 mM Tris HCl; 1 mM EDTA

Trypanblau (pH 7,0)

0,2% Trypanblau; 150 mM NaCl

Trypsin Gebrauchslösung

0,05% Trypsin; 0,5 mM EDTA; 0,3% BSA; 50 µg/ml DNase in PBS pH 7,3

**3.1.2 Materialien für die Arbeit mit Hefen**1xYPDA Medium/±Kanamycin (pH 6,5)

20 g/l Difco Pepton (BD Biosciences/Difco); 10 g/l Hefe Extrakt (Invitrogen)

20 g/l Agar (nur für Platten)

30 mg Adeninhemisulfat

pH-Wert einstellen, autoklavieren (20 min, 121°C, 3 bar), dann sterile Dextrose Lösung (40% w/w) bis zu einer Finalkonzentration von 2% und ggfs. 15 mg/l Kanamycin hinzugeben.

Basisrezept SD-Selektionsmedien und -plattenSD/-Ade/-His/-Leu/-Trp Medium oder SD/-Leu/-Trp Medium (pH 5,8)

1,7 g/l Difco YNB (ohne Aminosäuren oder (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub> Zusatz;  
BD Biosciences)

5,0 g/l (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>

20 g/l Agar (nur für Platten)

0,6 g/l Aminosäure Supplement “-Ade/-His/-Leu/-Trp DO” (BD Biosciences)  
für SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp Medium bzw.

0,64 g/l Aminosäure Supplement “-Leu/-Trp DO” (BD Biosciences)  
für SD/-Leu/-Trp Medium

pH-Wert einstellen und autoklavieren. Dann 50 ml/l sterile Dextroselösung (40%ig, w/v) hinzugeben, auf 50°C abkühlen lassen. 1 ml/l X-α-Gal und für SD/-Leu/-Trp Medien zusätzlich 10 ml/l sterile Adeninhemisulfatlösung (5 g/l) hinzusetzen. Für SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp Medium Platten 2,5 ml/l (2,5 mM) sterilfiltrierte 1M 3-Amino-1,2,4-triazollösung (Sigma #A-8056) hinzugeben.

Die Aminosäurekonzentrationen dieser SD-Minimalmedien sind wie folgt: L-Arginin HCl 20 mg/l, L-Isoleucin 30 mg/l, L-Lysin 30 mg/l, L-Methionin 20 mg/ml, L-Phenylalanin 50 mg/l, L-Threonin 200

mg/l, L-Tyrosine 30 mg/l, L-Uracil 20 mg/l, L-Valin 150 mg/l. Je nach Minimalmedium zusätzlich: L-Leucin 100 mg/l, L-Tryptophan 20 mg/l, L-Histidinmonohydrat 20 mg/l und L-Adeninhemisulfat 70 mg/l.

TEM Puffer:

50 mM Tris pH 7,5; 25 mM EDTA; 1% (v/v) 2-Mercaptoethanol; 10 µl Lyticase in TE 5U/µl.

Letztere wird wie folgt angesetzt: 6,8 mg *Arthrobacter Luteus* Lyticase (Sigma #L-2524; 3490 U/mg Enzym) in 1 ml TE-Puffer lösen und bei -20°C aufbewahren.

10x Lithiumacetat-Lösung (pH 7,5):

1 mol/l Lithiumacetat (Sigma) in H<sub>2</sub>O lösen und pH-Wert mit verdünnter Essigsäure einstellen. Autoklavieren.

LiOAc/PEG Lösung (frisch ansetzen, pH 7,5)

40% PEG 3350 (Polyethylenglykol, Sigma #P2640); 0,1M Lithiumacetat; 1xTE Puffer

Lachs Sperma DNA:

*Salmon sperm DNA* (Sigma #D1626) wurde in H<sub>2</sub>O gelöst (10 mg/ml) und mindestens 4h bei RT gerührt. Die NaCl-Konzentration wurde auf 0,1M eingestellt und die DNA wurde einmal mit Phenol/TE pH7,0 und einmal mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) extrahiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen, zum Scheren der DNA 12x durch eine Kanüle gezogen und die DNA anschließend mit 2 Vol kaltem 100% EtOH gefällt. Nach Zentrifugation (20 min/4°C) wurde die präzipitierte DNA in TE gelöst (20 mg/ml) und eingefroren. Alternativ wurde fragmentierte DNA direkt von Clontech bezogen (Bezeichnung „Yeastmaker Carrier DNA“). Vor Verwendung wurde die DNA etwa 20 min bei 100° C im Heizblock denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt.

X-α-Gal Lösung:

20 mg 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-α-D-galactopyranosid (X-α-Gal; Glycosynth Ltd., Warrington/Cheshire, England) in 1 ml DMF lösen und bei -20°C lagern.

### 3.1.3 Oligonukleotide

#### Klonierungsprimer

Bezeichnung	Gen	Sequenz
MB5_RGS_Sall/Nde -T7P_F	RGS5	ACGCGTCGACGTAATACGACTCACTATAGGGCGAACATATGCCACCA TGTGTAAGGGACTGGCA
MB6_RGS_BglII /Bam myc_R	RGS5	TGGAAGATCTCTACAGGTCCTCCTCTGAGATCAGCTTCTGCTCCTCGG ATCCCTTGATTAGCTCCTTATAAACTCAG
MB7_RGS1- 70_BllI/Bam_myc R	RGS5	TGGAAGATCTCTACAGGTCCTCCTCTGAGATCAGCTTCTGCTCCTCGG ATCCACCTCTCGAACAGGTCCTGA
MB21_pACT2_F	Prey	AAGTGAACCTGCGGGTTTTTCAGTATCTACG
MB22_pACT2_R	Prey	CTATTCGATGATGAAGATACCCACCAAACCC
MB26_actIP KpnI- HindIII-ATG-HA		CCCGGTACCAAGCTTGCCACCATGTACCCATAC GATGTTCCAGATTACGCTAGC
MB27_actIP		GGAAGATCTCTCGAGCAGTATCTACGATTCATAGATCTC
MB28_act_KpnI-Sal- Kozak-ATG-HA		CCCGGTACCGTCGACGCCACCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTAC GCTAGC
MB29_act_XbaI		GCTAGTCTAGACAGTATCTACGATTCATAGATCTC
MB30_ACIII_F	ACIII	CCCGGTACCGTCGACGCCAACATGCCGAGGAACCCAG
MB31_ACIII_HA-R	ACIII	GCTAGTCTAGATCAAGCGTAATCTGGAACATCGTATGGGTAGATATCG GGTTGTCCACCACCTGGT
MB81_GNAI3_F	Gai3	GAAGAATTCATGGGCTGCACGTTGAGCGCCGA
MB82_GNAI3_R	Gai3	GGACTCGAGTCAATAAGCCACATTCCTTAAG
MB116_UCK_XhoI- BamHI_F	UCK	AGC GCT CGA GCA GGA TCC ATGAAGCCGTTGGTCGTGTTCC
MB117_UCK_myc_ R	UCK	GCTGGATCCTCGACCTTACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCG CCTTCTTTGTCAAAAATCTTC
MB115_IIIC1_myc_ R	AC3	GCTGGATCCTCGACCTTACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTCG CTCTGCTTCTCCTTCTCCAC
MB122_IIIC1_Sall_B amHI_R	AC3	GCTGGATCCGTCGACCTTACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTC CTCTCCGCTCTGCTTCTCCTTCTCCAC

#### Primer und Sonden für die TaqMan PCR

RGS5 [6-FAM]-TCTATGCCCTGATGGAGAAGGATTCTCTGC-[TAMRA]  
 HPRT [6-FAM]-CTGGTATTTGCAGATTCAACTTGCCTCATC-[TAMRA]

(Quellen: Eurogentech, Seraing/Belgien, oder Operon, Köln.)

Primer für die Real-Time PCR mit SYBR Green I

<b>Bezeichnung</b>	<b>Konz. [nM]</b>	<b>Sequenz</b>
3' RGS5	300	GCTTTGACTTGGCCCAGAAA
5' RGS5	300	CCTGACCAGATGACTACTTGATTAGCT
3' Desmin	300	GACGCTGTGAACCAGGAGTTC
5' Desmin	300	GCGTTCTGCTGCTCCAAG
3' PDGFR $\beta$	300	GCTCACGGTCTGAGCCATTC
5' PDGFR $\beta$	300	GCTCGGACATTAAGGCTTGCT
3' HPRT	300	ACACCTGCTAATTTTACTGGCAACA
5' HPRT	300	TGGAAAAGCCAAATACAAAGCCTA
3' PDGF-B	300	AAGTTTAAGCACACCCATGACAAG
5' PDGF-B	300	ATTAAATAACCCTGCCACACTCT
3' $\alpha$ SMA	300	GATCCACAAAACGTTCCAGTTG
5' $\alpha$ SMA	300	GCTGTCTACCTTCCAGCAGATGT
3' Tie-2	300	TTTACAACAGCGTCTATCGGACTC
5' Tie-2	300	TCGCCTCTCGACTTCCACAT
3' VEGF-R2	300	GATGCAGGAACTACACGGTCAT
5' VEGF-R2	300	GGTCCCATACTGGTAGGAATCCA
3' CD146	300	CACGACATTGGCTTGAATAGTTG
5' CD146	300	CACGTCACTCCCCATGATGA
3' Claudin-5	300	GCCCAGCTCGTACTTCTGTGA
5' Claudin-5	300	TTAAGGCACGGGTAGCACTCA
3' ACIII	300	TGAGCACGAACTGAACCAGCT
5' ACIII	300	CTTTACCACCTGGGCGGAC
3' Pap7	300	ATGGACAGGCCAAAACCCA
5' Pap7	300	CCAAGGCTTCTTCTGCAGCT
3' 9BP1	300	GCCTCAGGCTCCATTGAAGTA
5' 9BP1	300	TTGCTGATGACCCGTGACC
3' FKBP	300	GGGCTTTGAGGTGCTCGAT
5' FKBP	300	CCATGTCCTCTAGTGGTGGCA
3' Fbn-2	300	GGAACGAGGATGGCGTCTT
5' Fbn-2	300	CTTGGCCGTGTGCAGGTAG
3' Gabarap	300	GATCCGGAAGCGAATTCATC
5' Gabarap	300	GGTGGGTGGAATGACATTGTT
3' UCK	300	CATTGTCGAGAAATACGGCTACAC
5' UCK	300	CTGTGAGTCTGGATTCTTCTTTCA
3' Cpxm1	300	CACCTACCTGGAGCAGGTGC
5' Cpxm2	300	CAATGCCGAGCTCTGTGTCTT
3' Cacybp	300	TGACGCGCGACGGC
5' Cacybp	300	GCAATACTTTGACCTCTTCTAGGTCTTT

### 3.1.4 Plasmide

Die verwendeten Plasmide wurden von folgenden Firmen bezogen: Stratagene (pBlueskript SK), Invitrogen (CMV- Vektoren pBUDCE4.1/Zeocin und pcDNA6V5HisA/Blasticidin, TA Klonierungsvektor pCR2.1, Vektor pRSET B zur Expression rekombinanter His-Tag Fusionsproteine in E. coli), BD Biosciences/Clontech (der CMV-Vektor pEGFPN3, Yeast-2-Hybrid Vektoren pGBKT7, pACT2 und pGADT7) und Amersham (pGEX-6P-1 zur Expression rekombinanter GST-Fusionsproteine in E. coli). Die Plasmidkarten sind im Anhang abgebildet.

### 3.1.5 Primärantikörper und Sekundärreagenzien

#### Primärantikörper:

Antikörper	Klon/ Bezeichnung	Spezies	Isotyp	Bezug	Verdünnung	Stamm-Konz. [mg/ml]
$\alpha$ CD16/CD32	2.4G2	Ratte	IgG2b, $\kappa$	BD Pharmingen, Heidelberg	50 <sup>2</sup>	0,5
$\alpha$ CD31	MEC13.3	Ratte	IgG2a	BD Pharmingen	100 <sup>1</sup>	0,5
$\alpha$ Desmin	D33	Maus	IgG1, $\kappa$	DAKO, Glostrup, Dänemark	300 <sup>1</sup>	0,23
$\alpha$ GAPDH	MAB374	Maus	IgG1	Chemicon, Hofheim	300 <sup>3</sup>	1,0
$\alpha$ HA high affin.	3F10	Ratte	IgG1	Roche, Mannheim	1000 <sup>3</sup>	0,1
$\alpha$ His-Tag	70796-3	Maus	IgG1	Novagen	1000 <sup>3</sup> 25-50 <sup>1</sup>	0,2
$\alpha$ Myc-Tag	9E10	Maus	IgG1	Dr. G. Moldenhauer, DKFZ	1000 <sup>3</sup>	1
$\alpha$ PDGFR $\beta$ ( $\alpha$ CD140b)	APB5	Ratte	IgG2a, $\kappa$	THP Med. Products Wien/eBiosciences	50-100 <sup>2</sup>	0,1
$\alpha$ PDGFR $\beta$	28D4	Maus	IgG2a	BD Pharmingen	10 <sup>1</sup>	0,1
$\alpha$ PDGFR $\beta$	polyklonal	Kaninchen	--	BD Pharmingen	500 <sup>3</sup>	--
$\alpha$ RGS5 (rekombinant)	KOM1 polyklonal	Maus	IgG1	Dr. G. Moldenhauer, DKFZ	100 <sup>1</sup> 1000 <sup>3</sup>	1
$\alpha$ RGS5 (rekombinant)	1M4	Maus	IgG1	Dr. G. Moldenhauer, DKFZ	100 <sup>1</sup> 500-1000 <sup>3</sup>	1
$\alpha$ RGS5 (rekombinant)	2443 (affin.) polyklonal	Kaninchen	--	--	10 <sup>3</sup>	0,1
$\alpha$ RGS5 (Peptid)	LQN (affin.) polyklonal	Kaninchen	--	--	500 <sup>3</sup>	--
$\alpha$ VEGFR2	Avas12a1	Ratte	IgG2a	BD Pharmingen	500 <sup>3</sup>	0,5

(1) Immunfluoreszenz, (2) FACS, (3) Western Blot, (4) andere Applikationen; alle Antikörper sind Anti-Maus Antikörper

#### Markierte Primärantikörper:

Antikörper	Klon	Spezies	Isotyp	Bezug	Verdünnung	Stamm-Konz. [mg/ml]
$\alpha$ ME-9F1:FITC	ME-9F1	Ratte	IgG2a	A. Hamann, Berlin	100 <sup>1</sup>	--
$\alpha$ CD31:FITC	Mec13.3	Ratte	IgG2a	BD Pharmingen	100 <sup>1</sup>	0,5
$\alpha$ HA:bio	3F10	Ratte	IgG1 Fab	Roche, Mannheim	333 <sup>3</sup>	0,05
$\alpha$ RGS5 :bio (rekombinant)	1M4	Maus	IgG1	Dr. G. Moldenhauer, DKFZ	100 <sup>1</sup> 1000 <sup>3</sup>	1
$\alpha$ Myc:bio	9E10	Maus	IgG1	Dr. G. Moldenhauer, DKFZ	1000 <sup>3</sup>	1
$\alpha$ PDGFR $\beta$ :APC	APB5	Ratte	IgG2a, $\kappa$	3.4.16	50-100 <sup>2</sup>	1-2

**Sekundärantikörper:**

Antikörper	Konjugat	Spezies	Bezug	Verdünnung	Stamm-Konz. [mg/ml]
$\alpha$ Kaninchen IgG(H+L):Pox	Peroxidase	Ziege	Vector, Burlingame Calif., USA	100.000 <sup>3</sup>	1
$\alpha$ Maus IgG(H+L):Pox	Peroxidase	Pferd	Vector	100.000 <sup>3</sup>	1
$\alpha$ Ratte IgG F(ab') <sub>2</sub> :Cy3	Cyanin 3 (Cy3)	Ziege	Dianova, Hamburg	200 <sup>1</sup>	1
$\alpha$ Ratte IgG (H+L)	--	Ziege	Dianova	-- <sup>4</sup>	1,7
$\alpha$ Ratte IgG (H+L)	Peroxidase	Ziege	Dianova	100.000 <sup>3</sup>	0,8

**Sekundärkonjugate:**

Konjugatkomplex	Kopplung	Bezug	Verdünnung	Stamm-konz. [mg/ml]
SA:POX	Peroxidase	Vector	100.000 <sup>3</sup>	1 <sup>3</sup>
SA:Cy3	Cyanin 3	Dianova	300-400 <sup>3</sup>	1 <sup>1</sup>
SA:FITC	FITC	Dianova	300-400	1 <sup>1</sup>

**3.1.6 Eukaryontische Zellen**

Die Zelllinien cos7 (Spezies: Affe), NIH3T3 (Spezies: Maus; Fibroblastenzelllinie) und 293T (Spezies: Mensch; Nierenzelllinie) wurden in DMEM bei 37°C/7,5% CO<sub>2</sub> propagiert. 293T-Zellen benötigten zusätzlich 4,5 g/l Glukose. Bei Konfluenz wurden die Zellen mit Trypsin-EDTA-Lösung abgelöst und in neue Kulturflaschen ausgesät.

**3.1.7 Mäuse**

Alle Tiere wurden in pathogenfreier Umgebung in der Barrierestation des Zentralen Tierlabors am Deutschen Krebsforschungszentrum gehalten. RIP1Tag5-Mäuse (kurz RT5) wurden von D. Hanahan (UCSF, San Francisco/USA) zur Verfügung gestellt. Sie sind seit mehr als 30 Generationen auf C3HeB/Fe rückgekreuzt; sie sind daher C3HeB/Fe. Die RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere (RGS5-Knock-out) wurden in der Abteilung Hämmerling generiert (unpubliziert, siehe 5.4) und sind auf einem gemischten genetischen Hintergrund (C57BL/6x192P2/OlaHsd).

**3.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN****3.2.1 Animpfen von Bakterienkulturen**

Zum Animpfen von Übernachtflüssigkulturen (ÜN-Kulturen) im Miniprep-Maßstab wurde eine einzelne Bakterienkolonie von einer Agarplatte gepickt und in 3 - 5 ml LB-Selektionsmedium (je nach

Antibiotikaresistenz Ampicillin 100 µg/ml, Kanamycin 50 µg/ml oder Zeocin 25 µg/ml) resuspendiert. Die Kultur wurde bei 37°C im Inkubationsschüttler über Nacht inkubiert. Für Maxipreparationen wurden 100 ml LB Medium mit einer einzelnen Kolonien inokuliert und ebenso über Nacht im Schüttler inkubiert.

### **3.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli**

Die Isolierung von Plasmid DNA aus ÜN-Bakterienkulturen erfolgte mit „Qiaprep® Miniprep Spin Säulen“ der Firma Qiagen (Hilden) im Miniprep-Maßstab bzw. mit „Qiaprep® HiSpeed Säulen“ (Qiagen) im Maxiprep-Maßstab gemäß Angaben des Herstellers. Das Prinzip beider Kits beruht auf der alkalischen Lyse in Gegenwart von SDS. Nach der Renaturierung der Plasmid DNA in der nachfolgenden Neutralisation wird die DNA an Siliciummatrices gebunden, gewaschen und eluiert (Birnboim und Doly, 1979).

### **3.2.3 Quantifizierung von Nukleinsäuren durch Spektrometrie**

Die Purin- und Pyrimidinringe der Nukleinsäurebasen zeigen bei 260 nm maximale Absorption. In guter Näherung lässt sich bei niedriger Kontamination durch Proteine (d.h.  $OD_{260}/OD_{280} > 1,8$ ) die Nukleinsäurekonzentration wie folgt berechnen: [Konzentration] =  $OD_{260} \times \text{Faktor} \times \text{Verdünnungsfaktor}$ . Hierbei beträgt der Faktor für dsDNA 50 ng/µl, für ssDNA 33 ng/µl und für RNA 40 ng/µl.

### **3.2.4 DNA-Restriktionsspaltung**

Zur Klonierung von DNA Fragmenten wurden diese mit entsprechenden Restriktionsenzymen (Fermentas oder NEB) wie folgt geschnitten: 1 bis 10 µg DNA und 0,5 - 3 µl Restriktionsendonuklease (2,5 - 10 U/µg DNA, jedoch maximal 10% des Gesamtreaktionsvolumens) wurden in 1fach-Restriktionspuffer gemäß Herstellerangaben 1-3h bei 37°C (oder gemäß Produktbeschreibung des Enzyms) inkubiert.

### **3.2.5 Auftrennung von DNA in der Gelelektrophorese und DNA-Isolierung**

Gemische von DNA-Fragmenten im Bereich von 100 bis 12.000 bp können in der Agarosegelelektrophorese gemäß ihrer Länge aufgetrennt werden. Gleichzeitig werden Enzyme, die in vorherigen Arbeitsschritten eingesetzt wurden (wie Restriktionsendonukleasen oder Phosphatasen) und in der nachfolgenden Ligation inhibierend wirken würden, entfernt. Hierzu wurden die DNA Proben auf einem horizontalen Agarosegel (0,6 bis 2% Agarose in TAE Puffer, 0,5 µg/ml Ethidiumbromid) bei einer Gleichspannung von 70-115 V aufgetrennt. Für präparative Gele wurden die DNA-Fragmente auf einem UV-Transilluminator bei 366 nm ausgeschnitten und unter Verwendung von QiaQuick Säulen (Qiagen) gemäß Herstellerangaben aufgereinigt. Analytische Gele

wurden mit einem LumiImager Geldokumentationssystem (Roche, Mannheim) aufgenommen und die erhaltenen Bilder mittels Adobe Photoshop® graphisch bearbeitet.

### **3.2.6 Dephosphorylierung von DNA-Enden**

Alkalische Phosphatasen katalysieren die Entfernung von 5'-Phosphatgruppen von DNA und RNA. Die Behandlung von geöffneten Plasmidvektoren mit 1 U CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, 1 U/μl, Fermentas, St. Leon-Rot) pro 1-5 μg DNA in beliebigem Restriktionspuffer (Fermentas-Puffer B, G, O, R oder Y) bei 37°C/1h verhindert die Selbstligation des Vektors. Die Dephosphorylierung erfolgte in der Regel unmittelbar im Anschluss an den Restriktionsverdau.

### **3.2.7 Ligation von DNA-Enden**

T4 DNA Ligasen katalysieren die Knüpfung einer Phosphodiesterbindung in Duplex-DNA, RNA oder RNA:DNA Hybriden durch nukleophilen Angriff eines 3'-Hydroxylrestes auf einen benachbarten 5'-Phosphatrest. 5'-Phosphorylierte DNA-Fragmente aus Restriktionsspaltungen können in durch Restriktion geöffnete Plasmide inseriert werden, wenn die freien DNA Enden entsprechend kompatibel sind, d.h. über miteinander verknüpfbare freie Enden verfügen. Hierzu wurden 0,01 bis 0,1 pmol (meist 50-100 ng) des linearisierten und dephosphorylierten Vektors mit der dreifachen Menge des Insertfragmentes und je 1 μl T4 DNA Ligase (1,3 Weiss Units/μl, NEB Frankfurt) und Ligationpuffer (NEB) gemischt. Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 10 μl. Die Reaktion wurde bei 14°C über Nacht inkubiert und anschließend in der Transformation eingesetzt. Die Stoffmenge freier Enden (in pmol) lässt sich durch nachstehende Formel berechnen. Hierbei entspricht #bp der Länge des DNA-Fragmentes in bp.

$$\text{pmol freie Enden} = \mu\text{g} \times 10^6 / (658 \times \text{\#bp})$$

### **3.2.8 Herstellung hitzkompetenter Bakterien**

Mit einer Einzelkolonie E. coli DH5α (Genotyp: F- deoR recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) supE44 λ-thi-1 gyrA96 relA1) wurde zunächst eine Übernachtskultur in 50 ml LB Medium herangezogen. Zu 400 ml LB Medium wurden 10 ml der Übernachtskultur gegeben. Diese Kultur wurde inkubiert bis die OD<sub>600</sub> einen Wert von 0,3 bis 0,5 erreicht hatte. Die Bakterien wurden in 50 ml Falcon-Röhrchen abzentrifugiert (2500 rpm, 10 min, 4°C). Alle folgenden Arbeiten wurden steril und bei 4°C im Kühlraum durchgeführt. Die Pellets wurden in je 16,5 ml eiskaltem, frisch hergestelltem Rf 1 Puffer resuspendiert. Die Suspension wurde 20 min auf Eis inkubiert, dann erneut abzentrifugiert (2500 rpm, 10 min, 4°C), in je 4 ml Rf 2 Puffer resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Fraktionen wurden gepoolt (gesamt 32 ml) und mit gekühlten Pipettenspitzen aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C gelagert.

Rf 1: 100 mM RbCl; 50 mM MnCl<sub>2</sub>; 30 mM KaAc; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glycerin

Rf 2: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl<sub>2</sub>; 15% Glycerin

### **3.2.9 Transformation von E. coli**

Zur Transformation wurden 100 µl der in 3.2.8 hergestellten kompetenten E. coli DH5α im Eisbad aufgetaut und mit 5 µl der Ligationsreaktion gemischt. Die Reaktion wurde 20 min auf Eis, dann 90 s bei 42°C im Heizblock und schließlich wieder 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mit 800 µl antibiotikafreiem LB Medium gemischt und eine Stunde im Schüttler bei 37°C inkubiert. Danach wurden 50-100 µl der Bakteriensuspension auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert.

Höhere Transformationseffizienzen wurden mit dem kommerziell erhältlichen hitzekompetenten Top10 OneShot Bakterienzellen erreicht. Zu 50 µl OneShot-Zellen wurden 5 µl DNA hinzupipettiert, 30 min auf Eis inkubiert und im folgenden wie oben beschrieben verfahren. OneShot eigneten sich vor allem für die Transformation von aus Hefezellen gewonnener DNA. Da hier die DNA-Menge äußerst gering war, waren höhere Transformationseffizienzen notwendig.

### **3.2.10 Isolierung von RNA und cDNA-Synthese**

RNA-Präparation aus Hautfragmenten, β-Inseln und Insulinomen und cDNA-Synthese mit MMLV-RT: RNA wurde aus schockgefrorenen Gewebefragmenten mit Hilfe des Qiagen RNeasy Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) gemäß Herstellerangaben isoliert. Drei µg Gesamt-RNA wurden mit DNaseI (RQ DNase, Promega, Mannheim) nach Herstellerprotokoll behandelt, gefällt und in der cDNA-Synthese eingesetzt. Hierzu wurde die RNA mit 2 µl 150 µM Randomhexameren in einem Volumen von 10 µl gemischt und bei 68°C 10 min denaturiert, dann auf Eis gekühlt. Zu diesem Ansatz wurden 30 µl MMLV-Prämix pipettiert und 2 h bei 42°C inkubiert. Die cDNA Erststrangsynthese wurde durch Zugabe von 160 µl H<sub>2</sub>O gestoppt. Von dieser cDNA wurden 2,5 µl für die quantitative PCR Reaktion eingesetzt.

*MMLV-Prämix:* 30 µl enthielten 8 µl 5x RT Puffer (Invitrogen Y00146), 4 µl 100 mM DTT (Endkonzentration 10 mM), 2 µl 10 mM dNTP (0,5 mM pro Nukleotid), 1 µl RNasin® RNase Inhibitor (Promega), 2 µl MMLV (400U; Invitrogen)

RNA-Präparation aus Perizyten (PZ), Endothelien (EC) und Gesamttumoren und cDNA-Synthese mit Superscript II-RT: Gesamt-RNA wurde unter Verwendung von „Absolutely RNA Microprep“ Säulen (Stratagene, Amsterdam, Niederlande) isoliert. Die Kapazität der Microprep RNA Säulen beträgt  $5 \times 10^5$  Zellen. Die in der Durchflusszytometrie aus der Gesamttumorsuspension isolierten Perizyten ( $\sim 1-2 \times 10^4$  Zellen/Experiment) bzw. Endothelzellen ( $\sim 1 \times 10^5$ /Experiment; Abschnitt 3.5.1) wurden

direkt in Lysepuffer aufgenommen; die RNA-Isolierung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Die RNA wurde anschließend mit „Pellet Paint“ (Novagen) gefällt. Hierzu wurden zu 100 µl eluierter RNA 2 µl Pellet Paint, 10 µl 3M NaOAc und 200 µl 100% EtOH (RT) gegeben, 2 min bei RT inkubiert und das Präzipitat bei 13.000 rpm/5 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde je einmal mit 70% EtOH, dann mit 100% EtOH gewaschen und anschließend getrocknet (5 min bei RT). Die RNA wurde in 5 µl DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und in der cDNA-Synthese eingesetzt. Die RT5-Tumoren wurden für die RNA-Isolierung zuvor mit einem FastPrep-Gerät (Qbiogene) homogenisiert. Dazu wurde ein kleiner Tumor mit 500 µl Lysepuffer (Stratagene Kit) und Bio101 Matrix D Perlen (Qbiogene) 35 s bei 6000 rpm in der FastPrep Zentrifuge zerkleinert. Das Lysat wurde entnommen, unlösliche Fragmente wurden durch Zentrifugation (13.000 rpm/2 min/4°C) abgetrennt und das geklärte Lysat wurde auf Microprep Säulen appliziert. Für die cDNA-Synthese mit dem Superscript II Kit (Invitrogen) wurden 100 ng oligo(dT)<sub>21</sub> Primer (0,5 µl) mit 4,5 µl RNA im PCR Thermocycler bei 70°C/4 min denaturiert. Die Reaktion wurde sofort auf Eis gestellt und 5 µl cDNA Prämix zugefügt. Die Synthese erfolgte anschließend im Thermocycler bei 50°C/1 h gefolgt von einer Hitzeinaktivierung bei 65°C/15 min. Die cDNA wurde auf ein Volumen von 100 µl gebracht und für die quantitative PCR in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:50 eingesetzt.

*Prämix:* 5 µl enthielten 1 µl 100 mM DTT (10 mM), 0,5 µl 10 mM dNTP (0,5 mM), 4 µg T4 gene 32 protein (USB), 20 U RNasin (Promega), 100 U Superscript II® (Kit) in 1x Superscript „First-Strand“ Puffer (Kit).

### **3.2.11 „Polymerase Chain Reaction“ (PCR)**

#### **A. Die Standard-PCR Reaktion**

In Standard-PCR Amplifikationen wurden 20 ng Plasmid-DNA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 µl Taq Polymerase (Sigma), 50 nM bis 500 nM 5'- und 3'- Primer, 10 mM Tris pH 8,3, 50 mM KCl, sowie jeweils 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP und dGTP eingesetzt. In der Regel wurde zur Amplifikation das Programm Taq1 verwendet (siehe unten).

#### **B. PCR Reaktionen mit Expand® Polymerase**

Für die Amplifikation von DNA-Konstrukten, die zur Klonierung verwendet werden sollte, wurde „Expand High Fidelity“ Polymerase (Roche, Mannheim) verwendet. Expand stellt ein Gemisch aus Taq Polymerase und einer speziellen „korrektur-lesenden“ Polymerase mit 3'→5' Exonukleaseaktivität dar. Zur Amplifikation wurden in einer 50 µl-Reaktion 25 ng Plasmid-DNA, 5 µl 10x Roche Expand Puffer #3, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl Expand Polymerase, 400 nM 5'- und 3'-Primer,

sowie jeweils 0,2 mM dATP, dTTP, dCTP, dGTP eingesetzt. Die PCR Bedingungen waren wie in den jeweiligen Anwendungen angegeben.

Die verwendeten Programme waren:

**P18:** Initiale Denaturierung (2 min/95°C), dann 10 Zyklen aus Denaturierung (45 s/95°C), Primer Annealing (30 s/61°C) und Elongation (60 s/72°C), sowie weiteren 20 Zyklen aus Denaturierung (45 s/95°C), Primer Annealing (30 s/64°C) und Elongation (60 s/72°C) und einer abschließenden Inkubation bei 72°C (10 min).

**Taq1:** Initiale Denaturierung (2 min/95°C), dann 36 Zyklen aus Denaturierung (45 s/95°C), Primer Annealing (30 s/60°C) und Elongation (60 s/72°C), sowie finaler Elongation (5 min/72°C)

**TD4:** Initiale Denaturierung (3 min/95°C), dann 10 Zyklen aus Denaturierung (45 s/95°C), Primer Annealing und Elongation (2 min/72°C), sowie weiteren 28 Zyklen aus Denaturierung (45 s/95°C), Primer Annealing (30 s/63°C) und Elongation (90 s/72°C) und einer abschließenden Inkubation bei 72°C (10 min).

**LT1:** Initiale Denaturierung (3 min/95°C), dann 22 Zyklen aus Denaturierung (30 s/95°C), Primer Annealing (30 s/60°C) und Elongation (120 s/72°C), sowie finaler Elongation (5 min/72°C)

### C. Die quantitative oder „Real-time PCR“

Quantitative PCR-Analysen wurden mit dem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green I (Eurogentech) oder mit spezifischen TaqMan® Sonden auf ABI 5700 oder ABI 7300-Geräten (Applied Biosystems) durchgeführt. Die PCR-Reaktionen enthielten pro 25 µl-Ansatz: 2,5 µl 10x qPCR Puffer, 0,75 µl SYBR Green I in DMSO (1:2000), 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,625 U HotStart Gold Polymerase, 0,25 U Uracil-N-Glykosylase, je 0,2 mM dATP, dCTP, dGTP und dUTP, 50-900 nM 5' und 3' PCR-Primer (meist 300 nM). Alle Reagenzien und TaqMan-Sonden („*probes*“) wurden von Eurogentech SA (Seraing, Belgien) bezogen; die Primersynthesen erfolgten durch die Firmen Operon (Köln) oder MWG Biotech (Ebersberg). TaqMan PCR-Reaktionen enthielten 5 mM MgCl<sub>2</sub>, sowie 100 nM der spezifischen Sonden anstelle von SYBR Green I. Diese waren 5' mit dem Fluorochrom 6-FAM<sup>TM</sup> bzw. 3' mit dem Quencher TAMRA markiert. Bei allen Experimenten wurden Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Zyklusparameter waren: 2 min/50°C zum UNG-vermittelten Abbau von DNA-Kontaminationen, 10 min/95°C zur Aktivierung der Polymerase, gefolgt von 40 Zyklen mit 15 s/95°C Denaturierung und 1 min/60°C Primer-Annealing und Kettenverlängerung. Bei SYBR Green-Messungen wurden die spezifische Amplifikation über Dissoziationskurven überprüft, wobei unspezifische Amplifikationen von der Auswertung ausgeschlossen wurden. Die Berechnung der relativen Genexpression erfolgte über die  $\Delta\text{ct}$ -Methode (beschrieben im ABI User Bulletin #2

erhältlich unter [www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)). Die ct-Werte wurden über die Expression des Haushaltsgens Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) normiert.

$$\begin{aligned} \text{relative Expression von Gen A} &= 2^{-\Delta ct} \\ &= 2^{-[ct(\text{GenA})-ct(\text{HPRT})]} \end{aligned}$$

### 3.2.12 Northern Blotting

Sondensynthese: Zur Generierung einer radioaktiv markierten Sonde wurde die Maus-RGS5-Sequenz in den Polylinker von pBluescript eingesetzt. Plasmid-DNA wurde mittels Restriktionsendonuklease linearisiert, mit Phenol-Chloroform gefällt und als Vorlage („template“) für die Sondensynthese verwendet. Die Sonden wurden dann mit einem „*Random Primed DNA Labeling Kit*“ (#1004760; Roche) gemäß Herstellerangaben erzeugt. Hierbei binden Hexanukleotide zufälliger Sequenz an komplementäre Sequenzen der cDNA. Klenow DNA Polymerase synthetisiert im nächsten Schritt komplementäre DNA Stränge unter Einbau radioaktiv markierter Nukleotide, hier  $\alpha$ [ $^{32}\text{P}$ ]dCTP (Quelle: Amersham, Freiburg).

Northern Blot: Zum Northern Blotting wurden 20  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in RNA Probenpuffer aufgenommen und bei 60°C 15 min hitzedenaturiert. Nach Zusatz von DNA Probenpuffer wurden die Proben auf einem Formaldehydagarosegel bei 5-7 V/cm aufgetragen, wobei 1x MOPS als Elektrophoresepuffer verwendet wurde. Das Gel wurde anschließend 4x in DEPC-H<sub>2</sub>O gewaschen und mit 20x SSC benetzt. Zum Blotten wurde zunächst eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) in destilliertem H<sub>2</sub>O gewässert, dann bis zur Verwendung in 10x SSC äquilibriert. Eine Blotkammer wurde mit mehreren Lagen Whatman Papier ausgelegt, so dass die beiden Seiten eine Pufferbrücke bildeten. Darauf wurden 2 weitere Whatman-Schichten (in der Größe des Gels), das mit Transferpuffer (20x SSC) benetzte Gel, die Membran, gefolgt von einem Stapel Zellstofftücher gegeben. Das Gel wurde mit Parafilm umlegt, um einen direkten Pufferstrom von den unteren in die oberen Papierschichten zu unterbinden. Das Pufferreservoir wurde mit 20x SSC befüllt; der Transfer erfolgte über Nacht bei RT. Am nächsten Tag wurde die Membran entnommen (Orientierung beachten), bei RT getrocknet und zur Quervernetzung der RNA mit 0,15 J/cm<sup>2</sup> UV-bestrahlt (UV Stratalinker 2400, Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Die Filter können dann bei RT gelagert werden. Die Membranen wurden 2 h bei 42°C in Prähybridisierungspuffer inkubiert (10 ml/100 cm<sup>2</sup> Filter), dann über Nacht in Hybridisierungspuffer. Die Sonde wurde vor Zugabe zum Hybridisierungspuffer 10 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt. Danach wurde die Membran zunächst 2x5 min mit 7x SSPE/0,1% SDS bei RT gewaschen, dann 2x15 min mit 1x SSPE/0,5% SDS

bei 37°C und schließlich 1h mit 0,1xSSPE/1%SDS bei 65°C. Die Membran wurde mit Frischhaltefolie bedeckt und auf Film exponiert. Die Gesamtmenge der pro Spur aufgetragenen RNA wurde durch Ethidiumbromidfärbung eines identischen Agarosegels kontrolliert. Ribosomale 18S und 26S RNA sollten in allen Proben gleichstarke Bandenintensitäten aufweisen.

RNA Probenpuffer:

2,2 M Formaldehyd, 1,85% (v/v) Formamid in DEPC-H<sub>2</sub>O

10x MOPS Puffer (pH 7,0):

41,2 g/l MOPS, 10,9 g/l Na-Acetat x3H<sub>2</sub>O, 3,7 g/l EDTA; pH-Wert mit NaOH einstellen. Lösung dunkel aufbewahren.

Formaldehydagarosegel:

0,7 M Formaldehyd, 1,5% Agarose in 1x MOPS Puffer pH7,0. Die Agarose wurde in Wasser gelöst und vor Zugabe von MOPS und Formaldehyd auf 60°C abgekühlt.

20x SSPE:

174 g/l NaCl, 27,6 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7,4 g/l EDTA. pH mit NaOH einstellen und autoklavieren.

Prähybridisierungspuffer:

50% Formamid, 6x SSPE, 5x Denhardt's, 0,5% SDS

Prähybridisierungspuffer:

50% Formamid, 6x SSPE, 5x Denhardt's, 0,5% SDS, 100 µg/ml frisch denaturierte Lachs-Sperma DNA (3.1.2), <sup>32</sup>P-markierte Probe (5-20 ng/ml, 1-5x10<sup>6</sup> cpm/ml).

### **3.2.13 Nicht-radioaktive In-situ-Hybridisierung (ISH)**

Sondensynthese: Für die Sondensynthese wurde, wie in 3.2.12, linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Diese wurden in einer *in vitro* Transkriptionsreaktion mit T7 oder T3 RNA-Polymerase erzeugt, wobei digoxigeninmarkierte Uridintriphosphate (Digoxigenin-11-UTP) inkorporiert wurden. In der Synthesereaktion (20 µl) mit dem „*Digoxigenin-Labeling Kit*“ (Roche) wurden 2,5 µg DNA, 2 µl 10x Transkriptionspuffer, 0,5 µl RNasin (Promega), 0,5 mM ATP, 0,5 mM CTP, 0,5 mM GTP, 0,3 mM UTP, 0,2 mM Digoxigenin-11-UTP und 2 µl T3/T7 RNA Polymerase (Roche) gemischt und 2 h bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 1 µl DNase I (2 U; Promega) und Inkubation bei 37°C/15 min abgebaut. Die Reaktion wurde mit 1 µl 0,5M EDTA-Lösung gestoppt. Die synthetisierte

Ribosonde wurde anschließend durch Zusatz von 10 µl LiCl Puffer und 70 µl 100% EtOH bei -20°C (2-24 h) gefällt, mit 70%-igem, kaltem EtOH gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE aufgenommen (30 min/37°C Inkubation zum Lösen der RNA). Die RNA-Konzentration betrug etwa 40-60 ng/µl.

Gewebeschnitte: Mit Hilfe eines Kryostats (Leica) wurden 7 µm-Dünnschnitte von eingebetteten Organen (3.3.2) angefertigt und auf silanbeschichtete Objektträger (Sigma #S4651) aufgebracht. Die Gefrierschnitte wurden 5 min in Aceton bei 4°C fixiert, bei -70°C gelagert und vor der Verwendung 1-2 h bei RT getrocknet. Paraffinschnitte wurden durch Xylol- und EtOH-DEPC-Bäder entparaffinisiert (3.3.2).

Färbung: Die Präparate wurden nach dem Trocknen mit 4% PFA fixiert (1h/RT), 2x 5 min mit PBS gewaschen und 5 min in 0,2 M HCl zur Inaktivierung endogener alkalischer Phosphatasen inkubiert (RT). Dann wurde mit 0,2% (Gefrierschnitte) bzw. 1,5% Pepsin (Paraffinschnitte) 5 min bei 37°C permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen (1x 5 min, RT). Zur Acetylierung wurden die Objektträger 5 min in 0,1 M Triethanolamin (pH8,0; Sigma) gewaschen, dann 10 min in 0,1 M Triethanolamin/0,25% Acetanhydrid inkubiert. Die Präparate wurden mit PBS 1x 5 min gewaschen, dann 10 min mit 5x SSC Puffer äquilibriert und in eine Plastikbox gegeben, die mit zwei Lagen Whatman Papier (in Box-Puffer getränkt) ausgelegt war. Die Präparate wurden dann mit Hybridisierungspuffer beschichtet und 2 h bei 55°C zur Prähybridisierung inkubiert. Die RNA-Sonden (2 µl) wurden mit 1 µl tRNA (50µg, Roche) und 17 µl frisch hergestelltem Hybridisierungspuffer gemischt, 5 min bei 80°C denaturiert und sofort auf Eis gekühlt. Die denaturierten Ribosonden (20 µl, ~150 ng RNA/ml) wurden zu 100 µl Hybridisierungspuffer auf den Gewebeschnitten gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 55°C. Die Proben wurden am nächsten Tag 5 min mit 2x SSC, dann 2x 5 min mit TNE Puffer im 45°C Wasserbad gewaschen. Danach wurde 1 h bei 37°C mit RNase A/T1 verdaut und erneut gewaschen wie folgt: 2x 20 min bei 55°C mit 2x SSC/50% Formamid, dann 0,1x SSC (20 min/55°C) und schließlich mit 1x TBS (2x 3 min bei RT). Alle folgenden Schritte wurden in einer mit angefeuchteten Zellstofftüchern ausgelegten Feuchtkammer durchgeführt, um ein Abtrocknen der Präparate zu vermeiden. Zunächst wurde mit Peroxidase-Blockierungslösung (DAKO #S2001) inkubiert (5 min/RT), mit TBS gewaschen (3 min/RT), gefolgt von einer Inkubation mit 1% Casein (Roche) mit 1 µg/ml Kaninchen Immunglobulin (DAKO) zur Blockierung unspezifischer Bindung. Die Immunfärbung erfolgte dann durch Inkubation (45 min/RT) mit 1 U/ml Peroxidase-gekoppeltem Anti-Digoxigenin Antikörper (Anti-Dig:POX, 1:150 verdünnt, Roche #1207733) in 1% Casein. Nach Waschen mit TBS (3x 4 min) wurden die Schnitte 8 min bei RT mit Biotin-Tyramiden (gemäß Herstellerangaben 1:50 verdünnt in „Amplifikation Diluent“, TSA-Biotin System Kit, NEN #NEL700001KT) bedeckt, mit TBS erneut gewaschen (3x 4 min) und dann 20 min/RT mit Kaninchen Anti-Biotin:POX inkubiert (1:150 in 1% Caseinpuffer, DAKO #P5106). Es wurde wieder mit TBS gewaschen (3x 4 min). Zur weiteren Signalverstärkung wurden die Biotin-

Tyramide ein weiteres Mal verwendet. Die Schnitte wurden 5 min mit Biotin-Tyramid (1:50 in 1% Caseinlösung) inkubiert, wie zuvor mit TBS gewaschen und mit Kaninchen Anti-Biotin:AP (Alkalische Phosphatase)-Antikörper (1:75 in 1% Caseinlösung; DAKO #D5107) beschichtet. Nach Waschen mit TBS und Inkubation in Substratpuffer (10 min/RT) erfolgte die Detektion durch Zugabe von Färbelösung (30 min/RT). Die Reaktion wurde mit TE Puffer gestoppt. Zum Schluss wurden die Objektträger in H<sub>2</sub>O getaucht und mit 1% Methylgrünlösung in H<sub>2</sub>O (30 s) gegen gefärbt. Die Präparate wurden durch zweimaliges Eintauchen in 90% EtOH, gefolgt von 2x 2 min in 100% EtOH und 2x 2 min in Xylol rehydriert und in Acrytol-Medium (#01721, Surgipath Europe Ltd, Peterborough, Großbritannien) eingedeckt.

In einigen Experimenten wurden Anti-Biotin:AP Antikörper, sowie die anschließende Färbung, durch Immunfluoreszenzfärbung mit 3 µg/ml Anti-Biotin:Cy3 (Maus mAK, IgG Fraktion, Dianova, Hamburg) ersetzt. Für die Doppelfärbungen von RGS5 und Endothel- oder Perizytenmarkern wurde im Anschluss an die In-situ-Hybridisierung eine Immunfluoreszenzfärbung (3.3.3) mit Ratte Anti-CD31 (BD Pharmingen) und Anti-Ratte IgG F(ab')<sub>2</sub>:FITC (3µg/ml Dianova) durchgeführt. Ebenso wurden Anti-Desmin Antikörper (DAKO) in Verbindung mit dem FITC-M.O.M. Kit (Mouse-on-Mouse Kit, Vector, Burlingame, Calif., USA) gemäß Herstellerprotokoll verwendet.

#### LiCl Puffer:

7,5 M LiCl, 20 mM Tris pH 7,4, 10 mM EDTA

#### Pepsinlösung:

0,2% oder 1,5% Pepsin (DAKO #S3002) in 0,2 M HCl. Vor Verwendung auf 37°C erwärmen.

#### Box-Puffer:

4x SSC, 50% Formamid (nicht deionisiert, Sigma)

#### Hybridisierungspuffer:

4x SSC, 40% Formamid, 10% Dextransulfat (Sigma #D8906), 1x Denhardt's (Sigma #D2532), 10 mM DTT, 1 mg/ml tRNA (Sigma #R9001)

#### TNE Puffer:

10 mM TrisHCl (pH7,5), 500 mM NaCl, 1 mM EDTA

#### RNase A/T1 (Ambion, Huntington, Großbritannien, #2288):

in TNE Puffer 1:35 verdünnt

Substratpuffer:

0,1 M Tris (pH9,5), 0,1 M NaCl, 0,05 M MgCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20,  
24 mg/l Levamisole (Sigma L9756)

Färbelösung:

225 µg/ml 4-Nitroblautetrazoliumchlorid (NBT, Roche),  
88 µg/ml 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP, Roche) in Substratpuffer.

*Alle Lösungen (außer den Puffern für die Färbung) wurden mit DEPC-Wasser angesetzt und waren RNase-frei.*

### **3.3 ZELLBIOLOGISCHE UND IMMUNOLOGISCHE METHODEN**

#### **3.3.1 Transfektion eukaryontischer Zellen mit Fugene6<sup>TM</sup>**

Fugene6 (Roche) ist ein Lipidgemisch, das DNA effizient komplexiert und in tierische Zellen einbringt. 293T-Zellen wurden mit bis zu drei Plasmidkonstrukten gleichzeitig transfiziert. Dazu wurden die im Wachstum befindlichen Zellen am Tag vor der Transfektion in neue 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen ausgesät (1:7). Zur Transfektion wurden in einem sterilen Eppendorf Gefäß 300 µl OptiMEM I®/GlutaMax<sup>TM</sup> (Gibco #51985) mit 31,5 µl Fugene6 gemischt. Dazu wurden 19,8 µg Plasmid DNA pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Die adhärent wachsenden 293T-Zellen waren zum Zeitpunkt der Transfektion etwa 60% konfluent, wurden kurz mit DPBS gewaschen und das Medium wurde durch 12 ml OptiMEM I ersetzt. Die DNA-Komplexe wurden tropfenweise auf die Zellen gegeben und über Nacht in der Flasche belassen. Am nächsten Tag wurde das Medium durch Standard DMEM Vollmedium ersetzt. 30-48 h nach Zugabe der DNA, wurden die Zellen lysiert. (Bei Verwendung anderer Kulturgefäße wurde die Menge aller Reagenzien entsprechend der Oberfläche des Kulturgefäßes proportional erhöht bzw. erniedrigt).

#### **3.3.2 Einbettung von Organproben für die Histologie**

Gefrierschnitte: Die entnommenen Organe wurden in Plastik-Einbettungsformen (Peel-A-Way Mold T-12 #18986, Polysciences Inc/Labonord) gelegt und mit O.C.T.-Medium (Tissue-Tek, Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande) überschichtet. Die Präparate wurden 5 min in einem Becherglas mit vorgekühltem Isopentan (4°C) auf Eis inkubiert. Das Gefäß wurde anschließend in flüssigem Stickstoff heruntergekühlt, bis das O.C.T.-Medium eine weiße Farbe annahm. Die blockförmigen Präparate wurden danach langsam in Stickstoff getaucht und dann bei -70°C aufbewahrt. Von diesen

Blöcken wurden 7 bis 10 µm Dünnschnitte angefertigt, die 5 min in Aceton (4°C) fixiert und bei -70°C gelagert wurden.

Paraffinschnitte: Hierzu wurden die entnommenen Organe über Nacht in 4% PFA fixiert und anschließend in der Abteilung Prof. Gröne (DKFZ) in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöcke wurden in 7 µm-Dünnschnitte geschnitten und in einer Serie aus Alkoholbädern entparaffinisiert: 2x 10 min Inkubation in Xylol, 2 min in 100% EtOH, 2 min in 95% EtOH, 2 min in 80% EtOH, 2 min in 70% EtOH, 2 min in 50% EtOH, 2 min in 30% EtOH, 2 min in H<sub>2</sub>O.

### 3.3.3 Immunfluoreszenz

Immunfärbung von Zytospin- oder Kammerobjektträger- (Chamber Slide-) Präparaten mit Maus-Primäantikörpern: Transfizierte Zellen wurden entweder am Tag nach der Transfektion auf Kammerobjektträger (aus Glas; LabTek II, Nunc) gesät oder mit einem Zytospin 2 Gerät (Shandon) auf Objektträger aufgebracht (~1x10<sup>5</sup> Zellen pro Objektträger, 700 rpm, 4 min). Die Zytospinpräparate wurden über Nacht (oder 1 h) bei RT getrocknet und ggfs. bei -70°C eingefroren. Nach Auftauen und Trocknen wurden die Zellen 5 min mit kaltem MeOH (-20°C) fixiert und wieder kurz getrocknet. Die Zellen wurden mit einem hydrophoben Stift umrandet (PapPEN, Zymed) und 5 min in PBS rehydriert. Kammerobjektträgerpräparate wurden nach Anhaften der Zellen kurz in PBS gewaschen und ebenfalls mit MeOH fixiert. Die Immunfärbung erfolgte mit einem M.O.M-FITC Kit (Vector) gemäß Herstellerangaben. Hierbei wurden die Präparate 1 h in M.O.M. Blockierlösung inkubiert, dann 30 min mit einem Maus Primäantikörper beschichtet, gefolgt von einem biotinylierten Anti-Maus Antikörper (10 min) und einem FITC:Avidin-Konjugat (5 min). Die gefärbten Präparate wurden in VectaShield mit DAPI-Farbstoff (4,6-Diamidino-3-phenylindol, Vector Labs) eingebettet und mit einem Axiovision Fluoreszenzmikroskop (Zeiss) aufgenommen. Für einige Aufnahmen wurden ein Konfokalmikroskop (Zeiss) verwendet.

Immunfluoreszenz auf Gefrierschnitten: Die Gewebeproben wurden in O.C.T.-Medium eingebettet (3.3.2). Alternativ wurden die Tiere vor der Gewebeentnahme mit PBS und 4% PFA (in PBS) kardial perfundiert und die Organe anschließend über Nacht in 30%-ige Saccharoselösung getaucht und in OTC eingebettet und eingefroren. Von diesen Präparaten wurden Gefrierschnitte angefertigt (3.3.2). Für die Immunfärbung wurden die Präparate nach Auftauen zunächst luftgetrocknet und mit einem hydrophoben Stift umrandet (PapPEN, Zymed). Alle nachfolgenden Schritte erfolgten in einer mit feuchten Tüchern ausgelegten Feuchtkammer. Zunächst wurden unspezifische Bindestellen durch Inkubation in 4% FCS (in TBS; 30 min/RT) abgesättigt. Danach wurden die Schnitte 1 h bei RT mit dem verdünnten Primäantikörper (in 0,5% FCS/TBS) inkubiert. Die Präparate wurden 2x 3 min mit TBS und 1x 3 min mit 0,5% FCS/TBS gewaschen. Der fluorochrommarkierte Sekundäantikörper

wurde anschließend in einer Verdünnung von 1:200 bis 1:500 verwendet und 30 bis 60 min auf den Schnitten belassen. Die Proben wurden erneut 3x mit TBS gewaschen und wie oben beschrieben eingebettet. Immunfärbungen mit Anti-PDGFR $\beta$  und Anti-Desmin wurden mit dem M.O.M. Kit wie zuvor beschrieben durchgeführt.

### **3.3.4 Hämatoxylin-Eosin (H&E)-Färbung**

Bei der H&E-Färbung werden subzelluläre Bestandteile des Gewebes angefärbt. Hierbei färbt der Farbstoff Hämatoxylin die Nuklei dunkelviolett, während der rote Eosin-Farbstoff an Proteine des Zytoplasmas bindet. Zur Färbung von Gefrierschnitten (3.3.2) wurden diese nach dem Trocknen 3 min in Hämatoxylin Färbelösung (Sigma) getaucht, kurz mit H<sub>2</sub>O gewaschen und dann 20 s in Differenzierungslösung (Sigma) inkubiert. Anschließend wurden die Präparate 2 bis 5 min in Eosinfärbelösung (Sigma, vor Gebrauch 0,5% (v/v) Essigsäure zugeben) getaucht. Nach kurzen Waschen mit H<sub>2</sub>O wurden die Schnitte wie folgt dehydriert: 2x 2 min Eintauchen in 95% EtOH, 2x 2 min 100% EtOH und zuletzt 2x 2 min in Xylen. Die noch feuchten Schnitten wurden mit Acrytol überschichtet und mit einem Deckglas versiegelt.

### **3.3.5 Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)**

Für Standardfärbungen wurden  $1 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l eiskaltem FACS Puffer mit fluorochrommarkierten Antikörpern (meist 1:100 verdünnt,  $\sim 1$ -5  $\mu$ g/ml) resuspendiert und 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend 2x mit FACS Puffer gewaschen und in 100  $\mu$ l FACS Puffer mit 1  $\mu$ g/ml Propidiumiodid aufgenommen. Die Akquisition und Analyse der Zellen erfolgte an einem FACS Calibur oder Vantage SE Cell Sorter (BD, Heidelberg) mit der Software CellQuestPro (BD). Alternativ zu direktmarkierten Antikörpern wurden biotinylierte Antikörper gefolgt von Streptavidin-Fluorochrom-Konjugaten oder unmarkierte Antikörper und entsprechende Zweitantikörper eingesetzt. Nach dem Waschen wurden die Zellen dann in dem Zweitreagenz resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und erneut 2x mit FACS Puffer gewaschen.

Die Isolierung von Perizyten und Endothelien aus RIP1Tag5-Tumoren mittels FACS Sortierung ist im Abschnitt 3.5.1 beschrieben.

#### FACS Puffer:

D-PBS, 3% FCS, 0,1% NaN<sub>3</sub>

#### Propidiumiodid-Lösung:

1 mg/ml in H<sub>2</sub>O

### 3.4 BIOCHEMISCHE METHODEN

#### 3.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die Bradford Färbung basiert auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G an Proteine in Lösung. Der Komplex aus Farbstoff und Protein bewirkt eine Verschiebung der Absorptionsmaxima des Farbstoffes von 464 nm auf 595 nm. Die Absorption ist im Konzentrationsbereich von 100 ng/ml bis 1,4 mg/ml Protein proportional zur Proteinmenge. Sie ist unbeeinflusst von reduzierenden Agenzien; die Bradford Methode ist allerdings nur bedingt verträglich mit Detergenzien (kompatibel sind z.B. Triton-X100 ~0,125%, NP40 ~0,1%, Digitonin ~1%).

Zur Proteinbestimmung im Mikrotitermaßstab wurden 5 µl Lysat (in der Regel NP40 oder Digitonin Lysat, 1:10 verdünnt) in einer 96-Loch Platte (Flachboden) vorgelegt. Als Standard wurden je 5 µl BSA-Lösung in TBS im Konzentrationsbereich von 125 µg/ml bis 2000 µg/ml verwendet. Nach Zusatz von 250 µl Bradford Reagenz wurde die Platte 5 min bei RT inkubiert und anschließend bei 595 nm photometrisch an einem Titertek Multiskan Plus MKII Gerät (Labsystems, Finnland) gemessen.

#### 3.4.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

In der denaturierenden SDS-PAGE werden Proteine in Anwesenheit von SDS elektrophoretisch gemäß ihrer molaren Masse aufgetrennt. In den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden 10 bis 15%-ige Acrylamidgele eingesetzt. Es wurden sowohl 8x7 cm-Minigele (Mini-Protean® III System, Biorad, München) als auch 16x20 cm Großgele (Protean® II xi, Biorad) verwendet. Als Größenstandard diente ein *Low-Range Marker* (#161-0305, Biorad)

##### Trenngel:

10-12% Acrylamid/Bisacrylamid (Gel 30, Roth); 375 mM Tris pH 8,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED

##### Sammelgel:

5% Acrylamid/Bisacrylamid, 125 mM Tris pH 6,8; 0,1% SDS; 0,1% APS; 0,1% TEMED

##### 10x SDS Laufpuffer (pH 8,3):

30,3 g/l Tris; 144,0 g/l Glycin; 10,0 g/l SDS

#### 6x Lämmli Auftragspuffer

62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8; 20% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,1% (w/v) Bromphenolblau

### **3.4.3 Coomassie Färbung**

Der Farbstoff Coomassie Brillant Blau R-250 bindet unspezifisch und irreversibel an fast alle Proteine. Zum Färben von Proteinbanden in Polyacrylamidgelen werden diese 20 min in Färbelösung inkubiert und anschließend durch mehrmaliges Waschen mit Destain Lösung entfärbt. Die Entfärbung ist auch bei 4° C über Nacht (ohne Schütteln) möglich. Die Nachweisgrenze liegt im Bereich von 0,1 bis 2  $\mu$ g Protein pro Bande. Zur Dokumentation wurden Gele bei 80°C im Vakuumgeltrockner (Biorad) 2 h getrocknet und anschließend gescannt.

#### Coomassie Färbelösung (#1097, Gerbu Biotechnik, Gaiberg):

1 Tablette (enthält 50 mg Coomassie Brillant Blue R) in 62,5 ml Entfärbelösung lösen und durch Faltenfilter filtrieren.

#### Entfärbelösung:

40% (v/v) MeOH, 10% (v/v) HOAc, 50% (v/v) H<sub>2</sub>O

### **3.4.4 Autoradiographie/Fluorographie**

Radioaktiv markierte Proteinproben wurden zunächst mittels SDS PAGE aufgetrennt. Die Acrylamidgele wurden 1 h oder über Nacht in Fixierlösung fixiert, wie unter 3.4.3 beschrieben getrocknet und anschließend über Nacht (oder bis zur Entwicklung der gewünschten Bandenintensität) mit Kodak BioMax Röntgen Film (Sigma) exponiert. Zur Signalverstärkung wurden die Gele in einigen Experimenten vor dem Trocknen zunächst durch Waschen mit DMSO (2x 15 min) dehydriert und dann 30 min in Rotifluoreszint Lösung (Roth) inkubiert (Fluorographie). Danach wurde das Gel 6x 10 min mit Leitungswasser gewaschen und im Geltrockner getrocknet.

#### Fixierlösung:

50% (v/v) MeOH, 12% (v/v) HOAc, 38% (v/v) H<sub>2</sub>O

### **3.4.5 Western Blotting**

Mit Hilfe der Western Blot Methode können Proteine in Proteingemischen wie Zell- oder Organextrakten qualitativ und quantitativ nachgewiesen werden, sowie deren Größe näherungsweise

bestimmt werden. Im klassischen Western Blot wird die Probe mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteinbanden können dann elektrophoretisch positionsgenau auf eine Membran transferiert werden und immunchemisch mittels spezifischer Antikörper detektiert werden.

Nach Auftrennung der Proteinproben wird das Polyacrylamidgel etwa 5-10 min in Transferpuffer äquilibriert. Zuvor wird ein der Gelgröße entsprechendes Stück Immobilon® PVDF Membran (Millipore) 15 s mit Methanol benetzt, dann 2 min in deionisiertes Wasser und schließlich 5-10 min in Transferpuffer gegeben. Der Transfer erfolgte in einer Biorad „TransBlot SD Kammer“ (Biorad, München) im Semi-Dry Verfahren nach folgendem Aufbau: Auf die Kathode gibt man drei in Transferpuffer-getränkte Whatman Filterpapiere, gefolgt von Gel, PVDF Membran, weiteren drei Lagen benetztem Whatman-Papier und der Platin-Anode. Der Transfer wurde bei 17 V/17 min (1 Minigel, 15%) bzw. 17 V/35 min (2 Minigele, 15%) durchgeführt. Der Transfer wurde mittels Ponceau-Färbung der Membran überprüft, die Membran wurde zum Entfernen des Farbstoffes kurz mit Wasser, dann mit PBST gewaschen und schließlich mit Blockierlösung 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf dem Wippschüttler inkubiert. Danach wurde 1 h bei RT (oder über Nacht bei 4°C) mit dem Primärantikörper (100 ng/ml bis 1 µg/ml in PBST/1% BSA/0,02% NaN<sub>3</sub>) inkubiert, 5x 10 min mit PBST gewaschen und erneut eine weitere Stunde mit Meerrettichperoxidase-(POX-) gekoppeltem Sekundärreagenz (1:100.000 in PBST, 1 ng/ml Endkonzentration) inkubiert. Bei biotinylierten Primärantikörpern wurde Streptavidin-POX (1 ng/ml) als Sekundärreagenz verwendet, ansonsten der jeweilige Anti-Primärantikörper. Es folgten weitere 5 Waschschrte mit PBST wie zuvor. Die Detektion erfolgte durch 1-minütige Inkubation des Blots in SuperSignal® WestDura (Pierce, Rockford, IL, USA) gemäß Herstellerangaben. Die durch Chemilumineszenz emittierten Photonen wurden mit Hilfe eines Scanners (LumiImager, Roche, Mannheim) erfasst und digitalisiert. Die digitalen Aufnahmen wurde mittels Adobe Photoshop® bearbeitet. Alternativ wurden konventionelle ECL-Filme (Amersham) verwendet, in einem Kodak Entwickler prozessiert, mit einem Flachbettscanner digitalisiert und ebenso in Photoshop bearbeitet.

#### Transferpuffer Semi-Dry (pH 9,2)

48 mM Tris; 39 mM Glycin; 1.3 mM SDS (0.0375%); 20% MeOH

#### Ponceau Färbelösung (Konzentrat von Sigma, P7767):

0,2% Ponceau S, 3% TCA, 3% Sulfosalicylsäure

#### Blockierlösung:

4% BSA in PBST oder 5% Milchpulver (skim milk, Fluka #70166) in PBST

Strippingpuffer (pH 6,7):

100 mM 2-Mercaptoethanol; 62.5 mM Tris-HCl; 2% SDS (immer frisch zusetzen)

PBST: 1x PBS pH 7,4; 0,1% Tween 20

**3.4.6 In-vitro-Proteinexpression mit Retikulozytenlysaten**

Zur *in vitro* Expression von Proteinen wurde ein T7 T<sub>N</sub>T® Kaninchen-Retikulozytenlysatsystem (#L4611, Promega) verwendet. Analog den Herstellerangaben, bestand ein 50 µl Versuchsansatz aus folgenden Komponenten: 25 µl Lysat, 2 µl T7 Reaktionspuffer, 1 µl T7 RNA Polymerase, 1 µl Aminosäurengemisch ohne Methionin, 20 µCi <sup>35</sup>S-Methionin (10 µCi/µl, #AG1094, Amersham), 40 U RNasin (Promega), 1 µg Plasmid DNA (3.2.2) und DEPC H<sub>2</sub>O. Der Ansatz wurde 90 min bei 30°C inkubiert und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Expression des gewünschten Proteins wurde auf einem Acrylamidgel überprüft, das anschließend getrocknet und autoradiographiert wurde. *In vitro* exprimierte, radiomarkierte Proteine wurden dann in Koimmunpräzipitationen eingesetzt.

**3.4.7 Bestimmung der Stabilität von RGS5 in Retikulozytenlysaten**

Retikulozytenlysatreaktionen (140 µl/Reaktion) wurden wie beschrieben zur Expression von RGS5:EGFP und Myc:RGS5 Fusionsproteinen angesetzt. Nach Zugabe des Radioisotopes wurden je 65 µl der Reaktionsmischung auf 2 Gefäße aufgeteilt. Diese enthielten bereits Arg-β-Ala und Bestatin (Endkonzentration 1 mM bzw. 0,15 mM) oder nur Bestatin als Kontrolle. Nach Mischen wurden die Reaktionen sofort auf 2x 3 Gefäße aliquotiert (20 µl pro Reaktionen) und im 37°C Wasserbad inkubiert. Nach 30, 60 oder 90 Minuten wurden die Reaktionen aus dem Bad entnommen, mit 10 µl 6x Lämmli Puffer versetzt, 3 min bei 96°C erhitzt und auf einen 15% Gel aufgetrennt. Die Autoradiographie erfolgte ohne Signalverstärkung mit Rotifluoreszint mittels Phosphoimager.

**3.4.8 Metabolische Markierung in cos7-Zellen zur Bestimmung der Stabilität von RGS5**

Cos7-Zellen wurden mit 4 µg DNA und 6 µl Fugene in 6 cm Schalen wie beschrieben transfiziert (3.3.1). Zwei Tage später wurden die Zellen trypsinisiert, mit 50 ml DPBS 2x gewaschen und in 400 µl Hungermedium aufgenommen. In 4 Eppendorfgefäße wurden 100 µl der Zellsuspension gegeben. Zu den Inhibitorproben wurden zusätzlich 5 µl des Proteasominhibitors 1 mM MG132 (Sigma) gegeben. Die Markierung („Pulse“) erfolgte im Anschluss daran mit 0,05 mCi <sup>35</sup>S-Methionin (5µl pro Reaktion, Amersham #AG1094) über 16 min im 37°C Wasserbad. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 1 ml eiskaltem „Chase-Medium“ gestoppt. Die Zellen wurden abzentrifugiert (4500 rpm/2 min/RT) und erneut mit Chase-Medium gewaschen. Die „0 h“- Proben wurden sofort nach Abnahme des Mediums mit D-PBS gewaschen und durch Zugabe von 100 µl Lysepuffer lysiert (4°C/1h). Die „2 h Chase“-

Proben wurden 2 h im 37°C Wasserbad inkubiert und ebenso mit DPBS gewaschen und lysiert. Im Chasemedium der Inhibitorproben befand sich 50 µM MG132.

Die Lysate wurden 3x über mehrere Stunden bzw. über Nacht mit 50 µl 50% Protein-G-Sepharose-Beads (PGS) geklärt. Für die IP wurden 20 µl PGS, 5 µg gereinigter Anti-RGS5 Antikörper (Klon 1M4) bzw. Anti-Myc Antikörper (Klon 9E10) zu den Lysaten gegeben und ~2 h bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Die IP wurde anschließend mit den Überständen 2x wiederholt. Die vereinigten Immunpräzipitate wurden 7x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen. Die trockenen Beads wurden in 40 µl 4x Lämmli-puffer aufgenommen, 3 min bei 95°C erhitzt und abzentrifugiert. Die Präzipitate wurden auf einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographiert (3.4.4, inklusive der Signalverstärkung mit Rotifluoreszint). Phosphoreszenzplatten („Phosposcreens“) wurden 3 Tage exponiert und anschließend mit einem BioRad-Phosphoimager gescant.

Hungermedium:

RPMI mit 50 mg/l L-Cystein, ohne L-Methionin

Chase-Medium:

DMEM, 10% FCS, 1,4 mg/ml L-Methionin

Lysepuffer:

1% NP40 in 1xPBS und *complete*® *EDTA-free* Proteaseinhibitor (1 Tabl. pro 25 ml, Roche)

Waschpuffer:

1% NP40 in 1xPBS und *complete*® *EDTA-free* Proteaseinhibitor (1 Tabl. pro 50 ml)

### **3.4.9 Herstellung von rekombinanten His-Tag-Proteinen (RGS5)**

RGS5 mit N-terminalem Hexahistidintag (His:RGS5) wurde erzeugt, indem die murine RGS5-Sequenz mit BamHI- und BglII-Primern amplifiziert, geschnitten und in die BamHI/BglII Restriktionsschnittstellen des Vektors pRSET B (Invitrogen) eingefügt wurde. Kompetente Zellen des E. coli Stammes BL21(DE3)pLysS wurden dann mit dem RGS5 Konstrukt transformiert und auf LB Agarplatten mit 50 µg/ml Ampicillin und 35 µg/ml Chloramphenicol plattiert. Mit den resultierenden Klonen wurde eine 50-100 ml Starterkultur (ebenso supplementiert mit Ampicillin und Chloramphenicol) angeimpft und diese über Nacht in einem Inkubationsschüttler (Innova Shaker) bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Starterkultur zu 2 l LB Medium (50 µg/ml Ampicillin, ohne Chloramphenicol, auf 37°C vorgewärmt) gegeben und erneut im Inkubationsschüttler inkubiert bis die OD<sub>600</sub> etwa 0,5 bis 0,7 erreicht hatte (etwa 3 h). Die Expression wurde dann durch Zugabe von

1 mM IPTG induziert und die Kultur weitere drei bis vier Stunden auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Kultur 20 min bei 6000 rpm (GS3 Rotor) in einer Sorvallzentrifuge bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Bakterienpellets bei -70°C bis zur Lyse gelagert.

Herstellung von rekombinantem RGS5 Protein unter nativen Bedingungen: Zum Lysieren der Zellen wurden diese auf Eis in 7 ml gekühltem Lysepuffer A resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mg/ml Lysozym wurde zunächst 30 min auf Eis inkubiert und nachfolgend mittels Ultraschall-Behandlung (Sonfier 250, Branson, Einstellung 50%, 2 min) der vollständige Aufschluss durchgeführt. Das Lysat wurde mit weiteren 7 ml Lysepuffer A (jedoch ohne DTT und EDTA) versetzt, in Korex Reagenzgefäße überführt und bei 10.000 rpm 20 min im SS34 Rotor bei 4°C zentrifugiert. Falls der Überstand nach Zentrifugieren noch hochviskos war, wurde das Lysat zum Scheren der DNA fünf Mal durch eine Kanüle (0,9 mm) gezogen und erneut bei 10.000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand wurde dann mit 2 ml 50%-iger NTA-Agarose (Qiagen, Hilden) gemischt und 1 h bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert. Die Suspension wurde dann in eine Säule überführt und diese nach Absetzen der Agarose mit 2x 4 ml Waschpuffer A gewaschen. Die gebundenen His:RGS5 Fusionsproteine wurden mit 4 ml Elutionspuffer A eluiert und in acht 500 µl-Fractionen aufgefangen. Danach wurde die OD<sub>600</sub> zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration gemessen und die DTT-Konzentration der Proben auf 1 mM eingestellt. Jeweils 20 µl der Fractionen, sowie gleiche Volumina von Waschfraktion und Lysat vor Reinigung mit NTA Agarose, wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und dieses mit Coomassie-Lösung gefärbt, um die Expression zu überprüfen.

Lysepuffer A:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH 8,0

Nach Einstellung des pH-Wertes mit NaOH gibt man dazu 1 mM PMSF/2-Propanol und *complete*® Tabletten (Roche, 1 Tablette/25 ml), sowie 2 mM DTT und 1 mM EDTA.

Waschpuffer A:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, pH 8,0, *complete*® (wie zuvor)

Elutionspuffer A:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8,0, *complete*® (wie zuvor)

Herstellung von rekombinantem RGS5 unter denaturierenden Bedingungen: Die Bakterien wurden 15 min auf Eis aufgetaut und mit 5 ml Lysepuffer B pro Gramm Bakterienpellet (Nassgewicht) resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch ständiges Resuspendieren über 15 min bei RT; die Lösung sollte nach dem Aufschluss transparent sein. Das Lysat wurde in Korex-Gefäße überführt und wie

oben beschrieben bei 10 000 rpm zentrifugiert. Der klare Überstand (4 ml) wurde anschließend mit 1 ml NTA-Agarose gemischt, 30 min bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert und in eine Säule überführt. Diese wurde zweimal mit je 4 ml Waschpuffer B gewaschen und gebundenes RGS5 wurde durch Zugabe von zunächst 500 µl Elutionspuffer B, dann 10x 500 µl Elutionspuffer E, fraktionell eluiert. Die Proteinkonzentration der Fraktionen wurde bestimmt und Aliquots der Fraktionen auf einem Polyacrylamidgel aufgetragen und gefärbt wie oben beschrieben. Proteinhaltige Fraktionen wurden vereinigt und über Nacht in PBS dialysiert. Die His-Tag-Sequenz wurde durch Verdau mit Enterokinase EKMax<sup>TM</sup> (1U/µl, Invitrogen) abgespalten. Hierzu wurden 20 µg Fusionsprotein mit 0,1U EKMax in 1x EKMax Puffer gemischt und 16h bei 37°C inkubiert. Danach wurde erneut in PBS dialysiert.

Lysepuffer B (pH 8,0):

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TrisCl, 8 M Harnstoff. pH mit NaOH einstellen.

Waschpuffer B (pH6,3):

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TrisCl, 8 M Harnstoff. pH mit HCl einstellen

Elutionspuffer B (pH 5,9)

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TrisCl, 8 M Harnstoff. pH mit HCl einstellen

Elutionspuffer C (pH 4,5)

100 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM TrisCl, 8M Harnstoff. pH mit HCl einstellen

EKMax Puffer

50 mM Tris pH 8,0, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,1% Tween 20

*Den pH-Wert aller Harnstoff-Puffer unmittelbar vor Verwendung einstellen!*

### **3.4.10 Herstellung von rekombinanten GST-Proteinen (UCK und AC3)**

Die Gesamtkodierungssequenz von AC3 und UCK wurde vom Deutschen Ressourcenzentrum (RZPD, Heidelberg; [www.rzpd.de](http://www.rzpd.de)) als IMAGE Klone (Bezeichnung: IMAGp998L0714409 (AC3) bzw. IMAGp998D191147 (UCK)) bezogen. Die C1-Domäne von AC3 wurde mit den Primern 115 und 122 amplifiziert (Roche Expand Polymerase Programm LT1); die Gesamtsequenz von UCK wurde mit den Primern 116 und 117 gleichermaßen amplifiziert. Die PCR Produkte wurden mit EcoRI und Sall (AC3) bzw. BamHI (UCK) geschnitten und in den gleichsam geschnittenen Vektor pGEX-6P-1 (Amersham) eingefügt. BL21(DE3)-Zellen wurden, wie für die His-Tag-Proteine beschrieben,

transformiert. Mit den resultierenden Klonen wurden 5 ml LB-Medium (100 µg/ml Ampicillin, 35 µg/ml Chloramphenicol) angeimpft und über Nacht im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde diese Starterkultur 1:100 verdünnt (es wurden 12 ml Gesamtkultur benötigt) und bei 37°C bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5-0,8 inkubiert (3-4 h). Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur wurde weitere 2 h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Die Bakterienzellen wurden abzentrifugiert, das Pellet wurde mit kaltem PBS gewaschen und bei -70°C bis zur Lyse gelagert. Zur Zellyse wurden 600 µl Lysispuffer (4°C) hinzu gegeben und 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden durch 10maliges Einfrieren und Auftauen (alternierende Zyklen aus 15 s in flüssigem Stickstoff und 1 min in warmen Wasserbad oder 50°C Heizblock) aufgebrochen. Das Lysat wurde zum Scheren der DNA 10 bis 15 mal durch eine graue Kanüle gezogen und anschließend abzentrifugiert, so dass ein klarer, partikelfreier Überstand zurückbleibt. Das Lysat (600 µl) wurde dann auf eine Microspin-Säule aufgetragen (Amersham Pharmacia) und 10 min bei RT inkubiert. Die Aufreinigung der GST-Proteine erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Säulen wurden 2x mit PBS gewaschen und gebundene GST-Proteine wurden mit 2x 120 µl Glutathionpuffer eluiert (10 min/RT). 10 µl des Eluats wurden auf einem Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt, um die Ausbeute der Aufreinigung abzuschätzen.

#### Lysepuffer:

1 mM DTT, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF und complete® in 1x PBS.

Vor der Verwendung 1 mg/ml Lysozym und 1,75 µl DNase I (10 U/µl; Worthington) hinzugeben.

### **3.4.11 Affinitätschromatographische Reinigung von Kaninchenserum**

Eine 1 ml-Chromatographie-Säule wurde mit His:RGS5-gekoppelter Cyanbromidsepharose befüllt und mit 20 ml 1x PBS äquilibriert. Das Kaninchenserum wurde 1:1 mit PBS verdünnt, durch einen Partikelfilter (0,45 µm Low-Protein, Millipore) filtriert und auf die Säule gegeben (maximal 5 ml). Der Durchlauf wurde über einen Zeitraum von 3 h wiederholt aufgetragen. Die Säule wurde anschließend mit 20 ml PBS gewaschen. Gebundene Antikörper wurden dann mit 8 ml 0,1 M Glycin-Lösung pH8,8 eluiert. Die Fraktionen (500 µl) wurden in Eppendorf-Gefäßen aufgefangen, in die 50 µl 1 M Tris pH8,0 vorgelegt waren. Der Gesamtproteingehalt der Fraktionen wurde nach Bradford bestimmt. Fraktionen mit >100 µg/ml Gesamtprotein wurden vereinigt und zur Stabilisierung und Konservierung mit 1% BSA und 0,1% Natriumazid versetzt. Die Säule wurde durch Waschen mit 30 ml Glycin und 20 ml PBS regeneriert.

### **3.4.12 Koimmunpräzipitation (Ko-IP) zur Detektion von RGS5-Bindungspartnern**

Immunpräzipitationen werden häufig eingesetzt, um gering konzentrierte Antigene in komplexen Proteinmischungen nachzuweisen. Ebenso können durch diese Technik Bindungspartner, die mit dem präzipitierten Antigen interagieren, isoliert werden und durch spezifische Antikörperfärbung im nachfolgenden Western Blot identifiziert werden.

In den hier beschriebenen Experimenten wurden 293T-Zellen mit den potentiellen Bindungspartnern und RGS5 transfiziert (3.3.1) und 36 – 42 h später geerntet. Das Zellpellet wurde mit D-PBS gewaschen, abzentrifugiert und nach Abnehmen des Überstands bei  $-70^{\circ}\text{C}$  bis zur Lyse gelagert. Zur Lyse wurden  $2 - 5 \times 10^7$  Zellen (für 293T entspricht dies der Zellzahl in einer konfluenten  $75 \text{ cm}^2$  Kulturflasche) in 1 ml Digitonin Lysepuffer resuspendiert und bei  $4^{\circ}\text{C}$  1-2 h auf dem Roller inkubiert. Alle nachfolgenden Schritte wurden bei  $4^{\circ}\text{C}$  mit gekühlten Puffern durchgeführt. Das Lysat wurde bei 14.000 rpm zur Abtrennung von Nukleus und Membranfragmenten zentrifugiert. Der Gesamtproteingehalt des Überstands wurde dann mittels Bradford Assay bestimmt. Zur Kontrolle der Transfektion wurden Aliquots abgenommen (etwa  $75 \mu\text{g}$  Gesamtprotein) und bis zur Verwendung in der Elektrophorese eingefroren. Im nachfolgenden „Preclearing“ (d.h. Klären der Lysate von unspezifisch adsorbierenden Proteinen) wurden  $30\text{-}50 \mu\text{l}$  Protein G Sepharose 4 Fast Flow (=PGS) oder Protein A Sepharose CL-4B (=PAS; beide von Amersham Pharmacia) zugegeben. Wie Tabelle 1 zeigt, unterscheiden sich die Affinitäten von PAS und PGS im Hinblick auf verschiedenen IgG Isotypen bzw. Antikörper aus verschiedenen Spezies. Für Maus-Antikörper wurde daher PGS verwendet, während bei Ratten Antikörpern (wie Anti-HA, Roche) als Brückenantikörper ein Ziege Anti-Ratte Antikörper ( $3 \mu\text{g}/\text{IP}$ ) und PGS verwendet wurde.

PAS oder PGS Beads wurden vor der Verwendung mehrmals mit TBS gewaschen. Die Lysate wurden mindestens 3 h oder über Nacht geklärt und anschließend bei 6000 rpm/3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und in neue Eppendorf Gefäße überführt. Nach Zugabe von  $2\text{-}6 \mu\text{g}$  Antikörper wurde 30 min auf dem Roller inkubiert. Dazu wurden  $25 \mu\text{l}$  der Bead-Suspension (50%ige Suspension in TBS) mittels einer schräg angeschnittenen  $200 \mu\text{l}$ -Spitze (Gilson) pipettiert und mindestens 3-4 h oder über Nacht inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden mit Waschpuffer auf ein Volumen von 1 ml gebracht und bei 6000 rpm abzentrifugiert. Die Beads wurden 4x mit je 1 ml Waschpuffer gewaschen, wobei der Waschpuffer zum Schluss vollständig mit einer Hamilton Spritze abgenommen wurde. Die Proben wurden mit  $20 \mu\text{l}$  4x Lämmli Puffer 3 min bei  $96^{\circ}\text{C}$  erhitzt, kurz auf Eis gekühlt und abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. PAGE und Western sind in Abschnitt 3.4.1 und 3.4.3 beschrieben.

Digitonin Lysepuffer:

1% Digitonin; 1 mM EDTA; 1 mM PMSF in 1x TBS pH 7,4

*complete*® (1 Tablette per 25 ml, Roche)

Digitonin Waschpuffer:

0,1% Digitonin; 1 mM EDTA in 1x TBS pH 7,4

*complete*® (1 Tablette per 50 ml, Roche)

Antikörper	Protein A	Protein G	Antikörper	Protein A	Protein G
Ratte IgG1	–	+	Mensch	++++	++++
Ratte IgG2a	–	++++	Pferd	++	++++
Ratte IgG2b	–	++	Ziege	–	++
Maus IgG1	+	++++	Kaninchen	++++	+++
Maus IgG2a	++++	++++	Huhn	–	+
Maus IgG2b	+++	+++	Hamster	+	++
Maus IgG3	++	+++	Ratte	+/-	++
			Maus	++	++

Tabelle 1: Affinitäten von Protein A und G für verschiedene IgG Subklassen bzw. Antikörper aus verschiedenen Spezies

### 3.4.13 Immunpräzipitation mit rekombinanten Proteinen an Glutathionbeads

Zur Immunpräzipitation wurden je 5 µg der rekombinanten Gst-Proteine mit 20 µl Glutathionbeads (Amersham) und 50 µl TBS gemischt und auf Eis inkubiert (1 h). Die Beads wurden 2x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und danach mit 5 µg His:RGS5 (in 1 ml Waschpuffer) erneut inkubiert (2,5 h/4°C). Die Immunpräzipitate wurden 4x mit 1 ml Waschpuffer gewaschen und nach Zugabe von Lämmli-Puffer hitzedenaturiert. Die Proben wurden auf einem Acrylamidgel aufgetrennt und die Proteinbanden mit Anti-RGS5- oder Anti-Myc-Antikörpern detektiert.

Waschpuffer:

0,1% NP40, 1 mg/ml BSA in TBS pH7,4

### 3.4.14 Konventionelle Immunpräzipitationen

Für konventionelle Immunpräzipitationen wurden die Zellen in 1% NP40-Lysepuffer oder RGS-Lysepuffer lysiert. Für die Waschschrte wurden diese 1:5 verdünnt. Im Vergleich zu Digitonin oder CHAPS besitzt NP40 (Igepal®) ein höheres Proteinsolubilisierungspotential. Daher wurden NP40-haltige Lyse- und Waschpuffer in der Regel nicht für Koimmunpräzipitationen verwendet, in denen schwache Protein-Interaktionen detektiert werden sollten.

NP40-Lysepuffer:

1% NP40, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA in TBS pH7,4

RGS-Lysepuffer:

25 mM HEPES pH7,5, 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,5% Natriumdeoxy-cholat, 10% Glycerin, 25 mM NaF, 2 mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>

**3.4.15 Herstellung von Organextrakten**

Zur Herstellung von Organextrakten wurden die entnommenen Organe in N<sub>2</sub> schockgefroren, gewogen und sofort in Matrix-D Gefäße gegeben (QBiogene/Bio101 #6913-100). Die Organfragmente (40-150 mg) sollten vollständig von den Matrix-D Perlen umgeben sein. Nach Zusatz von 500 µl kaltem Homogenisierungspuffer D wurde 2x 20s bei 6500 rpm homogenisiert (Bio101 Gerät). Alle weiteren Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Der Überstand wurde abgenommen und die Perlen mit weiteren 500 µl Homogenisierungspuffer gewaschen. Zu den vereinigten Überständen wurden 50 µl Detergenz-Mix gegeben (pro 1 ml Probe) und zur Lyse der Zellen 1 h auf der Rollschüttler inkubiert. Zellfragmente wurden durch Zentrifugation (5min/13.000 rpm) abgetrennt. Alternativ wurden Organe mit einem Polytron PT2100 (Kinematica, Luzern) homogenisiert, wobei pro 100 mg Gewebe 1 ml Homogenisierungspuffer/1% NP40 verwendet wurden. Die Gesamtproteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt (1:25 Verdünnung) und betrug zwischen 5 und 25 mg/ml.

Homogenisierungspuffer:

1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 50 mM Sucrose, complete® EDTA-free (1 Tablette auf 25 ml) in TBS pH7,4.

Detergenz-Mix:

20% NP40, 10% Natriumdeoxychololat in H<sub>2</sub>O

**3.4.16 Markierung von Antikörpern mit Allophycocyanin (APC)**

Die Markierung von Antikörpern mit dem Fluoreszenzfarbstoff APC erfolgte mit einem PhycoLink ® APC Konjugationskit der Firma Prozyme (San Leandro, CA, USA) gemäß Herstellerangaben. Lysinseitenketten im APC Molekül werden hierbei durch SMCC (Succinimidyl-4-[N-maleimidomethyl]-cyclohexane-1-carboxylate) mit Maleimidgruppen verknüpft. Diese reagieren mit reduzierten Cysteinen und anderen Sulfhydrylgruppen unter Bildung von stabilen APC Konjugaten.

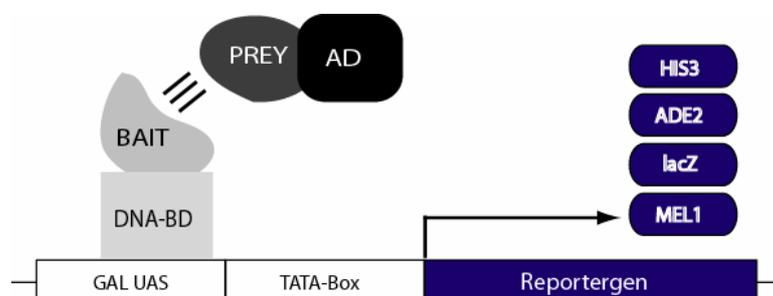
Anti-PDGFR $\beta$  Antikörper (CD140b, ebioscience/THP Wien) wurde zur FACS-Färbung von Tumorzellsuspensionen mit APC markiert. Hierzu wurden 100-200  $\mu\text{g}$  Antikörper durch Ultrazentrifugation mit 30 kD MWCO Ultrafree MC Säulen (Millipore, #UFC3LTK00) bei 5000 rpm/2 min auf ein Volumen von etwa 50  $\mu\text{l}$  eingeengt und durch Zugabe von 20  $\mu\text{mol}$  DTT (30 min/RT) reduziert. Überschüssiges DTT wurde durch Gelfiltration mit BioSpin 6 (BioRad #732-6002) Säulen, die zuvor nach Herstellerangaben mit Exchange Puffer (Prozyme) äquilibriert wurden, durch Zentrifugation bei 1000xg/4 min entfernt. Zur Kopplung wurden 3,2 mg aktiviertes APC pro mg Ig hinzu gegeben und 60 min bei RT auf einen Drehrad inkubiert. Freie Sulfhydrylgruppen wurden durch Zugabe von 34  $\mu\text{g}$  NEM (N-Ethylmaleimid) pro mg IgG abgesättigt (20 min /RT). Anschließend wurden 50 bis 100  $\mu\text{l}$  des Konjugates auf eine neue mit Storage Puffer (Prozyme) äquilibrierte BioSpin 6 (BioRad) aufgetragen und bei 1000xg 4 min eluiert. Das Konjugat wurde auf NIH 3T3 Fibroblasten in der Flow Zytometrie getestet und bei 4°C in lichtundurchlässigen Probenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) gelagert.

Exchange Puffer: 50 mM MES; 2 mM EDTA (pH 6,0); 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Pentachlorophenol

Storage Puffer: 10 mM Tris; 150 mM NaCl (pH 8,2); 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Pentachlorophenol  
(beide von Prozyme)

### 3.4.17 Yeast-2-Hybrid-Screening mittels des Matchmaker Two-Hybrid System 3™

Das Yeast-2-Hybrid-Screening ermöglicht die *in vivo* Detektion von Protein-Interaktionen in Hefezellen. Im hier verwendeten *Matchmaker 3™* System wird das *bait* (engl. Köder)-Gen als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne (BD) des Transkriptionsfaktors GAL4 exprimiert. Der potentielle Bindungspartner, das *Prey* (Beute)-Protein, ist dagegen mit der Aktivierungsdomäne (AD) von GAL4 verbunden. Interagieren Bait und Prey, kommt es durch die enge Nachbarschaft der beiden GAL4-Domänen zur Wiederherstellung der Transaktivierungsaktivität von GAL4 (Abbildung 4). Als Konsequenz wird die Expression verschiedener, artifiziell eingebrachter, Reportergene induziert.



**Abbildung 4: Das Prinzip des Gal4-basierten 2-Hybrid-Screenings im Matchmaker-3-System.** (modifiziert nach: Matchmaker-Handbuch). Durch eine Kernlokalisierungssequenz gelangen Bait- und Prey-Fusionen unabhängig voneinander in den Hefe-Zellkern. Dort wird das Bait-Fusionsprotein über die DNA-Bindestelle (DNA-BD) zum Gal4 Promotor rekrutiert. Ist ein Prey-Protein gebunden, kann die Gal4-Transaktivierungsdomäne (AD), die nun zum Promotor gelangt ist, die Transkription der Reportergene initiieren.

In Wildtyp-Hefestämmen bindet GAL4 in Gegenwart von Galaktose an stromaufwärts von TATA-Box und Transkriptionsstart gelegene Aktivierungssequenzen (*Upstream Activator Sequences* oder UAS) und initiiert die Transkription verschiedener Gene, die am Galaktose-Metabolismus beteiligt sind (Johnston et al., 1994). Die Hefestämme im Matchmaker-System AH109 und Y187 sind, wie Abbildung 5 zeigt, genetisch verändert. Wesentlich ist die Auxotrophie dieser Stämme für die Aminosäuren Histidin, Adenin, Leucin und Tryptophan infolge genetischer Manipulation am Anabolismus beteiligter Enzyme. Des Weiteren sind verschiedene Reportergene unter die Kontrolle des GAL4-Transkriptionsfaktors gestellt. Bei Bait-Prey-Interaktion bindet der rekonstituierte GAL4-Transkriptionsaktivator an die GAL4-spezifischen UAS-Sequenzen und induziert die Expression der ihnen nachgeschalteten Reportergene *HIS3*, *ADE2*, *lacZ* und *MEL1*. *HIS3* und *ADE2* Reporter vermitteln Histidin- und Adeninprototrophie. Bei Interaktion sind die Hefezellen daher nicht mehr auf Histidin und Adenin-Supplementation im Medium angewiesen und wachsen daher auf entsprechenden Selektionsplatten ohne diese Aminosäuren. Die Gene *lacZ* und *MEL1* erlauben X-Gal Selektion. Die von *MEL1* kodierte  $\alpha$ -Galaktosidase wird im Unterschied zur  $\beta$ -Galaktosidase (durch LacZ rekonstituiert) sezerniert. Die MEL1-Selektion ist daher auf X- $\alpha$ -Gal beschichteten Platten möglich und erfordert im Gegensatz zur lacZ-Selektion keine Zelllyse (Aho et al., 1997). Bei Interaktion wird X- $\alpha$ -Gal in ein blaues Produkt umgewandelt, das zur Anfärbung der Kolonien führt. Zudem werden die Hefestämme nach Transformation mit Bait- bzw. Prey-Plasmiden Tryptophan- bzw. Leucinprototroph, da die Vektoren die in den Hefestämmen deletierten TRP1- und LEU2-Wildtypgene kodieren.

<b>Genotypen der verwendeten Hefestämme:</b>			<b>Wildtyp</b>	<b>Mutante</b>	<b>Phenotyp der Mutante</b>		
<p><b>AH109:</b> MAT<math>\alpha</math>, trp1-901, leu2-3,112, ura3-52, his3-200, gal4<math>\Delta</math>, gal80<math>\Delta</math>, LYS2::Gal1<sub>UAS</sub>-Gal1<sub>TATA</sub>-HIS3, GAL2<sub>UAS</sub>-GAL2<sub>TATA</sub>-ADE2, URA3::MEL1<sub>UAS</sub>-MEL1<sub>TATA</sub>-lacZ</p> <p><b>Y187:</b> MAT<math>\alpha</math>, ura3-52, his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gal4<math>\Delta</math>, met, gal80<math>\Delta</math>, URA3::GAL1<sub>UAS</sub>-GAL1<sub>TATA</sub>-lacZ</p>			TRP1	trp1-901	Trp <sup>-</sup>	benötigt Trp im Medium (d.h. Trp-auxotroph)	
			LEU2	leu2-3	Leu <sup>-</sup>	Leu-auxotroph	
			HIS3	his3-200	His <sup>-</sup>	His-auxotroph	
			URA3	ura3-52	Ura <sup>-</sup>	Ura-auxotroph	
			LYS2	lys2-801	Lys <sup>-</sup>	Lys-auxotroph	
			ADE2	ade2-101	Ade <sup>-</sup>	Ade-auxotroph, führt zu einer Rotfärbung der Kolonien auf Adenin-armen Medien, wahrscheinlich infolge Oxidation und Polymerisation von 5-Aminoimidazolribotid	
			GAL4	gal4-542 oder gal4D	Gal <sup>-</sup>	Defekt im Galactose-Metabolismus	
			GAL80	gal80-538	Gal <sup>-</sup>	Defekt im Galactose-Metabolismus	

<b>Reporter Gen</b>	<b>Hefestamm</b>		<b>Gen Beschreibung</b>	<b>positiver Phenotyp</b>
	<b>AH109</b>	<b>Y187</b>		
lacZ	X	X	codiert $\beta$ -Galactosidase	blaue Kolonien bei Metabolisierung von X- $\beta$ Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D-galactopyranosid)
MEL1	X		codiert $\alpha$ -Galactosidase	blaue Kolonien bei Metabolisierung von X- $\alpha$ Gal (5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\alpha$ -D-galactopyranosid)
HIS3	X	X	führt zu His Prototrophie	Wachstum auf SD/-His
LEU2	X	X	führt zu Leu Prototrophie	Wachstum auf SD/-Leu
ADE2	X		führt zu Ade Prototrophie	Wachstum auf SD/-Ade

**Tabelle 2: Genotypen der Hefestämme und Reportergene.**  
(Matchmaker-Handbuch, Clontech).

Im folgenden wird das Screening einer Hefe Bank, die bereits mit GAL4-AD-Prey-Konstrukten transformiert ist, beschrieben (kommerziell erhältlich unter der Bezeichnung: „*Matchmaker Pretransformed Library*“, *17 day Mouse Embryo*; #S1864; Clontech/BD Biosciences, Heidelberg). Zu deren Generierung wurde eine cDNA Bank aus Maus-Embryonen am 17. Tag der Gestation angelegt. Diese wurde im Vektor pACT2 in *E. coli* amplifiziert, die DNA wurde isoliert und zur Transformation von Y187 des Mating-Typs Alpha (Mat- $\alpha$ ) verwendet. Transformierte Hefezellen wurden amplifiziert, geerntet und eingefroren. Diese wurden direkt im 2-Hybrid-Screen verwendet und mit Mating-Typ  $\alpha$  (Mat-a) Zellen des mit dem Bait-Konstrukt (RGS5) transformierten Stammes AH109 fusioniert. Diploide Zellen wurden auf Minimalnährböden ohne Histidin, Adenin, Tryptophan und Leucin (aber mit X- $\alpha$ -Gal) plattiert und 14-21 Tage inkubiert. Die Fähigkeit der Hefestämme auf Tryptophan- bzw. Leucin-freien Medien zu wachsen, wird nach Transformation mit dem Bait bzw. Prey-Vektor wieder hergestellt, so dass auf diploide Klone selektiert wird, die Adenin, Histidin und  $\alpha$ -Galactosidase synthetisieren.

#### Klonierung der Y2H-Konstrukte:

Als Baits wurden die gesamte RGS5 Sequenz (Bait 1) bzw. die N-terminalen Sequenz ohne RGS-Domäne (RGS5(1-70), Bait 2) im 2-Hybrid-Verfahren eingesetzt. Die Sequenzen wurden aus muriner RGS5 cDNA (in pEGFP-N3) mit den Primern #5 und #6 (Bait 1) bzw. #5 und #7 (Bait 2) durch PCR mit Expand® Polymerase und Programm P18 amplifiziert (3.2.11). PCR Produkt und Plasmidvektor pGBKT7 (Clontech) wurden mit NdeI und BamHI geschnitten und, wie zuvor beschrieben, ligiert. Die eingefügten Sequenzen wurden durch Sequenzierung überprüft. Die RGS5-Sequenz war N-terminal mit der GAL4-DNA-Bindungsdomäne verknüpft (Vektormappen siehe Anhang). Die Kontrollkonstrukte p53 und SV40 Large SV40-Tag wurden kommerziell erworben und befanden sich im Polylinker der Vektoren pGBKT7 bzw. pGADT7 (Anhang). Die Prey-cDNAs wurden mit EcoRI-NotI-Sall-Adapttern verbunden und stromabwärts der GAL4-Aktivierungsdomäne in die EcoRI/XhoI-Stellen von pACT2 eingefügt.

#### Herstellung kompetenter Hefezellen (ausreichend für 5 Transformationen):

Die Hefestämme AH109 und Y187 wurden auf YPDA Platten ausgestrichen und 3 bis 5 Tage bei 30°C inkubiert. Eine streichholzkopfgroße Kolonie wurde dann in 300  $\mu$ l 0.1 M LiOAc/1x TE resuspendiert und anschließend in der Tischzentrifuge abzentrifugiert (2000 rpm, 5 s, 20°C). Das Pellet wurde in 300  $\mu$ l TE/LiOAc aufgenommen und für die Transformation verwendet.

#### Transformation von Hefezellen (in kleinem Maßstab):

In einem Eppendorf Gefäß wurden 300  $\mu$ l LiOAc/PEG Lösung, 1  $\mu$ g Plasmid DNA (Qiagen Mini Prep), 50  $\mu$ g Lachs Sperma DNA und 50  $\mu$ l der kompetenten Zellen gemischt und im Heizschüttler (Eppendorf) 30 min bei 30°C/300 rpm inkubiert. Gelegentlich wurden die Proben durch Umdrehen

gemischt. Danach wurden 25 µl DMSO (Merck, Darmstadt) hinzu gegeben und weitere 15 min bei 42°C/300 rpm inkubiert. Die Proben wurden auf Eis gekühlt und anschließend 1 min bei 4000 rpm, dann 10 s bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das resultierende weißliche Pellet wurde in 160 µl NaCl Lösung resuspendiert und sofort auf 10 cm SD Minimalböden ausgestrichen. Die Platten wurden bei 30°C bis zum Erscheinen von ersten Kolonien inkubiert (etwa 3-4 Tage).

#### Vorversuche:

*Titration von 3-Amino-1,2,4-triazol (3-AT):* In sehr geringem Maß kann HIS3 in AH109 basal synthetisiert werden, da dessen Expression weniger stringent kontrolliert ist als die von ADE2. Der kompetitive Inhibitor des HIS3 Proteins, 3-AT, wurde daher verwendet, um das Wachstum auf Histidin-freien Medien zu minimieren (Durfee et al., 1993). Der Zusatz von 2,5 mM 3-AT erwies sich als optimal, um das Wachstum von Bait 1/2-transformierten AH109-Kolonien auf SD/-His/-Trp Platten auf ein Minimum zu reduzieren (nach 1 Woche sollten die Kolonien unter 1 mm Durchmesser bleiben). Der Prey-Stamm Y187 trägt nur die Reportergene *lacZ* und *MEL1* und weist daher kein Hintergrundwachstum auf.

*Überprüfung autonomer Reportergenaktivierung durch Bait-Proteine:* Einzelkolonien von RGS5-transformierten AH109-Zellen (dem Bait-Stamm) wurden von SD/-Trp Platten gepickt und auf SD/-Trp/-Ade ausgestrichen. Diese wurden etwa 7 Tage bei 30°C inkubiert.

*Bait-Toxizitätstest:* Je 5 ml SD/-Trp-Flüssigmedium wurden mit Bait 1- und Bait 2-transformierten AH109-Kolonien oder einer nicht-transformierten AH109-Kolonie angeimpft. Die Proben wurden über Nacht bei 30°C/270 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Zelldichte photometrisch über die Messung der OD<sub>600</sub> bestimmt.

*Kontrollmating Experiment:* Folgende Mating-Reaktionen wurden durchgeführt: #1 Bait in AH109 mit SV40-T-Antigen (Tag) in Y187, #2 p53 in AH109 und Tag, sowie #3-#6 p53, Tag, Bait alleine. Hierzu wurden pro Reaktion 500 µl 2x YPDA (+15 µg/ml Kanamycin) mit den entsprechenden Klonen angeimpft (Einzelkolonie zwischen 1,5-2,5 mm Durchmesser, <2 Wochen alt). Nach kräftigem Resuspendieren (1 min) wurden die Kulturansätze 24 h bei 30°C/200 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden 1:10 und 1:100 bzw. #3-#6 1:100 und 1:1000 mit 0,5x YPDA verdünnt. Je 100 µl der Verdünnungen wurden auf SD/-Leu, SD/-Trp, SD/-Leu/-Trp, SD/-Leu/-Trp/-His und SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade Platten ausgestrichen. Diese wurden bei 30°C bis zum Sichtbarwerden von diploiden Kolonien inkubiert und die Anzahl der Kolonien auf Verdünnungsplatten mit etwa 50-300 cfu (*colony forming units*) gezählt. Die Koloniezahl pro ml (cfu/ml) wird als Viabilität bezeichnet und ergibt sich aus Kolonienzahl x Verdünnung : plattiertes Volumen. Die Mating-Effizienz (oder Fusionseffizienz) wird bestimmt durch den Fusionspartner mit der geringeren Viabilität. Mathematisch ist die Mating-

Effizienz der Quotient aus der Viabilität auf SD/-Leu/-Trp (diploide Zellen) und der Viabilität auf Einzelselektionsplatten (haploide Zellen).

#### Yeast-2-Hybrid (Y2H) Screening von prätransformierten Matchmaker™ Hefe Banken:

*1. Vorbereitung der Bait Kultur:* Zunächst wurde eine 2-3 cm große Kolonie des mit dem Bait-Konstrukt transformierten AH109-Stammes (Bait-Stamm) in 50 ml SD/-Trp Medium angeimpft und bei 30°C/270 rpm 16-24 h inkubiert bis die Absorption bei 600 nm mindestens 0,8 betrug. Die Kultur wurde dann bei 1000xg für 5 min zentrifugiert und der Überstand bis zu einem Restvolumen von 5 ml Flüssigkeit entfernt. Nach Resuspendieren des Pellets wurde die Zellzahl mittels Neubauer Hämozytometer bestimmt. Die Zellkonzentration sollte mindestens  $1 \times 10^9$  betragen.

*2. Mating von Bait und Prey Stämmen:* Zum Y2H-Screening wurde ein 1 ml-Aliquot der Hefebank unmittelbar vor der Verwendung in einem 24°C Wasserbad aufgetaut und mit der Bait-Kultur in einem 2 l-Erlenmeyer Kolben vereinigt, wobei 10 µl der Prey-Kultur vorher zur Titerbestimmung (wie unten beschrieben) abgenommen wurde. Danach wurde das Gesamtvolumen der vereinigten Kulturen mit 2x YPDA Medium auf 50 ml gebracht und die Kultur 20-24 h bei 30°C/40 rpm inkubiert. Nach 20 h wurde die Kultur lichtmikroskopisch auf die Bildung von Zygoten untersucht. Waren diploide Hefezellen sichtbar, wurde die Kultur weitere 4 h inkubiert. Dann wurde die Kultur in 50 ml Falcon Röhrchen überführt und abzentrifugiert (1000xg, 10 min, 4°C). Das Kulturgefäß wurde zweimal mit je 50 ml 2x YPDA gespült und die Spüllösung mit der Probe vereinigt und abzentrifugiert. Zum Schluss wurden die vereinigten Pellets in 10 ml 0,5x YPDA/Kana aufgenommen, ein weiteres Aliquot von 50 µl wurde für die Titerbestimmung von diploiden Zellen abgenommen und die verbleibende Kultur auf 50 150mm-SD/-His/-Ade/-Leu/-Trp/+X-α-Gal Platten mit Hilfe eines Drigalski Spatels aufgetragen (200 µl Kultur pro Platte). Die Platten wurden mit der Kulturseite nach unten anschließend 8-21 Tage bis zum Sichtbarwerden von Kolonien bei 30°C inkubiert. Einzelkolonien wurden anschließend mittels einer Impföse auf eine neue SD-Minimalplatte (wie zuvor) aufgebracht. Dabei wurden mehr als 25 Klone als 5-mm-Ausstriche auf eine 150-mm-Platte mit rückseitigem Schachbrett-Raster plattiert. Diese diente als „Master“-Platte für die interagierenden Prey-Klone.

*3. Titerbestimmung der Hefe Stämme:* Zur Titerbestimmung der haploiden und diploiden Bank wurden die in Arbeitsschritt 2 entnommenen Aliquots wie in Tabelle 3 beschrieben verdünnt und auf 100-mm-Selektionsplatten ausgestrichen. Diese wurden bis zum Sichtbarwerden von Kolonien bei 30°C inkubiert. Viabilitäten und Mating-Effizienzen werden wie im Abschnitt „Kontrollmating“ beschrieben berechnet. Die Zahl der „gescreenten“ Klone, d.h. die auf Interaktion überprüften Preys, ergibt sich aus der Viabilität der diploiden Bank (in cfu/ml) multipliziert mit dem Gesamtvolumen des Matingansatzes (~10 ml). Sie sollte ca.  $5 \times 10^6$  betragen (Clontech).

Hefe Plasmid Mini Präparation von Prey Plasmid Klonen:

Einzelne Hefekolonien wurden mittels einer sterilen Impföse von der Master-Platte gepickt, in 5 ml SD/-Leu/-His/-Ade Medium überführt und 16 bis 24 h bei 30°C/250 rpm im Inkubationsschüttler inkubiert (Innova, New Brunswick Scientific). Die Hefezellen wurden 5 min bei 14000 rpm abzentrifugiert und in 200 µl TEM Puffer resuspendiert. Nach 1-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die nun zellwandfreien Hefezellen (Sphäroblasten) erneut abzentrifugiert (6000 rpm/5 min /4°C) und in 250 µl P1 Puffer (Qiagen, Hilden) resuspendiert. Danach wurden die Zellen durch Zugabe von 250 µl P2 Puffer lysiert. Im Weiteren wurde wie im *Qiagen Spin Prep* Protokoll beschrieben (inklusive des optionalen Waschschrilles mit PB Puffer) verfahren. Die Plasmid DNA wurde durch Zugabe von 30 µl 10 mM Tris Puffer pH 7,5 eluiert.

Reaktion	Verdünnung	Ausplattiertes Vol. in ml	Selektion		
			/-Leu/-Trp	/-Leu (Prey)	/-Trp (Bait)
haploide Bank (ohne Bait)	100	0,05		X	
	10000	0,05		X	
	10000	0,1		X	
Diploide Bank (mit Bait)	10	0,1	X	X	X
	100	0,1	X	X	X
	1000	0,1	X	X	X
	10000	0,1	X	X	X

**Tabelle 3: Bestimmung der Viabilität und Mating Effizienz**

PCR-Amplifikation und Sequenzierung von Prey-cDNAs

Zur Amplifikation der Prey-cDNAs wurden in einer 50 µl Reaktion 2 µl der Hefe-DNA, 5 µl Fermentas 10x PCR Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot), 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTPs, 100 nM Primer #21 und #22 (pACT2-F/R) und 1 µl Taq-Polymerase eingesetzt. Das verwendete PCR Programm war TD4 (3.2.11). Ein Fünftel der PCR-Reaktion wurde auf ein 0,8% Agarosegel aufgetragen und aufgetrennt, der Rest wurde mit 5 Volumina Qiagen PB Puffer (Qiagen Hilden) vermischt und je nach Bandenintensität auf MinElute (Qiagen) oder QiaQuick Säulen (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Ein Zwanzigstel des Elutionsvolumens von 15-30 µl wurden auf einem Gel zur Überprüfung der Reinheit der Fragmente analysiert. Die restliche DNA wurde zur Sequenzierung (durch Qiagen Hilden) mit dem Sequenzierungsprimer #9247\_pACT2seqF verwendet.

Analyse der cDNA Sequenzen:

Die Sequenzen wurden mit dem BLAST Programm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) identifiziert bzw. auf Sequenzhomologie überprüft.

### Subklonierung von Prey-cDNAs in andere Vektoren:

Aufgrund der geringen DNA-Konzentrationen in den Hefe-Miniprep-Präparationen wurden 5 µl der Hefe-DNA in Top10 OneShot transformiert. Miniprep-DNA aus E.coli wurden dann als Template-DNA in PCR-Reaktionen eingesetzt. Hierbei wurden über die Primersequenz (Primer #26 und #27) neue Restriktionsschnittstellen, ein ATG mit vorgeschalteter Kozak-Konsensus-Sequenz (GCCACC) und eine 5'-HA-Sequenz (kodierend für das Nonapeptid YPYDVPDYA) eingeführt. Letztere wird spezifisch durch das Hybridom 3F10 („Anti-HA *high affinity*“, Roche) erkannt. Die Durchführung der PCR (mit Expand Polymerase und Programm P18) sowie der Subklonierung ist in 3.2 beschrieben. Als Zielvektoren für die *in vitro* Expression bzw. Transfektionsexperimente (Abschnitt 4.3) wurden die Plasmide pBudCE4.1, pcDNA6/V5-HisA oder pCR2.1 verwendet (alle Invitrogen; Karten siehe Anhang).

## **3.5 TIEREXPERIMENTELLE ARBEITEN**

### **3.5.1 Isolierung von Langerhans'schen Inseln und Insulinomen**

Zur Isolierung von Tumoren aus RIP1Tag5-Tieren wurden pro Experiment zwischen 5 und 6 Mäuse im Alter von 27 bis 30 Wochen verwendet. Die Tiere wurden durch zervikale Dislokation getötet, der Abdominalraum geöffnet und die Tumoren wurden entnommen. Die Insulinome wurden anschließend von Bindegewebe befreit, mit einer Klinge homogenisiert und in Kollagenase Lösung aufgenommen. Der Ansatz wurde 13 min bei 37°C/150 rpm im Rotationswasserbad inkubiert und die enzymatische Reaktion anschließend durch Zugabe von 30 ml DMEM/5% FCS gestoppt. Die aufgebrochenen Gewebefragmente wurden durch ein Metallsieb, dann durch ein 40 µl-Zellsieb (Falcon) gedrückt und bei 720xg/5 min/4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde zur Erythrozytenlyse in 1 ml PharmLyse (BD Pharmingen #555899) aufgenommen und etwa 50 s durch Pipettieren resuspendiert. Die Lyse wurde mit 50 ml DMEM/5% FCS gestoppt und die Zellen erneut abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann nach Abnehmen des Überstandes mit FACS Puffer auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt und erneut durch ein Zellsieb gedrückt. Die Einzelzellsuspension wurde zur Absättigung von Fc-Rezeptoren 15 min bei 4°C mit 150 µg/ml Fc Block inkubiert (Ratte αCD16/αCD32, Klon 2.4G2, BD Pharmingen) und anschließend einmal mit FACS Puffer gewaschen. Zur FACS Färbung von Endothelien wurden die Zellen in 1 ml FACS Puffer mit je 10 µg/ml αCD31:FITC und ME-9F1:FITC aufgenommen und 15 min bei 4°C inkubiert. Für die Isolation von Perizyten wurde ein Allophycocyanin (APC)-markierter Anti-PDGFRβ (3.4.16) verwendet und in einer Konzentration von etwa 5 µg/ml eingesetzt. Die Zellen wurden 2 mal mit FACS Puffer gewaschen und in 1 ml FACS Puffer aufgenommen und in ein Zellsiebröhrchen (Falcon) pipettiert. Zum Ausschluss von toten Zellen wurde der Suspension 120 µl ViaProbe (7-Amino-actinomycin D; BD Pharmingen) zugesetzt und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellsortierung erfolgte mittels eines FACS-Vantage SE Durchflusszytometers.

### Kollagenase Lösung:

50 mg Kollagenase II (220 U/mg, #4176CLS2, Worthington); 50 mg Kollagenase IV (200 U/mg, #4188CLS4, Worthington), 200 mg BSA (Kohn's Fraction V, Sigma), 60 U DNase I (#2006-D, Worthington) in 20 ml DPBS.

### **3.5.2 Setzen von Hautwunden**

Für Wundheilungsstudien wurden C3HeB/Fe Mäuse verwendet, auf deren Rücken etwa 5 mm lange Schnittwunden gesetzt wurden. Dazu wurde die Haut bis zur Skelettmuskelschicht (Panniculus carnosus) eingeschnitten und an den Tagen 1, 3, 6, 9 und 14 nach dem Setzen der Wunden die verwundete Region entnommen. Dazu wurden diese zusammen mit 2 mm der gesunden Randregion ausgeschnitten und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nachfolgend wurde die RNA aus diesen Hautfragmenten isoliert wie unter 3.2.10 beschrieben.

### **3.5.3 Immunisierung mit rekombinatem RGS5**

Immunisierung von Kaninchen: Das zur Peptidimmunisierung verwendete Peptid LQNSYGFATFKS wurde von der Firma SeqLab (Göttingen) synthetisiert, mit KLH gekoppelt und i.p. injiziert. Das polyklonale Serum wurden anschließend durch SeqLab im Dot-Blot Assay auf Peptidreaktivität getestet und für positiv befunden. Rekombinant in E. coli synthetisiertes His:RGS5 wurde aus Bakterienlysat denaturierend aufgereinigt (siehe 3.4.9), der N-terminale His-Tag-Rest wurde entfernt und das gereinigte Protein zur Immunisierung von Kaninchen verwandt. Die Immunisierung erfolgte durch die Firma Eurogentech. Das Kaninchenserum wurde anschließend durch Affinitätschromatographie an rekombinatem RGS5 gereinigt.

Immunisierung von RGS5<sup>-/-</sup>-Mäusen (durchgeführt von Dr. G. Moldehauer, DKFZ): RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere wurden wiederholt mit rekombinatem RGS5 s.c. immunisiert: zunächst 1x mit 250 µg 1:1 in CFA, dann weitere 5x im Abstand von 14 Tagen mit 125 µg in PBS. Milzzellen wurden drei Tage nach der letzten Immunisierung entnommen und mit Myelomzellen der Linie X63.Ag8 fusioniert. Die resultierenden Hybridome wurden durch limitierende Verdünnung vereinzelt und unter Selektion in HAT-Medium kultiviert. Die Kulturüberstände resistenter Klone wurden nachfolgend im ELISA an rekombinatem RGS5 auf Reaktivität überprüft.

### **3.5.4 Adoptiver T-Zell-Transfer (durchgeführt von Dr. R. Ganss, DKFZ)**

*Transfers:* Adoptive Transfers von tumorspezifischen T-Lymphozyten wurden von Dr. R. Ganss, wie bereits publiziert, durchgeführt (Ganss et al., 2002). Hierbei wurden RT5-Tiere einer Strahlendosis von 10 Gy ausgesetzt (Buchler X-ray Strahler, Buchler, Braunschweig). Einen Tag nach der Bestrahlung wurde das Knochenmark durch i.v. Injektion von  $5 \times 10^6$  Knochenmarkzellen aus Rag<sup>-/-</sup> oder C3HeB/Fe Tieren rekonstituiert. Nach 3 Wochen erhielten die Tiere  $5 \times 10^6$  *in vitro* aktivierte

TagTCR1-T-Zellen (SV40-Tag-spezifische CD4<sup>+</sup> Effektor-T-Zellen) intravenös. Der Transfer wurde im Abstand von 3 Wochen 2x wiederholt. Die Tumoren wurden dann entnommen, fixiert, in OTC Medium eingebettet und für Gefrierschnitte verwendet.

*Generierung von TagTCR1-Effektorzellen:* TagTCR1 Zellen wurden aus den Lymphknoten von TagTCR1 Mäusen (Forster et al., 1995) isoliert und bei einer Dichte von  $1,5 \times 10^7$  Zellen pro 6-Loch-Platte ausgesät und in RPMI Medium mit 10% FCS, 2 mM Glutamine, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 0,05 mM 2-Mercaptoethanol, 10 U/ml rekombinantem IL-2 und 25 nM Tag Peptid 362-384 kultiviert. Die *in vitro* aktivierten Zellen wurden nach 72h geerntet und injiziert.

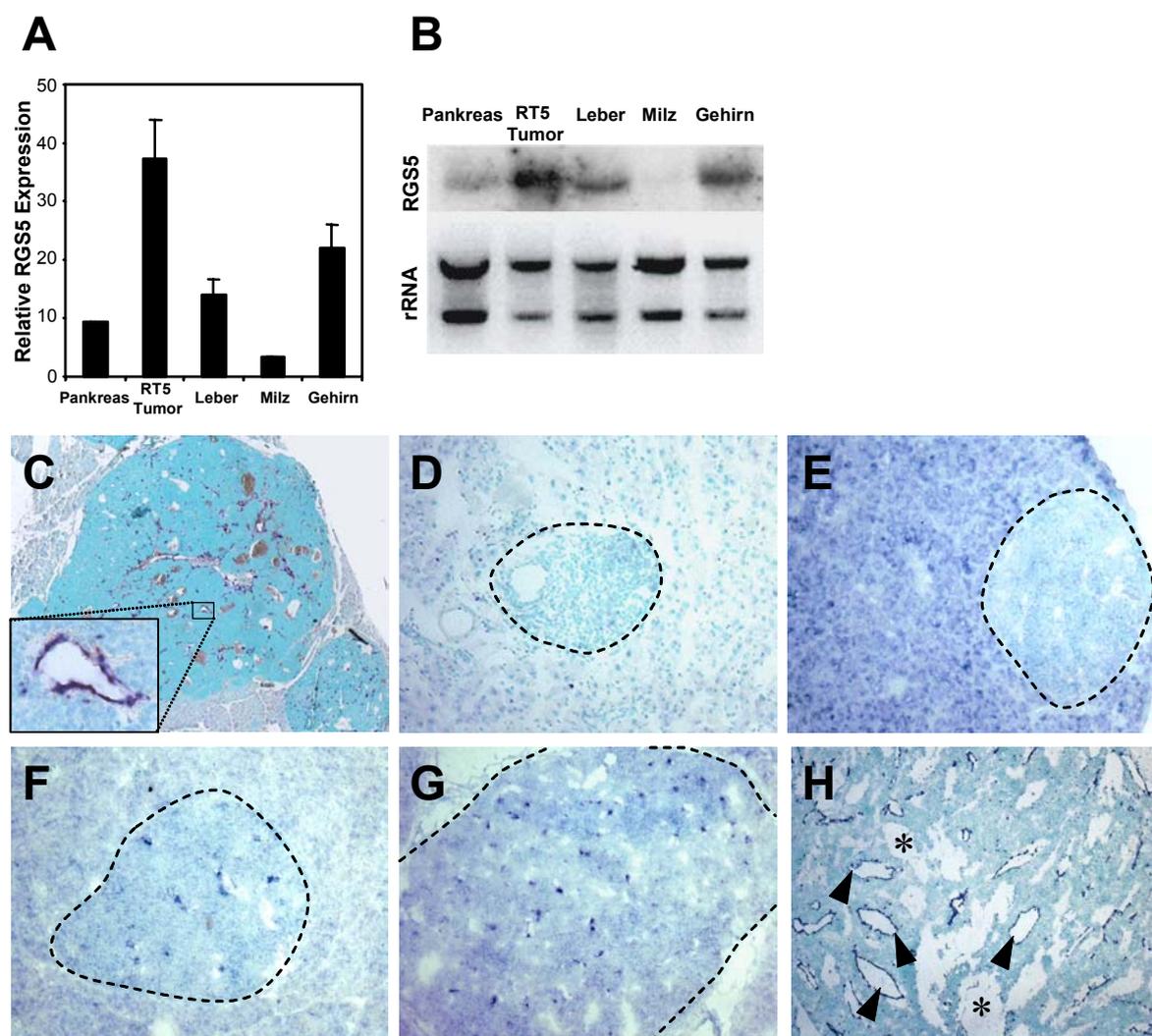
## 4 Ergebnisse

### 4.1 STUDIEN ZUR ROLLE VON RGS5 IN DER ANGIOGENESE

#### 4.1.1 Induktion von RGS5 in RIP1Tag5-Tumoren während der Neovaskularisierung

Bereits vor Beginn dieser Arbeit hatte Frau Dr. Ganss mit Hilfe der subtraktiven Hybridisierung von cDNAs aus Kapillargefäßen normaler Langerhans'scher Inseln und RT5-Tumoren gezeigt, dass RGS5 tumorspezifisch hochreguliert war. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde die RGS5-Expression in soliden Tumoren und Pankreas, sowie Leber, Milz und Gehirn, durch quantitative RT-PCR und Northern Blot untersucht. Beide Analysemethoden zeigten übereinstimmend, dass RGS5 vier- bis fünffach höher im Tumor, als im normalen Pankreas, exprimiert wurde (Abbildung 5A und B). Im Vergleich zum Insulinom exprimierten alle analysierten Organe deutlich weniger RGS5. Dies deckt sich mit Befunden anderer Arbeitsgruppen, die gezeigt haben, dass RGS5 in vielen Geweben konstitutiv exprimiert wird. Eine hohe RGS5-Expression wurde unter anderem in Aorta, Herz, Niere, Skelettmuskel und in bestimmten Gehirnregionen gezeigt (siehe Einleitung).

Die Expression von RGS5 war im Tumor erhöht, jedoch war nicht bekannt, welcher Zelltyp innerhalb des Tumors dafür verantwortlich war. Ebenso war die Kinetik der RGS5-Expression im Verlauf des Tumorstadiums unklar. Aus diesem Grund wurden In-situ-Hybridisierungen auf pankreatischem Gewebe durchgeführt. In Abbildung 5C ist der Paraffindünnschnitt eines soliden RT5-Tumors gezeigt, der mit einer markierten RGS5-Ribosonde hybridisiert wurde. Die RGS5-Färbung ist dunkelblau dargestellt und ist, in Übereinstimmung mit Befunden anderer Gruppen (Furuya et al., 2004; Chen et al., 2004; Kirsch et al., 2001), eindeutig mit Zellen der Tumorkapillargefäße assoziiert. In RT5-Tieren werden im Alter von 25 Wochen erste solide Tumoren manifest. Gleichzeitig findet man normale, untransformierte  $\beta$ -Zell-Inseln, wie auch alle anderen Stadien der Tumorentwicklung. Schnitte aus Tumorgewebe von 25 bis 30 Wochen alten RT5-Tieren wurden analog mit RGS5-Ribosonden gefärbt (Abbildung 5D-H). In den normalen Inseln, hyperplastischen Inseln und im exokrinen Pankreas waren RGS5-Transkripte nicht detektierbar (Abbildung 5D+E). In frühen Angiogenesegefäßen (Abbildung 5F) erschienen hingegen erstmals schwache RGS5-Signale. Dieses Stadium, das als „Angiogenic Switch“-Stadium bezeichnet wird (Hanahan und Folkman, 1996), ist morphologisch durch dilatierte Gefäße gekennzeichnet (Ryschich et al., 2002). In soliden Tumoren war die RGS5-Expression maximal und trat in großen und kleinen Tumorgefäßen auf (Abbildung 5H). Die Induktion erfolgt zeitgleich mit der Neovaskularisierung in der Angiogenese. Die im RT5-Tumor charakteristischen Einblutungen („blood lakes“) sind nicht endothelumgrenzt, sondern von Tumorzellen umschlossen (Hashizume et al., 2000). Dementsprechend findet man hier keine RGS5-spezifische Färbung.



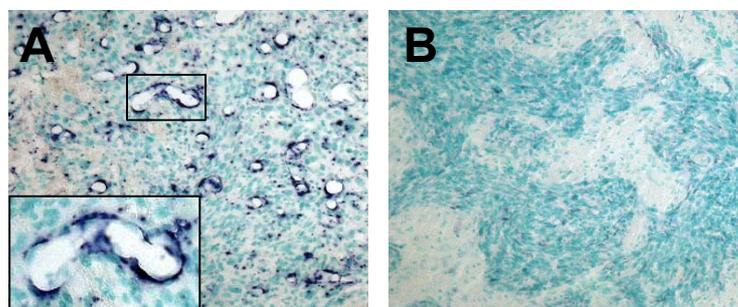
**Abbildung 5: Die RGS5-Expression wird im RT5-Tumor induziert und ist auf Angiogenesegefäße beschränkt.** (A+B) Die RGS5-mRNA-Expression wurde in Pankreas, Leber, Milz und Gehirn, sowie soliden Tumoren aus 30 Wochen alten RT5-Tieren in der quantitativen RT-PCR (A) und im Northern Blot (B) analysiert. Die Fehlerbalken in A geben die Standardabweichung (SD) aus 3 bis 5 unabhängigen Messungen an. (C-H) RGS5-Transkripte wurden durch In-situ-Hybridisierung (ISH) auf Paraffin- (C) bzw. Gefrierschnitten (D-H) visualisiert und durch Methylgrünfärbung gegengefärbt. Der Verlauf des Tumorwachstums im RT5-Modell ist in D bis H wieder gegeben. Die normalen Langerhans'schen Inseln (D) und hyperplastischen Inseln (E) sind noch negativ für RGS5. Nach Initiation der Angiogenese nimmt die Expression jedoch progressiv zu, wie die ISH an frühen (F) und späten (G) Angiogenesegefäßen zeigt. In soliden Tumoren sind deutlich RGS5-positive Gefäßstrukturen zu erkennen (C+H, Ausschnitt bzw. Pfeilspitzen). Einblutungen („blood lakes“) sind in H mit \* gekennzeichnet. Die gestrichelten Linien umreißen die  $\beta$ -Inselzellareale. Vergrößerungen: C (Ausschnitt) x25, D x16, E+F x12,5, G x10, H x5.

#### 4.1.2 Korrelation von RGS5-Expression und Angiogenesepotential in Astrozytomen

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass RGS5- und Angiogeneseinduktion im RT5-Modell gleichzeitig ablaufen. Es war allerdings unklar, ob sich dieses Phänomen auch auf andere Tumormodelle übertragen ließ. Wir untersuchten daher die Expression von RGS5 in zwei orthotopischen Astrozytommodellen. Die hier verwendeten Astrozytomlinien, Wildtyp-AST und HIFko-AST (siehe unten), unterscheiden sich in ihrem Angiogenesepotential und damit in ihrer

Fähigkeit, neue Gefäße durch Angiogenese zu bilden (Blouw et al., 2003). Die AST-Linien wurden ursprünglich aus Hippocampus-Astrozyten isoliert und mit SV40-Tag und V12-H-ras immortalisiert. Transformierte Astrozyten des Wildtyps bilden nach Implantation im Gehirn hypoxische, hämorrhagische Tumoren aus. HIFko-AST-Zellen wurden erzeugt, indem die aus HIFloxP-Mäusen stammende Wildtyplinie mit Cre-Adenoviren infiziert wurde (Blouw et al., 2003). Hierdurch konnte in den HIFloxP-Tieren das von loxP-Stellen flankierte HIF1 $\alpha$ -Gen (*hypoxia inducing factor 1 $\alpha$* ) deletiert werden. Nach intrakranialer Implantation wird in den Wildtypastrozytomen ein angiogenesegesteuerter Gefäßumbau vollzogen. Die Astrozytomgefäße zeigen typische Merkmale aktivierter Tumorgefäße, wie Dilatation, Fragilität und den Verlust der Gefäßhierarchie (Abbildung 6A). Sie ähneln damit den Tumorgefäßen im soliden RT5-Insulinom. Hingegen bilden HIF1 $\alpha$ -defiziente Astrozyten intrakranial hoch vaskularisierte und extrem invasive Tumoren aus. Die Gefäße erscheinen organisiert, weisen einen kleinen Gefäßquerschnitt auf und zeigen in ihrer Morphologie Ähnlichkeiten mit der Gefäßstruktur im normalen Gehirn (Abbildung 6B). HIF1 $\alpha$  kontrolliert die Expression von VEGF und vielen anderen Genen (Chaudhry et al., 2001, Semenza, 2002). Der Verlust in HIFko-Tumoren verhindert infolgedessen den Umbau der Gefäße durch Angiogenese. Stattdessen werden bestehende Gefäße „beschlagnahmt“ (sog. Gefäßkooptierung), um den Bedürfnissen des Tumors gerecht zu werden (Blouw et al., 2003).

Die In-situ-Hybridisierung zeigt, dass intrakraniale Wildtyp-Astrozytome in hohem Maß RGS5 exprimieren. Vor allem dilatierte Tumorblutgefäße (Ausschnitt in Abbildung 6) sind stark angefärbt. Währenddessen exprimieren HIFko-Astrozytome, in denen kein Gefäßumbau stattfindet, kaum RGS5. Damit korreliert die RGS5-Expression in zwei Tumormodellen mit dem Grad der Neovaskularisierung durch Angiogenese.

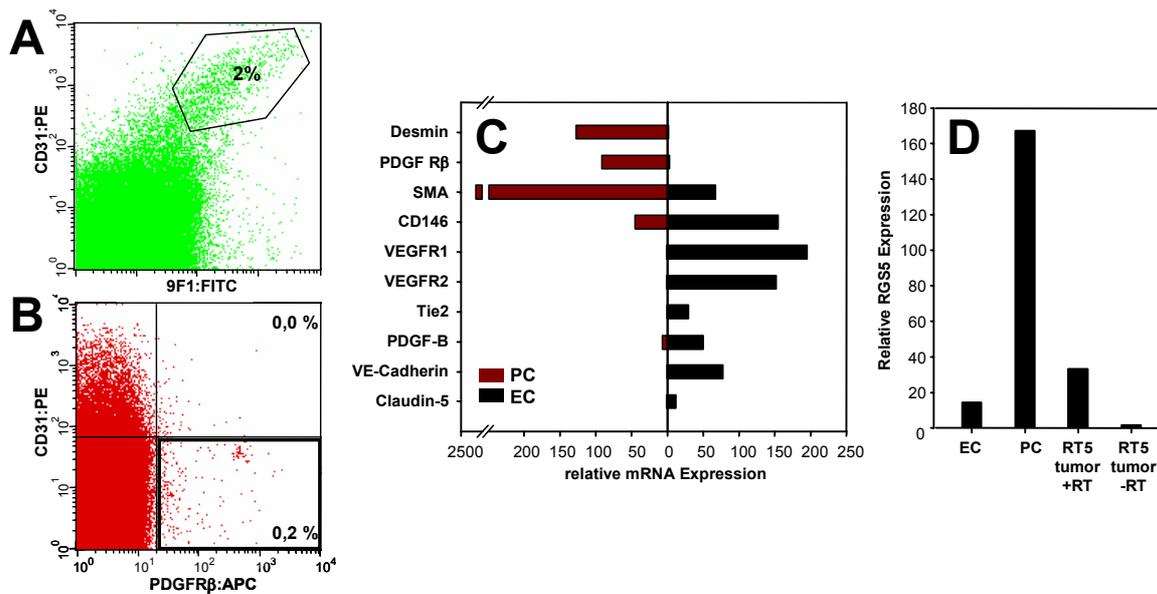


**Abbildung 6: RGS5-Expression in Astrozytomen.** Die RGS5-In-situ-Hybridisierung zeigt, dass RGS5 in Wildtyp-Astrozytomen (WT-AST, A), jedoch nicht in HIF1 $\alpha$ -defizienten Astrozytomen (HIFko-AST in B), exprimiert wird. Die Vergrößerung eines Tumorblutgefäßes ist in A dargestellt.

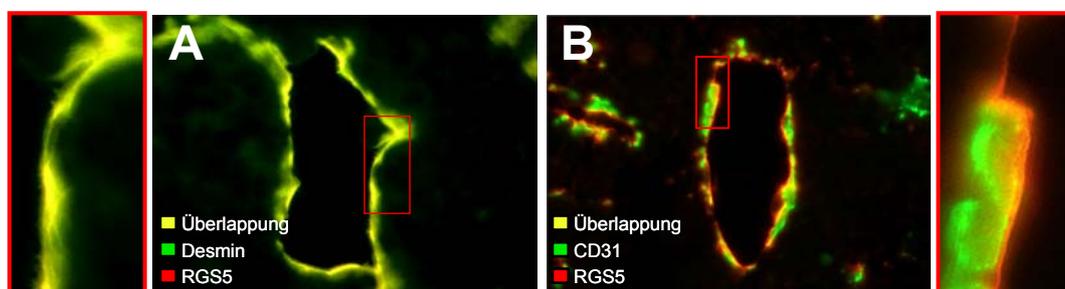
### 4.1.3 Perizytenspezifische Expression von RGS5

Berichte einiger Arbeitsgruppen legten die Vermutung nahe, dass die RGS5-Expression im endothelialen Kompartiment erfolgt (Kirsch et al., 2001). Hingegen weisen Betsholtz et al. eindrücklich nach, dass RGS5 im embryonalen Gehirn von Perizyten exprimiert wird (Cho et al., 2003). Die enge Nachbarschaft von Perizyten und Endothelzellen erschwert eine genaue Lokalisation von RGS5 durch In-situ-Hybridisierung. Aus diesem Grund wurden Endothelzellen (EZ) und Perizyten (PZ) aus soliden RT5-Tumoren mit Hilfe der Durchflusszytometrie isoliert und die relative RGS5-Expression in den beiden Zellpopulationen bestimmt. Endothelzellen wurden hierbei als ME-9F1<sup>+</sup>CD31<sup>+</sup>-Fraktion, Perizyten als PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>CD31<sup>-</sup> Zellfraktion, isoliert (Abbildung 7A+B). Das von ME-9F1 erkannte Antigen ist nicht bekannt; die Spezifität für murine Endothelzellen ist jedoch beschrieben (Harder et al., 1991). Der  $\beta$ -Rezeptor des *Platelet-derived Growth Factor* (PDGF), auch als CD140b bezeichnet, wurde vielfach als Perizytenmarker beschrieben. Bergers et al. zeigten, dass dieser Marker für die Isolierung von Tumorperizyten im RIPTag-Modell geeignet ist und auf  $\beta$ -Tumorzellen nicht auftritt (Bergers et al., 2003).

Die absolute Zellzahl sortierter Perizyten variierte beträchtlich von Experiment zu Experiment und lag zwischen 5.000 und 30.000 Zellen pro Tumorpräparation. Für jede Präparation wurden 5 bis 6 RT5-Mäuse im Alter von 27 bis 30 Wochen eingesetzt. Die unterschiedliche Ausbeute spiegelt teilweise die Varianz der eingesetzter Tumormasse wider, da die Tumorprogression und Gefäßdichte von Versuchstier zu Versuchstier verschieden ist. Allerdings wurden reproduzierbarere Ausbeuten von 80.000-120.000 Zellen pro Experiment bei den Endothelpräparationen erreicht. Um die Qualität und Reinheit der sortierten Zellpopulation beurteilen zu können, wurde daher die Expression von Markerproteinen in der quantitativen RT-PCR analysiert (Abbildung 7C). Wir konnten demonstrieren, dass die Endothelmarker CD146, VEGFR1, VEGFR2, tie2, PDGF-B, VE-Cadherin und Claudin-5 selektiv in der EZ-Präparation exprimiert waren. Das Expressionsmuster in der PZ-Präparation war reziprok (in Abbildung 7C als rote Histogramme dargestellt). Wie erwartet, fanden wir eine hohe Expression der perizytenspezifischen Marker Desmin, PDGFR $\beta$  und  $\alpha$ SMA, jedoch kaum oder nicht detektierbare Mengen endothelspezifischer Transkripte. Die FACS-Sortierung ermöglichte eine klare Auftrennung zweier definierter Zellpopulationen. Anknüpfend daran wurde die Expression von RGS5 in beiden Fraktionen analysiert (Abbildung 7D). Erstaunlicherweise war die RGS5-Expression im perivaskulären Kompartiment lokalisiert; in der Endothelfraktion konnten dagegen nur geringe Mengen RGS5-mRNA detektiert werden. Die in Abbildung 8 dargestellte Doppelfärbung von RGS5 mit endothel- oder perizytspezifischem Marker zeigt eindrucksvoll, dass die RGS5-Expression mit dem Perizytenmarker Desmin kolokalisierte (in gelb) und somit in diesem Zelltyp erfolgt. Im Gegensatz dazu ist die CD31-Färbung unmittelbar benachbart, jedoch klar trennbar von der RGS5-Färbung. Die während der Angiogenese im Tumor induzierte RGS5-Expression ist also auf die Perizyten der Gefäßwandung beschränkt.



**Abbildung 7: Im RT5-Tumor wird RGS5 von perivaskulären, PDGFRβ<sup>+</sup>-Zellen synthetisiert.** CD31<sup>+</sup>ME-9F1<sup>+</sup> Endothelzellen und PDGFRβ<sup>+</sup> Perizyten wurden durch FACS-Sortierung aus RT5-Tumoren isoliert (A+B). Aus den sortierten Zellpopulationen wurde Gesamt-RNA gewonnen und in cDNA umgeschrieben. In der nachfolgenden quantitativen PCR wurde die Reinheit der Präparationen bestätigt, indem die Expression von EZ- und PZ-spezifischen Genen überprüft wurde (C). Die relative RGS5-Expression in den isolierten EZ- und PZ-Populationen, sowie im Gesamttumor, wurde ebenso durch quantitative PCR bestimmt (D). Die relative Expression in C+D wurde gegen HPRT als internen Standard normiert. (-RT): cDNA-Synthese Kontrolle ohne Reverse Transkriptase. Die Prozentangaben in A+B geben den prozentualen Anteil der sortierten Zellen nach Ausschluss von toten Zellen durch Färbung mit 7-Aminoactinomycin D an.



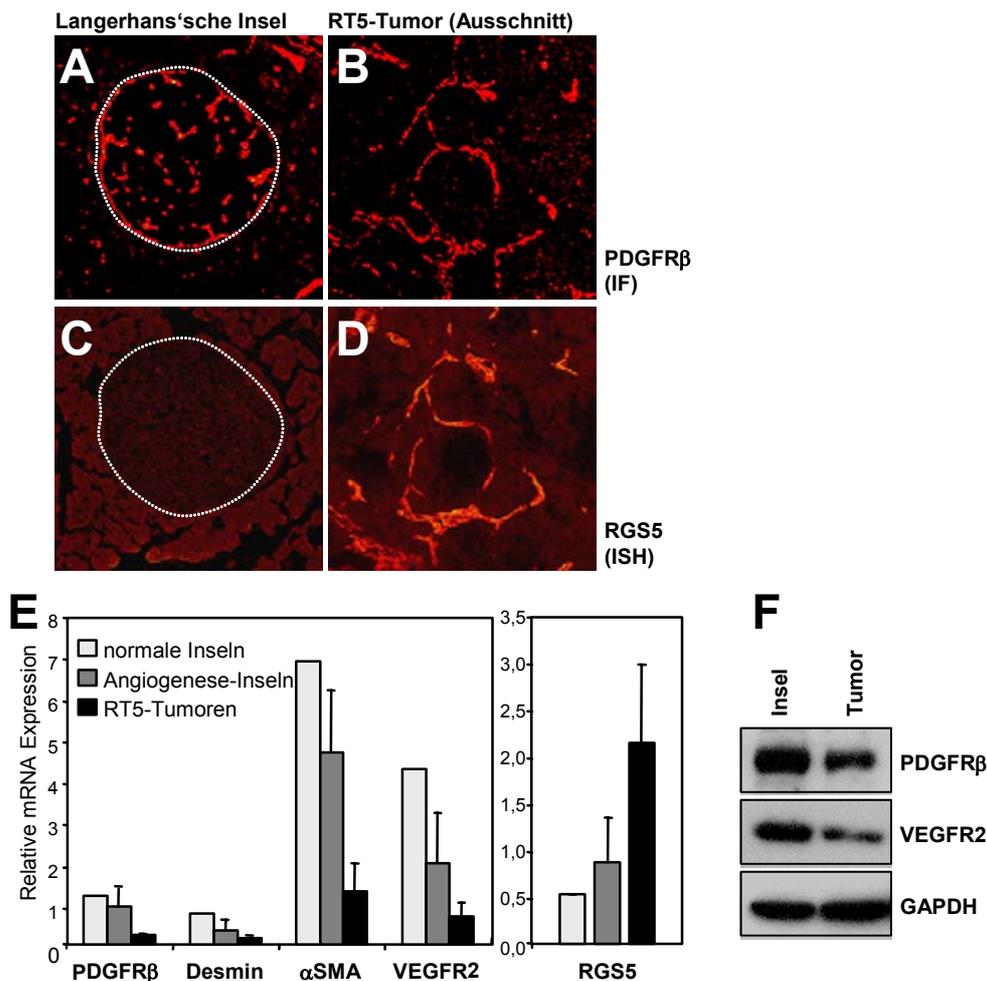
**Abbildung 8: Im RT5-Tumor kolokalisieren RGS5- und Desmin-Expression.** Gefrierschnitte solider Tumoren wurden zunächst mit RGS5-Ribosonden hybridisiert (rot) und nachfolgend immunchemisch mit Anti-CD31 (A) oder Anti-Desmin (B) Antikörpern gefärbt (grün). Die Ausschnitte (rote Umrandung) zeigen eindeutig die Kolokalisation von RGS5 und Desmin, nicht aber die Kolokalisation von RGS5 und CD31.

#### 4.1.4 Induktion der RGS5-Expression in den Perizyten während der Tumorentwicklung

In unterschiedlichen Geweben und Tumoren variiert die Umhüllung der Mikrokapillaren mit Perizyten. Nach Morikawa et al. sind im RIPTag2-Insulinom (das sich vom RT5 Insulinom lediglich durch den Zeitpunkt der SV40-Tag-Expression unterscheidet) und im *Lewis Lung*-Karzinom beispielsweise etwa 50% der Tumorgefäße mit Perizyten bedeckt; im MCa-IV-Mammakarzinom sind es über 80%. Demgegenüber ist in den meisten Gefäßen im Normalgewebe die Perizytenschicht

wesentlich dünner. Sie wird in der Literatur mit 11% Bedeckung für den Herzmuskel, 21% für den Skelettmuskel, 22-30% für das Gehirn oder mit 41% für die Retina beziffert (Sims et al., 1990; Morikawa et al., 2002). Es ist daher möglich, dass die Zunahme der RGS5-Expression im Tumor auf eine erhöhte Perizytenrekrutierung zurück zu führen war. Andererseits wurde ebenso demonstriert, dass Tumorperizyten, im Gegensatz zu den Perizyten im normalen Pankreas, SMA-positiv sind. Demnach werden offensichtlich während der Tumorentwicklung bestimmte Gene hoch reguliert. In Bezug auf die erhöhte RGS5-Expression im RT5-Tumor ergeben sich daher drei Erklärungsmöglichkeiten: 1. Perizyten wanderten während der Tumورprogression verstärkt in den Tumor, 2. Perizyten proliferierten *in situ*, oder 3. Perizyten induzierten (oder steigerten) die RGS5-Expression intratumoral.

Ein Vergleich der Expression von RGS5 und dem Perizytenmarker PDGFR $\beta$  in  $\beta$ -Zell-Inseln und im Tumorgewebe (Abbildung 9A-D) legte die Vermutung nahe, dass keine erhöhte Perizytenmigration oder -proliferation stattfand. Sowohl in normalen Inseln, als auch im Tumor, waren PDGFR $\beta$ -positive, perivaskuläre Zellen zu finden. Die Zelldichte (nicht notwendigerweise der Bedeckungsgrad der Gefäße) schien im Tumor nicht höher zu sein. Messbare RGS5-Signale waren dagegen nur im Tumor, nicht aber im Normalgewebe, detektierbar. Eine quantitative PCR-Analyse verschiedener Tumorstadien bestätigte, dass die Gefäßdichte und damit die Perizytenzahl im Verlauf der Tumorentwicklung abnimmt (Abbildung 9E). Als Indikator für die Gefäßdichte wurde die relative Expression der Endothelmarker VEGFR2, sowie der PZ-Marker PDGFR $\beta$ , Desmin und  $\alpha$ SMA, in normalen Inseln, Angiogeneseinseln und RT5-Tumoren gemessen. Die relative Expression von Endothel- und Perizytenmarker nahm gegenläufig zur RGS5-Expression progressiv ab. Auf Proteinebene wurde dies für PDGFR $\beta$  und VEGFR2 im Immunblot bestätigt (Abbildung 9F). Bei höchster RGS5-Expression war demnach die Gefäßdichte minimal – ein Indiz dafür, dass RGS5 intratumoral in den Perizyten hochreguliert wird. Obwohl die Gefäßneubildung durch Angiogenese initiiert wird und daher die Vaskularisierung zunimmt, um den Bedürfnissen des schnell wachsenden Tumors gerecht zu werden, ist dies nicht mit einem Anstieg der Gefäßdichte verbunden. In einer Vielzahl von Tumoren wurde bereits gezeigt, dass die Gefäßdichte im Tumor geringer als im Normalgewebe ist (Eberhard et al., 2000; Hlatky et al., 2002; Ryschisch et al., 2002; Blouw et al., 2003).

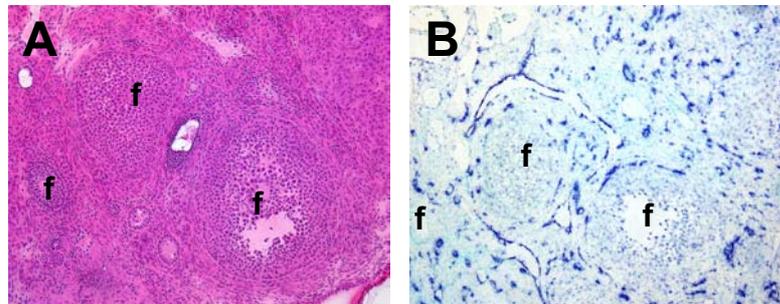


**Abbildung 9: Intratumorale Perizyten induzieren die Expression von RGS5.** (A-D) Konsekutive Gefrierschnitte einer Insel und eines soliden RT5-Tumors wurden mit Anti-PDGFR $\beta$ -Antikörpern (A+B) gefärbt oder mit RGS5-Ribosonden hybridisiert (C+D). (E) RNA aus normalen Inseln (1 Präparation mit 200 Inseln), Angiogeneseinseln (3 Präparationen mit je 10 Inseln) oder soliden Tumoren (12 Tumorproben) wurden in der quantitativen PCR auf die Expression von perizyten- und endothelspezifischen Markern, sowie RGS5, analysiert (Normierung mit HPRT). (F) Immunblot von Insel- und RT5-Tumorpräparationen zur Validierung der RNA-Daten in E. GAPDH (Glyzerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase): „Haushaltsgen“ zur Ladekontrolle. IF: Immunfluoreszenz; ISH: In-situ-Hybridisierung. (----) Abgrenzung der  $\beta$ -Zell-Inseln von exokrinem Pankreas.

#### 4.1.5 RGS5-Expression bei der physiologischen Angiogenese

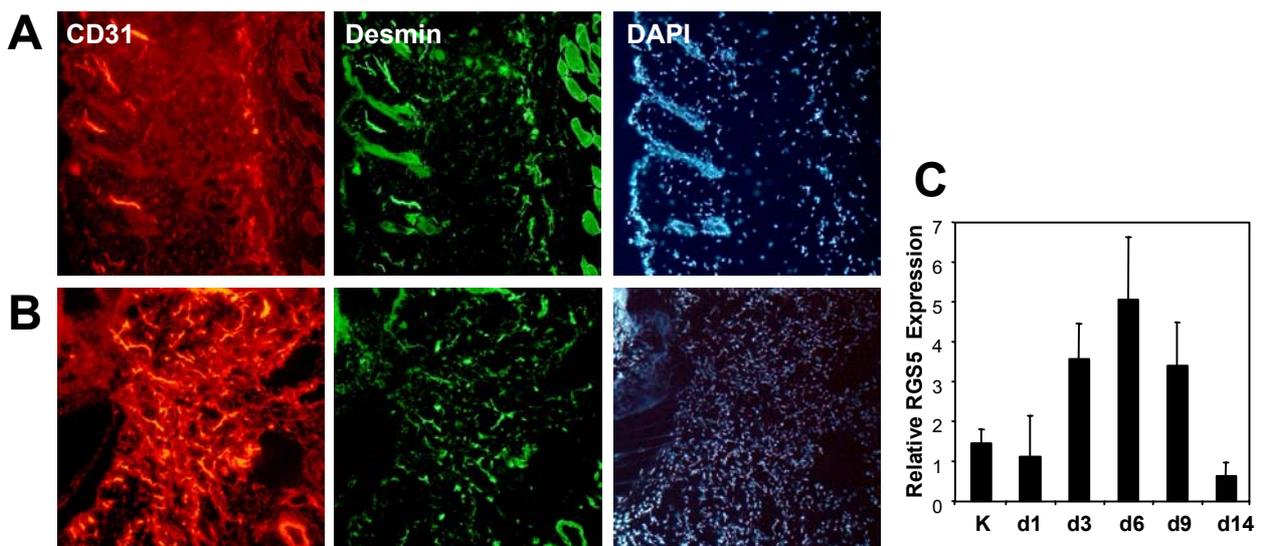
Bisher wurde nur die Expression von RGS5 in der pathologischen Angiogenese untersucht. Im folgenden werden zwei Beispiele physiologischer Angiogenese betrachtet: die Angiogenese in den weiblichen Fortpflanzungsorganen im Rahmen von Follikelreifung und Ovulation (Eisprung) und die Angiogenese im Granulationsgewebe während der Wundheilung. Die weiblichen Fortpflanzungsorgane (Ovar, Uterus und Plazenta) sind einem zyklischem Aufbau und Abbau unterworfen und gehören zu den wenigen Geweben, in denen physiologische Angiogenese stattfindet. Die Hämatoxylin/Eosin-Färbung eines murinen Ovars nach Hormonstimulierung zeigt Follikel unterschiedlicher Reifungsstadien, die von stark vaskularisiertem Stroma umgeben sind (Abbildung 10A). Durch In-situ-Hybridisierung mit RGS5-Sonden konnte demonstriert werden, dass RGS5

während der Angiogenese im Ovar exprimiert wird. Zudem ist die Expression deutlich auf die Blutgefäße begrenzt (Abbildung 10B).



**Abbildung 10: Angiogenese im Ovar.** Abgebildet sind konsekutive Gefrierschnitte des Ovars der Maus. (A) Hämatoxylin/Eosin-Färbung. (B) RGS5-In-situ-Hybridisierung. Follikel sind mit „f“ gekennzeichnet.

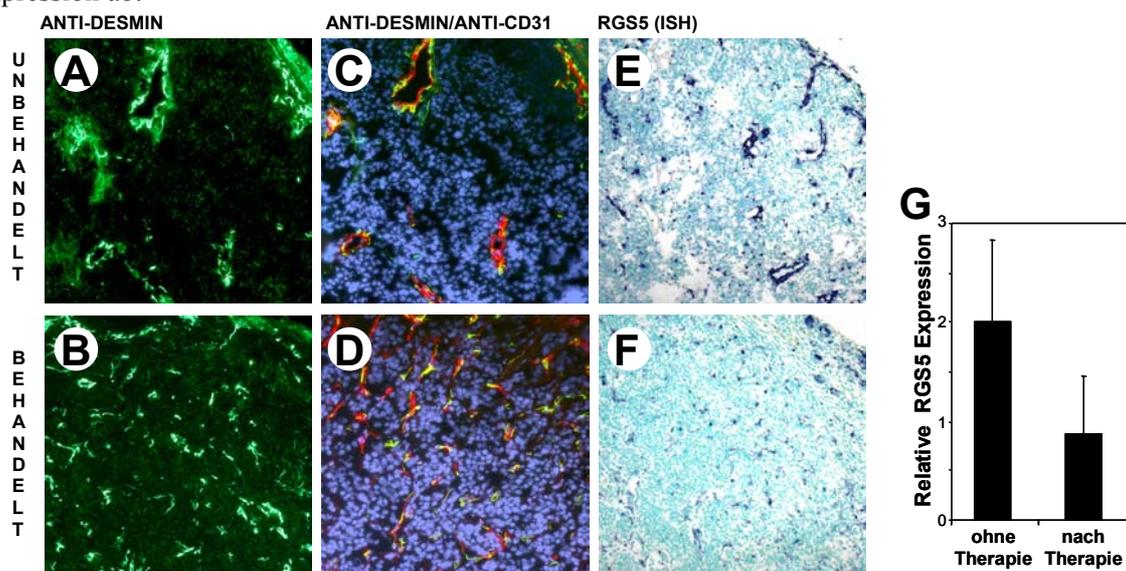
Zur Analyse der RGS5-Expression während der Wundheilung wurden dorsal Schnittwunden bei C3H-Versuchstieren gesetzt (Tag 1) und an den Tagen 1, 3, 6, 9 und 14 Hautproben entnommen. Diese wurden nachfolgend für histologische Färbungen oder zur RNA-Präparation verwendet. Die Wundheilung war begleitet von einer massiven Gefäßneubildung, wie an der Zunahme der Endothelfärbung (CD31) und der Perizytenfärbung (Desmin) in Abbildung 11 (A+B) zu erkennen ist. Die Expression von RGS5 folgte der Kinetik der Wundheilung: Innerhalb der ersten Woche stieg die RGS5-Expression langsam mit der Bildung von Granulationsgewebe (dem Wundstroma) an, und fiel dann in der abschließenden Vernarbungs- und Gewebeumbauphase wieder auf Basalniveau zurück (Abbildung 11C). Am Tag 14 war der Wundpfropf aufgelöst und die Wunde kaum von der ungeschädigten Haut unterscheidbar. Die Kinetik der RGS5-Expression folgt damit dem Verlauf der Gefäßneubildung.



**Abbildung 11: Angiogenese während der Wundheilung.** (A+B) Gefrierschnitte aus Hautproben, die vor (A) bzw. am Tag 6 nach (B) dem Setzen der Wunde entnommen worden waren, wurden immunhistologisch mit Anti-CD31 (rot), Anti-Desmin (grün) und dem DNA Farbstoff DAPI (blau – zur Kernfärbung) gefärbt. (C) Quantitative RT-PCR aus Hautproben vor (K: Kontrolle) und an den angezeigten Tagen nach der Wundensetzung entnommen. Normierung wie zuvor gegen HPRT - d: Tag (day).

#### 4.1.6 Kinetik der RGS5-Expression im Verlauf einer Tumorthherapie

Die RGS5-Expression und der Angiogeneseverlauf korrelierten in der Wundheilung, im Ovar und in zwei Tumormodellen. Es lag daher nahe zu überprüfen, ob RGS5 für die Prognose der Wirksamkeit einer Antiangiogenesetherapie verwendet werden könnte. Die für das RT5-Modell etablierte Tumorthherapie (Ganss et al., 2002) induziert keine Apoptose der gefäßbildenden Zellen, sondern basiert auf einer Kombination aus letaler Bestrahlung, Knochenmarkrestitution und adoptivem Transfer aktivierter, tumorspezifischer T-Zellen. Die Therapie bewirkt die Hemmung der Gefäßneubildung und führt schließlich zu „normalisierten“ Tumorgefäßen (siehe 1.1.5). Dies führt letztendlich zur vollständigen Abstoßung solider RT5-Tumoren. Wenn die RGS5-Expression mit dem Einschalten der Angiogenese induziert wird, würde dessen Expression vermutlich nach Abbruch der Gefäßneubildung reduziert oder eingestellt werden. Normalisierte Gefäße sollten demgemäß eine geringere RGS5-Expression zeigen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden unbehandelte und behandelte Tumoren nach Bestrahlung und adoptivem Transfer in der In-situ-Hybridisierung untersucht. Unbehandelte Tumore zeigten die typische heterogene Gefäßstruktur mit extensiven Einblutungen (Hämorrhagien) und stark unterschiedlichen Gefäßkalibern (Abbildung 12A+C). Im Gegensatz dazu wiesen behandelte Tumoren eine hohe Gefäßdichte auf; die Kapillargefäße ähnelten denen im normalen Pankreas (Abbildung 12B+D). Ebenso waren RGS5-Hybridisierungssignale in behandelten Tumoren deutlich reduziert (Abbildung 12F). Die Kinetik der RGS5-Expression verlief daher gegenläufig zur Gefäßnormalisierung. Die Reduktion der RGS5-Expression nach der Therapie konnte durch quantitative PCR bestätigt werden (Abbildung 12G). Die Befunde belegten, dass die RGS5-Expression in Tumorperizyten eng mit dem präzise regulierten Prozess der Angiogenese verknüpft ist. Mit dem Übergang der Gefäße in einen stabileren, ruhenden Zustand nimmt die RGS5-Expression ab.



**Abbildung 12: Therapie von RT5-Tumoren.** Unbehandelte (A,C,E) und behandelte (B,D,F) Tumoren wurden immunhistologisch auf Endothel- und Perizytenmarker und in der In-situ-Hybridisierung auf RGS5 untersucht. Kontrolltumoren aus 26-Wochen alten, unbehandelten RT5-Tieren wurden mit Anti-Desmin (grün - A,C), Anti-CD31 (rot - C), sowie RGS5 (E) gefärbt. Überlappende Desmin- und CD31-Signale sind gelb dargestellt. Geschwister Tiere wurden mit 1000 rad bestrahlt und erhielten nach Reconstitution des Knochenmarks drei adoptive Transfers mit SV40-Tag-spezifischen Effektor-T-Zellen. In der 26. Lebenswoche wurden die therapierten Tumoren isoliert und analog gefärbt: Desmin (B,D), CD31 (D), RGS5 (F). (G): Quantitative RT-PCR Ergebnisse aus Gesamt-RNA behandelter und unbehalteter Tumoren.

## 4.2 STUDIEN ZUR LOKALISATION UND STABILITÄT VON RGS5

### 4.2.1 Herstellung rekombinanter RGS-Fusionsproteine

Für die Analysen in Kapitel 4.2 wurden verschiedene RGS-Fusionskonstrukte generiert, die N- oder C-terminal mit einer Erkennungssequenz (Tag) verbunden waren (Abbildung 13). Im Myc:RGS5-Konstrukt war die Sequenz EQKLISEEDL aus dem Protoonkogen c-Myc der murinen RGS5-Sequenz (GenBank Nr. NM\_009063) vorgelagert. Diese wird spezifisch durch den Antikörper 9E10 (nachfolgend mit Anti-Myc bezeichnet) erkannt. Im His:RGS5-Konstrukt war RGS5 N-terminal mit einer Histidinpentamersequenz (His-Tag) verbunden, die eine Detektion mit Penta-His-Antikörpern (Anti-His, Novagen/VWR Darmstadt) ermöglichte. Alle in *E. coli* exprimierten RGS-Proteine enthielten dagegen Hexa-Histidin-Tags. Das Konstrukt RGS5:EGFP ist die C-terminale Fusion aus RGS5 und dem 30 kD-großen *enhanced green fluorescent protein*, EGFP. Das  $\Delta$ RGS5:EGFP-Fusionsprotein unterschied sich von dem RGS5:EGFP-Fusionsprotein lediglich durch eine N-terminale Deletion der Aminosäuren 1 bis 30.

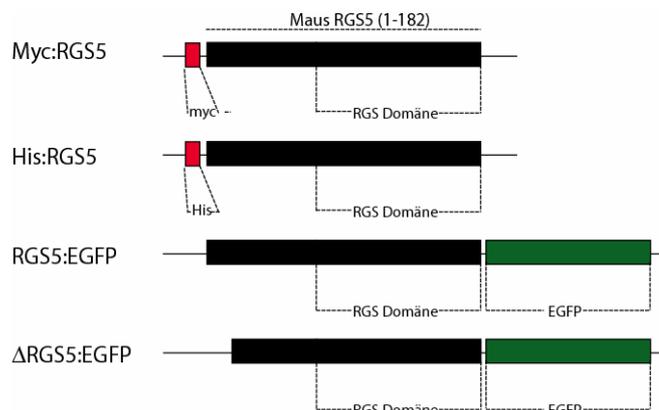
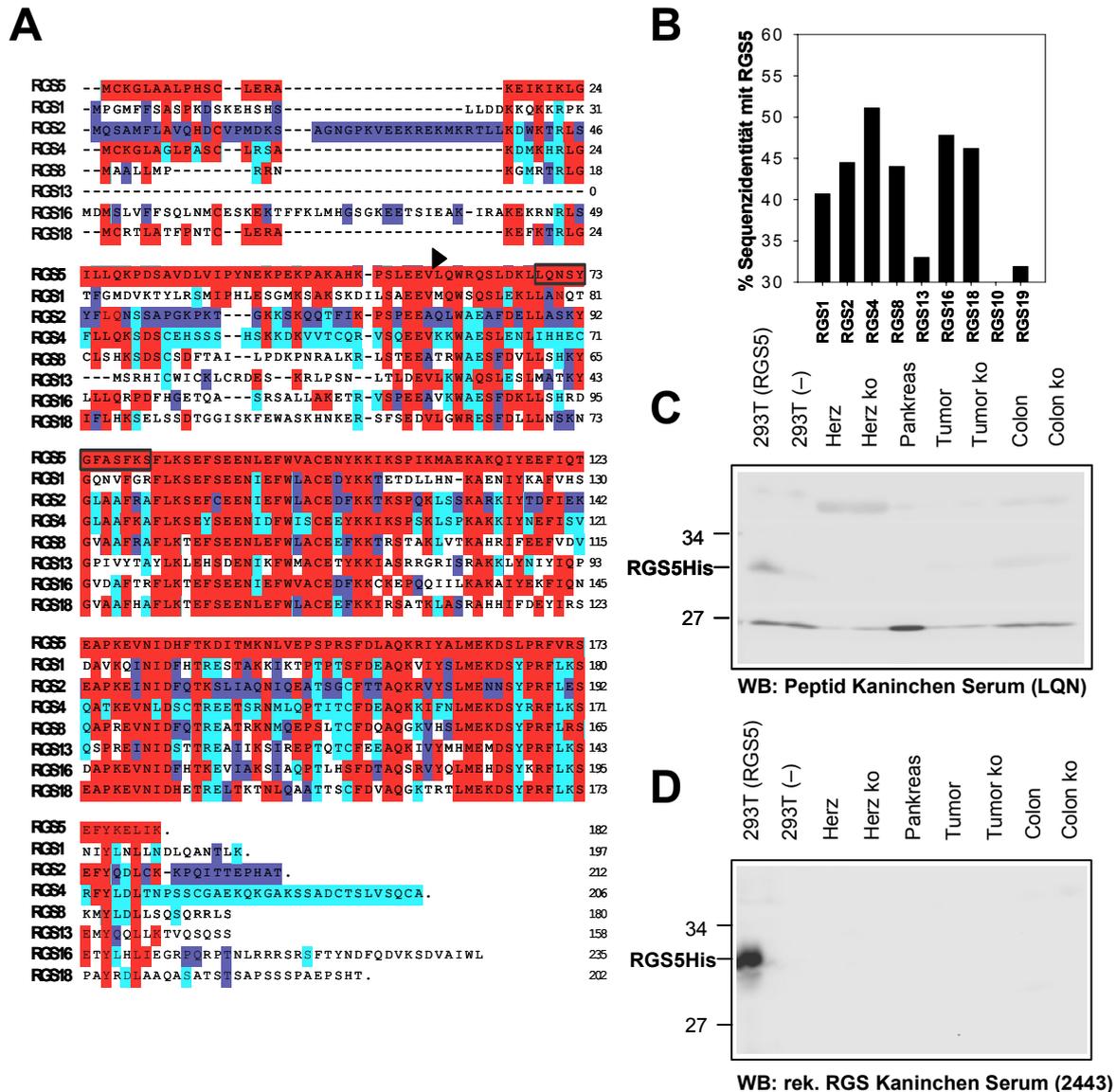


Abbildung 13: Generierung von RGS5-Fusionskonstrukten.

### 4.2.2 Generierung von RGS5-spezifischen Antikörpern

Die Herstellung von Antikörpern durch Immunisierung von Kaninchen mit Peptid setzt voraus, dass die Sequenz des Peptids eindeutig für das Immunogen ist, um eine Kreuzreaktivität des Antikörpers in späteren Anwendungen zu vermeiden. Große Sequenzhomologien zwischen den Mitgliedern der RGS-Familie begrenzen die Auswahl RGS5-spezifischer Peptidsequenzen, wie in Abbildung 14 (A+B) dargestellt. RGS4 besitzt mit 51% Sequenzidentität die höchste Homologie zu RGS5. Zudem sind vor allem die Sequenzabschnitte der RGS-Domäne, die mit Switch-Regionen von  $G\alpha$  interagieren, stark konserviert. Daraus resultiert, dass die Auswahl eindeutiger Peptidsequenzen stark eingeschränkt ist. Die für die Immunisierung verwendete Peptidsequenz LQNSYGFASFKS liegt in einem kurzen,

weniger konservierten Bereich innerhalb der RGS-Domäne (Abbildung 14A). Polyklonales Kaninchenserum (als „LQN“ bezeichnet) aus der Peptidimmunisierung detektierte RGS5 in 293T-Zellen nach transients Transfektion, jedoch nicht in Organlysaten aus Herz, Kolon, Pankreas oder RT5-Tumoren (Abbildung 14C). Auch RGS5:EGFP-Fusionsproteine waren in Transfektanten detektierbar (nicht gezeigt), hingegen konnte in keinem Fall endogenes RGS5 nachgewiesen werden.

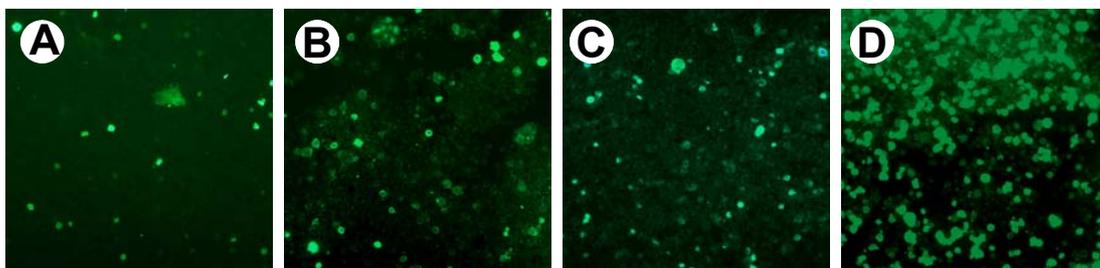


**Abbildung 14: Generierung und Reaktivität von Anti-RGS5 Antikörpern (Kaninchen).** (A) Homologievergleich muriner RGS-Sequenzen nach der Clustal W-Methode (Software: MegAlign/DNAStar, GATC Konstanz). Die zur Immunisierung verwendete Peptidsequenz ist durch Umrahmung hervorgehoben. Der Beginn der RGS-Domäne ist durch die Pfeilspitze gekennzeichnet. Farbcode: rot: mit RGS5 identische Aminosäurereste, cyan: mit RGS4 bzw. blau: mit RGS2 identische Reste. (B) Vergleich der prozentualen RGS5-Sequenzidentität der R4-Familienmitglieder, sowie den kleinen RGS-Molekülen RGS10 und RGS19/GAIP. (C+D) Reaktivität der gereinigten Seren LQN (Peptid) und 2443 (aus Immunisierung mit rekombinanten RGS5) im Immunblot auf  $8 \times 10^5$  RGS5-transfizierte 293T-Zellen (Spur 1) bzw. Organlysaten aus Wildtyp und RGS5-defizienten (ko) Mäusen (jeweils  $75 \mu\text{g}$  Gesamtprotein pro Spur). (-): untransfizierte 293T-Zellen. WB: im Western Blot verwendeter Antikörper.

Ebenso wurde rekombinantes His:RGS5 zur Immunisierung von Kaninchen verwendet (siehe 3.5.3). Dieses Immunsereum (bezeichnet als Serum 2443) erkannte ebenso durch Transfektion eingebrachtes RGS5 im Western Blot. Endogenes RGS5 war dagegen in keinem der analysierten Organe

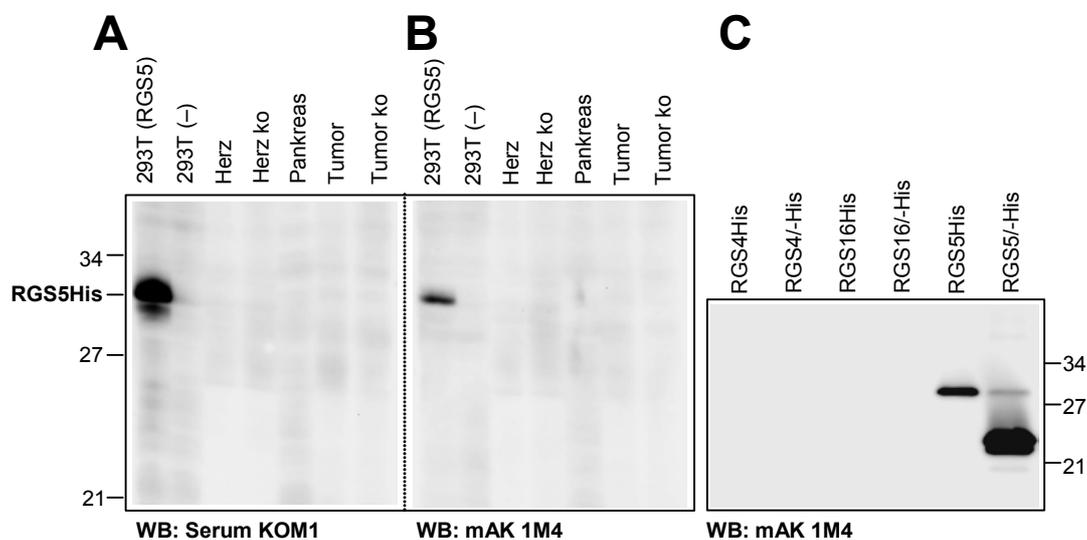
nachweisbar, obwohl vor allem Herz und Tumor nach unseren Daten (4.1.1) und denen anderer Gruppen (Adams et al., 2000; Seki et al., 1998) vergleichsweise hohe Expression zeigen dürften (Abbildung 14D).

Die kürzlich in unserer Arbeitsgruppe etablierte RGS5-Knock-out-Maus (siehe Abschnitt 4.4) ermöglichte die Generierung monoklonaler Antikörper nach Immunisierung von RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren mit rekombinantem RGS5-Protein (durchgeführt von Dr. G. Moldenhauer). Die Reaktivität der Hybridomüberstände wurde durch Immunfluoreszenzfärbung von Zytospins RGS5-transfizierter 293T-Zellen geprüft. Aus der Fusion resultierten zwei Klone mit der Bezeichnung 1M3 und 1M4, die in Immunfluoreszenz und ELISA gleich reaktiv waren und RGS5 detektierten (nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde nur der Klon 1M4 (Isotyp IgG1) für die Aufreinigung durch Affinitätschromatographie an Protein-G-Sepharose verwendet. Abbildung 15 zeigt die Immunfluoreszenzanalyse mit dem monoklonalem Antikörper 1M4 (A) und RGS5-Immuns serum, das unmittelbar vor der Fusion gewonnen wurde (bezeichnet als „KOM1“, in B). Im direkten Vergleich ist eine Anti-Myc Färbung gezeigt (C). Auf Zytospins mit Myc:RGS5-transfizierten 293T-Zellen zeigten sowohl Mausserum KOM1, als auch die monoklonalen Antikörper 1M4 und Anti-Myc, vergleichbare Fluoreszenzintensitäten. Nach Transfektion mit Myc:G $\alpha_{i3}$ -kodierender cDNA und analoger Färbung mit Anti-Myc (D) ergab sich ein sehr viel höherer Anteil myc-positiver Zellen, als dies bei der Transfektion mit Myc:RGS5-cDNA der Fall war. Der geringe Anteil gefärbter Zellen in den RGS5-Transfektanten spiegelt vermutlich nicht die Reaktivität des Antikörpers wider, sondern die relative Expressionshöhe der beiden Proteine. Weiterhin könnten die His-Tags im RGS5 schlechter zugänglich sein, als im G $\alpha$ . In Kotransfektionsexperimenten, in denen gleiche Mengen G $\alpha$ - und RGS5-cDNA eingesetzt wurden, war RGS5 grundsätzlich geringer exprimiert. Dies war im Western Blot nach einer denaturierenden Gelelektrophorese klar erkennbar (nicht gezeigt; vgl. Abbildung 25b). Somit erscheinen Unterschiede in der Epitopzugänglichkeit unwahrscheinlich. Die Expression von RGS5 nach Transfektion ist sicherlich sehr viel niedriger als die von G $\alpha$ , möglicherweise aufgrund einer höheren Toxizität von RGS5 bei Überexpression.



**Abbildung 15: Murine Anti-RGS5-Antikörper und Anti-Myc-Tag Antikörper zeigen vergleichbare Reaktivität in der Immunfluoreszenz.** Zytospins von 293T-Zellen, transient transfiziert mit Myc:RGS5 cDNA, wurden mit monoklonalem Anti-RGS5 Antikörper Klon 1M4 (A), mit Anti-RGS5 Serum KOM1 (B) oder Anti-Myc Antikörper (C) gefärbt. Als Kontrolle wurde Myc:G $\alpha_{i3}$ -cDNA transfiziert und ebenso mit Anti-Myc gefärbt (D). (Die Effizienz der Transfektion wurde mit Hilfe EGFP-transfizierter 293T-Zellen in der Durchflusszytometrie 24 h nach der Transfektion überprüft, und betrug 100% (nicht gezeigt)).

Im Western Blot mit Organextrakten ergab sich ein ähnliches Bild wie bei der Verwendung der Kaninchen-Antikörper. In 293T-Transfektanten war der Nachweis von überexprimiertem RGS5 unproblematisch. Dagegen konnte endogenes RGS5 nicht in Extrakten aus Herz, Pankreas, RT5-Tumor, Skelettmuskel, Gehirn, Leber, Thymus oder Niere detektiert werden (Abbildung 16 bzw. nicht abgebildet). Der Anti-RGS5-Antikörper 1M4 zeigte keine Kreuzreaktivität mit den stark homologen Familienmitgliedern RGS4 und RGS16, wie der Immunblot mit rekombinanten His:RGS5-Proteinen demonstriert. Da RGS5 auch nach proteolytischer Abspaltung des Histidinrestes detektiert wurde, ist das Epitop von 1M4 innerhalb des RGS5-Moleküls. Demnach erkannten das Mausserum KOM1, der monoklonale Antikörper 1M4, wie auch die beiden Kaninchenseren, RGS5 nach transienter Überexpression in 293T-Zellen, jedoch nicht endogen in Organextrakten.



**Abbildung 16: Immunoreaktivität von Anti-RGS5-Mausserum (KOM1) und monoklonalem Anti-RGS5-Antikörper 1M4.** (A)+(B): Identische Blots (wie in Abbildung 14) wurden entweder mit Mausserum (1:750) oder mit 1M4 inkubiert. (C) Zur Überprüfung der Kreuzreaktivität wurden etwa 500 ng der rekombinanten RGS-Proteine vor bzw. nach Abspaltung des His-Restes (-His) eingesetzt. Die Detektion erfolgte mit 1M4.

Weiterhin wurde RGS5 aus Herzextrakten mit Kaninchen- oder Maus-RGS5-Antikörpern präzipitiert, um so RGS5 in der Probe anzureichern. Auch mit Hilfe der Immunpräzipitation war eine Detektion von endogenem RGS5 nicht möglich (Daten nicht gezeigt). Dies unterstützt die Vermutung, dass RGS5 in äußerst geringen Mengen im Lysat vorlag.

#### 4.2.3 Die Stabilität von RGS5 *in vivo*

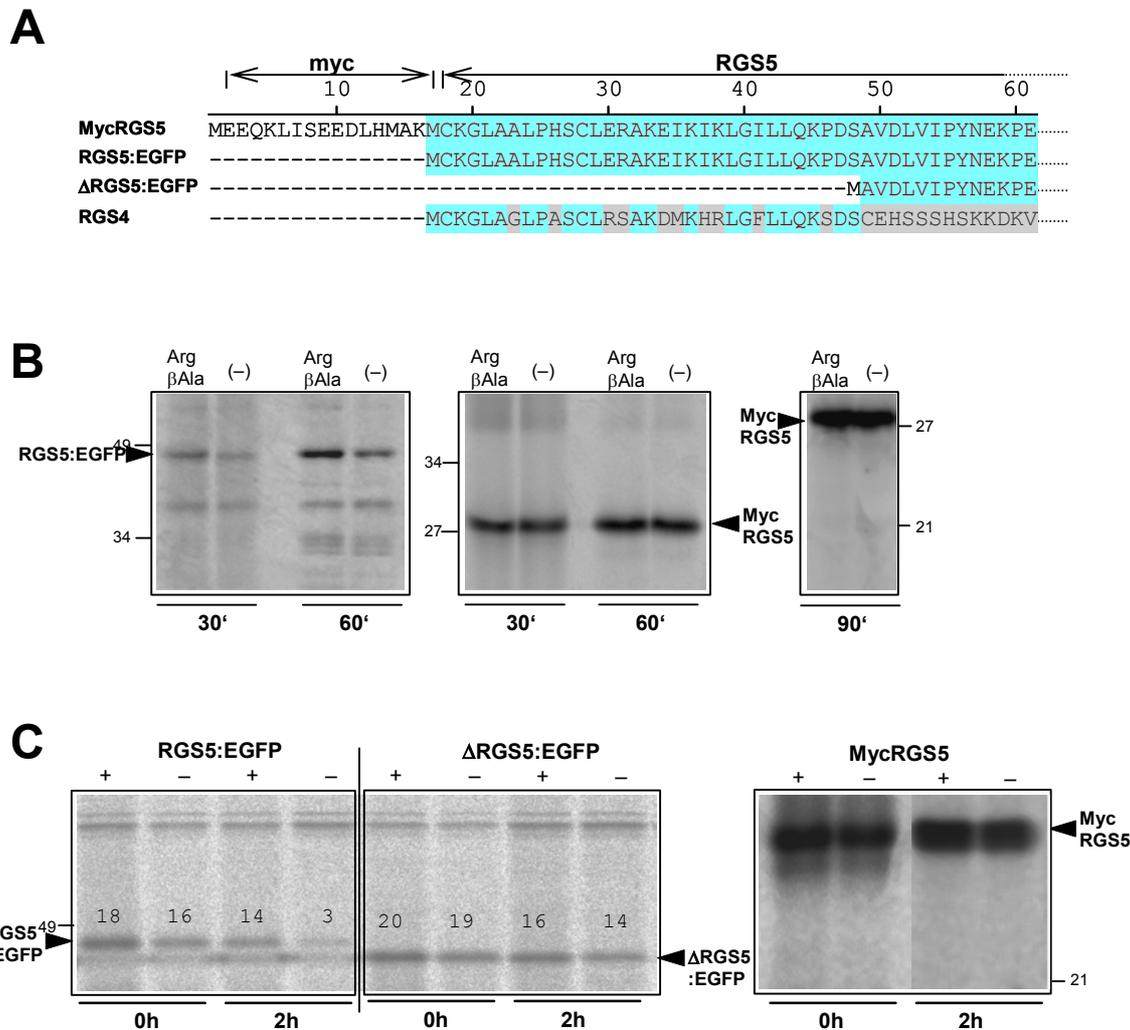
Eine Vielzahl von biologischen Regelkreisen, wie jene die Zelldifferenzierung oder Stress regulieren, enthält metabolisch instabile Proteine als regulatorische Instanz. Die kurze Halbwertszeit dieser Moleküle *in vivo* erlaubt, dass ihre Konzentration und ihre räumliche Ausbreitung schnell durch Veränderung der Synthese- oder Abbaurate reguliert werden kann (Maniatis, 1999; Nasmyth, 1999; Hershko und Ciechanover, 1998; Varshavsky, 1997). RGS5 ist als potentieller Regulator von  $G_{i1-3}$ ,  $G_q$

und G<sub>o</sub> (Cho et al., 2003; Zhou et al., 2001) an einer zentralen Schalterposition. Eine kurze Halbwertszeit könnte die beobachtete niedrige Konzentration von RGS5 *in vivo* erklären, da nur wenig Protein akkumuliert würde. RGS4 und RGS16, beide Mitglieder der R4-Familie und – wie zuvor gezeigt – RGS5 strukturell sehr ähnlich, sind ebenso durch ihre Verweildauer in der Zelle reguliert und werden über den sogenannten „*N-end rule pathway*“ abgebaut (Davydov und Varshavsky, 2000) (siehe dazu Box 1). Die Vermutung liegt daher nahe, dass RGS5 ebenso als Substrat in diesem Abbauweg dienen könnte.

**Box 1: Der „*N-end rule*“ Weg:** Die „N-End“-Regel setzt die Halbwertszeit eines Proteins in Beziehung mit dem N-terminalen Aminosäurerest (Varshavsky, 1997). In Vertebraten sind nach dieser Regel Asp, Glu und Cys „sekundär-destabilisierende“ Reste. Arginintransferasen verknüpfen diese Reste mit einem „primär-destabilisierenden“ Argininrest und machen das Protein zum Substrat für N-Recognin, einer Komponente des Ubiquitinierungsweges. N-Recognin der Säuger besitzt zwei Bindestellen, die als Typ 1- und Typ 2-Stelle bezeichnet werden. Typ 1-Stellen sind spezifisch für die primär-destabilisierenden Reste Arg und Lys, Typ 2 für hydrophobe Aminosäuren. Beide Bindestellen können spezifisch durch Dipeptide inhibiert werden (Davydov und Varshavsky, 2000). Im weiteren Verlauf wird das abzubauen Protein mehrfach kovalent mit Ubiquitin verknüpft, das als Erkennungssignal für den Abbau durch das 26S-Proteasom dient (Baumeister et al., 1998; DeMartino und Slaughter, 1999). In Eukaryonten sind destabilisierende Aminotermini allein nicht ausreichend. Die zweite Komponente eines Abbausignals (oder Degrons) wird durch einen oder mehrere interne Lysinreste gebildet, die ebenso ubiquitiniert werden (Davydov und Varshavsky, 2000; Chau et al., 1989). Eine Voraussetzung für die Degradation im „N-End“-Abbauweg ist die Entfernung des N-terminalen Methioninrestes durch zytosolische Methioninaminopeptidasen. Die Effizienz der Entfernung ist dabei von der Aminosäure an Position +2 des Proteins abhängig. Die Sequenz Met-Cys wird zeitgleich mit der Translation geschnitten.

Im Fall von RGS4 musste neben (1.) der kotranslationalen Entfernung des N-Methionins, (2.) einem Cys-Rest an Position +2, (3.) einem internen Lysin-Rest, eine weitere, (4.) Bedingung für die Degradation gegeben sein: ein basischer Rest (Arg oder Lys) auf Position +3. Wie der Sequenzvergleich in Abbildung 17A zeigt, sind die N-terminalen Aminosäuren von RGS4 und RGS5 identisch; die Bedingungen 1, 2 und 4 sind also bereits erfüllt. Die Stabilität von RGS5-Fusionsproteinen wurde zunächst durch In-vitro-Expression in Kaninchen-Retikulozyten untersucht. Im Gegensatz zur EGFP-Fusion besitzt Myc:RGS5 kein N-terminales Degron (also kein Cys auf +2) und sollte vor dem Abbau über den „N-End“-Weg geschützt sein (Abbildung 17A). Die relative Menge an RGS5:EGFP-Fusionsprotein war in Gegenwart des Typ 1-Inhibitors Arginin- $\beta$ -Alanin bei gleicher Inkubationszeit deutlicher höher als in Abwesenheit des Dipeptids (Abbildung 17B). Dagegen blieb die Bandenintensität der Myc:RGS5-Fusion bei Inkubation mit Arg- $\beta$ -Ala gleich. Die Stabilität von RGS5:EGFP war relativ gering, da eine beginnende Degradation bereits nach einstündiger Inkubation (siehe Banden bei 34 kD) sichtbar war, die unbeeinflusst von der Gegenwart des Dipeptids

war. Neben dem „N-End“-Abbauweg scheinen demnach weitere Degradationswege aktiv zu sein. Ebenfalls ist es möglich, dass die Inhibition nicht vollständig war. Der N-terminale Myc-Tag schützte RGS5 hingegen effektiv vor Degradation, da auch nach 90 Minuten keine Abbauprodukte evident waren.



**Abbildung 17: Stabilität von RGS5-Fusionsproteinen.** (A) Vergleich der Aminotermini von Myc:RGS5, RGS5:EGFP bzw. RGS5,  $\Delta$ RGS5:EGFP und RGS4 mit dem Programm DNASTar/ MegAlign (ClustalW). (B) Expression von RGS5:EGFP (links) und Myc:RGS5 (Mitte und rechts) in Retikulozytenlysaten in Gegenwart von 1 mM Arg- $\beta$ -Ala und 150  $\mu$ M Aminopeptidasen-Inhibitor Bestatin bzw. 150  $\mu$ M Bestatin allein (-). Die Reaktion wurde nach 30, 60, oder 90 min gestoppt. (C) Metabolische Markierung von RGS5:EGFP,  $\Delta$ RGS5:EGFP und Myc:RGS5 in cos7-Zellen und nachfolgender Immunpräzipitation mit Anti-RGS5 bzw. Anti-Myc. In den +-Proben wurde 50  $\mu$ M MG132 vor und während *Pulse* und *Chase* zugesetzt. Nach Entfernen nicht-metabolisierter Radioaktivität wurden die Zellen lysiert (0 h Proben) bzw. weitere 2 h bei 37° C inkubiert („*Chase*“) und dann lysiert. Die Zahlen geben die densitometrisch bestimmte normierte Pixelzahl (pro Flächeneinheit) an.

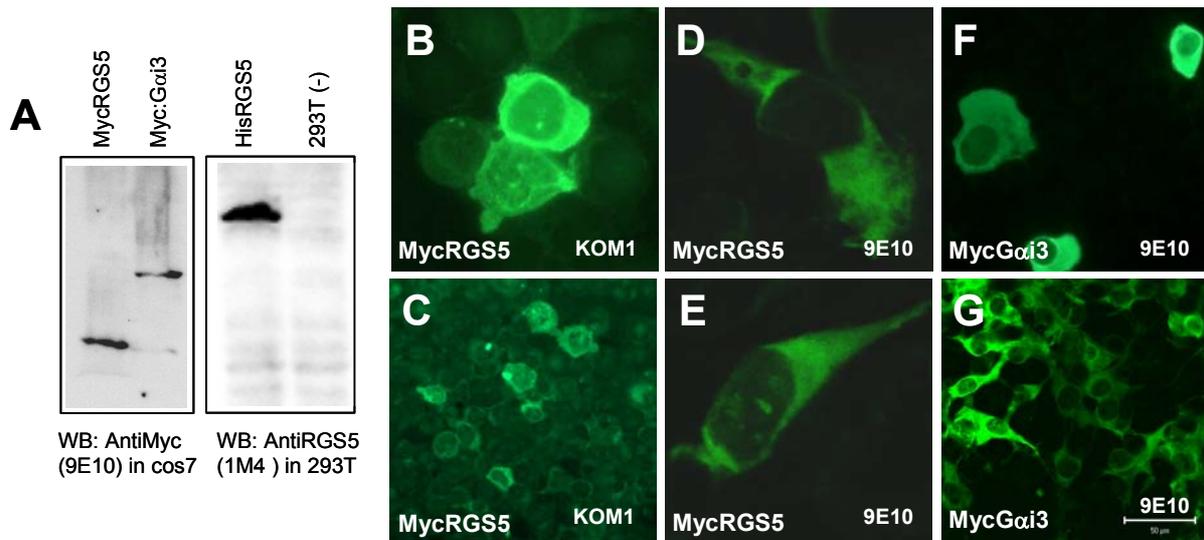
Die Stabilität von RGS5 wurde außerdem in cos7-Zellen *in vivo* untersucht. Die Zellen wurden transient mit RGS5:EGFP, Myc:RGS5 oder  $\Delta$ RGS5:EGFP transfiziert. Die metabolische Stabilität wurde anschließend in einem Pulse-Chase-Experiment gemessen. Zur Inhibition des proteasomalen Abbaus und damit auch des „N-End“-Weges, wurde der membrandurchlässige Proteasom-Inhibitor MG132 verwendet. Der Abbau des ungeschützten RGS5:EGFP Fusionsproteins nach 2 h Chase ist in Abbildung 17C deutlich sichtbar, wird jedoch verzögert durch Zugabe von MG132 (dritte Spur in C).

Die verkürzte Variante des Fusionsproteins, wie auch Myc:RGS5, zeigt auch nach 2-stündiger Chase-Inkubation keine signifikante Degradation und ist ebenso *in vivo* geschützt. Da sich die RGS5:EGFP Menge in Abwesenheit von MG132 nach 2 h mehr als halbiert hat, kann näherungsweise eine *in vivo* Halbwertszeit von <2 h angenommen werden. Dies deckt sich mit den Angaben für die Halbwertszeit von Wildtyp RGS4 in L-Zellen, die auf 40-50 min geschätzt wurde (Davydov und Varshavsky, 2000).

#### 4.2.4 Intrazelluläre Lokalisation von RGS5

RGS-Proteine sind in verschiedenen Zellkompartimenten lokalisiert. Dies resultiert aus den strukturellen Unterschieden zwischen den Mitgliedern der RGS-Familie und dient möglicherweise der Regulation ihrer Aktivität (Chatterjee und Fisher, 2000). Die differentielle Lokalisation verschiedener RGS-Moleküle impliziert, dass diese in der Zelle unterschiedliche Funktionen erfüllen. Da EGFP-Fusionen in den Stabilitätsstudien in transfizierten Zellen oder Retikulozytenlysaten instabil waren, wurde die Lokalisation von RGS5 durch Immunfärbung Myc- oder His-markierter RGS5-Proteine bestimmt. Im Gegensatz zu den RGS5:EGFP-Fusionen zeigten weder Myc:RGS5 noch das ebenso „geschützte“ His:RGS5 eine sichtbare Degradation (Abbildung 18A). In transient transfizierten 293T- oder cos7-Zellen konzentrierte sich die Lokalisation von Myc:RGS5 auf das Zytoplasma, während der Nukleus weitgehend ungefärbt blieb (Abbildung 18B-E). Besonders deutlich wird dies in den Konfokalmikroskopaufnahmen in D und E. Die Transfektion von His:RGS5 ergab ein identisches Lokalisationsmuster. Ebenso waren Färbungen mit Anti-RGS5 (B+C), Anti-Myc (D+E) oder Anti-His (bei Verwendung von His:RGS5; nicht abgebildet) vollkommen gleich.

RGS5 reguliert unter anderem die G alpha Isoform  $\alpha_3$  ((Cho et al., 2003) und 4.3). Es war daher wichtig zu untersuchen, inwieweit sich die Lokalisation der beiden Bindungspartner überschneidet. Myc: $G\alpha_3$  wurde in cos7-Zellen eingebracht und ebenso in der Immunfluoreszenz spezifisch gefärbt.  $G\alpha_3$  war im selben Kompartiment wie RGS5 lokalisiert. Auch hier war die Färbung zytoplasmatisch, allerdings zusätzlich mit einer erhöhten perinukleären Signalintensität. Letztere geht wohl auf die Expression von  $G\alpha_3$  im Golgi-Apparat zurück (Denker et al., 1996).

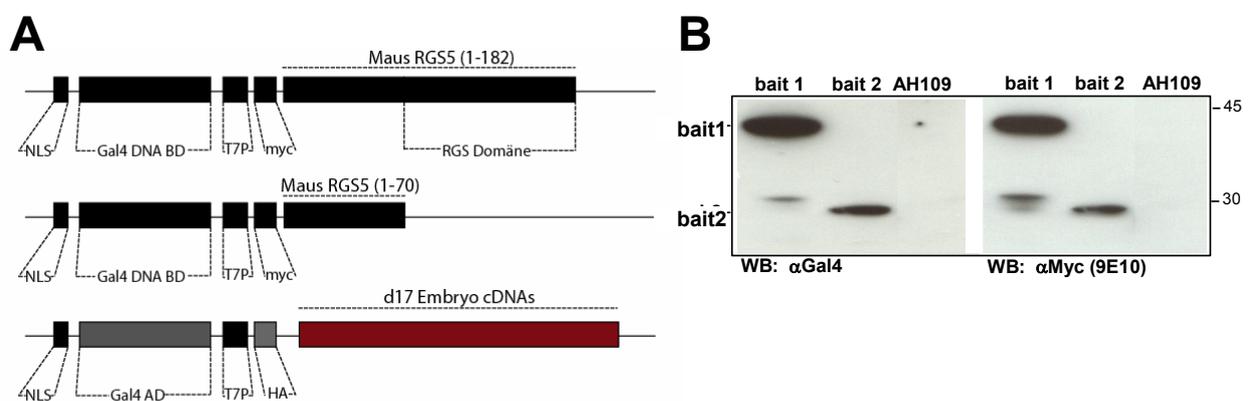


**Abbildung 18: Immunlokalisation von MycRGS5.** (A) Western Blot zur Überprüfung der Integrität von MycRGS5 und Gαi3 in NP40-Lysaten aus  $1 \times 10^6$  cos7 bzw. Lysaten aus  $5 \times 10^5$  293T-Zellen bei His:RGS5. (B-G) 293T (B,C,F) wurden mit  $3 \mu\text{g}$  Myc:RGS5 oder Gαi3 und Fugene6 transfiziert (6-cm-Schale). 24 h später wurden Zytospins angefertigt, diese fixiert, mit Anti-RGS5-Serum (KOM1) oder Anti-Myc (9E10) gefärbt und mit einem Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen. Cos7-Zellen (D,E,G) wurden auf Deckgläser in 6-cm-Schalen ausgesät und mit  $4 \mu\text{g}$  MycRGS5 oder  $2 \mu\text{g}$  Gα-DNA und Fugene transfiziert. Die Immunfärbung war analog der Zytospinfärbung; die Aufnahmen wurden mit einem Konfokalmikroskop mit freundlicher Hilfe von Dr. H. Spring (DKFZ) gemacht.

### 4.3 IDENTIFIZIERUNG VON RGS5-INTERAKTIONSPARTNERN DURCH 2-HYBRID-SCREENING

#### 4.3.1 Das Yeast-2-Hybrid Screening-Verfahren

Das hier verwendete Matchmaker-3-System beruht auf der Rekonstitution des Transkriptionsfaktors GAL4 nach Interaktion von Bait- und Prey-Proteinen im Hefe-Zellkern. Die Transkriptionsaktivität, die über die Expression verschiedener Reportergene detektiert wird, ist dabei ein Maß für die Protein-Protein-Interaktion ((Fields und Song, 1989); siehe 3.4.17). Der Bait- und Prey-Sequenz sind N-terminal die GAL4-Domänen, eine Myc- oder HA-Erkennungssequenz, sowie eine Kernlokalisationssequenz (NLS) vorgeschaltet (Abbildung 19A). Letztere ermöglichen den Transport der im Zytoplasma synthetisierten Proteine in den Zellkern, wo GAL4-DNA-BD:RGS5 an seine Erkennungssequenz bindet. Für eine Beschreibung des 2-Hybrid-Verfahrens wird auf Abschnitt 3.4.17 verwiesen. Im 2-Hybrid-Screening wurden als Bait die RGS5-Gesamtsequenz (Bait 1) bzw. eine C-terminal-verkürzte RGS5-Sequenz ohne RGS-Domäne (Bait 2) eingesetzt (Abbildung 19A). Letztere Variante erschien sinnvoll, da G-Proteine innerhalb der RGS-Domäne binden und somit die Gefahr bestand, im Screening mit der Gesamt-RGS5-Sequenz vor allem oder ausschließlich G $\alpha$ -Untereinheiten zu isolieren. Zudem eröffnete die Wahl der verkürzten RGS5-Sequenz die Chance, primär RGS5-spezifische Bindungspartner zu finden.



**Abbildung 19: Die Bait und Prey-Konstrukte.** (A) Schematische Abbildung der Fusionen aus Gal4-DNA-Bindungsdomäne und RGS5 (Bait 1) bzw. der verkürzten RGS5 Sequenz (Aminosäuren 1 bis 70, Bait 2) und der Prey-Gal4-AD-Fusionen. Alle Prey-Proteine waren HA-markiert. T7P: T7-Bakteriophagen-Promotor, HA: Hämagglutinin-A-Sequenz. (B) Immunoblot gegen Gal4 bzw. Myc-Tag zur Überprüfung der Integrität der Bait-Fusionsproteine.

Die Integrität der RGS5-Fusionsproteine wurde im Western Blot mit Anti-GAL4, Anti-Myc und Anti-RGS5 (KOM1; nicht gezeigt) überprüft. Bait 1 und Bait 2 waren in AH109-Lysaten (Hefe) zweifelsfrei detektierbar; die Bandengröße entspricht den berechneten Größen von ca. 40 bzw. 27 kDa. Degradationsprodukte (wahrscheinlich nach der Lyse entstanden) sind in geringer Menge vorhanden. Zur Überprüfung der Toxizität wurden die Wachstumsraten mit Bait transformierter und untransformierter AH109-Zellen verglichen. Übernachtskulturen zeigten ähnliche Zelldichten (bzw.

Absorption bei 600 nm, Werte nicht gezeigt). Folglich war die Überexpression von RGS5 nicht toxisch in AH109. Eine mögliche autonome Aktivierung eines Reportergergens durch RGS5 wurde geprüft, indem RGS5-transformierte Bait-Stämme auf Minimalmedium ohne Adenin ausgestrichen wurden. Es wuchsen jedoch keine Kolonien auf Adenin-defizienten Platten heran; das Reportergergen ADE2 konnte also nicht durch RGS5 allein aktiviert werden (Tabelle 4, erste Zeile). Gleichzeitig wurde die Reportergergenexpression nach Fusion von Bait-Stämmen mit einem irrelevanten Prey-Antigen (SV40-Tag) analysiert. Als Referenz wurde der diploide Stamm nach Fusion von p53-AH109 und SV40-Tag-Y187 verwendet. Wie Tabelle 4 zeigt, verhielten sich alle Stämme erwartungsgemäß: RGS5:SV40-Tag-Stämme wuchsen nicht auf Minimalmedien, unabhängig von der Stringenz der Selektion, da beide nicht aneinander binden. Dagegen nahm die Kolonienzahl des p53:SV40-Tag-Stammes mit der Stringenz der Selektion ab. Auf den wenig stringenten His-defizienten Platten (2. Spalte) wuchsen fast gleich viele Kolonien, wie auf den -Trp/-Leu-Platten. Damit besaßen fast alle diploiden Klone die Fähigkeit zur Aktivierung des HIS3-Reporters. In sehr viel weniger Klonen wurde dagegen der ADE2-Reporter (bzw. beide Reporter zusammen) aktiviert. Die starke Interaktion von p53 und SV40-Tag ist demnach im Matchmaker-3-System auch unter stringenten Selektionsbedingungen leicht nachweisbar. In einem weiteren Vorversuch wurde der Einfluss von RGS5 auf die Mating-Effizienz überprüft. Diploide Hefezellen, die aus der Fusion des Bait-Stammes und dem irrelevanten SV40-Tag-Stamm hervorgegangen waren, zeigten hohe Fusionseffizienzen von 50% (Bait 1) oder 44% (Bait 2). Demnach fusionierten etwa die Hälfte aller haploiden SV40-Tag-Hefezellen (diese zeigten die geringere Viabilität und waren daher limitierend – siehe 3.4.17) mit Bait-transformierten AH109-Zellen (Tabelle 5). RGS5 hat daher keinen inhibierenden Einfluss auf die Fusionseffizienz der beiden Hefestämme. Gemäß Angaben des Herstellers sind Mating-Effizienzen >2% hinreichend hoch, jedoch ist eine größere Effizienz im Hauptscreening gegen eine cDNA-Bank wünschenswert, da die Wahrscheinlichkeit, potentielle Interaktionspartner zu finden, mit der Fusionseffizienz zunimmt. Die Expression der GAL4:RGS5-Fusionen in Hefezellen war somit stabil und untoxisch. RGS5 konnte weder als autonomer Reportergergenaktivator fungieren, noch inhibierte RGS5 den Prozess des Matings und war damit als Bait geeignet.

Reaktion	Selektion				
	/-Leu/-Trp	/-Leu/-Trp/-His	/-Leu/-Trp/-Ade	/-Leu/-Trp/-His/-Ade	/-Trp/-Ade
Bait1 / Bait2	NB	NB	NB	NB	-/- 0
Bait1 x Tag	+/+ 102	-/- 0	-/- 0	-/- 0	NB
Bait2 x Tag	+/+ 210	-/- 0	-/- 0	-/- 0	NB
p53 x Tag	+/+ 233	+/+ 200	+/+ 96	+/+ 80	NB

**Tabelle 4: Reportergergenexpression in haploiden Bait-Stämmen und diploiden Hefestämmen nach Transformation mit SV40-Tag und p53 oder RGS5.** Die Selektion wurde auf SD-Minimalmedium wie angegeben durchgeführt. Die Phänotypen waren wie erwartet. Erwartungswerte sind links des Schrägstrichs, die experimentellen Werte rechts davon angegeben; Wachstum ist durch „+“ gekennzeichnet, kein Wachstum durch „-“. Die Werte geben die Kolonienzahl pro Platte an. NB: nicht bestimmt.

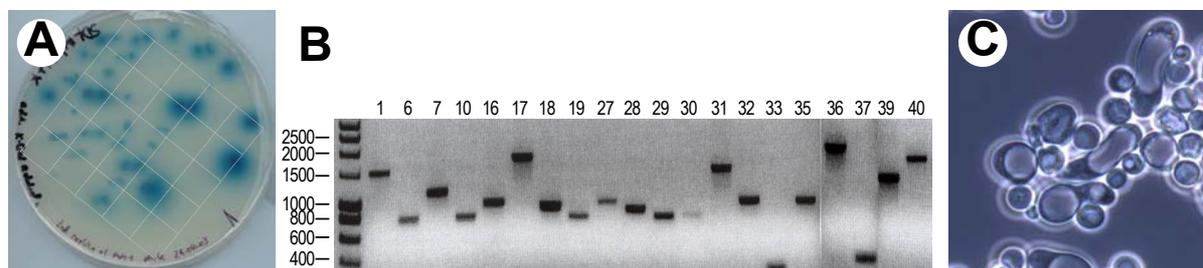
Reaktion	Verdünnung	Ausplattiertes Volumen in ml	Selektion			cfu/ml
			/-Leu/-Trp	/-Leu (Prey)	/-Trp (Bait)	
Bait1 x Tag	100	0,1	102			1,2x10 <sup>5</sup>
				239		2,4x10 <sup>5</sup>
					>240	>2,4x10 <sup>5</sup>
<b>Mating Effizienz</b>					50%	
Bait2 x Tag	100	0,1	210			2,1x10 <sup>5</sup>
				480		4,8x10 <sup>5</sup>
					>480	>4,8x10 <sup>5</sup>
<b>Mating Effizienz</b>					44%	

**Tabelle 5: Einfluss der Bait-Proteine auf die Mating-Effizienz.** Die Viabilität (cfu/ml) und Mating-Effizienz ist wie in Abschnitt 3.4.17 angegeben berechnet.

*Hauptscreening Verfahren:* Yeast-2-Hybrid-Screenings wurden für beide RGS5-Baits getrennt durchgeführt. Als Prey wurde - wie in 3.4.17 beschrieben - eine in den Hefestamm Y187 eingebrachte cDNA-Bank aus Tag 17-Mausembryonen verwendet. Um die Anzahl der Klone zu begrenzen, erfolgte die Selektion auf adenin- und histidinfreien Minimalmedien. Die Screenings mit Bait 1 und Bait 2 lieferten 50 bzw. 42 Klone, die auf adenin- und histidinfreien Platten wuchsen und X- $\alpha$ -Gal umsetzten (Abbildung 20A). Sie exprimierten somit die Reportergene HIS3, ADE2 und MEL1. In beiden Experimenten konnte Prey-cDNA aus insgesamt 62 Klonen isoliert, mit preyspezifischen PCR-Primern amplifiziert und schließlich sequenziert werden. Die Größe der Prey-cDNA-Sequenzen betrug zwischen 400 bp und 2500 bp (Abbildung 20B).

Um die in den 2-Hybrid-Verfahren gewonnenen experimentellen Daten zu beurteilen, wurde die Gesamtzahl der auf Interaktion überprüften, „gescreenten“ Prey-cDNAs berechnet. Sie ergibt sich nach Abschnitt 3.4.17 direkt aus der Zahl der diploiden Klone nach der Fusion und wird infolgedessen durch die Mating-Effizienz bestimmt. Die Fusion wurde lichtmikroskopisch auf die Bildung diploider Hefezellen überprüft (Abbildung 20C). Die Viabilität der fusionierten Zellen betrug auf Leu- und Trp-freien Medien  $4,1 \times 10^5$  bzw.  $4,8 \times 10^5$  cfu/ml. Sie war damit in den Screenings mit Bait 1 und Bait 2 etwa gleich, trotz höherer Viabilität der Bait- und Prey-transformierten Zellen im zweiten Screening (Tabelle 6). In beiden Experimenten wurden somit  $4-5 \times 10^6$  Klone auf eine Interaktion mit RGS5 geprüft. Unter Berücksichtigung der Amplifikation entspricht dies etwa  $2,4-3 \times 10^6$  unabhängigen, nichtamplifizierten Klonen in der ursprünglichen cDNA-Bank in E. coli (nach Clontech). Die Mating-Effizienz wurde ebenfalls für beide Experimente berechnet und ergab 24% für die Fusion mit Bait 1 bzw. 2% mit Bait 2. Die deutlich niedrigere Fusionseffizienz im Bait 2-Screening spiegelt die höhere Anzahl an Bait 2-transformierten Zellen wider, weil diese reziprok in die Berechnung der Mating-Effizienz eingehen. Da die Anzahl diploider Kolonien nahezu gleich ist, hat dies jedoch keine Konsequenzen für die Qualität des 2-Hybrid-Screenings. Zu Beginn beider Experimente betrug der

Titer der haploiden Hefe-Bank  $1,6-1,7 \times 10^8$  cfu und entsprach den Herstellerangaben. Die Screeningbedingungen waren somit optimal.



**Abbildung 20: Isolierung und Analyse der Prey-Klone.** (A) Diploide Hefestämme mit interagierenden Bait-Prey Proteinen wurden nach Isolation im 2-Hybrid-System auf gerasterten Selektionsplatten (SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade) mit X- $\alpha$ -Gal plattiert. (B) Gereinigte Produkte aus der PCR-Amplifikation mit pACT2-Polylinker-flankierenden Primern 21 und 22 zur Isolation der Prey-cDNA-Sequenz. Die Zahlen in B geben die Klon-Nummern an. (C) Lichtmikroskopische Aufnahme von Bait und Prey-transformierten Hefestämmen während des Mating-Prozesses.

Reaktion	Verdünnung	Ausplattiertes Volumen in ml	Selektion			cfu/ml
			/-Leu/-Trp	/-Leu (Prey)	/-Trp (Bait)	
haploide Bank (ohne Bait1)	10000	0,05		866		$1,73 \times 10^8$
	= Titer der Bank					
Diploide Bank (mit Bait1)	100	0,1	475			$4,8 \times 10^5$
	10000	0,1		172		$1,7 \times 10^7$
	10000	0,1			20	$2 \times 10^6$
					<b>Mating Effizienz</b>	$100\% \times 4,8 \times 10^5 / 2 \times 10^6$
					<b>Anzahl gescreenter Klone</b>	$4,8 \times 10^5 \times 10,1 \text{ ml}$ $= 4,8 \times 10^6$

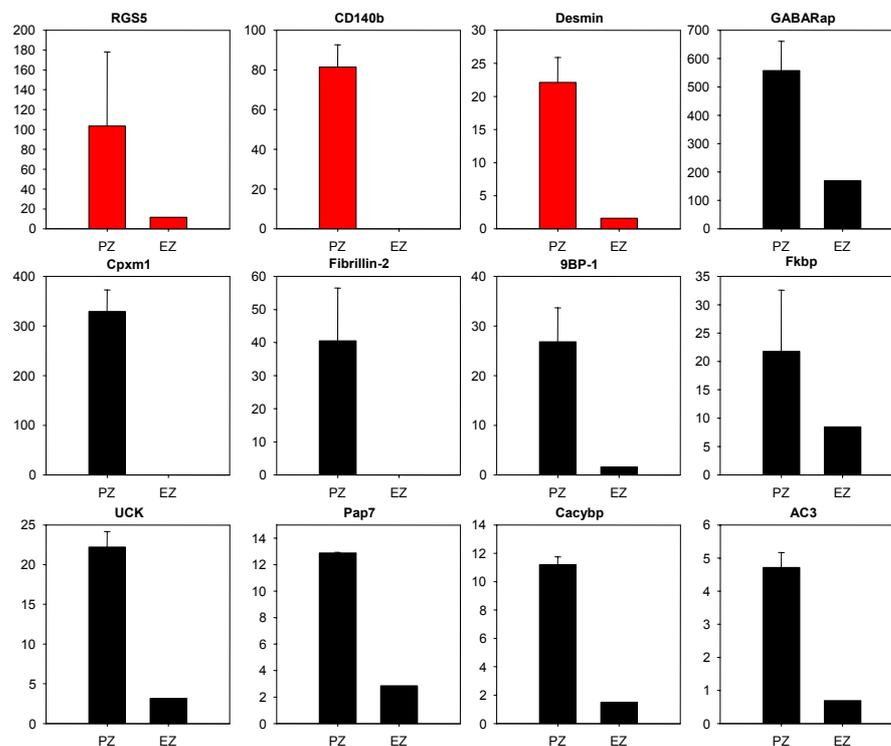
Reaktion	Verdünnung	Ausplattiertes Volumen in ml	Selektion			cfu/ml
			/-Leu/-Trp	/-Leu (Prey)	/-Trp (Bait)	
haploide Bank (ohne Bait2)	10000	0,05		800		$1,6 \times 10^8$
	= Titer der Bank					
Diploide Bank (mit Bait2)	100	0,1	413			$4,1 \times 10^5$
	10000	0,1		273		$2,7 \times 10^7$
	10000	0,1			800	$8 \times 10^7$
					<b>Mating Effizienz</b>	$100\% \times 4,1 \times 10^5 / 2,7 \times 10^7$
					<b>Anzahl gescreenter Klone</b>	$4,1 \times 10^5 \times 10 \text{ ml}$ $= 4,1 \times 10^6$

**Tabelle 6: Berechnung der Mating Effizienz und der Anzahl gescreenter Klone für die 2-Hybrid-Screenings mit RGS5-Baits 1 (oben) und 2 (unten).**

Die im Y2H-Verfahren isolierten Preys wurden durch Blast-Analyse der Sequenzen identifiziert. Irrelevante Sequenzen, wie ESTs (*expressed sequence tags*), polyA-Sequenzen, chromosomale oder nichtkodierende Sequenzen (*untranslated regions/UTR*, Introns), wurden verworfen. Ebenso blieben Sequenzen unberücksichtigt, deren Leserahmen nicht mit dem der GAL4-Domäne übereinstimmte.

Schließlich resultierten aus über 4 Millionen Klonen, die in beiden Screenings auf ihre mögliche Interaktion mit RGS5 überprüft wurden, lediglich 16 potentielle Prey-Kandidaten. Die interessantesten Preys werden in Tabelle 7 vorgestellt. Nur sechs dieser Prey-Proteine wurden mehr als einmal im Y2H-Screening isoliert. Die am häufigsten isolierten (jeweils drei „Treffer“) waren dabei die Adenylatzyklase 3 (*adenylate cyclase 3*; AC3) und die UMP/CMP-Kinase (UCK).

Da RGS5 stets intrazellulär auftritt, müssen physiologisch relevante Preys im selben Zelltyp wie RGS5 exprimiert sein, um an RGS5 binden zu können. Aus diesem Grund wurde die Expression verschiedener Prey-Gene in Perizyten aus RT5-Tumoren analysiert. Tumorendothelzellen wurden als Kontrollzellen verwendet. Wie in Abbildung 21 gezeigt, waren alle analysierten Prey-Gene, wie auch RGS5, in Perizyten bedeutend höher exprimiert als in Endothelien. Somit waren die analysierten Preys potentielle Bindungspartner für RGS5.



**Abbildung 21: Expression der Prey-Gene in Endothelien (EZ) und Perizyten (PZ).** Die relative Expression der Gene wurde durch quantitative PCR bestimmt. Gezeigt sind die Mittelwerte (nur PZ) der Messungen aus zwei unabhängigen PZ-Präparationen mit Standardabweichung. rot: RGS5 und Perizytenmarker CD140b (=PDGFR $\beta$ ) und Desmin zur Kontrolle der PZ-Präparation. Schwarz: Prey-Gene. Die Expression von HRPAs wurde nicht analysiert.

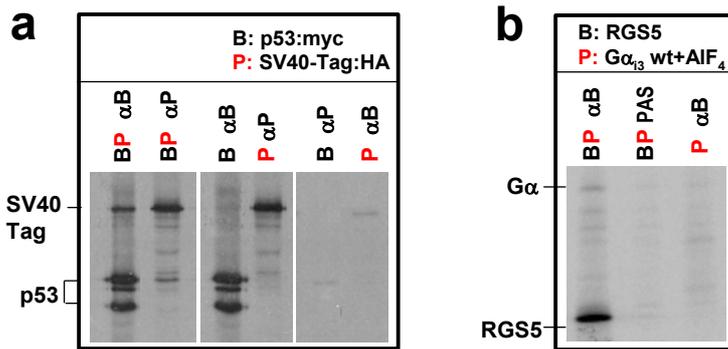
Klon Nr.	Klon Name (Abk.)	Acc. Nr.	GenBank Bezeichnung und Synonyme	kD	Treffer (hits)	Hauptfunktionsbereich	Funktion	Referenz
Y10	AC3	NM_138305.3	mm adenylyate cyclase type 3 (AC3)	135*	3x Bait 1	Proliferation/SMC-Relaxation	wird u.a. in SMC exprimiert und wirkt dort über die Synthese von cAMP einer Kontraktion/Proliferation entgegen	Wong et al. 2001; Webb et al. 2001; Trinh et al. 2003
Y12	Fkbp	BC027808.1	mm FK506 binding protein 8/38 mRNA (Fkbp8/38)	~30	1x Bait 1	Proliferation	wird durch Anstieg der Ca <sup>2+</sup> -Konzentration aktiviert, inhibiert Calcineurin, bindet und verankert Bcl-2 an der mitochondrialen Membran und beeinflusst die Apoptoseinduktion	Edlich et al. 2005; Shirane et al. 2003; Nielson et al. 2004
Y16	HRPA	AK034728.1	mm HRP20 short form homolog	30	1x Bait 1	Proliferation	beeinflusst möglicherweise das Tumorzellwachstum	Karp et al. 2004
Y27	E4F1	NM_007893.1	mm E4F transcription factor 1 (=phIAP3)	~8	2x Bait 1	Proliferation	in vaskulären SMC durch Östrogenstimulation induziert; vermittelt in SMC die Estrogen-stimulierte Proliferationsinhibition; Transkriptionsrepressor	Nakamura et al. 2004; Le Cam et al. 2004
Y29	Cpxm1	NM_019696.1	mm carboxypeptidase X1 (M14 family) (=CPX-1)	22	1x Bait 1	Abbau?	Metalloprotease; involviert in der Reifung von Osteoklasten	Chang et al. 2004; Lei et al. 1999
Y36	Fibrillin-2	L39790.1	mm fibrillin-2 (fbn-2)	24	1x Bait 1	?	cysteinreiches Glykoprotein und Hauptbestandteil extrazellulärer Mikrofilamenten	Chaudhry et al. 2001
Y40	UCK	AK004827	mm male lung cDNA UMP-CMP kinase homolog (UCK)	24	1x Bait 1, 2x Bait 2	?	zytoplasmatische Kinase, die Phosphatreste von ATP auf Pyrimidinnukleosidmonophosphate überträgt und mechanistische Ähnlichkeiten zu G-Proteinen aufweist	Hsu et al. 2005; Liou et al. 2003; Kosloff et al. 2003
Y44	Cacycbp	XM_129572.2	mm calcyclin-binding protein (Cacyp) (=Slah-1 interacting protein SIP)	34	1x Bait 1	Adaptor/proteasomaler Abbau	Adaptormolekül, das die Ubiquitinierung und den proteasomalen Abbau von beta-Catenin vermittelt und so die Zellproliferation inhibiert; bindet Ca <sup>2+</sup> -abhängig unter anderem an Cacyclin/Ca <sup>2+</sup> (=S100A6)	Matsuzawa et al. 2001; Bhattacharya et al. 2005; Batelli et al. 2005; Nowotny et al. 2003
Y55	Pap7	AF022770.3	mm peripheral benzodiazepine receptor protein (Pap7)(=Gocap1)	?	1x Bait 1, 1x Bait 2	Transport	assoziiert mit cAMP-abhängiger Proteinkinase; involviert in Steroidsynthese und mitochondrialen Cholesterintransport	Li et al. 2001; Liu et al. 2003
Y70	Gabarap	BC002126.1	mm GABA receptor associated protein (Gabarap)	13	1x Bait 2	Transport	vermittelt das Membrantargeting von GABA-Rezeptoren	Lei et al. 2004; Coyle et al. 2003
Y80	9BP-1	BC043464	mm similar to PDZ domain protein/9BP-1 (=MUPP1)	20	2x Bait 2	Adaptor	PDZ-enthaltendes Adaptormolekül und negativer Regulator der Zellproliferation; bindet verschiedene Signalingkomponenten, u.a. Serotoninrezeptoren, den AC3-Inhibitor Calmodulin-kinase II und mehrere tight junction-Moleküle (Claudine, JAM)	Lee et al. 1997; Lee et al. 2000; Parker et al. 2003; Krapivinsky et al. 2004; Coyne et al. 2004; Jeansonne et al. 2004; Ebnet et al. 2004

**Tabelle 7: Liste der potentiellen RGS5-Bindungspartner und deren publizierte Funktion.** Teilweise sind mehrere Bezeichnungen in der Literatur zu finden. Die Größenangaben beziehen sich auf die Größe der klonierten Proteine (aus dem 2-Hybridscreening) und nicht auf das native Protein (d.h. die Gesamtsequenz; \* Ausnahme: AC3, welches in 293T in voller Länge exprimiert wurde).

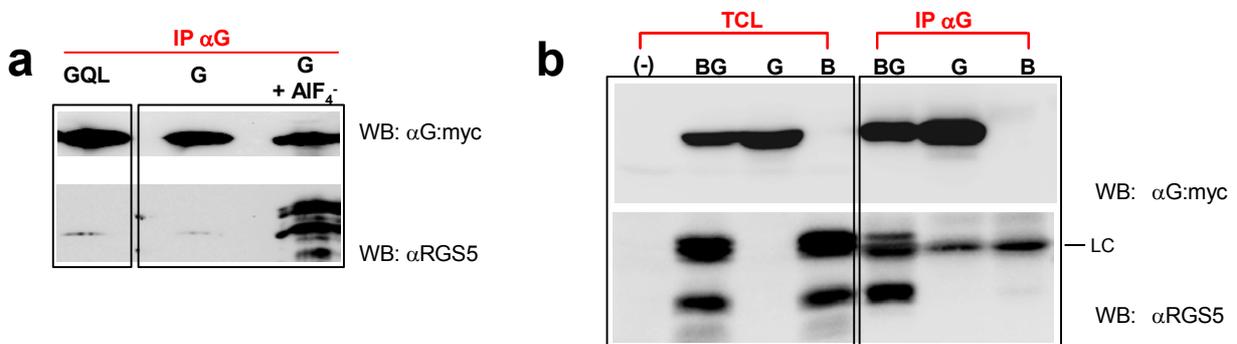
#### 4.3.2 Etablierung von Koimmunpräzitationssystemen zur Überprüfung von Protein-Interaktionen

Die Interaktion der in Tabelle 7 vorgestellten Preys mit RGS5 wurde biochemisch durch Koimmunpräzitation überprüft. Für die Synthese von Bait- und Prey-Proteinen wurden drei verschiedene Expressionssysteme verwendet: (1.) Lysate aus Kaninchenretikulozyten, (2.) Säugerzellen und (3.) *Escherichia coli*. Mit Hilfe von Retikulozytenlysaten konnten RGS5 und Preys als  $^{35}\text{S}$ -markierte Proteine exprimiert werden. *In vitro* synthetisierte Bait und Prey-Proteine wurden gemischt, mit spezifischen Antikörpern präzipitiert und autoradiographisch oder fluorographisch nachgewiesen. Zur Überprüfung der Interaktion im Säugerzellsystem wurden Bait- und Prey-Konstrukte durch Kotransfektion in die humane Nierenepithelzelllinie 293T eingebracht. Bait und Prey wurden aus transient transfizierten Zellen immunpräzipitiert und im Western Blot detektiert. Als dritte Möglichkeit zur Proteinexpression wurden Bait und Prey als rekombinante Proteine in *E. coli* hergestellt. Gereinigte Proteine wurden gemischt, immunpräzipitiert und dann im Western Blot nachgewiesen.

Um die verschiedenen Systeme zu überprüfen, wurden zunächst bekannte Bindungspartner, wie der Tumorsuppressor p53 und SV40-Tag, im Retikulozytenlysate exprimiert und analysiert. Der Tumorsuppressor p53 kopräzipitierte mit SV40-Tag; umgekehrt wurde SV40-Tag in der Immunpräzipitation gegen p53 detektiert (Abbildung 22a). Somit war die relativ starke Interaktion von p53 und SV40-Tag messbar. Gleichmaßen konnte die Interaktion von RGS5 und der  $G\alpha$ -Untereinheit i3 ( $G\alpha i3$ ) nachgewiesen werden, wobei  $G\alpha$  zuvor durch Tetrafluoraluminat ( $\text{AlF}_4^-$ ) und Guanosindiphosphat (GDP) aktiviert wurde (Abbildung 22b). Die Bandenintensität des kopräzipitierten RGS5 war allerdings deutlich schwächer als im Fall der p53:SV40-Tag-Interaktion. Jedoch konnte hiermit gezeigt werden, dass im zellfreien System exprimiertes RGS5 (damit ohne post-translationale Modifikationen) im Hinblick auf die Bindung von  $G\alpha$ -Untereinheiten funktionell aktiv war. Ebenso konnte rekombinantes His:RGS5 aus *E. coli* (Abbildung 23a) oder durch Transfektion in 293T eingebrachtes His:RGS5 (b) mit  $G\alpha i3$  präzipitiert werden, allerdings bedurfte es der Aktivierung mit  $\text{AlF}_4^-$ . In Abwesenheit von  $\text{AlF}_4^-$  oder bei Verwendung der konstitutiv aktiven Mutante  $G\alpha i3(\text{Q204L})$  wurde RGS5 dagegen nicht gebunden. Im  $G\alpha i3(\text{Q204L})$ -Molekül ist ein Glu-Rest im katalytischen Zentrum durch Leu ersetzt, das die hydrolytische Spaltung von GTP und somit die G-Protein-Inaktivierung verhindert. GDP und  $\text{AlF}_4^-$  bilden einen Komplex, der GTP im Übergangszustand der Dephosphorylierungsreaktion ähnelt. Viele RGS-Moleküle, darunter wie hier gezeigt auch RGS5, binden stärker an  $G\alpha$  im Komplex mit  $\text{GDP}:\text{AlF}_4^-$  als an die physiologische, GTP-gebundene Form.



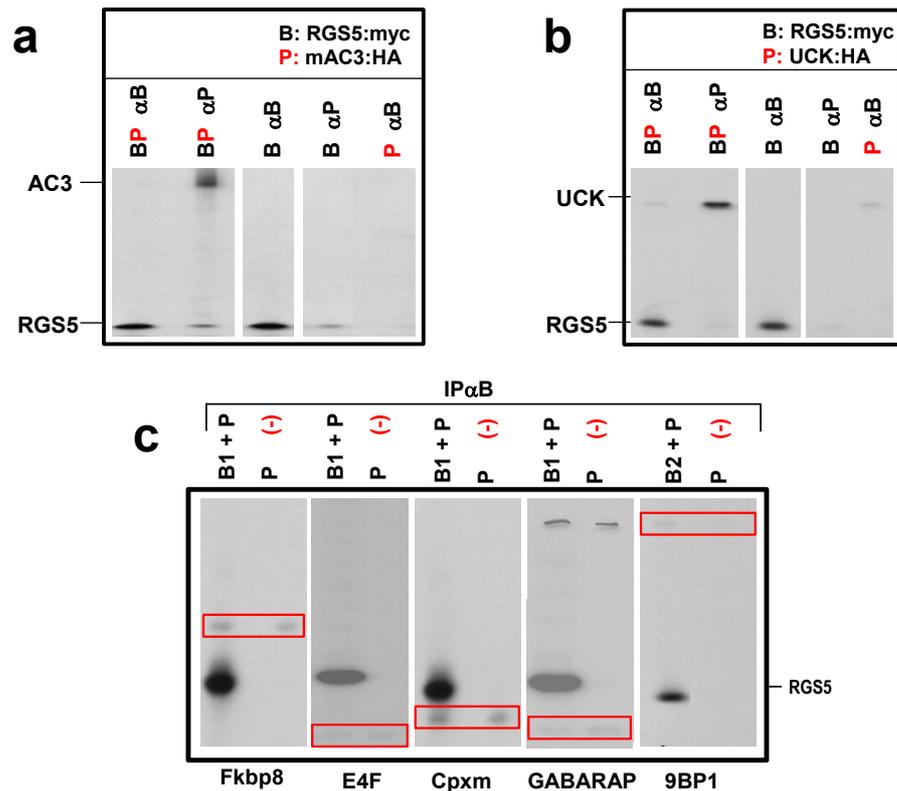
**Abbildung 22: Koimmunpräzipitation von im Retikulozytensystem exprimierten Proteinen.** (a) Je 10  $\mu$ l in vitro exprimiertes p53:myc und SV40-Tag:HA wurden gemischt und mit 5  $\mu$ g Anti-Myc ( $\alpha$ B) oder 3  $\mu$ g Anti-HA ( $\alpha$ P) immunpräzipitiert und durch Fluorographie detektiert. (b) Analog wurden RGS5 und Wildtyp G $\alpha$ <sub>i3</sub> (myc-markiert) nach Aktivierung mit GDP:AIF<sub>4</sub><sup>-</sup> (10 mM NaF, 100  $\mu$ M AlCl<sub>3</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 100  $\mu$ M Na-GDP) mit 5  $\mu$ l RGS5 Maus-Antiserum KOM1 und 3,5  $\mu$ g Ratte-Anti-Maus präzipitiert, aber autoradiographisch im Phosphoimager detektiert. Unspezifische Präzipitation der Proteine ist in der mittleren Spur (b) bzw. den beiden letzten Spuren (a) gezeigt. PAS: Protein-A-Sephrose. B: Bait, P: Prey



**Abbildung 23: Koimmunpräzipitation von G $\alpha$  und RGS5.** (a)  $1 \times 10^7$  293T-Zellen wurden mit der G $\alpha$ <sub>i3</sub>(Q209L):myc-Mutante (=GQL) bzw. Wildtyp G $\alpha$ <sub>i3</sub>:myc (=G) transfiziert, 48 h später mit Digitonin lysiert, mit 1  $\mu$ g rekombinantes His:RGS5 gemischt und mit 5  $\mu$ g Anti-G $\alpha$ :myc präzipitiert. Wo angegeben wurde 100  $\mu$ M AIF<sub>4</sub><sup>-</sup> während der Lyse zugesetzt. Die Western Blots gegen G $\alpha$ :myc und RGS5 (mit KOM1 Serum) sind abgebildet. (b) 293T-Zellen wurden in derselben Weise mit G $\alpha$ <sub>i3</sub>:myc (G) und His:RGS5 (B) transfiziert und in Gegenwart von AIF<sub>4</sub><sup>-</sup> präzipitiert ( $3 \times 10^6$  Zellen/IP). TCL: Gesamtzelllysat (*total cell lysate*) zur Überprüfung der Expression der transfizierten Gene, LC: leichte Immunglobulin Kette

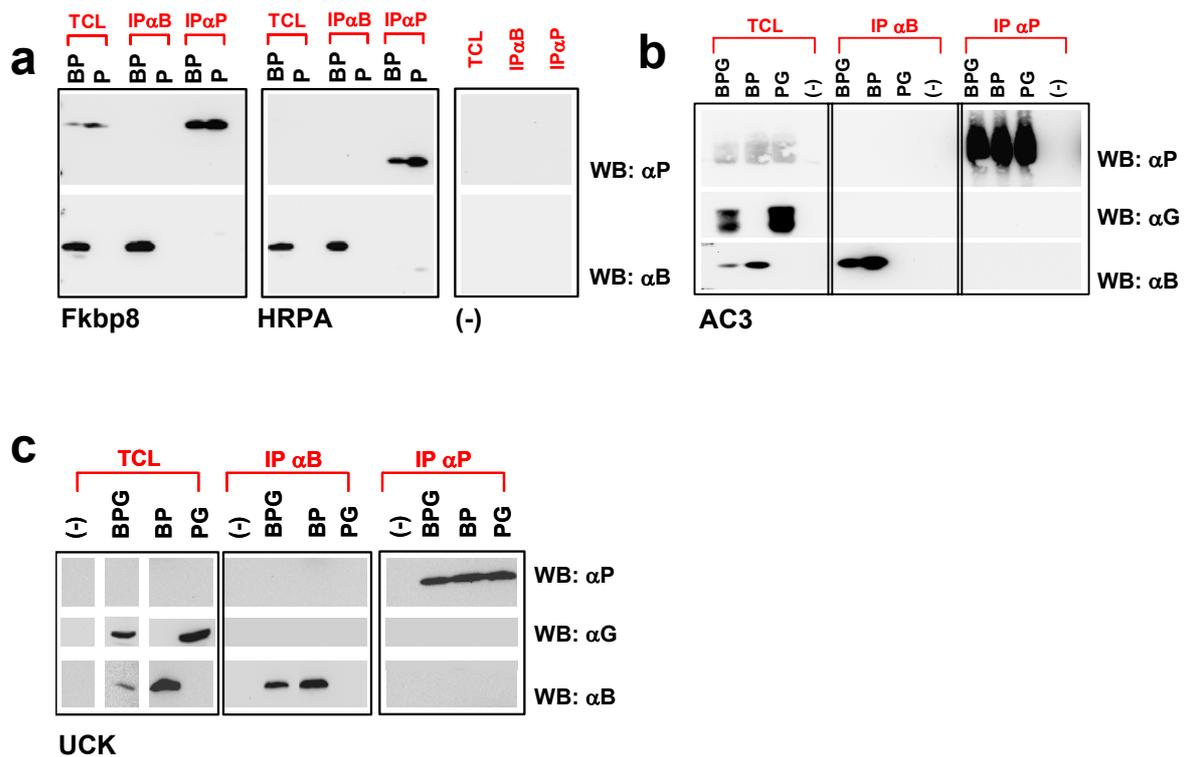
#### 4.3.3 Prüfung der Interaktion durch Immunpräzipitation

Die in Tabelle 7 genannten Preys wurden zunächst im Retikulozytenlysatsystem exprimiert und in der Immunpräzipitation eingesetzt. Die Interaktion der Prey-Fusionsproteine Fbn2:HA und HSPA:HA mit RGS5 konnte nicht überprüft werden, da die Banden in der Gelelektrophorese nicht trennbar waren. Auch Pap7:HA konnte nicht analysiert werden, da es *in vitro* nicht exprimiert wurde (nicht gezeigt). In Abbildung 24 sind die Immunpräzipitationsanalysen für die Preys AC3 und UCK, sowie für alle weiteren Prey-Proteine wiedergegeben. Keines der analysierten Prey-Proteine konnte mit RGS5 präzipitiert werden. Umgekehrt kopräzipitierte RGS5 nicht bei spezifischer Präzipitation der Prey-Proteine mit Anti-HA-Antikörpern (Abbildung 24 bzw. nicht gezeigt).



**Abbildung 24: Immunpräzipitation von RGS5-Bait und Preys im Retikulozytensystem.** (a+b) *In vitro* exprimiertes Myc:RGS5 und AC3:HA oder UCK:HA wurde mit 4 µg anti-Myc (αB) oder 2 µg Anti-HA (αP) präzipitiert und autoradiographisch detektiert. (c) Repräsentative Immunpräzipitationen mit Bait 1 (B1) oder Bait 2 (B2) und den Prey-Proteinen aus Tabelle 7 (HA-markiert). Die Expression der Prey-Proteine wurde durch IP gegen HA bestätigt (nicht gezeigt). Die Kästen zeigen die Position der zu erwartenden Prey-Banden an, allerdings war keine spezifische Kopräzipitation sichtbar.

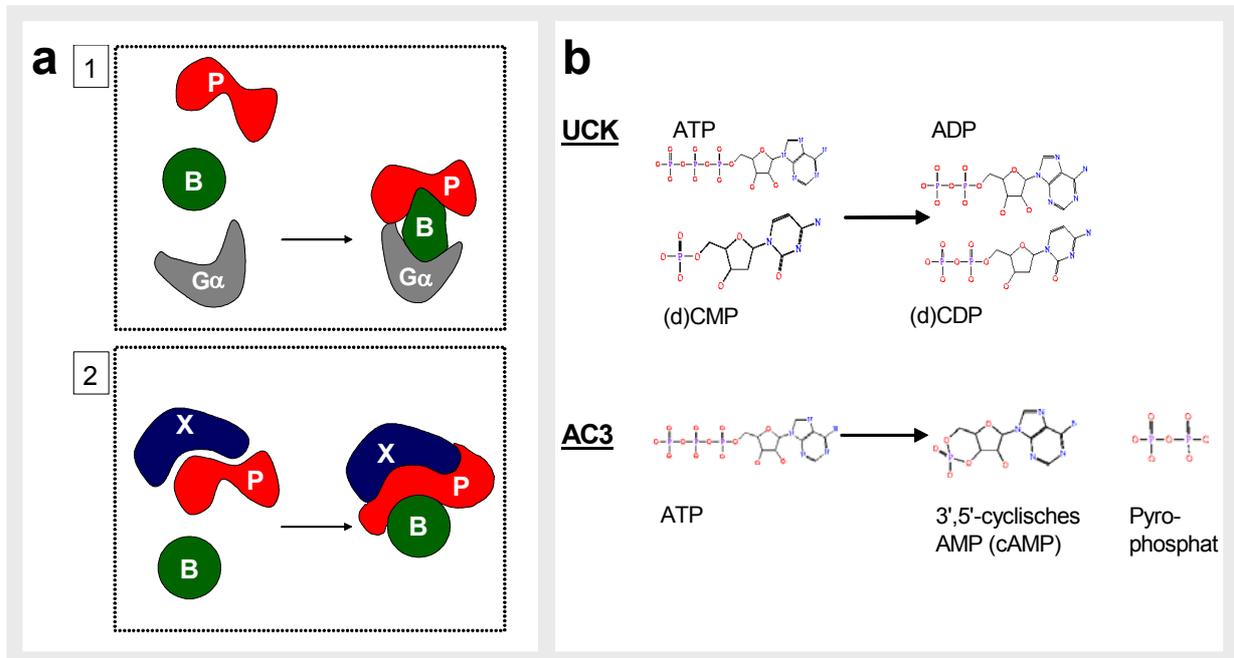
Das verwendete  $T_N T^{\text{®}}$ -Retikulozytensystem ist ein zellfreies Expressionssystem aus der zytoplasmatischen Fraktion von Retikulozytenlysaten. *In vitro* im Retikulozytensystem exprimierte Proteine sind daher nicht posttranslational modifiziert. Protein-Interaktionen, die Glykosylierungen oder ähnliche Modifikationen benötigen, können demnach nicht mit dem Retikulozytensystem detektiert werden. Intakte Säugerzellen stellen demgegenüber das physiologischere System dar. Die *in vivo* exprimierten Bait- und Prey-Proteine sind korrekt modifiziert und können in physiologischem Milieu interagieren. Die Anwesenheit endogener zytosolischer und membranständiger Proteine kann die Detektion indirekter Interaktionen ermöglichen, sofern die „Brückenglied“-Komponente (Proteine/Substrate, Kofaktoren) im Zelllysate ausreichend vorhanden ist. Einige der Preys wurden daher zusammen mit RGS5 in 293T-Zellen eingebracht und präzipitiert. So konnten Fkbp8, HSPA, UCK und AC3 aus 293T-Zellen mit Anti-HA präzipitiert werden („IP αP“ in Abbildung 25). Die Expression von E4F, Cpxm1, Fbn-2, Gabarap und 9BP1 war trotz gleich bleibend hoher Transfektionseffizienz, die nach EGFP-Transfektion durchflusszytometrisch bestimmt wurde, nicht nachweisbar. UCK und HSPA waren nur nach Anreicherung durch Immunpräzipitation detektierbar. Allerdings konnte auch in 293T-Zellen keine Interaktion mit RGS5 bestätigt werden, da keines der vier Prey-Proteine mit RGS5 kopräzipitierte.



**Abbildung 25: Immunpräzipitation von RGS5-Bait und Preys I.** (a)  $4 \times 10^7$  293T-Zellen wurden mit  $8,1 \mu\text{g}$  His:RGS5-DNA und  $14 \mu\text{g}$  Prey-DNA (BP) bzw. Prey (P) allein transfiziert, mit Digitonin lysiert und mit  $6 \mu\text{g}$  Anti-His/Anti-RGS5 ( $IP_{\alpha B}$ ) oder  $2,5 \mu\text{g}$  Anti-HA ( $IP_{\alpha P}$ ) immunpräzipitiert. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit biotinylierten Anti-HA ( $=\alpha P$ , oberer Teil) oder Anti-RGS5 Antikörpern ( $1M4:bio$ ,  $\alpha B$ , unterer Teil). (b und c)  $2 \times 10^7$  293T wurden mit  $8,1 \mu\text{g}$  His:RGS5 (B),  $8,1 \mu\text{g}$  Prey-DNA (P), und/oder  $3,6 \mu\text{g}$   $G\alpha i3:myc$ -DNA (G) transfiziert und wie zuvor präzipitiert und detektiert. Die Expression von  $G\alpha i3$  wurde im Western Blot mit Anti-Myc:bio kontrolliert ( $\alpha G$ ). Die verwendeten Prey-Konstrukte sind unter den Immunoblots angegeben. (-): untransfizierte 293T-Zellen.

Die Funktion von RGS5 ist eng verknüpft mit der selektiven Bindung verschiedener  $G\alpha$ -Untereinheiten. Es ist daher denkbar, dass die Interaktion mit einem dritten Bindungspartner nur in Anwesenheit von  $G\alpha$  möglich ist. Im RGS5-Molekül könnten *Konformationsänderungen* durch die Bindung von  $G\alpha$  induziert werden, die Bindestellen für weitere Interaktionspartner freigeben würden (siehe Abbildung 26a-1). Diese Hypothese wurde überprüft, indem  $G\alpha i3$  zusammen mit RGS5 und Prey kotransfiziert wurde. Für diese Experimente wurden AC3 und UCK als Prey gewählt, da AC3 und UCK als einzige der 2-Hybrid-Kandidaten je dreimal aus rund  $4 \times 10^6$  Klonen isoliert worden waren (Tabelle 7) und daher überaus interessante potentielle Bindungspartner darstellten. Beide Proteine binden Nukleotide und (de-)phosphorylieren oder zyklisieren sie unter ATP-Verbrauch (Abbildung 26b). Mit Blick auf die Rolle von RGS5 bei der GTP-Dephosphorylierung im  $G\alpha$ , erscheint es plausibel, dass RGS5 ebenso bei der Nukleosidphosphatumsatzung im aktiven Zentrum der UMP-CMP-Kinase (UCK) oder der Adenylatzyklase 3 (AC3) eine funktionell relevante Rolle spielen könnte. Überdies war für RGS2 eine funktionelle Interaktion mit AC3 bereits nachgewiesen worden (Sinnarajah und Dessauer, 2001). Dennoch konnte eine Bindung von AC3 bzw. UCK und

RGS5 auch in Gegenwart von überexprimiertem G $\alpha$ i3 in unseren Experimenten nicht detektiert werden.

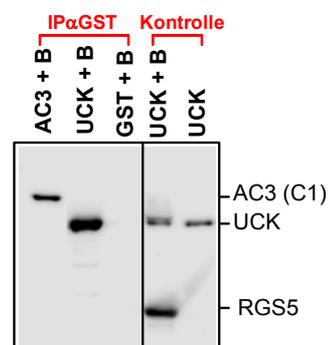


**Abbildung 26: Arbeitshypothesen (a). Katalysemechanismen von AC3 und UCK (b).** B: Bait; P: Prey; X: Komponente, die durch Bindung an Bait oder Prey eine Bait:Prey-Interaktion ermöglicht. (Details im Text).

Neben G $\alpha$  ist eine Vielfalt anderer Faktoren (Enzyme, Substrate oder Kofaktoren) denkbar, die in Bait oder Prey Konformationsänderungen induzieren, Modifikationen (wie Phosphatreste, Cystinbrücken oder Fettsäurereste) einführen oder entfernen und so letztendlich Aktivierungszustand und Bindungseigenschaften verändern (Abbildung 26a-2). Für die Adenylatzyklase 3 wurde diese Möglichkeit überprüft. Hierzu wurde AC3 (als HA-markiertes Gesamtprotein) durch Forskolinstimulation in RGS5- und G $\alpha$ i3-exprimierenden 293T-Zellen aktiviert. In der Immunpräzipitation war jedoch eine Interaktion von RGS5 und AC3 auch nach Aktivierung nicht nachweisbar (das Bandenmuster entsprach exakt dem in Abbildung 25b und ist daher nicht gezeigt).

Wahrscheinlich bindet nur ein Bruchteil der in einer Zelle hergestellten Prey-Moleküle an RGS5. Da die Prey-Proteine im 293T-System nur in geringen Mengen exprimiert wurden, war es unklar, ob die Kopräzipitation weniger Prey-Moleküle im Transfektionssystem zur Detektion einer Interaktion mit RGS5 ausreicht. Daher erschien es sinnvoll, Bait und Prey rekombinant in *E. coli* zu exprimieren. Hierzu wurden His:RGS5, sowie GST (Glutathion-S-Transferase)-Fusionen der Prey-Proteine UCK und AC3, hergestellt. Im ursprünglichen Y2H-Screening wurde nur ein Teil der gesamten kodierenden Sequenz von AC3 isoliert. Der isolierte DNA-Abschnitt umfasste die Aminosäuren 520 bis 655 und

kodierte die Subdomäne C1b (Prof. C. Dessauer, Houston/U.S.A, persönliche Mitteilung). C1b ist Teil der zytoplasmatischen C1-Domäne, die von zwei Transmembransegmenten begrenzt ist und das katalytische Zentrum des Enzyms enthält. Hier bindet neben anderen Regulatoren auch RGS2 (C. Dessauer). Da die Bindung von RGS5 an AC3 nur hier stattfinden kann, würde die Bestätigung der Interaktion interessante Perspektiven im Hinblick auf die Regulation von AC3 durch RGS5 eröffnen. Daher und aufgrund der besseren Löslichkeit wurde die C1-Domäne (Position 402 bis 631) anstelle des Gesamtproteins rekombinant hergestellt. Außerdem wurde die aus dem Y2H-Screening isolierte UCK-Sequenz (umfasste die Aminosäuren 15 bis 196) als GST-Fusionsprotein synthetisiert. Trotz erhöhter Proteinmengen konnte keine Bindung zwischen rekombinatem RGS5 und der an Matrix-gebundenen GST-Fusionsproteinen nachgewiesen werden (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Immunpräzipitation von RGS5-Bait und Preys II.** 5 µg rekombinantes Myc:AC3:GST (C1 Domäne mit Myc und GST Tag) oder Myc:UCK:GST wurden auf Glutathion immobilisiert (*IPαGST*) und mit 5 µg rekombinatem His:RGS5 (*B*) inkubiert, gewaschen und im Western Blot mit Anti-RGS5 und Anti-Myc detektiert.

Demnach konnte der biochemische Beweis einer Bindung von RGS5 an einen der isolierten Y2H-Klone mit den hier beschriebenen Immunpräzipitationsexperimenten bislang nicht erbracht werden (eine Zusammenfassung der Experimente ist in Tabelle 8 dargestellt). Die 2-Hybridmethode ist der Koimmunpräzipitation im Hinblick auf die Sensitivität überlegen, so dass eine physiologisch relevante Interaktion für die beschriebenen Bindungspartner keineswegs ausgeschlossen werden kann. Die Reanalyse der Interaktionen mit anderen, sensitiveren Detektionssystemen, beispielweise der Plasmaoberflächenresonanz, bleibt somit interessant.

Klon Name (Abkürzung)	293T IP	Retik. IP	RekP IP	Befund	Treffer
AC3	X <sup>(1,2)</sup>	X	X	ND	3
Fkbp8	X	X	NA	ND	1
HRPA	X	NA	NA	ND	1
E4F	●	X	NA	ND	2
Cpxm1	●	X	NA	ND	1
fbn-2	●	NA	NA	NA	1
UCK	X <sup>(1)</sup>	X	X	ND	3
Cacycbp	NA	X	NA	ND	1
PAP7	NA	●	NA	NA	2
GABARAP	●	X	NA	ND	1
9BP1	●	X	NA	ND	2

**Tabelle 8: Zusammenfassung der Immunpräzipitationsexperimente.**

x: analysiert; NA: nicht analysiert; ● nicht exprimiert bzw. Proteinexpression durch IP nicht detektiert; ND: nicht detektierbare Interaktion mit RGS5. 293T: Proteinexpression nach Kofransfektion in 293T-Zellen; Retik.: Retikulozytenlysatsystem; RekP: Expression als rekombinante Proteine in E. coli. Treffer: Anzahl identischer Klone im Y2H-Screening; (1) IP auch in Gegenwart von G $\alpha$ i3; (2) IP auch nach Aktivierung des Prey-Proteins (hier: Forskolin)

## 4.4 DIE RGS5-KNOCK-OUT-MAUS

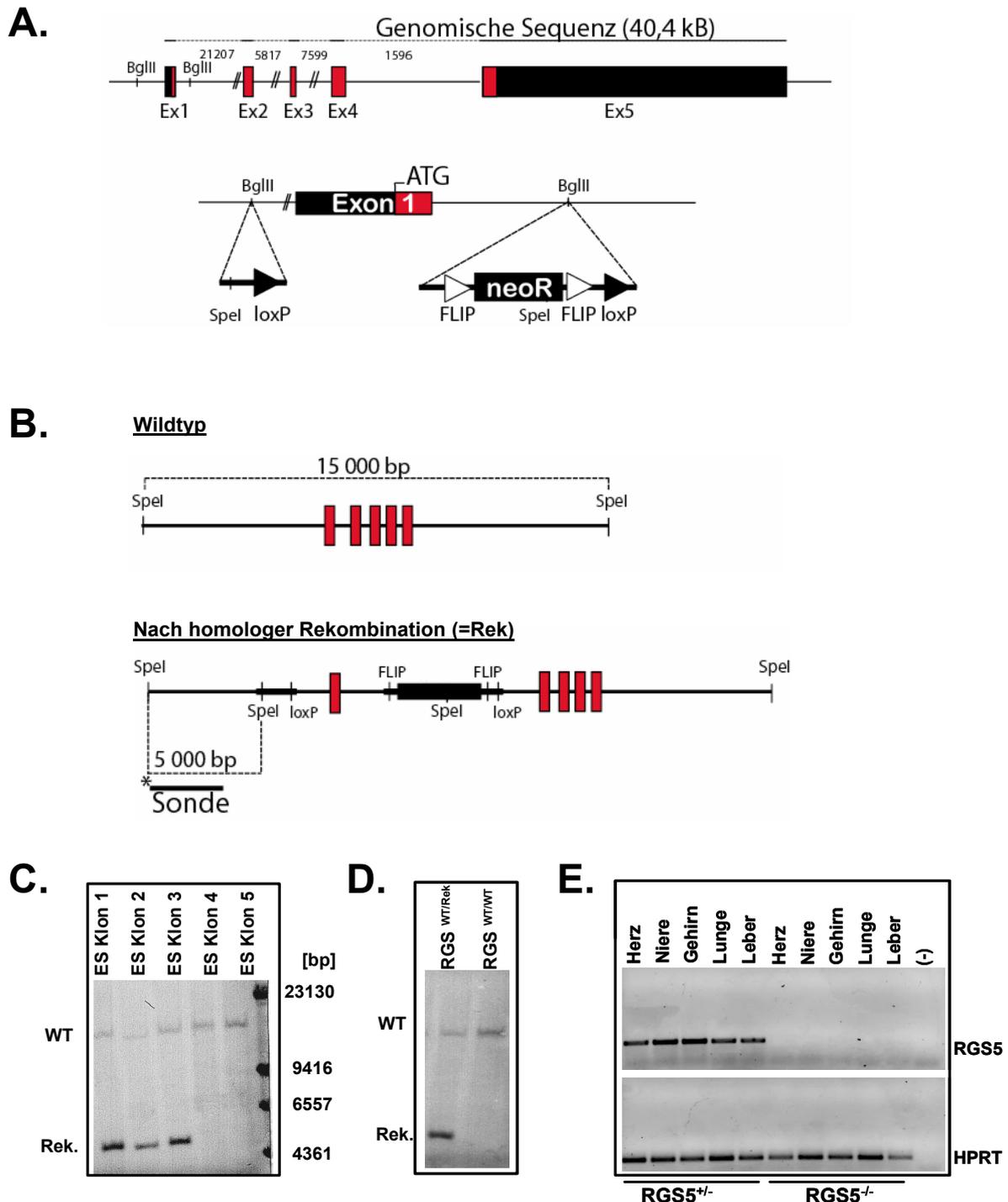
### 4.4.1 Generierung einer RGS5-defizienten Maus („RGS5-Knock-out“)

Um Erkenntnisse über die biologische Funktion von RGS5 zu gewinnen, wurde kürzlich in dieser Arbeitsgruppe eine konditional RGS5-defiziente Maus etabliert.<sup>7</sup> Die Expression von RGS5 kann in diesen Tieren durch gezielte, Cre-vermittelte Deletion von Exon 1 ausgeschaltet werden (Abbildung 28). Zur Generierung transgener Mäuse wurden im Transgenkonstrukt LoxP-Stellen beidseitig von Exon 1 positioniert und das LoxP-Konstrukt anschließend durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) eingebracht (siehe Abbildung 28A-C). Rekombinierte ES-Zell-Klone wurden in C57BL/6-Blastozysten injiziert und in scheinträchtige NMRI-Tiere, die zuvor mit vasktomierten Männchen verpaart worden waren, *in utero* implantiert. Chimäre Nachkommen wurden mit C57BL/6-Tieren verpaart. Die Keimbahnübertragung des LoxP-Konstrukts wurde anschließend in F1-Nachkommen durch Southern Blot untersucht (Abbildung 28D). Heterozygote Keimbahnchimären wurden zur Deletion von Exon 1 und der NeoR-Kassette mit Cre-Deleter-Tieren (Schwenk et al., 1995) gekreuzt. Die RGS5<sup>+/-</sup>-heterozygoten Nachkommen wurden miteinander verpaart und im Southern Blot auf das Fehlen beider RGS5-Allele selektiert (nicht gezeigt). Bei den Nachkommen konnte die Abwesenheit von RGS5-mRNA durch RT-PCR in mehreren Organen demonstriert werden (Abbildung 28E). Die homozygoten Nachkommen waren RGS5-defizient und werden nachfolgend als RGS5-Knock-out-Tiere (RGS5-KO oder RGS5<sup>-/-</sup>) bezeichnet. RGS5<sup>+/+</sup>-Kontrolltiere wurden erzeugt, indem die rekombinanten Keimbahnchimären mit FLIP-Deleter-Tieren, (Rodriguez et al., 2000) statt mit Cre-Deletern, gekreuzt wurden. Hierbei wurde nur die NeoR-Kassette entfernt. RGS5<sup>+/+</sup>-FLIP-Tiere entsprechen Wildtyp-RGS5-Mäusen, besitzen aber denselben genetischen Hintergrund wie die RGS5-KO-Mäuse.

### 4.4.2 Geburtenrate und histologische Befunde

RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere waren äußerlich normal und wiesen keine sichtbaren phänotypischen Veränderungen auf. Die histologische Analyse mehrerer Organe (Aorta, Herz, Gehirn, Niere, Pankreas, Leber, Thymus, Milz) von adulten RGS5-KO-Tieren zeigte bisher nur Alterationen in der Plazenta. Die genauen Ursachen werden zur Zeit analysiert. Die Nachkommenzahl war in der RGS5<sup>-/-</sup>-Kolonie (559 Tiere) deutlich geringer als in der RGS5<sup>+/+</sup>-FLIP-Kontrollgruppe (362 Tiere). Sowohl die Wurfgröße als auch die Zahl der lebensfähigen Jungtiere war in der RGS5<sup>-/-</sup>-Gruppe reduziert.

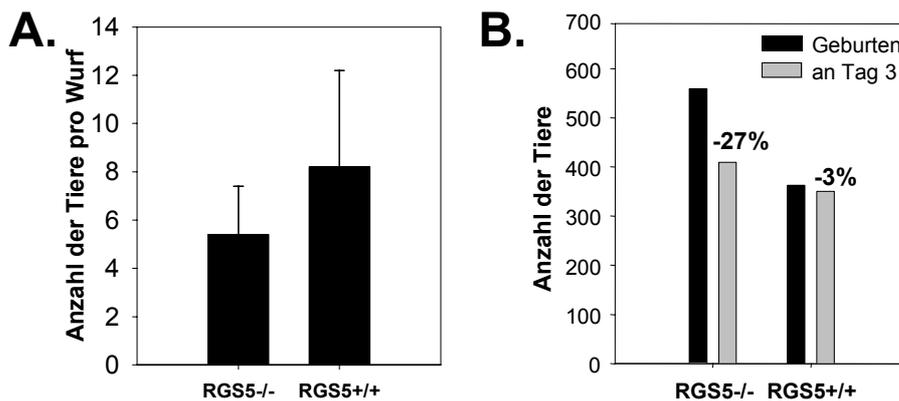
<sup>7</sup> Die Erzeugung dieser Maus erfolgte durch G. Küblbeck und S. Schmidt (Abteilung Prof. Hämmerling, DKFZ)



**Abbildung 28: Generierung einer konditionell RGS5-defizienten Maus.** (A) *Das Konstrukt:* Die genomische Sequenz des Maus-RGS5-Gens umfasst eine Länge von 40,4 kB auf Chromosom 1. Zur RGS5-Deletion genügte die Entfernung von Exon 1 (Ex1, 121 bp). Hierzu wurde eine SpeI-loxP-Sequenz in die stromaufwärts von Ex1 liegende BglIII-Schnittstelle innerhalb der 5'UTR-Region des RGS5-Gens eingefügt. Analog wurde eine NeoR-Kassette in die BglIII-Schnittstelle in Intron 1-2 eingesetzt. Diese enthielt die kodierende Sequenz für das Neomycinresistenzgen, flankierende FLIP-Sequenzen, sowie die 3' loxP-Sequenz. (Die Zahlen zwischen den Exonsequenzen geben die Größe der Introns in bp an). (B) *Integration:* Genomische RGS5-Sequenz vor bzw. nach homologer Rekombination in ES-Zellen E14TG2a (aus 129P2/OlaHsd). (C) *Detektion der Integration:* Neomycinresistente ES-Zell-Klone wurden im Southern Blot auf Integration der NeoR-Kassette überprüft. DNA resistenter ES-Zell-Klone wurden mit SpeI geschnitten, geblottet und mit einer markierten Sonde hybridisiert. Bei vollständiger Integration der beiden Kassetten lieferte die Restriktion ein 5000 bp-Fragment, während die Wildtypsequenz ein 15 kb-Fragment ergab (vgl. B). (D) *Keimbahnchimäre:* heterozygote F1-Nachkommen wurden im Southern Blot vor der Verpaarung mit Cre-Deletern auf die Keimbahnübertragung der Kassette überprüft. (E) *Organanalyse:* Die Expression von RGS5 in Organen aus homozygoten (RGS5<sup>-/-</sup>) und heterozygoten (RGS5<sup>+/-</sup>) F3-Nachkommen wurde mittels RT-PCR untersucht.

(Abbildung C und D wurden von G. Küblbeck zur Verfügung gestellt)

Die Wurfgröße betrug bei RGS5-defizienten Tieren im Schnitt 5,4 Nachkommen pro Muttertier (Abbildung 29A). Sie war damit um rund 34% niedriger, als in der RGS5-positiven Kontrollgruppe. Innerhalb der ersten drei Lebenstage starben zudem 27% der neugeborenen RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere, im Vergleich dazu jedoch lediglich 3% der RGS5<sup>+/+</sup>-FLIP-Kontrolltiere (Abbildung 29B). Die postnatale Sterblichkeit war in der RGS5-defizienten Kolonie demnach ungewöhnlich hoch.



**Abbildung 29: Prä- und postnatale Sterblichkeit.** (A) Durchschnittliche Wurfgrößen in der RGS5<sup>-/-</sup>-Gruppe (559 Tiere, 102 Würfe) und der Kontrollgruppe (362 Tiere, 42 Würfe). (B) In der RGS5<sup>-/-</sup>-Gruppe (559 Tiere) starben 27% der Tiere innerhalb der ersten drei Tage nach der Geburt. In der Gruppe der kongenen RGS5<sup>+/+</sup>-FLIP-Tiere (362 Tiere) starben im gleichen Zeitraum dagegen nur 3% der Nachkommen.

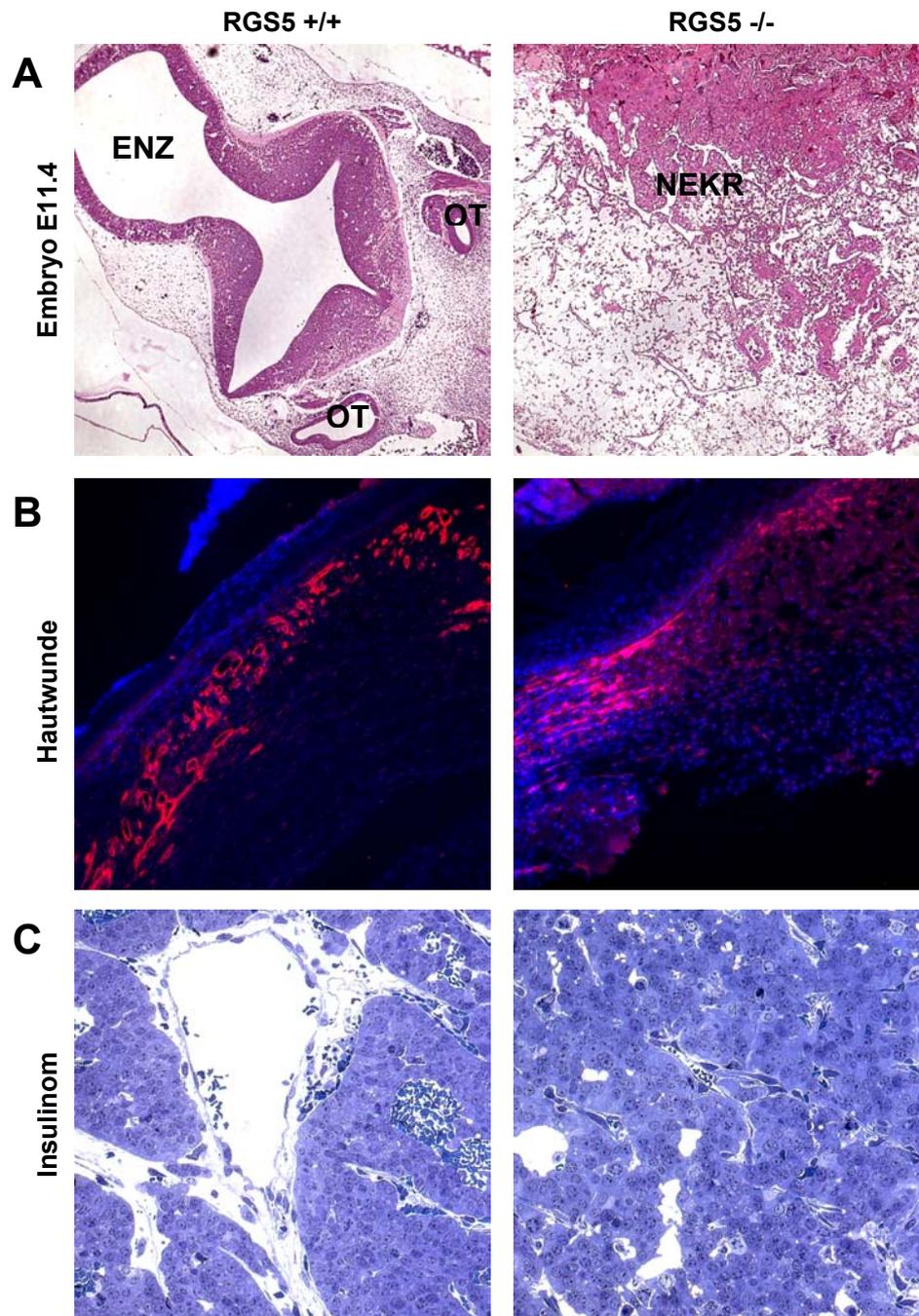
Möglicherweise ist die geringere Nachkommenzahl auf eine gestörte Embryonalentwicklung in Abwesenheit von RGS5 begründet. Um diese Annahme zu überprüfen, wurden trächtige RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere, sowie RGS5<sup>+/+</sup>-FLIP-Kontrolltiere 11,5 Tage p.c. (=E11,5) histologisch untersucht. Es zeigte sich, dass in RGS5-defizienten Tieren einige der Embryonen normal angelegt wurden und sich daher vermutlich korrekt entwickeln konnten, während ein anderer Teil der Embryonen im Uterus abstarb. Dies wurde durch eine prominente Gewebenekrose (NEKR) deutlich. In Abbildung 30A sind nekrotische, amorphe Bereiche innerhalb des Embryonalgewebes sichtbar. Im Unterschied dazu entwickelten sich RGS5<sup>+/+</sup>-Embryonen in FLIP-Tieren normal. In der Regel wurden etwa 8 bis 10 Embryonen angelegt. Die histologische Färbung in Abbildung 30A (links) zeigt einen normalen Embryo mit extraembryonaler Anlage. Das embryonale Enzephalon (ENZ) und zwei Otozysten (OT, Gehörvesikel) sind hier klar erkennbar. Die Gewebenekrose in RGS5<sup>-/-</sup>-Embryonen weist auf eine Unterversorgung der Embryonen hin und könnte die geringere Wurfgröße erklären. Ob die Unterversorgung in Abwesenheit von RGS5 auf Plazentadefekte zurück zu führen ist, ist noch nicht geklärt. Ebenso ist noch offen, ob diese ursächlich mit der erhöhten postnatalen Sterblichkeit zusammenhängt.

Wie zuvor gezeigt wurde (Abschnitt 4.1.5) korrelierte die RGS5-Expression mit dem Aufbau von Granulationsgewebe bei der Wundheilung. Dies führte zu der Annahme, dass RGS5 am Wundheilungsprozess funktionell beteiligt ist. Aus diesem Grund wurde die Wundheilung in RGS5-

KO-Tieren untersucht. Die Kinetik der Wundschließung war in Abwesenheit von RGS5 um ein bis zwei Tage verzögert. Dies steht im Zusammenhang mit einer protrahierten Migration von Endothelien in das Granulationsgewebe, wie in Abbildung 30B durch die Endothelfärbung (Anti-CD31) im Vergleich mit Wunden an Wildtyp-Tieren deutlich wird.

RGS5 wird in RIP1Tag5-Tumoren im Verlauf der Tumorangio-genese induziert. Die Expression wird allerdings nach einer therapeutisch herbeigeführten Gefäßnormalisierung nahezu eingestellt. Um den Einfluss von RGS5 auf die Tumorentwicklung zu analysieren, wurden RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere mit RT5-Tieren verpaart. RGS5-defiziente Nachkommen entwickelten solide Tumoren. Die Wachstumskinetik und die Lebenserwartung werden zur Zeit noch analysiert. Es scheint sich allerdings abzuzeichnen, dass die Lebenserwartung von RGS5<sup>-/-</sup>xRT5-Tieren etwas kürzer als die von RGS<sup>+/+</sup>-RT5-Tieren ist. Histologische Analysen an Ultradünnschnitten erster Tumoren zeigten, dass die Gefäßmorphologie in den RGS5<sup>-/-</sup>-Tumoren verändert war. Während RT5-Tumoren die typischen Merkmale von Tumorgefäßen (anormale Struktur, Kalibersprünge – siehe Kapitel 1) aufwiesen, waren in RGS5<sup>-/-</sup>-Tumoren ausschließlich kleine Gefäße sichtbar, die normalen Blutgefäßen oder den normalisierten Gefäßen in therapierten Tumoren (siehe 4.1.6) ähnelten (Abbildung 30C). Die Normalisierung der Gefäße tritt demnach sowohl nach einer therapiebedingten Reduktion der RGS5-Expression, als auch erstaunlicherweise in RGS5-defizienten Tieren auf. Offenbar ist allein das Fehlen von RGS5 in KO-Tieren ausreichend, um eine Gefäßnormalisierung und damit einen umfassenden Umbau des Tumorgefäßsystems herbeizuführen.

Weiterhin war in den RGS5-KO-Tumoren eine vermehrte Anzahl extravasierter Erythrozyten (bzw. blood lakes, 4.1.1) und lipidhaltiger, makrophagenähnlicher Zellen auffällig. Um welchen Zelltyp es sich bei letzteren handelt, ist noch ungeklärt. Ebenso fraglich ist die Ursache der vermehrten Blood-lake-Bildung. In-vitro-Daten anderer Gruppen zeigten, dass RGS5 an der Inhibition trophischer Signalwege, unter anderem über den PDGFR $\beta$ -Rezeptor, beteiligt ist (Cho et al., 2003). Da PDGF-B die Proliferation und Migration von Perizyten stimuliert (Hellstrom et al., 1999), vermuteten wir, dass RGS5<sup>-/-</sup>-Tiere eine veränderte Perizytenummantelung der Gefäße aufweisen. Eine Auszählung von Perizyten und Endothelzellen in der Elektronenmikroskopie ergab jedoch, dass das relative Verhältnis der beiden Zellpopulationen in RGS5-defizienten RT5-Tumoren unverändert war (nicht gezeigt).



**Abbildung 30: Analyse der RGS5-Knock-out-Maus.** (A) H&E-Färbung von embryonalem Gewebe aus RGS5<sup>+/+</sup> bzw. RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren am Embryonaltag E11,5. (B) Immunfluoreszenzfärbung von Endothelien im Granulationsgewebe mit Anti-CD31 nach kutaner Wundsetzung. Die Zellkerne sind mit DAPI angefärbt. (C) Methylenblaufärbung an Ultradünnschnitten von Insulinomen aus RT5-Tieren (RGS<sup>+/+</sup>) bzw. RT5xRGS5<sup>-/-</sup>-Tieren. ENZ: embryonales Enzephalon (Gehirn), OT: Otozysten, NEKR: nekrotisches Gewebe.

*Alle histologischen Experimente sind in Kooperation mit Herrn Prof. Gröne (Pathologie, DKFZ Heidelberg) durchgeführt worden.*

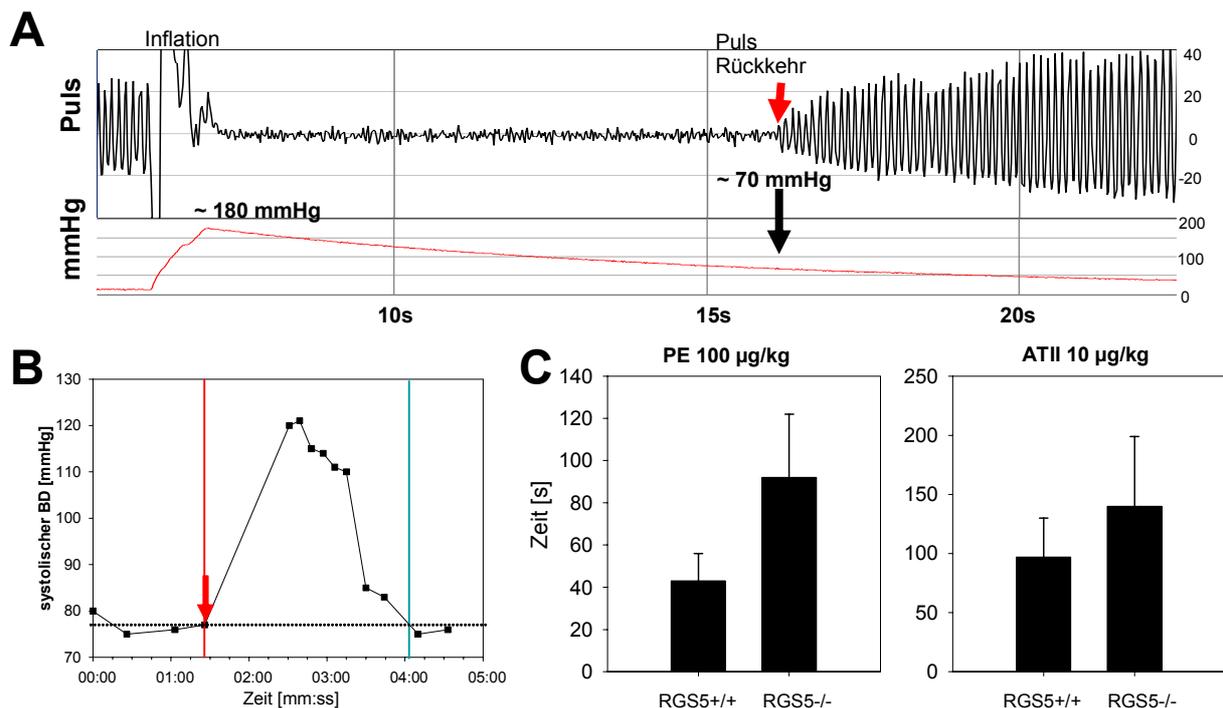
#### 4.4.3 Einfluss von RGS5 auf die Blutdruckregulation

Mehrere Hinweise aus der Literatur lassen auf eine Beteiligung von RGS5 an der Regulation des Blutdruck schließen: (1) Als Regulator von  $G\alpha_q$  und  $G\alpha_i$  ist RGS5 wahrscheinlich an der Signalgebung vieler Vasopressoren (d.h. gefäßkontrahierender Stoffe) unmittelbar beteiligt, da diese über  $G_q$ - und  $G_i$ -gekoppelte Rezeptoren operieren (Cho et al., 2003). Zu diesen Vasopressoren gehören beispielsweise Angiotensin-II (ATII), Endothelin-1 (ET-1) oder  $\alpha_1$ -adrenerge Agonisten (wie Phenylephrin (PE), Noradrenalin). Es wurde bereits gezeigt, dass die ATII- und ET-1-stimulierte Signalgebung *in vitro* durch RGS5 reguliert werden kann (Cho et al., 2003; Zhou et al., 2001). (2) Neben der GAP-Funktion spricht auch die vorwiegend arterielle und kardiale Expression von RGS5 für eine funktionelle Relevanz von RGS5 bei der Blutdruckregulation. Im Vergleich mit anderen Organen wird RGS5 im Herzen und auch in fast allen Arterien, Arteriolen und Kapillargefäßen auf hohem Niveau exprimiert (Li et al., 2004; eigene Daten) und kann daher potentiell Vasodilatation und -kontraktion beeinflussen. (3) Es wurde bereits eindrücklich demonstriert, dass nah verwandte RGS-Moleküle direkt in die Homöostase des kardiovaskulären Systems eingreifen. RGS2-defiziente Tiere waren aufgrund einer chronischen Vasokonstriktion hyperten (Heximer et al., 2003). Die transgene Überexpression von RGS4 führte dagegen nach einer Druckbelastung („pressure-overload“) zu einer reduzierten Herzhypertrophie (Rogers et al., 1999).

Um festzustellen, ob RGS5-KO-Mäuse ebenfalls an einer chronischen Konstriktion der Gefäße leiden, wurde die Kinetik des Blutdrucks nach Vasopressorgabe untersucht<sup>8</sup>. Der Verlauf des systolischen Blutdrucks (SBD) wurde hierbei durch nichtinvasive Blutdruckmessungen mittels einer Schwanzmanschette verfolgt. Dabei wird die Manschette über den systolischen Druck in der Schwanzarterie aufgepumpt, so dass der durch den Herzschlag erzeugte, pulsatile Blutstrom im Gefäß zum Erliegen kommt und das Pulssignal verschwindet. Nach Öffnen des Druckventils fällt langsam der Manschettendruck ab. Entspricht der Manschettendruck dem arteriellen Druck, ist die durch die Manschette bewirkte Kompression des Gefäßes aufgehoben und der Blutstrom ist wieder freigegeben. Dieser Druckpunkt (ca. 70 mmHg in Abbildung 31A, da unter Narkose) entspricht dem systolischen Blutdruck. Der Blutstrom wird hierbei optisch über die Lichtdurchlässigkeit des Schwanzes gemessen (Abbildung 31A, Pulskurve). Vor der Vasopressorstimulation wurde zunächst der basale Blutdruck mehrfach bestimmt. Danach wurde Phenylephrin oder Angiotensin-II intravenös in anästhesierte Tiere injiziert (der Zeitpunkt der Vasopressorgabe ist in Abbildung 31B durch die rote Linie indiziert). Im Anschluss wurden mehrfache Messungen des Blutdrucks vorgenommen. Beide hier verwendeten Vasopressoren bewirkten einen raschen Anstieg des Blutdrucks, der von einem langsameren Druckabfall gefolgt war (Abbildung 31B; die grüne Linie markiert das Wiedererreichen des basalen SBD). Im Vergleich mit RGS5<sup>+/+</sup>-FLIP-Kontrolltieren war jedoch der Druckabfall nach PE- oder

<sup>8</sup> Dieses und die folgenden Experimente wurden von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Prof. S. Offermanns (Institut für Pharmakologie der Universität Heidelberg) durchgeführt.

ATII-Stimulation in den RGS5-KO-Tieren deutlich verlangsamt (Abbildung 31C). Der Blutdruck wird maßgeblich durch den Kontraktionszustand der kleineren Gefäße und Kleinstgefäße (Arteriolen und Kapillaren) bestimmt. Daher ist die gemessene Druckänderung hauptsächlich auf die Kontraktion dieser so genannten Widerstandsgefäße zurückzuführen. Sowohl PE als auch ATII bewirkten eine länger andauernde Gefäßkontraktion in RGS5-defizienten Tieren. Folglich ist RGS5 in den Widerstandsgefäßen an der Blutdruckregulation beteiligt und moduliert die Signalgebung über ATII- bzw.  $\alpha_1$ -adrenerge Rezeptoren.



**Abbildung 31: Änderung des Blutdrucks nach Vasopressorinjektion.** (A) Ermittlung des arteriellen Blutdrucks mit Hilfe der Schwanzmanschette. Die pulsatile Strömung des Blutes wird durch Applizieren eines Manschettendruck von 180 mmHg kurzzeitig unterbunden (B) Repräsentative Bestimmung der Dauer der Konstriktion nach Injektion eines Vasopressors. Die rote Linie gibt den Zeitpunkt der Injektion an; die grüne Linie markiert den Zeitpunkt, nach welchem der Blutdruck wieder Basalniveau erreicht hatte. (C) Dauer der Vasopressorantwort nach intravenöser Injektion von Phenylephrin (PE) oder Angiotensin-II (ATII). Die Werte repräsentieren die gemittelten Messwerte aus 4 Experimenten (je 4 Tiere pro Gruppe) mit jeweils 2 bis 3 Wiederholungen der Agonist-Injektion. Die Fehlerbalken in C geben die Standardabweichung an.

Ebenso wurde der Einfluss von RGS5 auf die Induktion einer Herzhypertrophie<sup>9</sup> untersucht. Die im vorherigen Abschnitt beschriebene erhöhte Kontraktilität der Widerstandsgefäße in den RGS5-KO-Tieren könnte eine Hypertrophie auslösen bzw. eine induzierte Hypertrophie verstärken. Der gegenteilige Effekt war bei Überexpression von RGS4 eingetreten (Rogers et al., 1999). Da das Herz

<sup>9</sup> Die Herzhypertrophie stellt eine strukturelle Veränderung der Ventrikelmuskulatur dar. Sie resultiert als physiologische Antwort auf eine chronische Arbeitsbelastung, wie dies beispielsweise durch einen dauerhaft angehobenen Blutdruck der Fall sein kann. Die erhöhte Herzarbeit, die zur Aufrechterhaltung einer konstanten Pumpleistung gegen einen chronisch erhöhten arteriellen Blutdruck notwendig ist, wird durch die Vergrößerung des Herzens („Hypertrophie“) kompensiert (Klinke und Silbernagl, 2003; Hunter und Chien, 1999; Wagner et al., 1999). Es wird angenommen, dass Zytokine (Interleukin-1 $\beta$ ), Wachstumsfaktoren (wie FGF, IGF-1), Cathecholamine und kardiovaskuläre Peptidhormone (ATII) an der Entstehung einer Herzhypertrophie beteiligt sind. Im hypertrophierenden Herz nimmt das Zellvolumen der Kardiomyozyten zu.

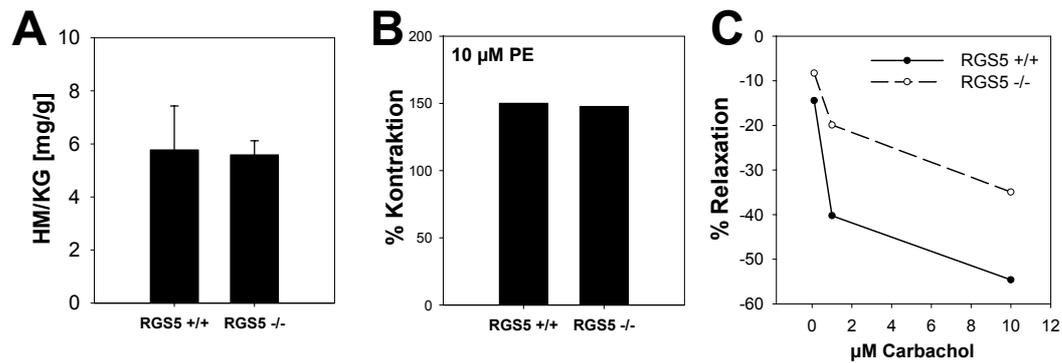
von RGS5-KO-Tieren nicht per se hypertroph war, überprüften wir, ob eine durch artifizielle Druckbelastung induzierte Hypertrophie in RGS5-KO-Tieren stärker ausgeprägt ist, als in RGS5-profizienten Kontrollmäusen. Hierzu wurde eine Aortenstenose induziert, indem die Aorta abdominalis über dem Abgang der Arteria renalis partiell ligiert wurde. Innerhalb von zwei Wochen führte diese Druckbelastung des Herzens (bzw. des linken Ventrikels) in Wildtyp-Mäusen und gleichsam in KO-Mäusen zu einer Herzhypertrophie, die durch Zunahme der Herzmasse (HM) relativ zum Körpergewicht (KG) gemessen werden konnte. Hinsichtlich des HM:KG-Verhältnisses waren keine Unterschiede feststellbar (Abbildung 32A). Demzufolge führt das Fehlen von RGS5 zumindest im betrachteten Zeitraum nicht zu einer erhöhten Gewichtszunahme des Myokards. Eine mögliche antihypertrophe Wirkung von RGS5 in der Peripherie (d.h. eine wachstumsbegrenzende Funktion auf arterielle SMC) wurde bisher noch nicht geprüft.

Neben der systemischen Wirkung des gefäßkontrahierenden Agonisten PE wurde auch dessen kontraktile Wirkung auf isolierte Fragmente von Aorta thoracica und Aorta abdominalis durch eine isometrische Spannungsmessung untersucht (Horvath et al., 2005). Hierzu wurden kurze Gefäßfragmente zwischen Widerstandsmessern eingeklemmt, die eine Detektion der Kontraktion nach Vasopressorstimulation ermöglichten. Nach PE-Stimulation war kein Unterschied in der Kontraktilität von Abdominal- oder Thoraxaorta von KO- und RGS<sup>+/+</sup>-Tieren messbar. (Abbildung 32B zeigt die Kontraktion nach Perfusion von A. thoracicus mit 10  $\mu$ M PE). Dies könnte auf eine unterschiedliche Wirkung von RGS5 auf die  $\alpha_1$ -adrenerge Signalgebung in Aorta und in der Peripherie hindeuten.

In einem weiteren Experiment wurde die NO-vermittelte Relaxationsfähigkeit in Abwesenheit von RGS5 untersucht. Hierzu wurden Aorta thoracica und Aorta abdominalis zunächst mit Prostaglandin F<sub>2 $\alpha$</sub>  präkontrahiert (PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  bindet dabei an Gq-gekoppelte Thromboxanrezeptoren<sup>10</sup>) und anschließend mit Carbachol stimuliert. Carbachol, ein nichthydrolysierbares Acetylcholinanalogon, bindet an muskarinische Rezeptoren auf der Membranoberfläche von Endothelzellen (Anger et al., 2004; Horvath et al., 2005) und induziert die Freisetzung von NO. Dieses relaxiert daraufhin vaskuläre SMC. PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  wurde verwendet, da es eine sehr starke und lang andauernde Konstriktion bewirkt, so dass der Effekt von relaxierenden Agonisten gut untersucht werden kann (Horvath et al., 2005). Sowohl Gefäße aus RGS5<sup>-/-</sup>- als auch RGS5<sup>+/+</sup>-Tieren relaxierten nach Carbacholzugabe, allerdings war die Fähigkeit von RGS5-positiven Gefäßen zur Relaxation erstaunlicherweise ungleich größer (Abbildung 32C). Bei geringen Carbacholkonzentrationen war der Unterschied in der Relaxationsfähigkeit RGS5-positiver und RGS5-negativer Gefäße minimal, im Konzentrationsbereich von 1  $\mu$ M bis 10  $\mu$ M Carbachol war der Unterschied jedoch dramatisch. RGS5 verstärkte demnach die Carbachol-stimulierte, NO-vermittelte Relaxation<sup>11</sup>.

<sup>10</sup> unpublizierte Daten Z. Benyo

<sup>11</sup> Die Blutdruckmessungen wurden durchgeführt von Dr. Angela Wirth (Abbildung 31), die Hypertrophieexperimente von Dr. Nina Wettschureck und Dr. Antonia Sassmann (Abbildung 32A) und die Ex-vivo-Stimulationsexperimente von



**Abbildung 32: Hypertrophieinduktion und Ex-vivo-Stimulation.** (A) Induktion der Herzhypertrophie durch Druckbelastung des Herzens. Die Angaben beziehen sich auf Tag 14 nach der Gefäßligation. HM/KG: Herzmasse zu Körpergewicht. Die Standardabweichung bezieht sich auf eine Gruppe von 6 (RGS5<sup>+/+</sup>) bzw. 7 Tieren (RGS5<sup>-/-</sup>) (B) Ex-vivo-Stimulation von Aorta thoracica aus RGS5-KO und RGS5<sup>+/+</sup>-Kontrolltieren mit Phenylephrin. Die Werte geben die prozentuale Kontraktion bezogen auf eine Referenzkontraktion mit 124 mM K<sup>+</sup> an. (C) Ex-vivo-Stimulation von Aorta thoracica mit 0,1 mM PGF2 $\alpha$  (Kontraktion) und anschließender Relaxation mit 0,1 – 10  $\mu$ M Carbachol. Die Werte geben die prozentuale Relaxation bezogen auf die Präkontraktion mit PGF2 $\alpha$  an.

## 5 Diskussion

### 5.1 STUDIEN ZUR ROLLE VON RGS5 IN DER ANGIOGENESE

#### 5.1.1 RGS5 in der Tumorangiogenese

##### A. RGS5 markiert Perizyten in der Tumorangiogenese

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass RGS5 gefäßspezifisch in autochthonen Tumoren RIP1Tag5-transgener Mäuse überexprimiert wird. Die histologische Analyse verschiedener Tumorstadien ergab, dass RGS5 in neoplastischen Läsionen zeitgleich mit der Gefäßneubildung induziert wurde; zu einem Zeitpunkt also, an dem angiogenesefördernde Faktoren im Verhältnis zu angiogeneseinhibierenden Faktoren im Tumormikromilieu überwiegen (Abbildung 5). Durch die Isolierung der beiden gefäßbildenden Zellpopulationen, Endothelzellen und Perizyten, aus soliden Tumoren konnte eindeutig belegt werden, dass die Expression von RGS5 auf PDGFR $\beta^+$ -Perizyten beschränkt war. Die Induktion von RGS5 in Tumorperizyten wies darauf hin, dass der Phänotyp dieser Zellen während der Tumorentwicklung moduliert wird. Die Veränderungen von perivaskulären Zellen sind vor allem in den letzten zwei Jahren Gegenstand intensiver Forschung. Morikawa et al. berichteten erstmals von „veränderten Perizyten innerhalb von Tumorblutgefäßen“ (Morikawa et al., 2002). Perizyten in RIP1Tag2-Tumoren, *Lewis-Lung*-Karzinomen und MCAIV-Mammakarzinomen waren deformiert, nur schwach mit Endothelgefäßen assoziiert und wiesen bizarre zytoplasmatische Fortsätze auf (Morikawa et al., 2002). Die Destabilisierung der Gefäßwände, ein vermehrtes Auftreten von Hämorrhagien, eine erhöhte Gefäßpermeabilität und ein veränderter vasomotorischer Tonus von Tumorblutgefäßen sind möglicherweise Konsequenzen dieser Veränderungen (Baluk et al., 2005; Morikawa et al., 2002). Der morphologische und strukturelle „Umbau“ der Perizyten im Verlauf der Tumorentwicklung scheint durch die spezielle Mikroumgebung (Freisetzung von Angiogenesefaktoren, Zytokinen, Wachstumsfaktoren etc.) im Tumor ausgelöst zu werden. Perizyten wurden als pluripotente Zellen mit einer hohen Plastizität beschrieben, die abhängig vom Mikromilieu verschiedene Differenzierungswege einschlagen (Hirschi et al., 2004). Unsere Studien zeigen eindrücklich, dass RGS5 eine spezifische Perizytenpopulation im Tumor kennzeichnet. In einer aktuellen Studie wiesen Song et al. die Existenz *verschiedener* Perizytenpopulationen im RIP1Tag-Tumor nach (Song et al., 2005). Sie demonstrierten, dass PDGFR $\beta^+$ -Zellen eine Vorläuferform von Perizyten darstellen, die teilweise aus dem Knochenmark stammen. Erstaunlicherweise sind diese unreifen PDGFR $\beta^+$ -Perizyten gleichsam RGS5-positiv. Sie verlieren jedoch die Expression beider Marker (RGS5 und PDGFR $\beta$ ) mit zunehmender Differenzierung zu unterschiedlichen Perizytenstypen. Diese kann durch geeignete autokrine oder parakrine (endotheliale) Stimuli induziert werden kann. Folglich charakterisiert die Expression von RGS5 eine pluripotente, unreife Perizytenpopulation im Tumor.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass RGS5 auch in Angiogenesegefäßen im Astrozytom hoch exprimiert ist. In HIF1 $\alpha$ -defizienten Astrozytomen, die im Unterschied zu Wildtypastrozytomen keine Neogefäße durch Angiogenese bilden können, war RGS5 hingegen deutlich niedriger exprimiert (Abbildung 6). Obwohl andere Gruppen ebenso RGS5 in Tumoren nachgewiesen haben (Rae et al., 2000; Furuya et al., 2004; Chen et al., 2004), konnten wir erstmals die Angiogeneseabhängigkeit und die perizytenspezifische Expression von RGS5 im Tumor demonstrieren. Die Expression von RGS5 in perivaskulären Zellen (Perizyten, SMCs) ist inzwischen auch in anderen Organen und Geweben zweifelsfrei nachgewiesen, so beispielsweise im embryonalen Gehirn (Cho et al., 2003), in arteriellen Gefäßen (Embryo; (Bondjers et al., 2003)) und in adulten Tieren (Li et al., 2004).

### B. Eine mögliche Rolle von RGS5 bei der Migration von perivaskulären Zellen

Die Bedeutung von RGS-Molekülen für die Migration wurde in RGS1-defizienten Mäusen deutlich, da hier die korrekte Zielsteuerung bestimmter Zellpopulationen gestört war (Moratz et al., 2004; Han et al., 2005). Eine hohe Konzentration bestimmter RGS-Moleküle blockiert dagegen die chemokingesteuerte Zellmigration (Chemotaxis) (Bowman et al., 1998; Lu et al., 2001). Analog könnte RGS5 die Migration von PZ/SMC in Richtung eines Sphingosin-1-phosphat- (S1P) oder PDGF-BB-Gradienten modulieren, da die Signalgebung über die entsprechenden Rezeptoren EDG1 bzw. PDGFR $\beta$  *in vitro* durch RGS5 regulierbar ist (Cho et al., 2003). Während RGS5 die S1P-Signalgebung sicherlich über die Inhibition von G $\alpha$  reguliert, fehlt in der Literatur bisher eine solide mechanistische Erklärung für die Regulation der *nicht-G-Protein-gekoppelten* PDGF-Signaltransduktion. Hobson et al. schlugen vor, dass die PDGF-BB- und S1P-Signalgebung gekoppelt sind, da in ihren Studien die Migration von Zellen in Richtung eines PDGF-Gradienten teilweise von der Signalgebung über EDG1 abhing (Hobson et al., 2001)<sup>12</sup>. Es wurde vermutet, dass die Aktivierung der Rezeptortyrosinkinase PDGFR $\beta$  durch PDGF-BB zur Aktivierung einer Sphingosinkinase führt, die wiederum S1P generiert. Endogenes S1P kann an extrazelluläre, G $\alpha$ i-gekoppelte Rezeptoren (EDG1) binden und so die Migration initiieren (Hobson et al., 2001). Als G $\alpha$ -Regulator sitzt RGS5 an einer zentralen Stelle, um die Migration zu inhibieren.

Andere Gruppen bezweifeln grundlegend die von Hobson vorgeschlagene Hypothese der Rezeptorkopplung. Kluk et al. zeigten, dass EDG1 die PDGF-induzierte Migration in SMC nicht verstärkt. Zudem war die Migration nicht Pertussistoxin-sensitiv, daher also G $\alpha$ i-unabhängig (Kluk et al., 2003). Gegen die Bedeutung von EDG1 in PZ/SMC spricht, dass der SMC-spezifische EDG1-Knock-out zu einer normalen Gefäßentwicklung führt. Dagegen ist der endothelspezifische Knock-out von EDG1 (wie der globale) durch unzureichend mit SMC ummantelte Gefäße gekennzeichnet. Die Autoren schließen eine Bedeutung der EDG1-Expression in SMC für die Gefäßentwicklung allerdings

<sup>12</sup> Chemotaxisstudien mit EDG1-defizienten Fibroblasten hatten gezeigt, dass die PDGF-BB-vermittelte Migration reduziert war, obwohl PDGF-BB nicht an den Sphingosin-1-phosphatrezeptor EDG1 bindet.

nicht aus, da die Deletion des *edg1*-Gens möglicherweise zu spät in der Embryonalentwicklung erfolgte (Allende et al., 2003).

Als potentieller Regulator von PDGF und S1P erscheint eine Rolle von RGS5 bei der Migration von vaskulären Zellen schlüssig. Wie könnte eine RGS5-regulierte Migration im Tumor aussehen? Möglicherweise werden Perizyten zunächst zu den Angiogenesegefäßen rekrutiert, wo RGS5 spezifisch hoch reguliert wird. Am Zielort angekommen wären Perizyten durch eine Erhöhung der RGS5-Expression nicht weiter ansprechbar auf Migrationssignale und quasi am endothelialen Gefäß fixiert. Der Mechanismus ist jedoch völlig unklar. Zum einen wurde der Rezeptorkopplungshypothese, die eine Regulation von PDGFR $\beta$  durch RGS5 erklären würde, direkt widersprochen. Zum anderen zeigten zellspezifische EDG1-Knock-out-Tiere eindrucksvoll, dass der S1P-Weg weniger wichtig im SMC/PZ-Kompartiment ist, in welchem RGS5 exprimiert wird. Vermutlich ist die Modulation des PDGFR $\beta$ -Weges durch RGS5 *in vivo* bedeutsamer und verläuft allenfalls partiell über EDG1.

### C. Die Induktion von RGS5 könnte druckabhängig sein

Die Ursache für die Induktion von RGS5 in Tumorperizyten ist unklar. Vielleicht spielt der in soliden Tumoren charakteristisch hohe interstitielle Druck (Jain et al., 1996) eine entscheidende Rolle. In normalen Geweben wird die überschüssige interstitielle Flüssigkeit über die Lymphgefäße drainiert, wobei ein interstitieller Druck um 0 mmHg beibehalten wird. Die Permeabilität der normalen Kapillargefäße ist reguliert und der Transport über die Gefäßwand abhängig von Diffusion (d.h. dem Transport über einen Konzentrationsgradienten) und Konvektion (d.h. Transport durch Erhöhung des Filtrationsdrucks) (Pietras et al., 2001). Dagegen sind im Tumor die Lymphdrainage und die Gefäßpermeabilität stark gestört, so dass der interstitielle Druck erhöht ist (Tong et al., 2004; Jain et al., 1987). Da die Expression von RGS5 in Neuroblastomzellen *in vitro* durch Anhebung des hydrostatischen Drucks (Manome et al., 2003) ansteigt, könnte die Erhöhung des interstitiellen Druck im Tumor ebenso RGS5 induzieren. Eine therapeutisch herbeigeführte Gefäßnormalisierung senkt den interstitiellen Druck wieder ab (Tong et al., 2004). Unsere Befunde, dass RGS5 in normalen pankreatischen Inseln (Abbildung 5) und in normalisierten Gefäßen (Abbildung 12) nicht detektierbar war, sind im Einklang mit dieser Hypothese. Des Weiteren ist RGS5 in arteriellen Gefäßen, die einem hohen Druck standhalten müssen, exprimiert und nicht in venösen Gefäßen mit grundsätzlich niedrigerem Druck (Adams et al., 2000).

Die Signalgebung über PDGFR $\beta$  erhöht den interstitiellen Druck in der Haut (nach vorheriger Senkung durch Anaphylaxe), während die spezifische Inhibition durch PDGFR $\beta$ -Antagonisten den interstitiellen Druck in Tumoren reduziert (Pietras et al., 2001; Rodt et al., 1996). Vermutlich sind PDGFR $\beta$ <sup>+</sup>-Perizyten sowohl in der Haut, als auch im Tumor, an der Druckregulation aktiv beteiligt (Reed et al., 2001; Pietras et al., 2001). RGS5 könnte daher bei erhöhtem Druck (ausgelöst durch eine persistierende PDGF-Signalgebung) induziert werden, um eine Abschaltung des PDGF-Signalwegs

und damit eine Senkung des Drucks herbeizuführen. Es ist spekulativ, RGS5 eine Rolle in diesen Regulationsprozessen zu zuweisen. Dessen ungeachtet ist das kongruente Expressionsmuster von PDGFR $\beta$  und RGS5, sowie die vermutete Regulation der PDGFR $\beta$ -Signalgebung durch RGS5 vor diesem Hintergrund spannend.

#### D. Die Bedeutung von RGS5 in der Tumorthherapie

Neuere Daten belegen, dass die Wirksamkeit einer Antiangiogenesetherapie durch eine Schädigung von Endothelzellen *und* Perizyten deutlich gesteigert wird (Bergers et al., 2003; Jain, 2005). Die alleinige Interferenz mit dem endothelialen Kompartiment war bisher in klinischen Studien nur mäßig erfolgreich (Yang et al., 2003; Cobleigh et al., 2003). Bergers et al. zeigten, dass die kombinierte Inhibition von PDGFR $\beta$  auf Perizyten und VEGFR auf Endothelzellen zur Regression von soliden RIPTag-Insulinomen führte. Keiner der verwendeten Inhibitoren war allein in der Lage die Tumorlast in diesem Umfang zu reduzieren. Die PDGFR $\beta$ -Inhibition bewirkte eine Ablösung der Perizyten von den Tumorgefäßen, während der VEGFR-Inhibitor die Angiogeneseinduktion blockierte. Der Synergieeffekt beruht unter anderem darauf, dass eine Anti-VEGF-Therapie sehr viel effizienter perizytenfreie Gefäße schädigt (Benjamin et al., 1999). Die Kombinationstherapie beeinträchtigte selektiv die Tumorgefäße; normale Blutgefäße in anderen Organen oder im benachbarten exokrinen Pankreas waren nicht betroffen (Bergers et al., 2003). Offenbar sind nur in der Angiogenese befindliche, nichtterminal differenzierte vaskuläre Zellen (EZ und PZ) empfänglich für die VEGFR bzw. PDGFR-Inhibition. RGS5 ist ein Marker für unreife, folglich therapiesensitive Perizyten. Die Expression von RGS5 indiziert daher, wann eine Intervention des Tumorwachstums durch eine Antiangiogenesetherapie sinnvoll ist.

Im RT5-Modell konnte in dieser Arbeit eindrucksvoll gezeigt werden, dass die Expression von RGS5 nicht nur mit dem „Einschalten“ der Angiogenese korrelierte, sondern erstaunlicherweise auch mit ihrem „Ausschalten“. So wurde RGS5 im Verlauf einer Kombinationstherapie in soliden Tumoren herunterreguliert, wobei gleichzeitig eine Normalisierung der Gefäße einsetzte (4.1.6). Dem Phänomen der Gefäßnormalisierung wurde in den letzten Jahren eine große Aufmerksamkeit zuteil und dennoch sind die mechanistischen Zusammenhänge weitestgehend unbekannt. Allgemein herrscht Konsens darüber, dass die Normalisierung im Tumor durch eine Hemmung der Angiogeneseprozesse ausgelöst wird (Jain and Booth, 2003 112 8; Jain, 2001). Bei der hier verwendeten Tumorthherapie trägt die Induktion der angiostatischen Faktoren MIG und IP10 zur Gefäßnormalisierung bei (Ganss et al., 2002). Vermutlich differenzieren RGS5-positive Angiogeneseperizyten infolge der veränderten Mikroumgebung. Die RGS5-Expression wird offenbar eingestellt, sobald die Aktivität der angiogenesefördernden Faktoren von der Aktivität der angiostatischen Faktoren übertroffen wird. Die Korrelation von Angiogeneseaktivität und RGS5-Expression im Verlauf einer Tumorthherapie macht RGS5 zu einem interessanten prognostischen Marker. Die Kenntnis der RGS5-Expressionshöhe könnte daher für die Vorhersage der Wirksamkeit einer Antiangiogenesetherapie aufschlussreich sein.

Weiterhin wäre die Kenntnis der RGS5-Expression hilfreich für die Applikationsdauer einer Antiangiogenesetherapie. Eine extensive Therapie führt zur vollständigen Gefäßzerstörung, die jedoch meist nicht zur Tumorregression ausreicht (Jain, 2005; Jain, 2001; Hurwitz et al., 2004). Aus diesem Grund wird eine Antiangiogenesetherapie in der Klinik durch eine Chemo- oder Strahlentherapie komplementiert. Jain et al. postulierten, dass diese konventionellen Therapien sehr viel effizienter in normalisierten Tumoren, als in nicht „vorbehandelten“ Tumoren oder zu lange behandelten Tumoren sind. Eine extensive Antiangiogenesetherapie zerstört die Tumorgefäße und verhindert eine O<sub>2</sub>-Zufuhr. Chemotherapeutika können dann den Tumor nicht mehr ausreichend durchdringen. Außerdem ist die Strahlentherapie unter hypoxischen Bedingungen wenig wirksam, da die Bildung freier Sauerstoff-Radikale (d.h. der Effektoren der Strahlentherapie) beeinträchtigt ist (Jain, 2005). Der optimale Beginn der Chemo-/Strahlentherapie wäre daher *nach* erreichter Normalisierung der Gefäße und *vor* der einsetzenden vollständigen Gefäßregression. Der Beginn dieses Zeitfensters (bzw. die Normierung) wäre durch den Verlust der RGS5-Expression gekennzeichnet.

Die tumorspezifische Expression von RGS5 im Nierenkarzinom (Rae et al., 2000; Furuya et al., 2004) wird bereits therapeutisch genutzt. In laufenden klinischen Studien wird RGS5-Peptid als Tumorvakzine zur Immunisierung von Nierenkarzinompatienten eingesetzt (H.J. Rammensee, Universität Tübingen – persönliche Mitteilung). Die denkbare Inhibition von RGS5 wäre dagegen vermutlich wenig Erfolg versprechend, da auch RGS5-defiziente RT5-Tiere Tumoren ausbilden (Abbildung 30). Folglich scheint RGS5 nicht notwendig für das Tumorwachstum zu sein. Vielleicht wäre die Überexpression von RGS5 zur Inhibition der PDGFR $\beta$ -Signalgebung, beispielsweise durch gentherapeutisch eingebrachtes RGS5, weitaus interessanter, zumal der PDGF-Weg essentiell für die Gefäßbildung ist (Soriano, 1994; Lindahl et al., 1997).

### **5.1.2 RGS5 markiert die physiologische Angiogenese**

Im adulten Stadium sind physiologische Angiogeneseprozesse vorwiegend auf die Wundheilung oder die Follikelreifung und Corpus-Luteum-Bildung im Menstruationszyklus beschränkt. Wie gezeigt werden konnte, wurde RGS5 sowohl im Ovar als auch im Granulationsgewebe bei der Wundheilung exprimiert, wobei die Expression auch hier eng gefäßassoziiert war (Abbildung 10+11). RGS5 repräsentiert daher ein Tumorantigen, das auch in normalen Entwicklungsprozessen von Bedeutung ist. Diese Befunde sind konsistent mit Daten von B. St.Croix et al. Die Autoren hatten die Genexpressionsprofile von Gefäßzellen verglichen, die aus normalen bzw. malignen Kolontumoren isoliert worden waren. Dabei wurde eine Reihe von Genen identifiziert, die tumorspezifisch hoch bzw. herunter reguliert waren (St.Croix et al., 2000). Die Produkte vieler hoch regulierter Gene waren bekannte Angiogenesemarker und involviert in Gefäßneubildung, Gefäßumbau und der Bildung von extrazellulärer Matrix. Des Weiteren wurde demonstriert, dass fast alle der tumorgefäßspezifischen

Gene, ebenso wie RGS5, im Granulationsgewebe und im Corpus Luteum exprimiert wurden. Diese und unsere Daten unterstützen eine der ältesten Hypothesen der Krebsforschung, nach der Tumoren nicht heilende Wunden darstellen (Dvorak, 1986). Wundheilung und Tumorgenese weisen eine Reihe von Parallelen auf. So scheinen die Mechanismen der Bildung von Tumorstroma und Granulationsgewebe sehr ähnlich zu sein, wobei von Tumorzellen, Makrophagen oder Keratinozyten produziertes VEGF-A eine Schlüsselfunktion einnimmt (Gillitzer und Goebeler, 2001; Dvorak, 2003)<sup>13</sup>. Im Unterschied zur Wundheilung wird im Tumor die Bildung von VEGF-A nicht eingestellt, so dass Tumoren „niemals“ heilen. Stattdessen lösen viele Tumoren eine desmoplastische Reaktion<sup>14</sup> aus, in deren Folge ein sie umgebendes fibröses Netzwerk entsteht (Dvorak, 2003; Singer und Clark, 1999). Die Expression von RGS5 verläuft daher wohl parallel mit der Induktion der Angiogenese und der Einwanderung von Endothelien in das Wundstroma und verschwindet nach der Elimination der Gefäße bei der Vernarbung. Durch die nahe Verwandtschaft von Wundheilung und Tumorgenese ist nicht verwunderlich, dass RGS5 in beiden Prozessen spezifisch hochreguliert wird. In ähnlicher Weise erfolgt auch im Ovar ein extensiver Aufbau und Abbau von Gefäßen. Hier nimmt während des Follikelwachstums die Gefäßdichte um den Follikel infolge VEGF-induzierter Angiogenese zu (Abbildung 10). Nach der Ovulation und der Follikelfreisetzung ist die nachfolgende Bildung des Corpus Luteums ebenfalls mit massiver Angiogenese verbunden (Neeman et al., 1997). Auch in diesem Prozess konnte die Expression von RGS5 hier klar demonstriert werden.

---

<sup>13</sup> Die Stromabildung ist in beiden Prozessen gekennzeichnet durch eine VEGF-A-vermittelte erhöhte Gefäßdurchlässigkeit für Plasma und Plasmaproteine. Eine Reihe von Plasmaproteinen, unter anderem Fibrinogen und Gerinnungsfaktoren, können dadurch aus den Blutgefäßen austreten. Die Gerinnungskaskade wird aktiviert und letztendlich gerinnt Fibrinogen zu Fibrin, das im Gewebe angesammelt und quervernetzt wird. Durch Einlagerung von Wasser entsteht eine gelartige Fibrinmatrix, die als provisorisches Stroma für einwandernde Endothelzellen, Fibroblasten und inflammatorische Zellen dient. In beiden Prozessen sind die neugebildeten Mikrogefäße schon früh von Perizyten umschlossen (Ruiter et al., 1993). Im Verlauf der Wundheilung nimmt allerdings die VEGF-A-Expression ab und die Gefäßpermeabilität normalisiert sich. Ebenso verlagert sich das Gleichgewicht von Fibrinablagerung zu Fibrinolyse, die durch das Plasmaprotein Plasminogen bzw. Plasmin bewirkt wird. Das provisorische Fibrinstroma wird nach und nach durch eine von Fibroblasten gebildete Kollagenmatrix ausgetauscht. Schließlich wird die Kollagensynthese eingestellt und das fibroblastenreiche Granulationsgewebe durch eine azelluläre Cicatrix (Narbe) ersetzt, wobei Blutgefäßzellen und andere Zellen des Granulationsgewebes durch Apoptose sterben.

<sup>14</sup> Desmoplastie (griech.: desmos + plassein: eine Fessel/Band bilden) bezeichnet das starke Wachstum von fibrösem Gewebe oder Bindegewebe.

## 5.2 STUDIEN ZUR LOKALISATION UND STABILITÄT VON RGS5

### 5.2.1 Subzelluläre Lokalisierung von RGS5

Um Aufschluss über die Funktion von RGS5 zu erhalten, wurde die subzelluläre Lokalisation von His- oder Myc-markierten RGS5-Fusionsproteinen nach Überexpression in Säugerzellen bestimmt. Sowohl in cos7- als auch in 293T-Zellen war die Lokalisation von RGS5 hauptsächlich zytoplasmatisch. Eine ähnliche Verteilung ergab sich für die RGS5-regulierte G-Protein-Untereinheit  $G\alpha_{i3}$ . Zu Beginn dieser Promotionsarbeit lagen keine Daten über die subzelluläre Verteilung von RGS5 vor. Inzwischen zeigten jedoch Liang et al. und Zhou et al. unabhängig voneinander mittels differentieller Zentrifugation, dass humanes RGS5 nach Überexpression in HEK293-Zellen in Membran- und zytosolischen Fraktionen enthalten war (Liang et al., 2005; Zhou et al., 2001).

Die regulatorische Funktion von RGS-Molekülen auf membrangebundene, rezeptorassoziierte  $G\alpha$ -Untereinheiten impliziert, dass RGS-Moleküle ebenso in oder an der Membran lokalisiert sein müssen. Unsere Ergebnisse ließen jedoch keine signifikante Membranassoziation von RGS5 erkennen. Vermutlich kann RGS5 jedoch durch geeignete Stimuli an die Membran rekrutiert werden. Es wurde bereits für andere RGS-Moleküle belegt, dass die Translokation durch eine Reihe von Faktoren, wie der Bindung an Rezeptoren (Roy et al., 2005), G-Proteine (Roy et al., 2005) oder akzessorische Proteine (Popov et al., 2000; Ward und Milligan, 2005; Niu et al., 2002; Benzing et al., 2000; Zheng et al., 2000), sowie Phosphorylierung (Burgon et al., 2001) oder Palmitoylierung (Tu et al., 1999; Hiol et al., 2003), beeinflusst wird. Beispielsweise wurde RGS2 in Gegenwart von kotransfiziertem Gs, Gq, dem Angiotensin-II-Rezeptor 1A ( $AT_{1A}R$ ), dem  $\beta_2$ -adrenergen ( $\beta_2AR$ ) oder  $\alpha_{1A}$ -adrenergen Rezeptor ( $\alpha_{1A}R$ ) zur Membran rekrutiert. Die Membranlokalisation wurde dabei durch eine direkte Interaktion induziert und erfolgte spezifisch durch Signalwegskomponenten (G-Proteine und Rezeptoren), deren Signalweg durch RGS2 reguliert wird (Hague et al., 2005; Roy et al., 2005; Roy et al., 2003). Aus diesem Grund wurde RGS4, das eine abweichende Rezeptorselektivität aufweist, durch eine andere Palette von Molekülen zur Membran rekrutiert (Roy et al., 2003). Welche Rezeptoren *in vivo* spezifisch von RGS5 reguliert werden, war zum Zeitpunkt der Durchführung der Lokalisationsstudien nicht bekannt. In Transfektionssystemen inhibiert RGS5 die Signalgebung über exogene  $AT_{1A}$ - und  $ET_A$ -Rezeptoren (Zhou et al., 2001) oder über endogene PDGF-B-Rezeptoren (PDGFR $\beta$ ) (Cho et al., 2003). Möglicherweise wird RGS5, wie RGS2, durch  $AT_{1A}R$  bzw.  $ET_A$ R oder PDGFR $\beta$  rekrutiert; die Koexpression von RGS5 und einem der vorgenannten Rezeptoren wurde bisher nicht überprüft.

Vermutlich ist die in dieser Arbeit gezeigte, primär zytoplasmatische Lokalisation von RGS5 *in vivo* nicht in gleichem Maß realisiert. Die Expression der RGS5-Fusionsproteine war nicht unter der Kontrolle des endogenen Promotors, sondern wurde durch einen CMV-Promotor gesteuert. Dies bewirkt eine starke, unphysiologische Überproduktion von RGS5. Die Situation *in vivo* wird daher

unter Umständen nicht korrekt abgebildet. Kann beispielsweise nur ein Teil der exprimierten Moleküle an der Membran binden, sind zwangsläufig alle anderen Moleküle im Zytoplasma lokalisiert. So zeigten Kruminis et al., dass überexprimiertes RGS4 hauptsächlich zytosolisch, endogenes RGS4 jedoch membranständig war (Kruminis et al., 2004). Die Lokalisation von endogenem RGS5 war nicht möglich, da die in unserem Labor hergestellten monoklonalen Anti-RGS5-Antikörper nicht reaktiv auf C2C12-Myoblasten oder A10-Zellen waren, die RGS5 endogen exprimieren (nicht gezeigt).

### **5.2.2 Die Bestimmung von endogenem RGS5**

Endogenes RGS5 konnte auch in Organextrakten weder im Western Blot noch durch Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Allerdings detektierten die von uns generierten Antikörper zweifelsfrei überexprimiertes oder rekombinantes RGS5-Protein, unabhängig vom Zellsystem (Sf9-Insektenzellen, Hefe, E. coli, Säugerzelllinien wie cos7, 293T, IMCD3, Hela – teilweise nicht gezeigt). Wir konnten aufzeigen, dass eine Bestimmung von endogenem RGS5 durch seine geringe Stabilität und die niedrige Expressionshöhe dieses Proteines erschwert wird.

#### A. Die Stabilität von RGS5:

Die präzise Koordination von Synthese- und Degradationsrate ermöglicht eine schnelle Anpassung an eine wechselnde Mikroumgebung und stellt einen wichtigen Regulationsmechanismus in der Zelle dar. Andere Gruppen zeigten bereits, dass die Stabilität einiger RGS-Moleküle aktiv reguliert wird, beispielsweise durch posttranslationale Modifikation (Hollinger und Hepler, 2002; Derrien et al., 2003). So wurde RGS7 durch Phosphorylierung nach Endotoxin-Exposition stabilisiert, wahrscheinlich aufgrund der Bindung akzessorischer Proteine (Benzing et al., 1999; Garrison et al., 1999). Neben der nichtselektiven lysosomalen Degradation besitzen Eukaryonten ein ATP-abhängiges, zytosolisches Abbausystem. Das 26S-Proteasom degradiert spezifisch mit Ubiquitin zum Abbau markierte Proteine, wobei die Halbwertszeit des Proteins nach der „N-End“-Regel durch die Identität der N-terminalen Aminosäure bestimmt wird (siehe 4.2.3). In dieser Dissertationsarbeit wurde demonstriert, dass RGS5 *in vivo* sehr instabil war. Der Abbau konnte jedoch mit „Typ-1“-Inhibitoren des N-Recognins, einer Komponente des N-End-Weges, oder durch Inhibition des Proteasoms blockiert bzw. verzögert werden. Da der Abbau von RGS5 durch den Typ-1-Inhibitor Arg-β-Ala inhibiert wurde, schien der Abbau N-Recognin-vermittelt und von einer Cys-Arginylierung abhängig zu sein. Damit war die Stabilität von RGS5 in der Hauptsache durch den Abbau über den N-End-Weg bestimmt. Die Beteiligung des Proteasoms untermauerte diese Annahme. Weiterhin war RGS5 durch eine Deletion der Aminosäuren 1-30 oder durch N-terminale Myc-Markierung gleichermaßen vor Degradation geschützt, da die Abbausignale („Degrons“) entfernt bzw. verdeckt wurden. Die Halbwertszeit von überexprimiertem und vermutlich auch endogenem RGS5 betrug

weniger als 2 h. Diese Daten sind im Einklang mit dem Befund, dass RGS4 und RGS16 ebenso über den N-End-Weges abgebaut werden (Davydov und Varshavsky, 2000).

Eine außerordentlich interessante Entdeckung im Hinblick auf die biologische Signifikanz des N-End-Weges machten A. Varshavsky und Mitarbeiter: Sie zeigten, dass die Cys-Arginylierung im N-End-Weg (siehe Box 1, Abschnitt 4.2.3) durch R-Transferasen essentiell für die kardiovaskuläre Entwicklung ist (Kwon et al., 2002). R-Transferase-defiziente Maus-Embryonen starben, da die Entwicklung des Herzens und der angiogenesebetriebene Umbau des Gefäßsystems gestört war. Damit wurde erstmals die Bedeutung dieses Abbauweges in der Angiogenese demonstriert. Cysteine mussten, um als Substrat der Arginylierung zu dienen, zuvor oxidiert werden. Bei O<sub>2</sub>-Knappheit würde daher der Abbau dieser N-End-Substrate unterbunden, so dass die Arginylierung gewissermaßen eine O<sub>2</sub>-Sensorfunktion einnimmt. Ein weiteres Beispiel bekräftigt den Bezug zur Angiogenese: Der Hypoxie-induzierte Faktor HIF1 $\alpha$ , selbst angiogenesefördernd und sehr kurzlebig, wurde durch einen analogen Prozess an einem primär destabilisierenden Prolin-Rest oxidiert und proteasomal abgebaut (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Der oxidative Abbau könnte somit generell in der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielen, zumal das in der Angiogenese induzierte RGS5, gleichsam wie RGS4 und RGS16, ein Substrat dieses Abbauweges ist. Vielleicht laufen Transkriptionsinduktion und Abbaustopp von HIF1 $\alpha$  und RGS5 unter hypoxischen Bedingungen *in vivo* Hand in Hand und ermöglichen so eine schnelle Adaptation an die veränderte Umgebung.

#### B. Die niedrige endogene Expression von RGS5:

Nahezu alle Studien zur Lokalisation von kleinen RGS-Molekülen wurden mit überexprimierten, markierten RGS-Molekülen durchgeführt, um die niedrige endogene Expression zu überwinden (Krumins et al., 2004). In zahlreichen Berichten wurden RGS-mRNA-Transkripte (unter anderem auch von RGS5) durch In-situ-Hybridisierung in Geweben, Northern Blot oder RT-PCR detektiert (Gold et al., 1997; Cho et al., 2003; Bondjers et al., 2003; Furuya et al., 2004; Chen et al., 2004; Li et al., 2004). Lediglich ein einziger, kürzlich veröffentlichter Report zeigt die endogene Expression von RGS5 auf Proteinebene (Jean-Baptiste et al., 2005). Von uns hergestellte Organextrakte aus Herz, Pankreas und RT5-Tumor jeweils aus RGS5<sup>+/+</sup> und RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren, sowie RGS5-transfizierte 293T-Zellen, wurden von Mitarbeitern dieser Arbeitsgruppe (Dr. M. Greenwood, McGill University, Montreal, Kanada) freundlicherweise im Western Blot analysiert. Im Gegensatz zu den publizierten Daten (Jean-Baptiste et al., 2005) war in keinem unserer Extrakte ein RGS5-Signal nachweisbar (überexprimiertes His:RGS5 wurde detektiert; Daten nicht gezeigt). Entweder ist die Konzentration an RGS5-Protein im Herz der Ratte sehr viel höher als in der Maus, oder der von Jean-Baptiste et al. verwendete Antikörper war kreuzreaktiv. Von den Schwierigkeiten bei der Detektion von endogenem RGS-Protein zeugen Reporte mehrerer Gruppen (Hollinger und Hepler, 2002; Holliger et al., 2001;

Krumins et al., 2004). RGS-Antiseren konnten in vielen Fällen rekombinante Proteine, nicht aber native RGS-Proteine in Zellen detektieren (Hollinger und Hepler, 2002). So war RGS14 mRNA im Cerebellum hoch exprimiert, in Lysaten jedoch nicht mit einem spezifischen Antikörper detektierbar. Zusammengenommen lassen unsere Daten und die anderer Gruppen vermuten, dass RGS5 nicht nur sehr instabil ist, sondern zusätzlich in äußerst geringen Mengen in der Zelle exprimiert wird. Wahrscheinlich ist diese Kombination für eine stringente metabolische Kontrolle unabdingbar.

### 5.3 IDENTIFIZIERUNG VON RGS5-INTERAKTIONSPARTNERN

#### 5.3.1 Die Spezifität von RGS-Molekülen

Nahezu alle biologischen Prozesse sind von dem koordinierten, meist höchst komplexen Zusammenspiel von Proteinkomponenten abhängig. Neue Bindungspartner zu identifizieren und das übergeordnete Signalnetzwerk zu definieren, in welches die Interaktion integriert ist, sind wesentliche Schritte, um die Funktion unbekannter Proteine verstehen zu können. Die GTPase-Aktivität von RGS5 ist weithin aufgeklärt, die physiologische Funktion und die Rezeptorspezifität sind jedoch unbekannt. Die Spezifität eines RGS-Moleküls ist nicht allein durch den  $G\alpha$ -Isotyp, mit welchem es interagiert, festgelegt, sondern wird durch die Komponenten des Komplexes bestimmt. Neuere Befunde haben ergeben, dass RGS-Proteine direkt mit G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) interagieren können (Hague et al., 2005; Roy et al., 2005). Dies legt nahe, dass die große Zahl unterschiedlicher RGS-Moleküle darin begründet ist, dass RGS-Proteine vielmehr spezifische Rezeptorkomplexe ansteuern und modulieren (Sierra et al., 2000; Hollinger und Hepler, 2003). Zur Aufklärung der Spezifität von RGS5 wurden Interaktionspartner mit Hilfe des Yeast-2-Hybrid Systems gesucht.

Unter Verwendung dieses Verfahrens konnte eine Reihe potentiell physiologisch relevanter RGS5-Bindungspartner entdeckt werden. Bei der nachfolgenden biochemischen Analyse richtete sich das Hauptaugenmerk auf zwei Proteine, UCK und AC3, da beide Enzyme mehrfach im 2-Hybridscreening als Bindungspartner isoliert worden waren. Zudem wiesen sie Parallelen mit dem bekannten RGS5-Bindungspartner  $G\alpha$  auf, da ihre Aktivität durch Nukleotide bestimmt wird (4.3.3). Aufgrund der Tatsache, dass RGS5 an der Nukleotidumsetzung im GTP-gebundenen  $G\alpha$  eingreift, erschien eine Beteiligung von RGS5 an der Umsetzung von ATP (im AC3) bzw. UMP/CMP (in der UCK) plausibel. Jedoch konnte eine Interaktion von Prey und RGS5 in unterschiedlichen Immunpräzipitationssystemen nicht bestätigt werden. Zur Kontrolle der verwendeten Systeme war die Interaktion von p53 und SV40-Tag zunächst im 2-Hybridssystem (4.3.1) und anschließend in der Koimmunpräzipitation (4.3.2) erfolgreich demonstriert worden. Außerdem war die Stringenz hinsichtlich der Selektion positiver Klone bei dem hier gewählten 2-Hybrid-Verfahren (Matchmaker™) relativ hoch, da gleichzeitig drei voneinander unabhängige Reportergene aktiviert

werden mussten. Vor diesem Hintergrund war es daher wahrscheinlich, dass produktive Interaktionen detektiert werden würden, die nicht aus einer unspezifischen Aktivierung der Reportergene resultierten.

### 5.3.2 Stärken und Schwächen verschiedener Protein-Interaktionssysteme

Im Hinblick auf über 4 Millionen cDNA-Konstrukte, die auf ihre mögliche Bindung mit RGS5 überprüft wurden, erschien die geringe Zahl von 16 potentiellen Bindungspartnern durchaus realistisch. Die widersprüchlichen Ergebnisse aus 2-Hybridscreening und Immunpräzipitation werden im folgenden analysiert. Das **2-Hybrid System** ermöglicht die Detektion schwacher Protein-Interaktionen. Eine quantitative Aussage über die Sensitivität für das in dieser Arbeit verwendete System ist nur bedingt möglich. Bezogen auf die Affinität, dürften jedoch Protein-Interaktionen mit Dissoziationskonstanten im Mikromolarbereich bestimmbar sein (Yang et al., 1995; Durfee et al., 1993; Landgraf et al., 2004).

Ein wichtiger Vorteil dieses Verfahrens ist die Möglichkeit, transiente Interaktionen detektieren zu können (Estojak et al., 1995). Ebenso sind in dem 2-Hybridssystem Interaktionen von schwach exprimierten Proteinen zugänglich, sofern die Reporterexpression für das Wachstum der Hefekolonie ausreicht. Gleiches gilt für einen geringen Anteil miteinander interagierender Moleküle. Der Grund für die hohe Sensitivität des Systems ist vermutlich der Verstärkungseffekt nach produktiver Interaktion und Transkriptionsaktivierung. Selbst bei transienter Interaktion oder niedriger Interaktionsrate können mehrere Zyklen aus Transkription und Translation durchlaufen werden, wobei stabile Reporterproteine produziert werden (Yang et al., 1995). Ebenso sind auch indirekte/induzierte Interaktionen im Hefe-System messbar. Eine Protein-Interaktion kann von einer Änderung der Konformation bzw. des „Molekülzustands“ abhängig sein. Dies kann durch die Bindung eines (oder mehrerer) zusätzlicher Komponenten erreicht werden. Beispiele sind die substratinduzierte Konformationsänderung von Enzymen, die Aktivierung nach Rezeptorstimulierung und/oder die Modifikation durch Tyrosin-Phosphorylierung, die zur Rekrutierung weiterer Interaktionspartner führt. Das Hefe-System besitzt den Vorteil, dass Interaktionen *in vivo* detektiert werden, wobei weitere für eine spezifische Bindung notwendige Faktoren „rekrutiert“ werden können. Die **Koimmunpräzipitation** ist verglichen mit dem Yeast-2-Hybrid System grundsätzlich weniger empfindlich (Landgraf et al., 2004; Li und Fields, 1993; Phizicky und Fields 1995; Van Aelst et al., 1993). Transiente Protein-Interaktionen sind meist nur indirekt oder gar nicht nachweisbar. Schwierig ist generell der Nachweis von Interaktionen bei geringem Anteil interagierender Moleküle oder niedriger Expressionshöhe der Bindungspartner. Indirekte Interaktionen sind zudem nur dann zugänglich, sofern die am Komplex beteiligten Proteine in genügender Menge vorhanden sind. Da in der Regel die Komponenten des Interaktionskomplexes nicht bekannt sind, ist auch die *in vitro* Rekonstitution mit Hilfe rekombinanter (oder *in vitro* exprimierter) Proteine fast unmöglich.

Zahlreiche Beispiele belegen die Problematik der biochemischen Verifizierung von Protein-Interaktionen, die im Yeast-2-Hybrid-Verfahren zuvor entdeckt worden waren. Van Aelst et al. demonstrierten erstmals die Interaktion der Raf-Kinase mit dem kleinen G-Protein Ras mittels 2-Hybridverfahren<sup>15</sup>, scheiterten aber bei dem Versuch, beide Proteine aus überexprimierenden Zellen kopräzipitieren. Sie schlossen daraus, dass der Nachweis einer physischen Bindung an Ras schwierig, jedoch durch das 2-Hybridsystem möglich sei (Van Aelst et al., 1993). In einer anderen Studie wurde die Interaktion von humanem p53 mit verschiedenen SV40-Tag-Punktmutanten untersucht, wobei die Mutation die Affinität zu p53 erniedrigte. Im 2-Hybridsystem wurde die Bindung aller drei SV40-Tag-Mutanten an p53 nachgewiesen. Keine der Interaktionen konnte jedoch durch Koimmunpräzipitation bestätigt werden. Die Autoren schlossen auch hier, dass 2-Hybridverfahren im Gegensatz zu Koimmunpräzipitationen den Nachweis schwacher oder transienter Interaktion ermöglichen (Li und Fields, 1993).

### 5.3.3 Warum war die Detektion nicht möglich?

In dieser Arbeit wurde die Kopräzipitation von p53 mit SV40-Tag, sowie von RGS5 mit  $G\alpha i3:AlF_4^-$ , gezeigt. Die Dissoziationskonstante für p53:Tag war in der Literatur mit 5,3 nM beziffert; die Bindung ist somit sehr stark (Kuhn et al., 1999). Für RGS5 und  $G\alpha i3:AlF_4^-$  waren keine  $K_D$ -Werte publiziert, jedoch für die homologen Bindungspaare RGS4 oder RGS10 und  $G\alpha i1:AlF_4^-$ . Die  $K_D$ -Werte lagen um 0,6 nM (Popov et al., 1997) und dürften für RGS5 daher ähnlich sein. Diese Interaktionen sind demnach hochaffin und so ist es nicht verwunderlich, dass diese auch durch Koimmunpräzipitation zugänglich waren.

Es ist denkbar, dass einige der im 2-Hybrid-Screening isolierten Preys zumindest in Hefezellen eine wirkliche Bindung mit RGS5 eingehen, die aber unter Umständen instabil oder nur kurzlebig ist. Bei einigen anderen der Prey-Kandidaten könnte die fehlende Detektion auch durch einen gemessen am Gesamtpool der beiden Bindungspartner geringen Anteil interagierender Moleküle begründet sein. Die Expression aller Preys war in den hier durchgeführten Immunpräzipitationen in Säugerzellen tendenziell niedrig, so dass Prey-Proteine in mehreren Fällen nicht im Gesamtzelllysat nachweisbar waren (4.3.3, Abbildung 24 a - HRP). Bindet nur ein Bruchteil der exprimierten Moleküle X an den Interaktionspartner Y, dann ist der Nachweis der Interaktion X:Y nur bei entsprechend hoher Expression des Proteins X möglich. Aus diesem Grund waren rekombinante Proteine hergestellt und in Koimmunpräzipitationen verwendet worden. Dies wurde bisher nur für AC3 und UCK durchgeführt, ohne Bestätigung einer Interaktion. Gegenwärtig wird untersucht, ob eines der anderen Prey-Proteine an RGS5 bindet. Bei allen erwähnten Fällen ist die Koimmunpräzipitation dem 2-Hybridverfahren mit hoher Wahrscheinlichkeit unterlegen. Roy et al. zeigten dass 1% des in

<sup>15</sup> Die Interaktion der Onkoproteine Ras (Ha-Ras) und Raf ist mittlerweile eindeutig belegt (Janeway et al., 2005; Geyer et al., 1996)

HEK293 Zellen überexprimierten AC2 an matrixgebundenes RGS2 bindet. Die Autoren folgerten, dass die schwachen Interaktionen von RGS2 und der Adenylatzyklase vermutlich auf eine niedrige Affinität oder die Abwesenheit von komplexstabilisierenden Proteinen zurückzuführen ist (Roy et al., 2005). Neben schwacher oder transientser Assoziation, niedriger Expression und partieller Interaktion verbleiben als fünfte und sechste Möglichkeit die indirekte bzw. induzierte Bindung von Bait und Prey.

#### Die indirekte oder induzierte Interaktion. Adenylatzyklasen.

Bei der indirekten/induzierten Interaktion wird die Bindung entweder durch eine Brückenkomponente vermittelt oder durch Bindung einer dritten Komponente induziert. Im Rahmen dieser Arbeit war der Einfluss von kotransfiziertem  $G\alpha i3$  auf die Interaktion von RGS5 mit AC3 oder UCK untersucht worden; eine Interaktion war jedoch nicht messbar. Roy et al. hingegen kotransfizierten AC3, RGS2 und Gs (den AC-stimulierenden  $G\alpha$ -Isotyp) und bestimmten die Interaktion durch BRET<sup>16</sup>. Erstaunlicherweise war eine Bindung von RGS2 an Adenylatzyklase 3 nachweisbar, allerdings ausschließlich in Gegenwart von Gs. Neben AC2 konnte ebenso AC6 an RGS2 binden (Roy et al., 2005). Aufgrund hoher Homologie zwischen RGS2 und RGS5 (45% Sequenzidentität; Abbildung 14) suggerieren diese Ergebnisse, dass auch AC3 und RGS5 eine schwache Bindung eingehen könnten, die durch stimulatorisches Gs vermittelt würde. Die Interaktion sollte daher mit sensitiveren Methoden, wie der BRET-Analyse (eventuell in Verbindung mit einem Kompetitionsassay (Roy et al., 2005)) oder der Oberflächenresonanz (SPR/BIAcore) in Anwesenheit von Gs erneut überprüft werden. Ein weiteres Beispiel für indirekte/induzierte Interaktionen ist die Bindung des  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptors ( $\beta_2AR$ ) an RGS2. Ein BRET-Signal ist nur dann detektierbar, wenn Gs oder die Adenylatzyklase zugegen ist (Roy et al., 2005; Ko et al., 2001). Vermutlich sind innerhalb dieses Signaltransduktionskomplexes Rezeptor,  $G\alpha$ , RGS und Adenylatzyklasen durch eine Serie von schwachen, zum Teil konkurrierenden Interaktionen miteinander verbunden (Buck und Iyengar, 2003).

Mehr und mehr Daten weisen darauf hin, dass RGS-Moleküle neben G-Proteinen viele Komponenten des Rezeptorkomplexes binden. So interagierte RGS2 direkt mit verschiedenen GPCRs ( $\beta_2AR$  (Roy et al., 2005),  $\alpha_{1A}AR$  (Hague et al., 2005), muscarinischen M1/M3/M5-Acetylcholin Rezeptoren (Bernstein et al., 2004)), Adaptormolekülen (Spinophilin (Wang et al., 2005)) und Effektoren (AC (Salim et al., 2003)). Dies zeigt, dass die Interaktionen von RGS-Molekülen mit ihren Bindungspartnern komplex sind und von vielen Faktoren beeinflusst werden. Das in Raum und Zeit

---

<sup>16</sup> Die BRET (*Bioluminescence Resonance Energy Transfer*)-Methode ermöglicht die Detektion einer Interaktion zweier Proteine, wobei eines der Bindungspartner als Luciferase-Fusionsprotein, das andere als GFP-Fusionsprotein z.B. in HEK293 Zellen exprimiert wird. BRET findet dann statt, wenn der Abstand zwischen Resonanzenergiedonor (Luciferase) und -akzeptor (GFP) 100 Å unterschreitet. Dies deutet auf eine direkte Interaktion zweier Proteine hin (Kenworthy und Edidin, 1998; Mercier et al., 2002)

koordinierte Zusammenspiel einer Vielzahl von Komponenten scheint daher entscheidend für das Zustandekommen von Interaktionen zu sein.

#### **5.3.4 Reale und nichtreale Bindungspartner**

In dieser Arbeit wurden mit Hilfe des Yeast-2-Hybrid-Systems verschiedene potentielle Interaktionspartner von RGS5 identifiziert. Die Bindung dieser Preys mit RGS5 scheint jedoch transient, sehr schwach oder partiell zu sein. Gleichfalls ist es wahrscheinlich, dass induzierte oder indirekte Interaktionen bei einigen Preys eine Rolle spielen. Vermutlich sind nicht alle isolierten Preys reale Bindungspartner. Transkriptionsfaktoren werden häufig, aber fälschlicherweise, als Preys in 2-Hybridscreenings isoliert. Diese „falsch positiven“ Preys (Engl.: *false positives*) können die Reporterexpression ohne Beteiligung des Baits aufgrund eigener Transaktivatoraktivität induzieren. Andere falsch positiven Interaktionen sind auf unphysiologische/veränderte Konformation der Bait- und Prey-Proteine zurückzuführen. So wird ein Großteil der Prey-Proteine (bedingt durch die Art der Generierung der Prey cDNA-Bank) nicht in voller Länge exprimiert. Dies kann dazu führen, dass Sequenzabschnitte für Bindungspartner zugänglich werden, die unter physiologischen Umständen niemals exponiert wären. Auch die GAL4-Domänen können die Interaktion beeinflussen. Weiterhin sind in Hefe stattfindende Interaktionen nicht notwendigerweise auch auf höhere Organismen übertragbar. Proteine, die artifiziell im Hefenuklear aneinander binden, können im Säuger in vollkommen verschiedenen Kompartimenten, Zelltypen oder Geweben exprimiert sein, so dass ein Aufeinandertreffen physiologisch unmöglich wäre. Dass die beschriebenen Preys in einem RGS5-positiven Zelltyp, den Tumorperizyten, exprimiert werden, konnte allerdings hier demonstriert werden.

## 5.4 DIE RGS5-KNOCK-OUT-MAUS

### 5.4.1 Die RGS5-Defizienz verursacht Gefäßanomalien

In RGS5-KO-Tieren war die Wundschließung verlangsamt. Vermutlich hängt dies mit einer unzureichenden Durchblutung des Wundstromas aufgrund einer verzögerten Einwanderung von Gefäßzellen in das Granulationsgewebe zusammen. Wie zuvor besprochen, scheint RGS5 an der Regulierung von Migrationsprozessen über PDGF-BB beteiligt zu sein, da der Rezeptor *in vitro* durch RGS5 gehemmt wird (Cho et al., 2003). PDGF-BB induziert zugleich die Migration von PZ/SMC und deren Proliferation (Hellstrom et al., 1999). Der Wegfall der PDGFR $\beta$ -Inhibition in RGS5-KO-Mäusen könnte eine Hypersensitivität gegenüber PDGF-BB bewirken und dadurch eine gestörte Migration/Proliferation von PZ/SMC zur Folge haben. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass die transgene *Überexpression* von PDGF-BB infolge einer Hyperproliferation zu Gefäßdefekten führt (Armulik et al., 2005; Forsberg-Nilsson et al., 2003). Möglicherweise geht die verzögerte Wundheilung auf eine gestörte PDGF-Regulation in RGS5-KO-Tieren zurück. In der normalerweise hoch vaskularisierten Plazenta führt die Abwesenheit von RGS5 ebenso zu bisher noch nicht näher definierten Defekten. Diese sind möglicherweise der Grund für eine embryonale Unterversorgung und das Absterben einiger Embryonen. Dies manifestiert sich in einer niedrigeren Wurfgröße und einer erhöhten postnatalen Sterblichkeit der RGS5-KO-Tiere. Die Mechanismen, die diese hohe prä- und postnatale Sterblichkeit bedingen, sind bisher ungeklärt und werden zur Zeit untersucht. In jedem Fall liegen den Veränderungen sicherlich, ebenso wie in der Wundheilung, Gefäßanomalien zu Grunde. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass Defekte in der Blut-Hirn-Schranke bei apoplexieanfälligen Ratten mit einer niedrigen RGS5-Expression in Zusammenhang gebracht wurden (Kirsch et al., 2001).

Im Pankreas von RT5xRGS5<sup>-/-</sup>-Tieren war die Blutversorgung offensichtlich ausreichend für die Ausbildung solider Tumoren. Die Gefäßmorphologie in RGS5-defizienten RT5-Tumoren unterschied sich jedoch von jener in RGS5-positiven Tumoren. Die Gefäße bildeten ein dichtes Netzwerk und ähnelten normalen Mikrogefäßen oder „normalisierten Gefäßen“. Der Verlust eines einzigen Gens – RGS5 – hatte demnach eine beträchtliche Konsequenz auf die Struktur der Tumorgefäße. Die molekularen Grundlagen der Gefäßnormalisierung sind bisher noch ungeklärt. In neuen Antiangiogenesetherapieansätzen ist die Normalisierung der Gefäße jedoch ein wesentliches „Zwischenziel“, um die Penetration von Arzneien in den Tumor zu optimieren (Jain, 2005). Die Aufklärung der beteiligten Signalwege ist daher für die Entwicklung neuer Therapien außerordentlich wichtig. Im Normalisierungsprozess werden unreife Gefäße „zurückgeschnitten“, so dass schließlich ein reiferes Gefäßnetzwerk zurückbleibt. Die tumortypische Löchrigkeit der Gefäße („leakiness“) für Makromoleküle ist in normalisierten Gefäßen geringer. Trotzdem ist die Penetration insgesamt erhöht, da der Blutfluss im Tumor nahezu stillsteht (Tong et al., 2004). Möglicherweise sind normalisierte

Gefäße in RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren ebenso reifer<sup>17</sup>, zeigen infolgedessen eine bessere Gewebepenetration von Makromolekülen und sind vermutlich weniger löchrig, als RGS5-positive Tumorgefäße. Wir planen daher, die Durchlässigkeit der Gefäße für Makromoleküle mit Hilfe von Kontrastmitteln zu untersuchen. Da normalisierte Gefäße in behandelten RGS5-positiven Tumoren (Ganss et al., 2002) besser von T-Zellen infiltriert werden, könnten Tumorgefäße aus RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren gleichsam eine höhere Extravasation von T-Zellen aufweisen. Adoptive Zelltransfers werden in naher Zukunft zeigen, ob dies der Fall ist.

Die Tumorgefäße in RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren wiesen keine veränderte Perizytenrekrutierung zu den Gefäßen auf, wie durch Auszählung der Endothelzellen und Perizyten ermittelt wurde. Eine erhöhte Perizytenabundanz scheint daher zumindest im Tumor nicht wahrscheinlich. Möglicherweise trägt die vermehrte Anzahl an „blood lakes“ in RGS5<sup>-/-</sup>-Tumoren dazu bei, dass die Blutversorgung sichergestellt ist. Blood lakes stellen Hohlräume im Tumor dar, die Erythrozyten enthalten und von Tumorzellen, statt Endothelzellen, umgrenzt sind. Diese Einblutungen wurden in vielen Tumoren beobachtet und könnten, sofern sie eine Verbindung zum Endothelgefäßsystem schaffen, einen Parallelkreislauf im Tumor bilden („Gefäßmimikry“<sup>18</sup>). Wir stehen erst am Anfang bei der Aufklärung der Gefäßanomalien in RGS5-defizienten Mäusen. Die Befunde, dass RGS5-KO-Tiere Plazentadefekte, eine verzögerte Gefäßbildung im Granulationsgewebe, sowie untypische, normalisierte Tumorgefäße aufweisen, untermauern die offensichtlich wichtige Funktion von RGS5 für die Integrität des Gefäßsystems.

#### **5.4.2 RGS5 ist an der Blutdruckregulation beteiligt**

Der größte Teil des gesamten Strömungswiderstands im Kreislaufsystem entsteht in den kleineren Arterien, Arteriolen und Kapillaren, den so genannten Widerstandsgefäßen. Die großen Arterien (wie die Aorta) leisten nur einen geringen Beitrag zum Gesamtwiderstand. Der Druck in den großen Leitarterien (d.h. der arterielle Blutdruck) wird daher vor allem durch den Tonus (Spannungszustand) der Widerstandsgefäße, sowie durch das Herzschlagvolumen, bestimmt. Der Gefäßtonus ergibt sich aus der Kontraktion der vaskulären SMC, die Arterien und Arteriolen umgeben.

RGS5 wird in arteriellen SMC exprimiert (Li et al., 2004) und besitzt GAP-Aktivität für Gq (Cho et al., 2003). Da die Signalgebung der meisten Vasopressoren (u.a. PE, ATII, Endothelin) über Gq vermittelt wird, ist RGS5 an einer zentralen Position, die Konstriktion der Gefäße zu regulieren. Wir konnten zeigen, dass in RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren die Rückkehr des Blutdrucks auf Basalniveau nach einer

<sup>17</sup> Dies wäre konsistent mit unserem Befund, dass RGS5 unreife Tumorgefäße (bzw. Perizyten) kennzeichnet.

<sup>18</sup> Da Tumorzellen gewissermaßen die Funktion von Endothelzellen imitieren, wird dieser Prozess als „Gefäßmimikry“ (*vasculogenic mimicry*) bezeichnet (Hendrix et al., 2003; Maniotis et al., 1999).

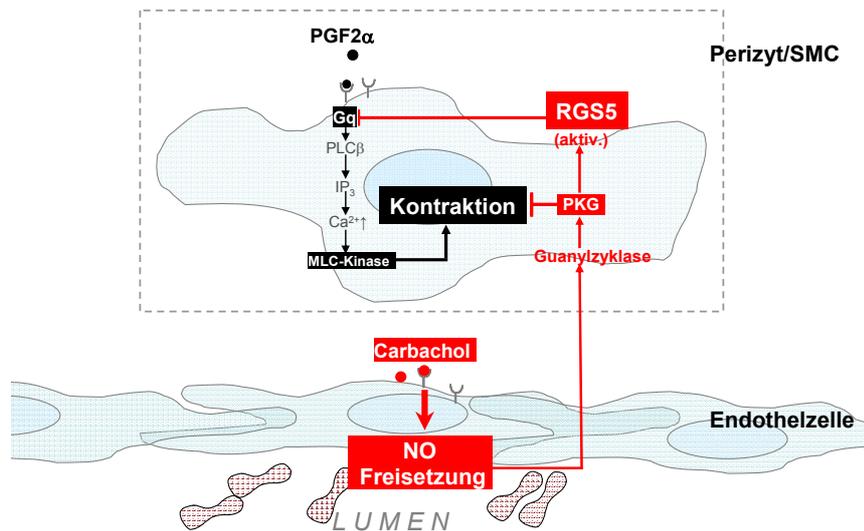
systemischen Vasopressorinjektion (PE oder ATII) ungleich länger dauerte, als in RGS5-positiven Kontrolltieren (Abbildung 31). Anders ausgedrückt ist die Dauer der Vasopressorantwort - und damit die Blutdruckerhöhung - in RGS5<sup>-/-</sup>-Mäusen verlängert. Da der arterielle Blutdruck den Kontraktionszustand der Widerstandsgefäße widerspiegelt, ist in Abwesenheit von RGS5 primär die Relaxation der Widerstandsgefäße verzögert. Unsere Daten legen folglich nahe, dass RGS5 die Relaxation der SMC fördert und eine Gefäßdilatation einleitet.

Die veränderte Vasopressorantwort in RGS5<sup>-/-</sup>-Mäusen lässt vermuten, dass der PE- bzw. ATII-Signalweg *in vivo* durch RGS5 modulierbar ist. In Bezug auf Angiotensin-II wird dies durch den Befund untermauert, dass RGS5 die Terminierung der AT<sub>1A</sub>-Signalgebung über ein Abschalten von G $\alpha$ -Untereinheiten beschleunigt (Cho et al., 2003; Wang et al., 2002; Zhou et al., 2001). Interessanterweise weisen auch RGS2-defiziente Mäuse eine gestörte Termination der AT<sub>1</sub>-Signalgebung auf, die unmittelbar auf eine mangelnde Inhibition von Gq zurückgeführt wurde (Heximer et al., 2003; Tang et al., 2003). Eine persistierende Stimulation von AT<sub>1</sub>-Rezeptoren bewirkte hier eine chronische Gefäßkonstriktion, die sich in einer ausgeprägten Hypertonie manifestierte (Heximer et al., 2003). Wahrscheinlich ist auch in RGS5-defizienten Tieren die Inaktivierung von Gq nach einer Stimulierung mit PE oder ATII verzögert, so dass eine länger andauernde Kontraktion von SMC resultiert.

Weiterhin wurde der Einfluss von RGS5 auf die *NO-vermittelte* Relaxation in isolierten Aortasegmenten („Ringen“) untersucht. Aortaringe aus RGS5-defizienten Tieren wiesen eine geringere Relaxation auf, als RGS5-positiv Kontrollgefäße (Abbildung 32). Auch hier gibt es Parallelen zur RGS2-Knock-out-Maus. Hier wurde der Nachweis erbracht, dass NO über cGMP indirekt die cGMP-abhängige Proteinkinase G-I (PKG1) aktiviert. Dies führte zu einer Phosphorylierung von RGS2 durch PKGI und resultierte in einer gesteigerten GAP-Aktivität des RGS2-Moleküls (Tang et al., 2003). Die reduzierte Relaxationsfähigkeit in RGS2<sup>-/-</sup>-Tieren wurde zuerst in Aortaringen festgestellt (Tang 2003) und kürzlich in isolierten, vaskulären SMC (aus Widerstandsgefäßen oder aus der Aorta) bestätigt (Sun et al., 2005). In Analogie zu RGS2 könnte der Aktivierungszustand von RGS5 in gleicher Weise durch NO-vermittelte Phosphorylierung gesteigert werden (Abbildung 33). Das zur Präkontraktion verwendete PGF<sub>2</sub> $\alpha$  bindet in der Aorta vorwiegend an Gq-gekoppelte Rezeptoren (persönliche Mitteilung, Z. Benyo). „Aktiviertes“ RGS5 würde Gq ungleich effizienter inhibieren als nichtaktiviertes RGS5 und könnte so eine rasche Terminierung der PGF<sub>2</sub> $\alpha$ -induzierten Kontraktion bewirken.

Eine Messung des basalen Blutdrucks in nichtanesthetisierten RGS5-KO-Tieren wurde bisher nicht vorgenommen, wird aber in Kürze durch Telemetrie erfolgen. Es ist ungewiss, ob der Verlust von RGS5 zur Entstehung einer Hypertonie ausreicht, oder ob möglicherweise neuronale oder hormonale

Mechanismen die RGS5-Defizienz kompensieren.<sup>19</sup> Eine Vielzahl von Berichten impliziert eine Rolle der Perizyten in der Regulation des mikrokapillären Blutstroms (Kawamura et al., 2004; Wu et al., 2003; Rhinehart et al., 2002; Martin et al., 2000). Möglicherweise ist die Expression von RGS5 in Perizyten (Abbildung 7) darin begründet, dass RGS5 hier, wie in vaskulären SMC, an der Kontrolle der Kontraktion beteiligt ist (Sims, 2000; Allt und Lawrenson, 2001).



**Abbildung 33: Modell der NO-vermittelten Relaxation von PZ/SMC unter RGS5-Beteiligung:** In Endothelzellen wird NO nach (Carbachol-)Stimulierung von Acetylcholinrezeptoren synthetisiert. NO gelangt in die glatten Muskelzellen (SMC), möglicherweise auch in PZ, und induziert dort zunächst die cGMP-Synthese durch die Guanylylzyklase. cGMP aktiviert seinerseits die Proteinkinase G (PKG), die über multiple, zum Teil ungeklärte Mechanismen (u.a. durch Hemmung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus intrazellulären Speichern (Wang et al., 1998; Sun et al., 2005; Yamamoto et al., 2001)) die Kontraktion hemmt. Nach Tang et al. steigert PKG die GTPase-Funktion von RGS2 und fördert so dessen relaxierende Wirkung nach einer Kontraktion (hier durch PGF2a). Wir vermuten, dass die NO-induzierte, RGS5-vermittelte Relaxation über denselben Signaltransduktionsweg verläuft.  $\dashv$ : Hemmung;  $\rightarrow$ : Stimulierung.

### 5.4.3 RGS5 - ein antihypertrophischer Faktor in den Gefäßen?

In dieser Arbeit wurde demonstriert, dass RGS5 in den Widerstandsgefäßen die Signaltermination über Rezeptoren für ATII und PE beschleunigt. ATII spielt eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer arteriellen Hypertrophie<sup>20</sup>, die z.B. schon durch eine ATII-Infusion induziert werden kann (Black et al., 1995; Geisterfer et al., 1988; Berk et al., 1989; Zhang et al., 2005). Fehlt RGS5, sind AT-II-Rezeptoren gewissermaßen nach einer Stimulierung hypersensitiv (Abbildung 31). Bei einer zu niedrigen RGS5-Expression könnte daher eine Gefäßhypertrophie resultieren. Weitere Indizien lassen vermuten, dass RGS5 die Proliferation von Gefäßmuskelzellen/Perizyten inhibiert und somit einer arteriellen Hypertrophie entgegenwirkt: (1) Alle Agonisten, die *in vitro* durch RGS5

<sup>19</sup> Denkbare Möglichkeiten des Ausgleiches wären ein Resetting des Baroreflexes (d.h. eine sympathische Veränderung des Ruhetonus) oder eine Erniedrigung der Wasser- und  $\text{Na}^+$ -Resorption in der Niere, die wiederum über das Renin-Angiotensin-System gesteuert wird. Eine verringerte Wasseraufnahme reduziert das Plasmavolumen und den venösen Rückstrom ins Herz. In der Folge sinken das Herzschlagvolumen und der arterielle Blutdruck (Lifton et al., 2001).

<sup>20</sup> Ähnlich der Situation im hypertrophierenden Herz reagieren auch Arterien bei einer erhöhten Belastung (Tension) mit der Verdickung der Gefäßwände durch proliferierende SMC.

inhibiert werden können, sind gleichzeitig SMC/PZ-Mitogene: ATII, ET-1 (Yamagishi et al., 1993), PDGF-BB (Hirschi et al., 1999; Hellstrom 1999). Generell fördern die meisten Vasokonstriktoren die Proliferation von vaskulären Muskelzellen, sind häufig Gq-gekoppelt und damit potentiell durch RGS5 inhibierbar. (2) In proliferierenden SMC innerhalb atherosklerotischer Plaques oder in der Neointima von künstlichen Gefäßbrücken<sup>21</sup> wird RGS5 herunter reguliert, nicht jedoch in „ruhenden“ SMC der angrenzenden Media (Li et al., 2004; Geary et al., 2002). (3) Auch RGS2-KO-Mäuse weisen eine vermehrte SMC-Proliferation u.a. in den Widerstandsgefäße in der Niere auf (Heximer et al., 2003). Mit Blick auf diese Befunde könnte die Hauptfunktion von RGS5 darin bestehen, das Wachstum der Stützzellen peripherer Gefäße (SMC/Perizyten) zu modulieren. Es wird interessant sein zu prüfen, ob RGS5<sup>-/-</sup>-Mäuse eine arterielle Hypertrophie entwickeln. Wie auch RGS2-KO-Tiere zeigen RGS5-KO-Mäuse keine Herzhypertrophie (4.4.3.).

#### **5.4.4 Adenylatzyklase 3 – eine physiologische Interaktion mit RGS5?**

Die Kontraktion der Gefäßmuskelzellen wird durch zwei gegenläufige Signalwege kontrolliert: Einerseits aktivieren Vasopressoren Gq-gekoppelte Rezeptoren, wobei letztendlich die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration angehoben wird und eine Kontraktion resultiert. Andererseits wird eine Relaxation durch Aktivierung Gs-gekoppelter Rezeptoren eingeleitet, wobei die cAMP-Synthese durch Adenylatzyklasen stimuliert wird. Zyklisches AMP (cAMP) wiederum inhibiert vasopressorische Signalwege und bewirkt daher eine Relaxation. Innerhalb des Gq-Weges steuert RGS5 die Kontraktion, indem es die Aktivierung von Gq zeitlich begrenzt. Diese „Ausschalterfunktion“ von RGS5 gegenüber Gq wird durch NO gesteigert (Abbildung 33+34) **Abbildung 34.**

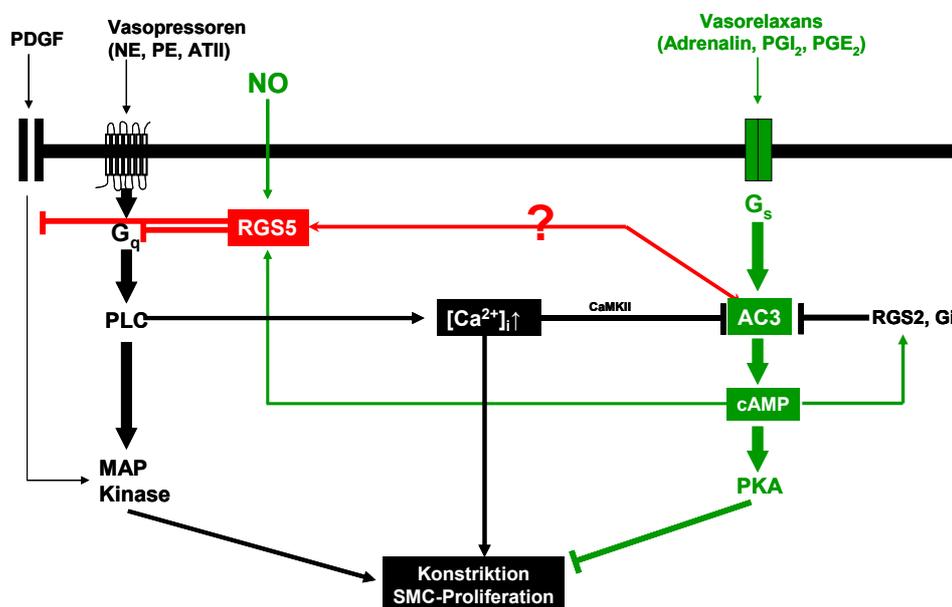
Hinweise aus der Literatur lassen vermuten, dass die RGS5-Expression von Adenylatzyklasen gesteuert sein könnte. So wurde RGS5 in verschiedenen Systemen bei einer Erhöhung der cAMP-Produktion induziert<sup>22</sup>, möglicherweise über cAMP-regulierbare Elemente (sog. CREB-Elemente). Im Fall des ebenso cAMP-sensitiven RGS2 wurde bereits demonstriert, dass dessen Promotor CREB-Elemente enthält (Pepperl et al., 1998; Siderovski et al., 1994). In der Hefe konnten wir eine Interaktion von RGS5 und Adenylatzyklase 3 (AC3) nachweisen. Beide Moleküle sind unabhängig voneinander an der Relaxation von vaskulären SMC beteiligt, so dass eine Kommunikation von RGS5 und AC3 physiologisch sinnvoll erscheint. Eine Interaktion könnte daher zum Beispiel einen Rückkopplungsmechanismus darstellen, der bei einer hohen cAMP-Synthese eingreift. RGS5 könnte so seine eigene Synthese kontrollieren. Auch hier gibt es Präzedenzen insofern, als C. Dessauer und Mitarbeiter klar nachwiesen, dass AC3 durch RGS2 inhibiert wird (Sinnarajah et al., 2001).

<sup>21</sup> Nach einer Transplantation werden künstliche Gefäßbrücken (Shunts/Bypässe) mit einer Neointimaschicht bedeckt, wobei mediale SMC aus benachbarten Regionen der Arterienwand rekrutiert werden. Häufig führt die Hyperproliferation von SMC in der Neointima jedoch zu Gefäßverschlüssen.

<sup>22</sup> In der Ratte wird RGS5 nach chronischer Stimulierung von  $\beta_2$ -adrenergen Rezeptoren ( $\beta_2$ AR) (z.B. mit Isoproterenol) oder durch eine „Akutdosis“ Amphetamin hoch reguliert (Jean-Baptiste et al., 2005; Burchett et al., 1999; Burchett et al., 1998). Letzteres kann D1-dopaminerge Rezeptoren binden und aktivieren. Beide Rezeptoren stimulieren über Gs die cAMP-Produktion.

In einer Vielzahl von Berichten wurde gezeigt, dass Gq- und Gs-gekoppelte Signalwege miteinander kommunizieren und einander beeinflussen (Webb et al., 2001; Wei et al., 1998; Wong 2001; Ostrom et al., 2003). In arteriellen SMC konnte die Gs-vermittelte AC-Aktivierung durch eine Kostimulation des Gq-Weges (durch Vasopressin) entscheidend moduliert werden (Webb et al., 2001). AC3 – eine der AC-Hauptisoformen in arteriellen SMC – wird maßgeblich durch  $\text{Ca}^{2+}$  reguliert, das eine Schlüsselfunktion im Gq-Kontraktionsweg einnimmt (Wong et al., 2001). Die Regulation wird dabei über die Calmodulinkinase II (CaMKII) vermittelt, die AC3 durch Phosphorylierung inhibiert (Wei et al., 1998; Wei et al., 1996). Die Interaktion von RGS5 und AC3 würde eine weitere Verknüpfung von Gq- und Gs-gekoppelten Signalwegen herstellen und damit zur präzise koordinierten Kontrolle der Kontraktion/Relaxation beitragen.

$\text{Ca}^{2+}$  und cAMP sind entscheidend an der Wachstumskontrolle beteiligt, wirken aber reziprok: Während  $\text{Ca}^{2+}$  für die Proliferation von SMC notwendig ist, wird diese von cAMP inhibiert. In Aorta-SMC wird zum Beispiel die PDGF-BB induzierte Proliferation durch eine Aktivierung der AC3 inhibiert (Wong et al., 2001). cAMP antagonisiert dabei (vermittelt über PKA) die mitogenen Hauptwege (MAP-Kinase-Weg, etc.) (Bornfeldt und Krebs, 1999). Als Regulator des PDGF-BB-Weges könnte RGS5 auch hier koordiniert mit cAMP bzw. der AC3 an der Inhibition der Zellproliferation beteiligt sein.



**Abbildung 34: Schema der Kopplung von Kontraktions-/Proliferationswegen (schwarz) und Relaxationswegen (grün):** RGS5 könnte synergistisch mit AC3 an der Kontrolle des Kontraktionszustand und des Wachstums von SMC beteiligt sein (rot). RGS5 inhibiert dabei den Hauptschalter der Kontraktion, G<sub>q</sub>. Gleichzeitig hemmt RGS5 den Proliferations- und Migrationsweg über PDGFRβ. Auf der anderen Seite fördert AC3 über die Produktion von cAMP direkt die Relaxation. cAMP aktiviert nicht nur die PKA, sondern induziert seinerseits RGS2 (Pepperl et al., 1998) und vermutlich auch RGS5 (siehe Text). Die Konsequenz einer möglichen Interaktion von RGS5 und AC3 ist nicht bekannt. NE: Norepinephrin (Noradrenalin), PLC: Phospholipase C, PGI<sub>2</sub>/PGE<sub>2</sub>: Prostaglandin I<sub>2</sub>/E<sub>2</sub>, PKA: Proteinkinase A.

## 5.5 SYNOPSIS

RGS5 beschleunigt das Abschalten aktivierter G-Proteine. Es teilt diese katalytische Funktion mit über 25 anderen RGS-Molekülen, wobei die funktionellen Unterschiede zwischen den Familienmitgliedern bis heute zum Großteil ungeklärt sind. Diese Dissertationsarbeit zielte darauf ab, die spezifische Funktion von RGS5 *in vivo* zu erforschen. Das besondere Interesse galt dabei seiner Rolle während der Karzinogenese. Wir konnten demonstrieren, dass RGS5 in autochthonen Pankreastumoren, sowie in Geweben, in denen eine aktive Angiogenese stattfand, eng gefäßassoziiert exprimiert wurde. In RT5-Tumorperizyten wurde RGS5 zeitgleich mit der Angiogenese induziert. Dies zeigte, dass Perizyten im Tumor während der Gefäßneubildung molekulare Veränderungen erfahren und daher potentielle Angriffspunkte für neuartige Antitumorthérapien darstellen. RGS5 ist nicht nur als potentielles Tumorantigen für Vakzinierungsstrategien relevant, sondern markiert gleichsam eine Subpopulation von unreifen Perizyten im Tumor, die auf eine Antiangiogenesetherapie ansprechen. Die Expression von RGS5 in unreifen Perizyten lässt auf eine wichtige Funktion dieses Moleküls in der Gefäßreifung schließen. Möglicherweise beeinflusst RGS5 aktiv die Migration dieser Gefäßzellen im Verlauf der Angiogenese. Die genetische Deletion von RGS5 bewirkte in RT5-Tumoren eine dramatische Gefäßnormalisierung. Wir sind die ersten, die diesen Prozess durch das Ausschalten eines einzigen Gens rekapitulieren konnten. Die Normalisierung ist vor dem Hintergrund einer neuen Generation von Antiangiogenesetherapien bedeutsam, da sie als Zwischenziel für eine effektivere Tumorthérapie angesehen wird.

In normalen Gefäßen wird RGS5 vorwiegend in arteriellen SMC und in Perizyten exprimiert (Li et al., 2004). Mittels arterieller Druckmessungen in RGS5<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten wir demonstrieren, dass RGS5 an der Regulation des Tonus der Widerstandsgefäßen beteiligt ist. 2-Hybridstudien zeigten, dass AC3 in der Hefe mit RGS5 interagiert. Funktionell könnte diese Interaktion zur koordinierten, synergistischen Steuerung der SMC-Kontraktion dienen, da beide - unabhängig voneinander - eine Relaxation fördern. Unsere Daten und die anderer Gruppen implizieren eine regulatorische Funktion von RGS5 auf die Signalgebung der Vasopressoren Angiotensin-II, sowie des  $\alpha_1$ -AR-Agonisten Phenylephrin. RGS5 limitiert dabei die „Einschaltdauer“ nach Rezeptorstimulierung über seine GTPase-Aktivität für G $\alpha$ q-Proteine. Möglicherweise werden diese und andere trophische Signalwege teilweise chronisch durch RGS5 inhibiert. Dies könnte kritisch für die Homöostase der Gefäßwand sein (Li et al., 2004), zumal zahlreiche Beispiele belegen, dass ein Verlust von RGS5 zur Pathogenese der Atherosklerose, der Apoplexie, und möglicherweise der Hypertonie oder vaskulären Hypertrophie beitragen kann. Gefäßanomalien in RGS5<sup>-/-</sup>-Tieren unterstreichen eindrücklich, dass RGS5 für die Integrität der Gefäße offensichtlich eine wesentliche, wenn auch noch weitgehend unerforschte Rolle spielt.

**„Chance favors the prepared mind“**

**Louis Pasteur**

## 6 Literaturverzeichnis

Adams L.D., Geary R.L., McManus B. und Schwartz S.M. (2000). A comparison of aorta and vena cava medial message expression by cDNA array analysis identifies a set of 68 consistently differentially expressed genes, all in aortic media. Circ Res. **87**(7): 623-31.

Aho S., Arffman A., Pummi T. und Uitto J. (1997). A novel reporter gene MEL1 for the yeast two-hybrid system. Anal Biochem. **253**(2): 270-2.

Allende M.L., Yamashita T. und Proia R.L. (2003). G-protein-coupled receptor S1P1 acts within endothelial cells to regulate vascular maturation. Blood. **102**(10): 3665-7.

Allt G. und Lawrenson J.G. (2001). Pericytes: cell biology and pathology. Cells Tissues Organs. **169**(1): 1-11.

Anger T., Zhang W. und Mende U. (2004). Differential contribution of GTPase activation and effector antagonism to the inhibitory effect of RGS proteins on Gq-mediated signaling in vivo. J Biol Chem. **279**(6): 3906-15.

Armulik A., Abramsson A. und Betsholtz C. (2005). Endothelial/pericyte interactions. Circ Res. **97**(6): 512-23.

Baluk P., Hashizume H. und McDonald D.M. (2005). Cellular abnormalities of blood vessels as targets in cancer. Curr Opin Genet Dev. **15**(1): 102-11.

Baumeister W., Walz J., Zuhl F. und Seemuller E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. Cell. **92**(3): 367-80.

Becker C., Pohla H., Frankenberger B., Schuler T., Assenmacher M., Schendel D.J. und Blankenstein T. (2001). Adoptive tumor therapy with T lymphocytes enriched through an IFN-gamma capture assay. Nat Med. **7**(10): 1159-62.

Bell S.E., Mavila A., Salazar R., Bayless K.J., Kanagala S., Maxwell S.A. und Davis G.E. (2001). Differential gene expression during capillary morphogenesis in 3D collagen matrices: regulated expression of genes involved in basement membrane matrix assembly, cell cycle progression, cellular differentiation and G-protein signaling. J Cell Sci. **114**(Pt 15): 2755-73.

Benjamin L.E., Golijanin D., Itin A., Pode D. und Keshet E. (1999). Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. J Clin Invest. **103**(2): 159-65.

Benzing T., Brandes R., Sellin L., Schermer B., Lecker S., Walz G. und Kim E. (1999). Upregulation of RGS7 may contribute to tumor necrosis factor-induced changes in central nervous function. Nat Med. **5**(8): 913-8.

Benzing T., Yaffe M.B., Arnould T., Sellin L., Schermer B., Schilling B., Schreiber R., Kunzelmann K., et al. (2000). 14-3-3 interacts with regulator of G protein signaling proteins and modulates their activity. J Biol Chem. **275**(36): 28167-72.

Bergers G. und Benjamin L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. Nat Rev Cancer. **3**(6): 401-10.

- Bergers G., Javaherian K., Lo K.M., Folkman J. und Hanahan D. (1999). Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. Science. **284**(5415): 808-12.
- Bergers G., Song S., Meyer-Morse N., Bergsland E. und Hanahan D. (2003). Benefits of targeting both pericytes and endothelial cells in the tumor vasculature with kinase inhibitors. J Clin Invest. **111**(9): 1287-95.
- Berk B.C., Vekshtein V., Gordon H.M. und Tsuda T. (1989). Angiotensin II-stimulated protein synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. Hypertension. **13**(4): 305-14.
- Berman D.M., Kozasa T. und Gilman A.G. (1996). The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. J Biol Chem. **271**(44): 27209-12.
- Bernstein L.S., Ramineni S., Hague C., Cladman W., Chidiac P., Levey A.I. und Hepler J.R. (2004). RGS2 binds directly and selectively to the M1 muscarinic acetylcholine receptor third intracellular loop to modulate Gq/11alpha signaling. J Biol Chem. **279**(20): 21248-56.
- Bhattacharya S., Lee Y.T., Michowski W., Jastrzebska B., Filipek A., Kuznicki J. und Chazin W.J. (2005). The modular structure of SIP facilitates its role in stabilizing multiprotein assemblies. Biochemistry. **44**(27): 9462-71.
- Bhowmick N.A., Chytil A., Plieth D., Gorska A.E., Dumont N., Shappell S., Washington M.K., Neilson E.G., et al. (2004). TGF-beta signaling in fibroblasts modulates the oncogenic potential of adjacent epithelia. Science. **303**(5659): 848-51.
- Black M.J., Bertram J.F., Campbell J.H. und Campbell G.R. (1995). Angiotensin II induces cardiovascular hypertrophy in perindopril-treated rats. J Hypertens. **13**(6): 683-92.
- Blankenstein T. (2005). The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system. Curr Opin Immunol. **17**(2): 180-6.
- Blankenstein T. und Qin Z. (2003). The role of IFN-gamma in tumor transplantation immunity and inhibition of chemical carcinogenesis. Curr Opin Immunol. **15**(2): 148-54.
- Blouw B., Song H., Tihan T., Bosze J., Ferrara N., Gerber H.P., Johnson R.S. und Bergers G. (2003). The hypoxic response of tumors is dependent on their microenvironment. Cancer Cell. **4**(2): 133-46.
- Bondjers C., Kalen M., Hellstrom M., Scheidl S.J., Abramsson A., Renner O., Lindahl P., Cho H., et al. (2003). Transcription profiling of platelet-derived growth factor-B-deficient mouse embryos identifies RGS5 as a novel marker for pericytes and vascular smooth muscle cells. Am J Pathol. **162**(3): 721-9.
- Boon T. und van der Bruggen P. (1996). Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. J Exp Med. **183**(3): 725-9.
- Bornfeldt K.E. und Krebs E.G. (1999). Crosstalk between protein kinase A and growth factor receptor signaling pathways in arterial smooth muscle. Cell Signal. **11**(7): 465-77.
- Bowman E.P., Campbell J.J., Druey K.M., Scheschonka A., Kehrl J.H. und Butcher E.C. (1998). Regulation of chemotactic and proadhesive responses to chemoattractant receptors by RGS (regulator of G-protein signaling) family members. J Biol Chem. **273**(43): 28040-8.
- Bremers A.J. und Parmiani G. (2000). Immunology and immunotherapy of human cancer: present concepts and clinical developments. Crit Rev Oncol Hematol. **34**(1): 1-25.

- Buck E. und Iyengar R. (2003). Organization and functions of interacting domains for signaling by protein-protein interactions. Sci STKE. **2003**(209): re14.
- Burchett S.A., Bannon M.J. und Granneman J.G. (1999). RGS mRNA expression in rat striatum: modulation by dopamine receptors and effects of repeated amphetamine administration. J Neurochem. **72**(4): 1529-33.
- Burchett S.A., Volk M.L., Bannon M.J. und Granneman J.G. (1998). Regulators of G protein signaling: rapid changes in mRNA abundance in response to amphetamine. J Neurochem. **70**(5): 2216-9.
- Burgon P.G., Lee W.L., Nixon A.B., Peralta E.G. und Casey P.J. (2001). Phosphorylation and nuclear translocation of a regulator of G protein signaling (RGS10). J Biol Chem. **276**(35): 32828-34.
- Carmeliet P. (2000). Developmental biology. One cell, two fates. Nature. **408**(6808): 43, 45.
- Carmeliet P. (2003). Angiogenesis in health and disease. Nat Med. **9**(6): 653-60.
- Chang E.J., Kwak H.B., Kim H., Park J.C., Lee Z.H. und Kim H.H. (2004). Elucidation of CPX-1 involvement in RANKL-induced osteoclastogenesis by a proteomics approach. FEBS Lett. **564**(1-2): 166-70.
- Chatterjee T.K. und Fisher R.A. (2000). Cytoplasmic, nuclear, and golgi localization of RGS proteins. Evidence for N-terminal and RGS domain sequences as intracellular targeting motifs. J Biol Chem. **275**(31): 24013-21.
- Chau V., Tobias J.W., Bachmair A., Marriott D., Ecker D.J., Gonda D.K. und Varshavsky A. (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. Science. **243**(4898): 1576-83.
- Chaudhry I.H., O'Donovan D.G., Brenchley P.E., Reid H. und Roberts I.S. (2001). Vascular endothelial growth factor expression correlates with tumour grade and vascularity in gliomas. Histopathology. **39**(4): 409-15.
- Chaudhry S.S., Gazzard J., Baldock C., Dixon J., Rock M.J., Skinner G.C., Steel K.P., Kielty C.M., et al. (2001). Mutation of the gene encoding fibrillin-2 results in syndactyly in mice. Hum Mol Genet. **10**(8): 835-43.
- Chen C.K., Burns M.E., He W., Wensel T.G., Baylor D.A. und Simon M.I. (2000). Slowed recovery of rod photoresponse in mice lacking the GTPase accelerating protein RGS9-1. Nature. **403**(6769): 557-60.
- Chen X., Higgins J., Cheung S.T., Li R., Mason V., Montgomery K., Fan S.T., van de Rijn M., et al. (2004). Novel endothelial cell markers in hepatocellular carcinoma. Mod Pathol. **17**(10): 1198-210.
- Cho H., Kozasa T., Bondjers C., Betsholtz C. und Kehrl J.H. (2003). Pericyte-specific expression of Rgs5: implications for PDGF and EDG receptor signaling during vascular maturation. Faseb J. **17**(3): 440-2.
- Cobleigh M.A., Langmuir V.K., Sledge G.W., Miller K.D., Haney L., Novotny W.F., Reimann J.D. und Vassel A. (2003). A phase I/II dose-escalation trial of bevacizumab in previously treated metastatic breast cancer. Semin Oncol. **30**(5 Suppl 16): 117-24.
- Coyle J.E. und Nikolov D.B. (2003). GABARAP: lessons for synaptogenesis. Neuroscientist. **9**(3): 205-16.

- Coyne C.B., Voelker T., Pichla S.L. und Bergelson J.M. (2004). The coxsackievirus and adenovirus receptor interacts with the multi-PDZ domain protein-1 (MUPP-1) within the tight junction. J Biol Chem. **279**(46): 48079-84.
- Davydov I.V. und Varshavsky A. (2000). RGS4 is arginylated and degraded by the N-end rule pathway in vitro. J Biol Chem. **275**(30): 22931-41.
- DeMartino G.N. und Slaughter C.A. (1999). The proteasome, a novel protease regulated by multiple mechanisms. J Biol Chem. **274**(32): 22123-6.
- Denker S.P., McCaffery J.M., Palade G.E., Insel P.A. und Farquhar M.G. (1996). Differential distribution of alpha subunits and beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on Golgi membranes of the exocrine pancreas. J Cell Biol. **133**(5): 1027-40.
- Derrien A., Zheng B., Osterhout J.L., Ma Y.C., Milligan G., Farquhar M.G. und Druey K.M. (2003). Src-mediated RGS16 tyrosine phosphorylation promotes RGS16 stability. J Biol Chem. **278**(18): 16107-16.
- Dohlman H.G., Apaniesk D., Chen Y., Song J. und Nusskern D. (1995). Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. **15**(7): 3635-43.
- Dohlman H.G. und Thorner J. (1997). RGS proteins and signaling by heterotrimeric G proteins. J Biol Chem. **272**(7): 3871-4.
- Durfee T., Becherer K., Chen P.L., Yeh S.H., Yang Y., Kilburn A.E., Lee W.H. und Elledge S.J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. Genes Dev. **7**(4): 555-69.
- Dvorak H.F. (1986). Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. N Engl J Med. **315**(26): 1650-9.
- Dvorak H.F. (2003). Rous-Whipple Award Lecture. How tumors make bad blood vessels and stroma. Am J Pathol. **162**(6): 1747-57.
- Eberhard A., Kahlert S., Goede V., Hemmerlein B., Plate K.H. und Augustin H.G. (2000). Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies. Cancer Res. **60**(5): 1388-93.
- Ebnet K., Suzuki A., Ohno S. und Vestweber D. (2004). Junctional adhesion molecules (JAMs): more molecules with dual functions? J Cell Sci. **117**(Pt 1): 19-29.
- Edlich F., Weiwad M., Erdmann F., Fanghanel J., Jarczowski F., Rahfeld J.U. und Fischer G. (2005). Bcl-2 regulator FKBP38 is activated by Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. Embo J. **24**(14): 2688-99.
- Estojak J., Brent R. und Golemis E.A. (1995). Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. Mol Cell Biol. **15**(10): 5820-9.
- Fields S. und Song O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature. **340**(6230): 245-6.
- Folkman J., Watson K., Ingber D. und Hanahan D. (1989). Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. Nature. **339**(6219): 58-61.

- Forsberg-Nilsson K., Erlandsson A., Zhang X.Q., Ueda H., Svensson K., Nister M., Trapp B.D., Peterson A.C., et al. (2003). Oligodendrocyte precursor hypercellularity and abnormal retina development in mice overexpressing PDGF-B in myelinating tracts. Glia. **41**(3): 276-89.
- Forster I., Hirose R., Arbeit J.M., Clausen B.E. und Hanahan D. (1995). Limited capacity for tolerization of CD4+ T cells specific for a pancreatic beta cell neo-antigen. Immunity. **2**(6): 573-85.
- Furuya M., Nishiyama M., Kimura S., Suyama T., Naya Y., Ito H., Nikaido T. und Ishikura H. (2004). Expression of regulator of G protein signalling protein 5 (RGS5) in the tumour vasculature of human renal cell carcinoma. J Pathol. **203**(1): 551-8.
- Gabrilovich D.I., Chen H.L., Girgis K.R., Cunningham H.T., Meny G.M., Nadaf S., Kavanaugh D. und Carbone D.P. (1996). Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. Nat Med. **2**(10): 1096-103.
- Ganss R., Arnold B. und Hammerling G.J. (2004). Mini-review: overcoming tumor-intrinsic resistance to immune effector function. Eur J Immunol. **34**(10): 2635-41.
- Ganss R. und Hanahan D. (1998). Tumor microenvironment can restrict the effectiveness of activated antitumor lymphocytes. Cancer Res. **58**(20): 4673-81.
- Ganss R., Limmer A., Sacher T., Arnold B. und Hammerling G.J. (1999). Autoaggression and tumor rejection: it takes more than self-specific T-cell activation. Immunol Rev. **169**: 263-72.
- Ganss R., Ryschich E., Klar E., Arnold B. und Hammerling G.J. (2002). Combination of T-cell therapy and trigger of inflammation induces remodeling of the vasculature and tumor eradication. Cancer Res. **62**(5): 1462-70.
- Garbi N., Arnold B., Gordon S., Hammerling G.J. und Ganss R. (2004). CpG motifs as proinflammatory factors render autochthonous tumors permissive for infiltration and destruction. J Immunol. **172**(10): 5861-9.
- Garrison T.R., Zhang Y., Pausch M., Apanovitch D., Aebersold R. und Dohlman H.G. (1999). Feedback phosphorylation of an RGS protein by MAP kinase in yeast. J Biol Chem. **274**(51): 36387-91.
- Geary R.L., Wong J.M., Rossini A., Schwartz S.M. und Adams L.D. (2002). Expression profiling identifies 147 genes contributing to a unique primate neointimal smooth muscle cell phenotype. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **22**(12): 2010-6.
- Geisterfer A.A., Peach M.J. und Owens G.K. (1988). Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic smooth muscle cells. Circ Res. **62**(4): 749-56.
- Gerhardt H. und Betsholtz C. (2003). Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. Cell Tissue Res. **314**(1): 15-23.
- Geyer M., Schweins T., Herrmann C., Prisner T., Wittinghofer A. und Kalbitzer H.R. (1996). Conformational transitions in p21ras and in its complexes with the effector protein Raf-RBD and the GTPase activating protein GAP. Biochemistry. **35**(32): 10308-20.
- Gillitzer R. und Goebeler M. (2001). Chemokines in cutaneous wound healing. J Leukoc Biol. **69**(4): 513-21.
- Gimbrone M.A., Jr., Leapman S.B., Cotran R.S. und Folkman J. (1972). Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. J Exp Med. **136**(2): 261-76.

- Glass C.K. und Witztum J.L. (2001). Atherosclerosis. the road ahead. Cell. **104**(4): 503-16.
- Gold S.J., Ni Y.G., Dohman H.G. und Nestler E.J. (1997). Regulators of G-protein signaling (RGS) proteins: region-specific expression of nine subtypes in rat brain. J Neurosci. **17**(20): 8024-37.
- Gorelik E. (1983). Concomitant tumor immunity and the resistance to a second tumor challenge. Adv Cancer Res. **39**: 71-120.
- Griffioen A.W., Damen C.A., Blijham G.H. und Groenewegen G. (1996). Tumor angiogenesis is accompanied by a decreased inflammatory response of tumor-associated endothelium. Blood. **88**(2): 667-73.
- Grillet N., Pattyn A., Contet C., Kieffer B.L., Goridis C. und Brunet J.F. (2005). Generation and characterization of Rgs4 mutant mice. Mol Cell Biol. **25**(10): 4221-8.
- Hague C., Bernstein L.S., Ramineni S., Chen Z., Minneman K.P. und Hepler J.R. (2005). Selective inhibition of alpha1A-adrenergic receptor signaling by RGS2 association with the receptor third intracellular loop. J Biol Chem. **280**(29): 27289-95.
- Han S.B., Moratz C., Huang N.N., Kelsall B., Cho H., Shi C.S., Schwartz O. und Kehrl J.H. (2005). Rgs1 and Gnai2 regulate the entrance of B lymphocytes into lymph nodes and B cell motility within lymph node follicles. Immunity. **22**(3): 343-54.
- Hanahan D. (1985). Heritable formation of pancreatic beta-cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes. Nature. **315**(6015): 115-22.
- Hanahan D. und Folkman J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. Cell. **86**(3): 353-64.
- Hao H., Gabbiani G. und Bochaton-Piallat M.L. (2003). Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. Arterioscler Thromb Vasc Biol. **23**(9): 1510-20.
- Harder R., Uhlig H., Kashan A., Schutt B., Duijvestijn A., Butcher E.C., Thiele H.G. und Hamann A. (1991). Dissection of murine lymphocyte-endothelial cell interaction mechanisms by SV-40-transformed mouse endothelial cell lines: novel mechanisms mediating basal binding, and alpha 4-integrin-dependent cytokine-induced adhesion. Exp Cell Res. **197**(2): 259-67.
- Hashizume H., Baluk P., Morikawa S., McLean J.W., Thurston G., Roberge S., Jain R.K. und McDonald D.M. (2000). Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am J Pathol. **156**(4): 1363-80.
- Hellstrom M., Kalen M., Lindahl P., Abramsson A. und Betsholtz C. (1999). Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Development. **126**(14): 3047-55.
- Hendrix M.J., Seftor E.A., Hess A.R. und Seftor R.E. (2003). Vasculogenic mimicry and tumour-cell plasticity: lessons from melanoma. Nat Rev Cancer. **3**(6): 411-21.
- Hershko A. und Ciechanover A. (1998). The ubiquitin system. Annu Rev Biochem. **67**: 425-79.
- Heximer S.P., Knutsen R.H., Sun X., Kaltenbronn K.M., Rhee M.H., Peng N., Oliveira-dos-Santos A., Penninger J.M., et al. (2003). Hypertension and prolonged vasoconstrictor signaling in RGS2-deficient mice. J Clin Invest. **111**(4): 445-52.

- Hiol A., Davey P.C., Osterhout J.L., Waheed A.A., Fischer E.R., Chen C.K., Milligan G., Druey K.M., et al. (2003). Palmitoylation regulates regulators of G-protein signaling (RGS) 16 function. I. Mutation of amino-terminal cysteine residues on RGS16 prevents its targeting to lipid rafts and palmitoylation of an internal cysteine residue. J Biol Chem. **278**(21): 19301-8.
- Hirschi K.K. und Majesky M.W. (2004). Smooth muscle stem cells. Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol. **276**(1): 22-33.
- Hirschi K.K., Rohovsky S.A., Beck L.H., Smith S.R. und D'Amore P.A. (1999). Endothelial cells modulate the proliferation of mural cell precursors via platelet-derived growth factor-BB and heterotypic cell contact. Circ Res. **84**(3): 298-305.
- Hlatky L., Hahnfeldt P. und Folkman J. (2002). Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. J Natl Cancer Inst. **94**(12): 883-93.
- Hobson J.P., Rosenfeldt H.M., Barak L.S., Olivera A., Poulton S., Caron M.G., Milstien S. und Spiegel S. (2001). Role of the sphingosine-1-phosphate receptor EDG-1 in PDGF-induced cell motility. Science. **291**(5509): 1800-3.
- Hollinger S. und Hepler J.R. (2002). Cellular regulation of RGS proteins: modulators and integrators of G protein signaling. Pharmacol Rev. **54**(3): 527-59.
- Hollinger S., Taylor J.B., Goldman E.H. und Hepler J.R. (2001). RGS14 is a bifunctional regulator of Galphai/o activity that exists in multiple populations in brain. J Neurochem. **79**(5): 941-9.
- Horrevoets A.J., Fontijn R.D., van Zonneveld A.J., de Vries C.J., ten Cate J.W. und Pannekoek H. (1999). Vascular endothelial genes that are responsive to tumor necrosis factor-alpha in vitro are expressed in atherosclerotic lesions, including inhibitor of apoptosis protein-1, stannin, and two novel genes. Blood. **93**(10): 3418-31.
- Horvath B., Orsy P. und Benyo Z. (2005). Endothelial NOS-mediated relaxations of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse: a methodological study. J Cardiovasc Pharmacol. **45**(3): 225-31.
- Hsu C.H., Liou J.Y., Dutschman G.E. und Cheng Y.C. (2005). Phosphorylation of Cytidine, Deoxycytidine, and Their Analog Monophosphates by Human UMP/CMP Kinase Is Differentially Regulated by ATP and Magnesium. Mol Pharmacol. **67**(3): 806-14.
- Huang S., Xie K., Bucana C.D., Ullrich S.E. und Bar-Eli M. (1996). Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. Clin Cancer Res. **2**(12): 1969-79.
- Hunter J.J. und Chien K.R. (1999). Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure. N Engl J Med. **341**(17): 1276-83.
- Hurwitz H., Fehrenbacher L., Novotny W., Cartwright T., Hainsworth J., Heim W., Berlin J., Baron A., et al. (2004). Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. N Engl J Med. **350**(23): 2335-42.
- Ibe S., Qin Z., Schuler T., Preiss S. und Blankenstein T. (2001). Tumor rejection by disturbing tumor stroma cell interactions. J Exp Med. **194**(11): 1549-59.
- Ivan M., Kondo K., Yang H., Kim W., Valiando J., Ohh M., Salic A., Asara J.M., et al. (2001). HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Science. **292**(5516): 464-8.

- Jaakkola P., Mole D.R., Tian Y.M., Wilson M.I., Gielbert J., Gaskell S.J., Kriegsheim A., Hebestreit H.F., et al. (2001). Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. Science. **292**(5516): 468-72.
- Jain R.K. (1987). Transport of molecules in the tumor interstitium: a review. Cancer Res. **47**(12): 3039-51.
- Jain R.K. (1996). Delivery of molecular medicine to solid tumors. Science. **271**(5252): 1079-80.
- Jain R.K. (2001). Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy: a new paradigm for combination therapy. Nat Med. **7**(9): 987-9.
- Jain R.K. (2003). Molecular regulation of vessel maturation. Nat Med. **9**(6): 685-93.
- Jain R.K. (2005). Normalization of tumor vasculature: an emerging concept in antiangiogenic therapy. Science. **307**(5706): 58-62.
- Jain R.K. und Booth M.F. (2003). What brings pericytes to tumor vessels? J Clin Invest. **112**(8): 1134-6.
- Jain R.K. und Munn L.L. (2000). Leaky vessels? Call Ang1! Nat Med. **6**(2): 131-2.
- Janeway C.A., Travers P., Walport M. und Shlomchik M.J. (2005). Immunobiology. (Ausgabe 6). New York - London, GS Garland Science.
- Jean-Baptiste G., Li X., Yang Z., Heubach J., Gaudio S., Khoury C., Ravens U. und Greenwood M.T. (2005). Beta adrenergic receptor-mediated atrial specific up-regulation of RGS5. Life Sci. **76**(13): 1533-45.
- Jeansonne B., Lu Q., Goodenough D.A. und Chen Y.H. (2003). Claudin-8 interacts with multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) and reduces paracellular conductance in epithelial cells. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand). **49**(1): 13-21.
- Johnston M., Flick J.S. und Pexton T. (1994). Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol. **14**(6): 3834-41.
- Kammertoens T., Schuler T. und Blankenstein T. (2005). Immunotherapy: target the stroma to hit the tumor. Trends Mol Med. **11**(5): 225-31.
- Kardestuncer T., Wu H., Lim A.L. und Neer E.J. (1998). Cardiac myocytes express mRNA for ten RGS proteins: changes in RGS mRNA expression in ventricular myocytes and cultured atria. FEBS Lett. **438**(3): 285-8.
- Karp C.M., Pan H., Zhang M., Buckley D.J., Schuler L.A. und Buckley A.R. (2004). Identification of HRPAP20: a novel phosphoprotein that enhances growth and survival in hormone-responsive tumor cells. Cancer Res. **64**(3): 1016-25.
- Kawamura H., Kobayashi M., Li Q., Yamanishi S., Katsumura K., Minami M., Wu D.M. und Puro D.G. (2004). Effects of angiotensin II on the pericyte-containing microvasculature of the rat retina. J Physiol. **561**(Pt 3): 671-83.
- Kawarada Y., Ganss R., Garbi N., Sacher T., Arnold B. und Hammerling G.J. (2001). NK- and CD8(+) T cell-mediated eradication of established tumors by peritumoral injection of CpG-containing oligodeoxynucleotides. J Immunol. **167**(9): 5247-53.

- Kenworthy A.K. und Edidin M. (1998). Distribution of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein at the apical surface of MDCK cells examined at a resolution of <100 Å using imaging fluorescence resonance energy transfer. J Cell Biol. **142**(1): 69-84.
- Kirsch T., Wellner M., Luft F.C., Haller H. und Lippoldt A. (2001). Altered gene expression in cerebral capillaries of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. Brain Res. **910**(1-2): 106-15.
- Klinke R. und Silbernagl S. (2003). Lehrbuch der Physiologie. (Ausgabe 4). Stuttgart - New York, Georg Thieme Verlag.
- Kluk M.J., Colmont C., Wu M.T. und Hla T. (2003). Platelet-derived growth factor (PDGF)-induced chemotaxis does not require the G protein-coupled receptor S1P1 in murine embryonic fibroblasts and vascular smooth muscle cells. FEBS Lett. **533**(1-3): 25-8.
- Ko J.K., Choi K.H., Kim I.S., Jung E.K. und Park D.H. (2001). Inducible RGS2 is a cross-talk regulator for parathyroid hormone signaling in rat osteoblast-like UMR106 cells. Biochem Biophys Res Commun. **287**(4): 1025-33.
- Koelle M.R. und Horvitz H.R. (1996). EGL-10 regulates G protein signaling in the *C. elegans* nervous system and shares a conserved domain with many mammalian proteins. Cell. **84**(1): 115-25.
- Kosloff M. und Selinger Z. (2003). GTPase catalysis by Ras and other G-proteins: insights from Substrate Directed SuperImposition. J Mol Biol. **331**(5): 1157-70.
- Krapivinsky G., Medina I., Krapivinsky L., Gapon S. und Clapham D.E. (2004). SynGAP-MUPP1-CaMKII synaptic complexes regulate p38 MAP kinase activity and NMDA receptor-dependent synaptic AMPA receptor potentiation. Neuron. **43**(4): 563-74.
- Krieg A.M. (2003). CpG motifs: the active ingredient in bacterial extracts? Nat Med. **9**(7): 831-5.
- Krieg A.M., Hartmann G. und Yi A.K. (2000). Mechanism of action of CpG DNA. Curr Top Microbiol Immunol. **247**: 1-21.
- Krumins A.M., Barker S.A., Huang C., Sunahara R.K., Yu K., Wilkie T.M., Gold S.J. und Mumby S.M. (2004). Differentially regulated expression of endogenous RGS4 and RGS7. J Biol Chem. **279**(4): 2593-9.
- Kuhn C., Muller F., Melle C., Nasheuer H.P., Janus F., Deppert W. und Grosse F. (1999). Surface plasmon resonance measurements reveal stable complex formation between p53 and DNA polymerase alpha. Oncogene. **18**(3): 769-74.
- Kwon Y.T., Kashina A.S., Davydov I.V., Hu R.G., An J.Y., Seo J.W., Du F. und Varshavsky A. (2002). An essential role of N-terminal arginylation in cardiovascular development. Science. **297**(5578): 96-9.
- Landgraf C., Panni S., Montecchi-Palazzi L., Castagnoli L., Schneider-Mergener J., Volkmer-Engert R. und Cesareni G. (2004). Protein interaction networks by proteome peptide scanning. PLoS Biol. **2**(1): E14.
- Le Cam L., Lacroix M., Ciemerych M.A., Sardet C. und Sicinski P. (2004). The E4F protein is required for mitotic progression during embryonic cell cycles. Mol Cell Biol. **24**(14): 6467-75.
- Lee B.N. und Adams T.H. (1994). Overexpression of flbA, an early regulator of *Aspergillus* asexual sporulation, leads to activation of brlA and premature initiation of development. Mol Microbiol. **14**(2): 323-34.

- Lee S.S., Glaunsinger B., Mantovani F., Banks L. und Javier R.T. (2000). Multi-PDZ domain protein MUPP1 is a cellular target for both adenovirus E4-ORF1 and high-risk papillomavirus type 18 E6 oncoproteins. J Virol. **74**(20): 9680-93.
- Lee S.S., Weiss R.S. und Javier R.T. (1997). Binding of human virus oncoproteins to hDlg/SAP97, a mammalian homolog of the Drosophila discs large tumor suppressor protein. Proc Natl Acad Sci U S A. **94**(13): 6670-5.
- Lei Y., Xin X., Morgan D., Pintar J.E. und Fricker L.D. (1999). Identification of mouse CPX-1, a novel member of the metalloprotease gene family with highest similarity to CPX-2. DNA Cell Biol. **18**(2): 175-85.
- Leil T.A., Chen Z.W., Chang C.S. und Olsen R.W. (2004). GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons. J Neurosci. **24**(50): 11429-38.
- Li B. und Fields S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. Faseb J. **7**(10): 957-63.
- Li H., Degenhardt B., Tobin D., Yao Z.X., Tasken K. und Papadopoulos V. (2001). Identification, localization, and function in steroidogenesis of PAP7: a peripheral-type benzodiazepine receptor- and PKA (RIalpha)-associated protein. Mol Endocrinol. **15**(12): 2211-28.
- Li J., Adams L.D., Wang X., Pabon L., Schwartz S.M., Sane D.C. und Geary R.L. (2004). Regulator of G protein signaling 5 marks peripheral arterial smooth muscle cells and is downregulated in atherosclerotic plaque. J Vasc Surg. **40**(3): 519-28.
- Liang Y., Li C., Guzman V.M., Chang W.W., Evinger A.J., 3rd, Sao D. und Woodward D.F. (2005). Identification of a novel alternative splicing variant of RGS5 mRNA in human ocular tissues. Febs J. **272**(3): 791-9.
- Lifton R.P., Gharavi A.G. und Geller D.S. (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. Cell. **104**(4): 545-56.
- Lindahl P., Johansson B.R., Leveen P. und Betsholtz C. (1997). Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. Science. **277**(5323): 242-5.
- Liou J.Y., Dutschman G.E., Lam W., Jiang Z. und Cheng Y.C. (2002). Characterization of human UMP/CMP kinase and its phosphorylation of D- and L-form deoxycytidine analogue monophosphates. Cancer Res. **62**(6): 1624-31.
- Liu J., Li H. und Papadopoulos V. (2003). PAP7, a PBR/PKA-RIalpha-associated protein: a new element in the relay of the hormonal induction of steroidogenesis. J Steroid Biochem Mol Biol. **85**(2-5): 275-83.
- Lu Q., Sun E.E., Klein R.S. und Flanagan J.G. (2001). Ephrin-B reverse signaling is mediated by a novel PDZ-RGS protein and selectively inhibits G protein-coupled chemoattraction. Cell. **105**(1): 69-79.
- Maniatis T. (1999). A ubiquitin ligase complex essential for the NF-kappaB, Wnt/Wingless, and Hedgehog signaling pathways. Genes Dev. **13**(5): 505-10.
- Maniotis A.J., Folberg R., Hess A., Seftor E.A., Gardner L.M., Pe'er J., Trent J.M., Meltzer P.S., et al. (1999). Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. Am J Pathol. **155**(3): 739-52.

- Manome Y., Saeki N., Yoshinaga H., Watanabe M. und Mizuno S. (2003). A culture device demonstrates that hydrostatic pressure increases mRNA of RGS5 in neuroblastoma and CHC1-L in lymphocytic cells. Cells Tissues Organs. **174**(4): 155-61.
- Martin A.R., Bailie J.R., Robson T., McKeown S.R., Al-Assar O., McFarland A. und Hirst D.G. (2000). Retinal pericytes control expression of nitric oxide synthase and endothelin-1 in microvascular endothelial cells. Microvasc Res. **59**(1): 131-9.
- Matsuzawa S.I. und Reed J.C. (2001). Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. Mol Cell. **7**(5): 915-26.
- Mercier J.F., Salahpour A., Angers S., Breit A. und Bouvier M. (2002). Quantitative assessment of beta 1- and beta 2-adrenergic receptor homo- and heterodimerization by bioluminescence resonance energy transfer. J Biol Chem. **277**(47): 44925-31.
- Mittmann C., Chung C.H., Hoppner G., Michalek C., Nose M., Schuler C., Schuh A., Eschenhagen T., et al. (2002). Expression of ten RGS proteins in human myocardium: functional characterization of an upregulation of RGS4 in heart failure. Cardiovasc Res. **55**(4): 778-86.
- Moratz C., Hayman J.R., Gu H. und Kehrl J.H. (2004). Abnormal B-cell responses to chemokines, disturbed plasma cell localization, and distorted immune tissue architecture in Rgs1<sup>-/-</sup> mice. Mol Cell Biol. **24**(13): 5767-75.
- Morikawa S., Baluk P., Kaidoh T., Haskell A., Jain R.K. und McDonald D.M. (2002). Abnormalities in pericytes on blood vessels and endothelial sprouts in tumors. Am J Pathol. **160**(3): 985-1000.
- Mullen C.A., Urban J.L., Van Waes C., Rowley D.A. und Schreiber H. (1985). Multiple cancers. Tumor burden permits the outgrowth of other cancers. J Exp Med. **162**(5): 1665-82.
- Murphy J.J. und Norton J.D. (1990). Cell-type-specific early response gene expression during plasmacytoid differentiation of human B lymphocytic leukemia cells. Biochim Biophys Acta. **1049**(3): 261-71.
- Nakagomi H., Petersson M., Magnusson I., Juhlin C., Matsuda M., Mellstedt H., Taupin J.L., Vivier E., et al. (1993). Decreased expression of the signal-transducing zeta chains in tumor-infiltrating T-cells and NK cells of patients with colorectal carcinoma. Cancer Res. **53**(23): 5610-2.
- Nakamura Y., Igarashi K., Suzuki T., Kanno J., Inoue T., Tazawa C., Saruta M., Ando T., et al. (2004). E4F1, a novel estrogen-responsive gene in possible atheroprotection, revealed by microarray analysis. Am J Pathol. **165**(6): 2019-31.
- Nasmyth K. (1999). Separating sister chromatids. Trends Biochem Sci. **24**(3): 98-104.
- Neeman M., Abramovitch R., Schiffenbauer Y.S. und Tempel C. (1997). Regulation of angiogenesis by hypoxic stress: from solid tumours to the ovarian follicle. Int J Exp Pathol. **78**(2): 57-70.
- Nielsen J.V., Mitchelmore C., Pedersen K.M., Kjaerulff K.M., Finsen B. und Jensen N.A. (2004). Fkbp8: novel isoforms, genomic organization, and characterization of a forebrain promoter in transgenic mice. Genomics. **83**(1): 181-92.
- Niu J., Scheschonka A., Druey K.M., Davis A., Reed E., Kolenko V., Bodnar R., Voyno-Yasenetskaya T., et al. (2002). RGS3 interacts with 14-3-3 via the N-terminal region distinct from the RGS (regulator of G-protein signalling) domain. Biochem J. **365**(Pt 3): 677-84.

- Nowotny M., Spiechowicz M., Jastrzebska B., Filipek A., Kitagawa K. und Kuznicki J. (2003). Calcium-regulated interaction of Sgt1 with S100A6 (calcyclin) and other S100 proteins. J Biol Chem. **278**(29): 26923-8.
- Ochsenbein A.F., Klenerman P., Karrer U., Ludwig B., Pericin M., Hengartner H. und Zinkernagel R.M. (1999). Immune surveillance against a solid tumor fails because of immunological ignorance. Proc Natl Acad Sci U S A. **96**(5): 2233-8.
- Ochsenbein A.F., Sierro S., Odermatt B., Pericin M., Karrer U., Hermans J., Hemmi S., Hengartner H., et al. (2001). Roles of tumour localization, second signals and cross priming in cytotoxic T-cell induction. Nature. **411**(6841): 1058-64.
- Ostrom R.S., Naugle J.E., Hase M., Gregorian C., Swaney J.S., Insel P.A., Brunton L.L. und Meszaros J.G. (2003). Angiotensin II enhances adenylyl cyclase signaling via Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. Gq-Gs cross-talk regulates collagen production in cardiac fibroblasts. J Biol Chem. **278**(27): 24461-8.
- Overwijk W.W., Theoret M.R., Finkelstein S.E., Surman D.R., de Jong L.A., Vyth-Dreese F.A., DelleMijn T.A., Antony P.A., et al. (2003). Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive CD8<sup>+</sup> T cells. J Exp Med. **198**(4): 569-80.
- Pardoll D. (2003). Does the immune system see tumors as foreign or self? Annu Rev Immunol. **21**: 807-39.
- Parker L.L., Backstrom J.R., Sanders-Bush E. und Shieh B.H. (2003). Agonist-induced phosphorylation of the serotonin 5-HT<sub>2C</sub> receptor regulates its interaction with multiple PDZ protein 1. J Biol Chem. **278**(24): 21576-83.
- Pepperl D.J., Shah-Basu S., VanLeeuwen D., Granneman J.G. und MacKenzie R.G. (1998). Regulation of RGS mRNAs by cAMP in PC12 cells. Biochem Biophys Res Commun. **243**(1): 52-5.
- Phizicky E.M. und Fields S. (1995). Protein-protein interactions: methods for detection and analysis. Microbiol Rev. **59**(1): 94-123.
- Pietras K., Ostman A., Sjoquist M., Buchdunger E., Reed R.K., Heldin C.H. und Rubin K. (2001). Inhibition of platelet-derived growth factor receptors reduces interstitial hypertension and increases transcapillary transport in tumors. Cancer Res. **61**(7): 2929-34.
- Polverini P.J. und Leibovich S.J. (1984). Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. Lab Invest. **51**(6): 635-42.
- Popov S., Yu K., Kozasa T. und Wilkie T.M. (1997). The regulators of G protein signaling (RGS) domains of RGS4, RGS10, and GAIP retain GTPase activating protein activity in vitro. Proc Natl Acad Sci U S A. **94**(14): 7216-20.
- Popov S.G., Krishna U.M., Falck J.R. und Wilkie T.M. (2000). Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin reverses phosphatidylinositol 3,4, 5-trisphosphate-dependent inhibition of regulators of G protein-signaling GTPase-activating protein activity. J Biol Chem. **275**(25): 18962-8.
- Prevost-Blondel A., Zimmermann C., Stemmer C., Kulmburg P., Rosenthal F.M. und Pircher H. (1998). Tumor-infiltrating lymphocytes exhibiting high ex vivo cytolytic activity fail to prevent murine melanoma tumor growth in vivo. J Immunol. **161**(5): 2187-94.
- Pugh C.W. und Ratcliffe P.J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. Nat Med. **9**(6): 677-84.

- Qin Z., Schwartzkopff J., Pradera F., Kammertoens T., Seliger B., Pircher H. und Blankenstein T. (2003). A critical requirement of interferon gamma-mediated angiostasis for tumor rejection by CD8+ T cells. Cancer Res. **63**(14): 4095-100.
- Rae F.K., Stephenson S.A., Nicol D.L. und Clements J.A. (2000). Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. Int J Cancer. **88**(5): 726-32.
- Reed R.K., Berg A., Gjerde E.A. und Rubin K. (2001). Control of interstitial fluid pressure: role of beta1-integrins. Semin Nephrol. **21**(3): 222-30.
- Rhinehart K., Zhang Z. und Pallone T.L. (2002). Ca(2+) signaling and membrane potential in descending vasa recta pericytes and endothelia. Am J Physiol Renal Physiol. **283**(4): F852-60.
- Richter G., Kruger-Krasagakes S., Hein G., Huls C., Schmitt E., Diamantstein T. und Blankenstein T. (1993). Interleukin 10 transfected into Chinese hamster ovary cells prevents tumor growth and macrophage infiltration. Cancer Res. **53**(18): 4134-7.
- Rodriguez C.I., Buchholz F., Galloway J., Sequerra R., Kasper J., Ayala R., Stewart A.F. und Dymecki S.M. (2000). High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. Nat Genet. **25**(2): 139-40.
- Rodt S.A., Ahlen K., Berg A., Rubin K. und Reed R.K. (1996). A novel physiological function for platelet-derived growth factor-BB in rat dermis. J Physiol. **495 ( Pt 1)**: 193-200.
- Rogers J.H., Tamirisa P., Kovacs A., Weinheimer C., Courtois M., Blumer K.J., Kelly D.P. und Muslin A.J. (1999). RGS4 causes increased mortality and reduced cardiac hypertrophy in response to pressure overload. J Clin Invest. **104**(5): 567-76.
- Rosenberg S.A. (1999). A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. Immunity. **10**(3): 281-7.
- Ross E.M. und Wilkie T.M. (2000). GTPase-activating proteins for heterotrimeric G proteins: regulators of G protein signaling (RGS) and RGS-like proteins. Annu Rev Biochem. **69**: 795-827.
- Ross R. (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. N Engl J Med. **340**(2): 115-26.
- Roy A.A., Baragli A., Bernstein L.S., Hepler J.R., Hebert T.E. und Chidiac P. (2005). RGS2 interacts with Gs and adenylyl cyclase in living cells. Cell Signal.
- Roy A.A., Lemberg K.E. und Chidiac P. (2003). Recruitment of RGS2 and RGS4 to the plasma membrane by G proteins and receptors reflects functional interactions. Mol Pharmacol. **64**(3): 587-93.
- Ruiter D.J., Schlingemann R.O., Westphal J.R., Denijn M., Rietveld F.J. und De Waal R.M. (1993). Angiogenesis in wound healing and tumor metastasis. Behring Inst Mitt.(92): 258-72.
- Ryschich E., Schmidt J., Hammerling G.J., Klar E. und Ganss R. (2002). Transformation of the microvascular system during multistage tumorigenesis. Int J Cancer. **97**(6): 719-25.
- Salim S., Sinnarajah S., Kehrl J.H. und Dessauer C.W. (2003). Identification of RGS2 and type V adenylyl cyclase interaction sites. J Biol Chem. **278**(18): 15842-9.
- Santelli E., Leone M., Li C., Fukushima T., Preece N.E., Olson A.J., Ely K.R., Reed J.C., et al. (2005). Structural analysis of Siah1-Siah-interacting protein interactions and insights into the assembly of an E3 ligase multiprotein complex. J Biol Chem. **280**(40): 34278-87.

- Schuler T., Kornig S. und Blankenstein T. (2003). Tumor rejection by modulation of tumor stromal fibroblasts. J Exp Med. **198**(10): 1487-93.
- Schwenk F., Baron U. und Rajewsky K. (1995). A cre-transgenic mouse strain for the ubiquitous deletion of loxP-flanked gene segments including deletion in germ cells. Nucleic Acids Res. **23**(24): 5080-1.
- Seki N., Brooks A.D., Carter C.R., Back T.C., Parsonneault E.M., Smyth M.J., Wiltrout R.H. und Sayers T.J. (2002). Tumor-specific CTL kill murine renal cancer cells using both perforin and Fas ligand-mediated lysis in vitro, but cause tumor regression in vivo in the absence of perforin. J Immunol. **168**(7): 3484-92.
- Seki N., Sugano S., Suzuki Y., Nakagawara A., Ohira M., Muramatsu M., Saito T. und Hori T. (1998). Isolation, tissue expression, and chromosomal assignment of human RGS5, a novel G-protein signaling regulator gene. J Hum Genet. **43**(3): 202-5.
- Semenza G. (2002). Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1. Biochem Pharmacol. **64**(5-6): 993-8.
- Shirane M. und Nakayama K.I. (2003). Inherent calcineurin inhibitor FKBP38 targets Bcl-2 to mitochondria and inhibits apoptosis. Nat Cell Biol. **5**(1): 28-37.
- Siderovski D.P., Heximer S.P. und Forsdyke D.R. (1994). A human gene encoding a putative basic helix-loop-helix phosphoprotein whose mRNA increases rapidly in cycloheximide-treated blood mononuclear cells. DNA Cell Biol. **13**(2): 125-47.
- Sierra D.A., Popov S. und Wilkie T.M. (2000). Regulators of G-protein signaling in receptor complexes. Trends Cardiovasc Med. **10**(6): 263-8.
- Sims D.E. (2000). Diversity within pericytes. Clin Exp Pharmacol Physiol. **27**(10): 842-6.
- Sims D.E., Miller F.N., Donald A. und Perricone M.A. (1990). Ultrastructure of pericytes in early stages of histamine-induced inflammation. J Morphol. **206**(3): 333-42.
- Singer A.J. und Clark R.A. (1999). Cutaneous wound healing. N Engl J Med. **341**(10): 738-46.
- Sinnarajah S., Dessauer C.W., Srikumar D., Chen J., Yuen J., Yilma S., Dennis J.C., Morrison E.E., et al. (2001). RGS2 regulates signal transduction in olfactory neurons by attenuating activation of adenylyl cyclase III. Nature. **409**(6823): 1051-5.
- Song S., Ewald A.J., Stallcup W., Werb Z. und Bergers G. (2005). PDGFRbeta+ perivascular progenitor cells in tumours regulate pericyte differentiation and vascular survival. Nat Cell Biol. **7**(9): 870-9.
- Soriano P. (1994). Abnormal kidney development and hematological disorders in PDGF beta-receptor mutant mice. Genes Dev. **8**(16): 1888-96.
- Spiotto M.T., Fu Y.X. und Schreiber H. (2003). Tumor immunity meets autoimmunity: antigen levels and dendritic cell maturation. Curr Opin Immunol. **15**(6): 725-30.
- Spiotto M.T., Rowley D.A. und Schreiber H. (2004). Bystander elimination of antigen loss variants in established tumors. Nat Med. **10**(3): 294-8.
- Spiotto M.T. und Schreiber H. (2005). Rapid destruction of the tumor microenvironment by CTLs recognizing cancer-specific antigens cross-presented by stromal cells. Cancer Immun. **5**: 8.

- Spiotto M.T., Yu P., Rowley D.A., Nishimura M.I., Meredith S.C., Gajewski T.F., Fu Y.X. und Schreiber H. (2002). Increasing tumor antigen expression overcomes "ignorance" to solid tumors via crosspresentation by bone marrow-derived stromal cells. Immunity. **17**(6): 737-47.
- St Croix B., Rago C., Velculescu V., Traverso G., Romans K.E., Montgomery E., Lal A., Riggins G.J., et al. (2000). Genes expressed in human tumor endothelium. Science. **289**(5482): 1197-202.
- Sun X., Kaltenbronn K.M., Steinberg T.H. und Blumer K.J. (2005). RGS2 is a mediator of nitric oxide action on blood pressure and vasoconstrictor signaling. Mol Pharmacol. **67**(3): 631-9.
- Takeda S., Kadowaki S., Haga T., Takaesu H. und Mitaku S. (2002). Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. FEBS Lett. **520**(1-3): 97-101.
- Tang K.M., Wang G.R., Lu P., Karas R.H., Aronovitz M., Heximer S.P., Kaltenbronn K.M., Blumer K.J., et al. (2003). Regulator of G-protein signaling-2 mediates vascular smooth muscle relaxation and blood pressure. Nat Med. **9**(12): 1506-12.
- Teitelman G., Alpert S. und Hanahan D. (1988). Proliferation, senescence, and neoplastic progression of beta cells in hyperplastic pancreatic islets. Cell. **52**(1): 97-105.
- Tesmer J.J., Berman D.M., Gilman A.G. und Sprang S.R. (1997). Structure of RGS4 bound to AIF4--activated G(i alpha1): stabilization of the transition state for GTP hydrolysis. Cell. **89**(2): 251-61.
- Tlsty T.D. und Hein P.W. (2001). Know thy neighbor: stromal cells can contribute oncogenic signals. Curr Opin Genet Dev. **11**(1): 54-9.
- Tong R.T., Boucher Y., Kozin S.V., Winkler F., Hicklin D.J. und Jain R.K. (2004). Vascular normalization by vascular endothelial growth factor receptor 2 blockade induces a pressure gradient across the vasculature and improves drug penetration in tumors. Cancer Res. **64**(11): 3731-6.
- Trinh K. und Storm D.R. (2003). Vomeronasal organ detects odorants in absence of signaling through main olfactory epithelium. Nat Neurosci. **6**(5): 519-25.
- Tu Y., Popov S., Slaughter C. und Ross E.M. (1999). Palmitoylation of a conserved cysteine in the regulator of G protein signaling (RGS) domain modulates the GTPase-activating activity of RGS4 and RGS10. J Biol Chem. **274**(53): 38260-7.
- Turk M.J., Guevara-Patino J.A., Rizzuto G.A., Engelhorn M.E., Sakaguchi S. und Houghton A.N. (2004). Concomitant tumor immunity to a poorly immunogenic melanoma is prevented by regulatory T cells. J Exp Med. **200**(6): 771-82.
- Van Aelst L., Barr M., Marcus S., Polverino A. und Wigler M. (1993). Complex formation between RAS and RAF and other protein kinases. Proc Natl Acad Sci U S A. **90**(13): 6213-7.
- Varshavsky A. (1997). The ubiquitin system. Trends Biochem Sci. **22**(10): 383-7.
- Wagner M., Mascareno E. und Siddiqui M.A. (1999). Cardiac hypertrophy: signal transduction, transcriptional adaptation, and altered growth control. Ann N Y Acad Sci. **874**: 1-10.
- Wang G.R., Zhu Y., Halushka P.V., Lincoln T.M. und Mendelsohn M.E. (1998). Mechanism of platelet inhibition by nitric oxide: in vivo phosphorylation of thromboxane receptor by cyclic GMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A. **95**(9): 4888-93.
- Wang Q., Liu M., Mullah B., Siderovski D.P. und Neubig R.R. (2002). Receptor-selective effects of endogenous RGS3 and RGS5 to regulate mitogen-activated protein kinase activation in rat vascular smooth muscle cells. J Biol Chem. **277**(28): 24949-58.

- Wang T., Niu G., Kortylewski M., Burdelya L., Shain K., Zhang S., Bhattacharya R., Gabrilovich D., et al. (2004). Regulation of the innate and adaptive immune responses by Stat-3 signaling in tumor cells. Nat Med. **10**(1): 48-54.
- Wang X., Zeng W., Soyombo A.A., Tang W., Ross E.M., Barnes A.P., Milgram S.L., Penninger J.M., et al. (2005). Spinophilin regulates Ca<sup>2+</sup> signalling by binding the N-terminal domain of RGS2 and the third intracellular loop of G-protein-coupled receptors. Nat Cell Biol. **7**(4): 405-11.
- Ward R.J. und Milligan G. (2005). A key serine for the GTPase-activating protein function of Regulators of G protein Signalling proteins is not a general target for 14-3-3 interactions. Mol Pharmacol.
- Webb J.G., Yates P.W., Yang Q., Mukhin Y.V. und Lanier S.M. (2001). Adenylyl cyclase isoforms and signal integration in models of vascular smooth muscle cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol. **281**(4): H1545-52.
- Wei J., Wayman G. und Storm D.R. (1996). Phosphorylation and inhibition of type III adenylyl cyclase by calmodulin-dependent protein kinase II in vivo. J Biol Chem. **271**(39): 24231-5.
- Wei J., Zhao A.Z., Chan G.C., Baker L.P., Impey S., Beavo J.A. und Storm D.R. (1998). Phosphorylation and inhibition of olfactory adenylyl cyclase by CaM kinase II in Neurons: a mechanism for attenuation of olfactory signals. Neuron. **21**(3): 495-504.
- Willimsky G. und Blankenstein T. (2000). Interleukin-7/B7.1-encoding adenoviruses induce rejection of transplanted but not nontransplanted tumors. Cancer Res. **60**(3): 685-92.
- Wiseman B.S. und Werb Z. (2002). Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. Science. **296**(5570): 1046-9.
- Wong S.T., Baker L.P., Trinh K., Hetman M., Suzuki L.A., Storm D.R. und Bornfeldt K.E. (2001). Adenylyl cyclase 3 mediates prostaglandin E<sub>2</sub>-induced growth inhibition in arterial smooth muscle cells. J Biol Chem. **276**(36): 34206-12.
- Wu D.M., Kawamura H., Sakagami K., Kobayashi M. und Puro D.G. (2003). Cholinergic regulation of pericyte-containing retinal microvessels. Am J Physiol Heart Circ Physiol. **284**(6): H2083-90.
- Yamagishi S., Hsu C.C., Kobayashi K. und Yamamoto H. (1993). Endothelin 1 mediates endothelial cell-dependent proliferation of vascular pericytes. Biochem Biophys Res Commun. **191**(3): 840-6.
- Yamamoto S., Yan F., Zhou H. und Tai H.H. (2001). Serine 331 is the major site of receptor phosphorylation induced by agents that activate protein kinase G in HEK 293 cells overexpressing thromboxane receptor alpha. Arch Biochem Biophys. **393**(1): 97-105.
- Yancopoulos G.D., Davis S., Gale N.W., Rudge J.S., Wiegand S.J. und Holash J. (2000). Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. Nature. **407**(6801): 242-8.
- Yang J.C., Haworth L., Sherry R.M., Hwu P., Schwartzentruber D.J., Topalian S.L., Steinberg S.M., Chen H.X., et al. (2003). A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. N Engl J Med. **349**(5): 427-34.
- Yang M., Wu Z. und Fields S. (1995). Protein-peptide interactions analyzed with the yeast two-hybrid system. Nucleic Acids Res. **23**(7): 1152-6.
- Yu P., Lee Y., Liu W., Chin R.K., Wang J., Wang Y., Schietinger A., Philip M., et al. (2004). Priming of naive T cells inside tumors leads to eradication of established tumors. Nat Immunol. **5**(2): 141-9.

Yu P., Lee Y., Liu W., Krausz T., Chong A., Schreiber H. und Fu Y.X. (2005). Intratumor depletion of CD4+ cells unmasks tumor immunogenicity leading to the rejection of late-stage tumors. J Exp Med. **201**(5): 779-91.

Zhang Y., Griendling K.K., Dikalova A., Owens G.K. und Taylor W.R. (2005). Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Hypertension. **46**(4): 732-7.

Zheng B., Chen D. und Farquhar M.G. (2000). MIR16, a putative membrane glycerophosphodiester phosphodiesterase, interacts with RGS16. Proc Natl Acad Sci U S A. **97**(8): 3999-4004.

Zhou J., Moroi K., Nishiyama M., Usui H., Seki N., Ishida J., Fukamizu A. und Kimura S. (2001). Characterization of RGS5 in regulation of G protein-coupled receptor signaling. Life Sci. **68**(13): 1457-69.

Zimmermann K. (1923). Der feinere Bau der Blutcapillaren. Z Anat Entwicklungsgesch. **68**: 29-109.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

1M4	monoklonaler Anti-RGS5-Antikörper
$\alpha_1$ AR	$\alpha_1$ -adrenerger Rezeptor
AC3	Adenylatzyklase
AD	(DNA)-Aktivierungsdomäne
Ade	Adenin
AH109	Hefestamm
$\text{AlF}_4^-$	Fluoraluminat
AR	adrenerger Rezeptor
$\alpha$ SMA	<i>alpha-Smooth muscle actin</i>
AST	Astrozytom
$\text{AT}_1/\text{AT}_{1A}$	Angiotensin-II-Rezeptor Typ 1(A)
ATII	Angiotensin-II
ATP	Adenosintriphosphat
$\beta_2$ AR	$\beta_2$ -adrenerger Rezeptor
BD	(DNA)-Bindedomäne
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i>
bio	Biotin
BM	Basalmembran
bp	Basenpaare
$\text{Ca}^{2+}$	Kalzium-Ionen
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	<i>cluster of differentiation</i> (Differenzierungsmarker)
CD140b	PDGFR $\beta$
CD31	PECAM-1 (Endothelzellmarker)
cDNA	<i>complementary DNA</i>
cfu	<i>colony forming units</i>
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
CMP	Zytosinmonophosphat
CTL	zytotoxische T-Zellen ( <i>cytotoxic T cells</i> )
Cys	Cystein
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DKN	drainierende Lymphknoten
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DZ	dendritische Zellen
EDG1	=S1P <sub>1</sub> (Sphingosinrezeptor-1)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
ES	Embryonale Stammzellen
ET-1	Endothelin-1
$\text{ET}_A$	Endothelinrezeptor A
EtOH	Ethanol
EZ	Endothelzelle
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FLIP	RGS5-positiver Kontrollstamm
$\text{G}\alpha\text{i3(Q204L)}$	G alpha i3-Mutante (204Gln-->Leu)
GAL4	(Galaktosidase-induzierender Transkriptionsfaktor)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
Gi	$\text{G}\alpha$ -Untereinheit i

$\gamma$ IFN	$\gamma$ -Interferon
Go	G $\alpha$ -Untereinheit o
Gq	G $\alpha$ -Untereinheit q
Gs	G $\alpha$ -Untereinheit s (AC-stimulierend)
GST	Glutathion-S-transferase
GTP	Guanosintriphosphat
H&E	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
HIF	<i>hypoxia-inducible factor</i>
HIFko	HIF-Knock-out
His	Histidin
HM	Herzmasse
HPRT	Hypoxanthinguaninphosphoribosyltransferase
IP	Immunpräzipitation
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
IL-4	Interleukin-4
ISH	In-situ-Hybridisierung
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
kB	=1000 bp
kD	Kilo-Dalton
KG	Körpergewicht
KO	Knock-out
KOM1	RGS5-Antiserum (Maus)
LCMV	Lymphozytochoriomeningitisvirus
loxP	<i>Locus of crossing-over of P1 bacteriophage</i>
M	Molarität
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
ME-9F1	endothelspezifischer Antikörper
MeOH	Methanol
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
MLC-Kinase	<i>Myosin light chain kinase</i>
mmHg	Milimeter Quecksilbersäule (Druckeinheit)
NE	Norepinephrin (Noradrenalin)
NEM	N-Ethylmaleimid
NeoR	Neomycinresistenz (G418-Resistenz)
NO	Stickstoffmonoxid
OD600	Optische Dichte bei 600 nm
p.c.	post coitus
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PDGFR $\beta$	<i>platelet-derived growth factor receptor beta (=CD140b)</i>
PE	Phenylephrin
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF2 $\alpha$	Prostaglandin F2 $\alpha$
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandin I <sub>2</sub>
PKA	Proteinkinase A
PKG	cGMP-abhängige Proteinkinase G
PLC	Phospholipase C
PZ	Perizyt
Rek	rekombinant
RGS5	<i>Regulator of G Protein Signaling 5</i>
RGS-Box	<i>Regulator of G Protein Signalin-Domäne</i>
RIP	<i>Rat insulin promoter</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute

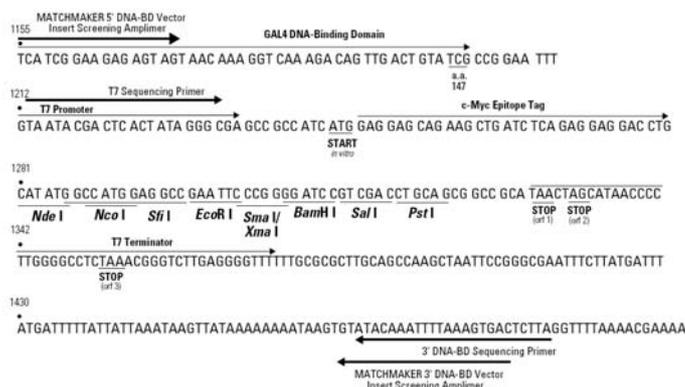
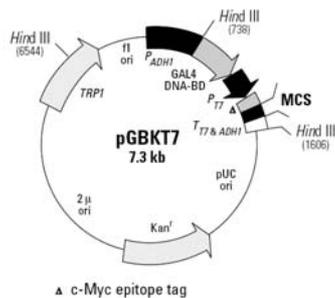
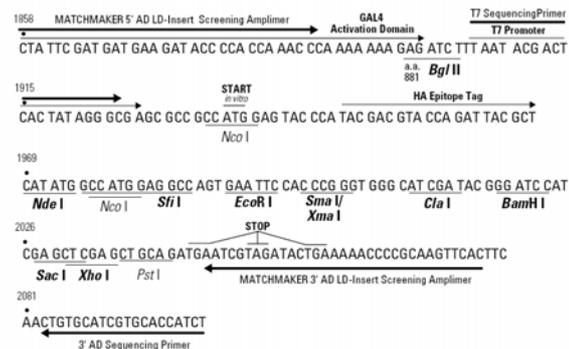
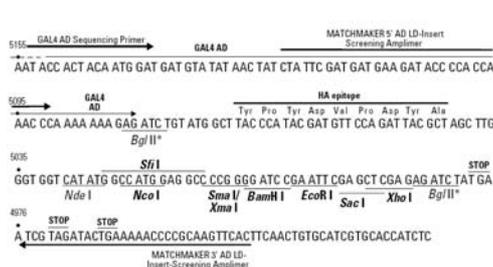
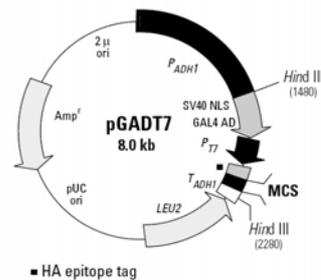
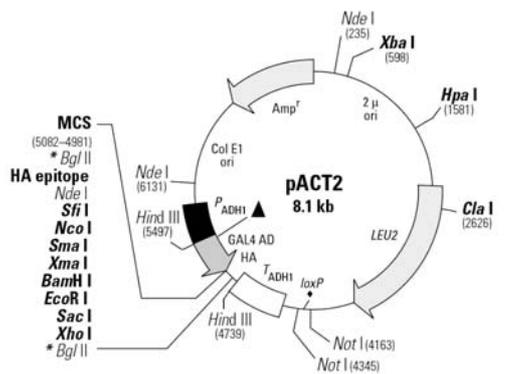
---

rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription bzw. Raumtemperatur
RT5	RIP1 Tag5
s	Sekunde
s.c.	subkutan
S1P	Sphingosin-1-phosphat
SA	Streptavidin
SBD	systolischer Blutdruck
SMC	Smooth muscle cell (glatte Muskelzelle)
SV40-Tag	<i>Simian Virus-40 large T Antigen</i>
TGF $\beta$	<i>Tumor growth factor-<math>\beta</math></i>
tie2	endothelialer Angiopoeitin-Rezeptor
TZR	T-Zell-Rezeptor
UCK	UMP/CMP-Kinase
UMP	Uracilmonophosphat
UTR	<i>untranslated region</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
WT	Wildtyp
Y189	Hefestamm
Y2H	Yeast-2-Hybrid

# ANHANG

## Vektorkarten

### Yeast-2-Hybrid Matchmaker Vektoren (Quelle: Clontech):





Ich erkläre hiermit, dass ich die vorgelegte Dissertation selbst verfasst und mich dabei keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe,

Heidelberg im Herbst 2005

(Mario Berger)

