

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

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

vorgelegt von

Diplom-Biochemikerin

Julia Reinkober

Tag der mündlichen Prüfung:

**Die Bedeutung der GRK2
für die pathologische Myokardhypertrophie**

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Wieland

Prof. Dr. Johannes Backs

„Alles Wissen und alle Vermehrungen unseres Wissens endet nicht mit einem Schlusspunkt, sondern mit Fragezeichen. Ein Plus an Wissen bedeutet ein Plus an Fragestellungen, und jede von ihnen wird immer von neuen Fragestellungen abgelöst.“

Hermann Hesse

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation mit dem Titel "Die Bedeutung der GRK2 für die pathologische Myokardhypertrophie" selbst verfasst und mich bei keiner anderen als der von mir bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt und dadurch zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben.

In erster Linie bedanke ich mich bei Dr. Philip Raake für die Bereitstellung dieses sehr interessanten Themas. Ebenso danke ich ihm für seine konstruktiven kritischen Anmerkungen sowie seine sehr engagierte Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Thomas Wieland für die Übernahme des Erstgutachtens. Zudem bedanke ich mich bei ihm für die vielfältigen Anregungen und Impulse, die den Verlauf der wissenschaftlichen Untersuchungen entscheidend mitbeeinflusst haben.

Ebenso danke ich Prof. Johannes Backs für die Begutachtung dieser Arbeit. Auch seine Ideen und Vorschläge haben mir bei der Erstellung der Arbeit sehr geholfen.

Sehr herzlich danke ich Prof. Patrick Most für die uneingeschränkte Unterstützung zu jeder Zeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Kollegen und Kolleginnen für die wundervolle Zeit. Jeder Einzelne von euch hat zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen. Vor allem möchte ich Henrike Tscheschner für ihre außergewöhnliche Hilfsbereitschaft und ihre wissenschaftliche Expertise danken. Ebenso danke ich Suzan Allam für ihre uneingeschränkte Unterstützung und die tolle Zeit im Labor.

Des Weiteren möchte ich die Gelegenheit nutzen, um mich nicht nur bei meiner Arbeitsgruppe, sondern auch bei der AG Most, AG Chorianopoulos, AG Hassel und AG Müller für das angenehme Arbeitsklima und für die Unterstützung bedanken.

Julia Ritterhoff, Sabine Eschricht, Susann Werkmeister und Henrike Tscheschner, ihr wart diejenigen, die mich in den vergangenen Jahren nicht nur durch unsere berühmten wissenschaftlichen Diskussionen beim Kaffee trinken in neue thematische Bahnen lenkten, sondern auch verstanden, mich in den richtigen Momenten zu motivieren und mir Mut zu machen. Ich habe gerne mit euch gearbeitet und viel gelacht.

Nicht minder aufreibend waren die vergangenen Jahre für meine Eltern und meinen Freund Frank, die dieses Werk in allen Phasen mit jeder möglichen Unterstützung bedacht haben. Bei Ihnen möchte ich mich besonders bedanken. Sie haben immer an mich geglaubt. Danke!

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Herzmuskelhypertrophie.....	1
1.1.1 Pathophysiologie der Herzhypertrophie	2
1.1.2 Zelluläre und molekulare Veränderungen in der pathologischen Herzhypertrophie.....	3
1.1.3 Signalwege in der pathologischen Myokardhypertrophie	4
1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und G-Proteine	9
1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2).....	11
1.3.1 Aufbau von GRK2.....	12
1.3.2 Funktionelle Rolle von GRK2	13
1.3.3 Die kardiale Bedeutung von GRK2	15
1.4 Stand der Forschung	16
1.5 Ziel dieser Arbeit.....	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material.....	19
2.1.1 Neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten aus der Ratte.....	19
2.1.2 Zellkulturmaterialien.....	19
2.1.3 Adenoviren.....	19
2.1.4 Primersequenzen für die quantitative Real-Time PCR.....	20
2.1.5 siRNA Sequenzen	20
2.1.6 Medien, Puffer, Lösungen.....	21
2.1.7 Chemikalien und Reagenzien.....	24
2.1.8 Antikörper	26
2.1.9 Verbrauchsmaterialien.....	28
2.1.10 Sonstige Materialien.....	29
2.1.11 Laborgeräte.....	29
2.2 Methoden	30
2.2.1 Zellbiologische Methoden	30
2.2.2 Virologische Methoden.....	35
2.2.3 Molekularbiologische Methoden.....	38
2.2.4 Proteinbiochemische Methoden.....	41
2.2.5 Statistik.....	42

3	Ergebnisse.....	43
3.1	Die Untersuchung der kardialen GRK2 in der pathologischen Hypertrophie.....	45
3.1.1	Die GRK2 Expression unter pro-hypertrophen Bedingungen	45
3.1.2	GRK2 und die pathologische Hypertrophieantwort	47
3.1.3	Die Bedeutung von GRK2 für die Entstehung der pathologischen Hypertrophie in Fibroblasten.....	51
3.2	Einfluss von GRK2 auf relevante Signaltransduktionswege in der pathologischen Hypertrophie.....	54
3.2.1	Der Einfluss von GRK2 auf den Transkriptionsfaktors NFAT	54
3.2.2	Untersuchung der Einflussnahme von GRK2 auf den Calcineurin Signaltransduktionsweg	55
3.2.3	Der Einfluss von GRK2 auf den MAPK Kinase Signaltransduktionsweg.....	57
3.2.4	Die Bedeutung von GRK2 für die GSK3 β -Aktivierung.....	58
3.2.5	Die Bedeutung von GRK2 für die AKT-Aktivierung.....	63
3.2.6	Der Effekt von GRK2 auf die PI3K γ vermittelte Signaltransduktion.....	66
3.2.7	Untersuchung möglicher Bindungspartner von GRK2 und deren Einflussnahme auf die pathologische Hypertrophie.....	69
4	Diskussion.....	72
4.1	GRK2, ein neuer Regulator der pathologischen Hypertrophie.....	72
4.2	GRK2 provoziert die pathologische Myokardhypertrophie über den GSK3 β /AKT Signaltransduktionsweg.....	74
4.2.1	GRK2 moduliert den NFAT-Influx in den Nukleus durch GSK3 β -Inhibition	75
4.2.2	GRK2 inhibiert GSK3 β durch eine verstärkte AKT-Aktivierung.....	77
4.2.3	GRK2 vermittelt seinen hypertrophen Effekt an der Membran über G α_q und PI3K γ	78
4.3	Ausblick	80
5	Zusammenfassung/Summary.....	82
	Literaturverzeichnis.....	84
	Publikationsverzeichnis	93

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung eines gesunden und hypertrophierten Herzens.....	2
Abbildung 2: Illustrierte Darstellung der prominentesten Signaltransduktionswege in der pathologischen Myokardhypertrophie.	5
Abbildung 3: Aufbau und Funktion der einzelnen Domänen von GRK2.....	12
Abbildung 4: Interaktome der GRK2.	13
Abbildung 5: Darstellung der unterschiedlichen Mechanismen, durch die GRK2 verschiedene Signalwege moduliert.....	15
Abbildung 6: Genetische GRK2-Inhibition reduziert die pathologische Myokardhypertrophie.....	16
Abbildung 7: Vermehrte GRK2-Epxression im Rahmen der pathologischen nicht jedoch der physiologischen Myokardhypertrophie.....	17
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Duolink Assay.	35
Abbildung 9: Aufreinigung der Adenoviren.....	37
Abbildung 10: Analyse verschiedener siRNA Sequenzen zum gezielten GRK2 <i>knockdown</i> in NRVCMS.....	43
Abbildung 11: Adenovirale Überexpression von GRK2.....	44
Abbildung 12: GRK2-mRNA Expression unter pro-hypertropher Stimulation <i>in vitro</i>	46
Abbildung 13: GRK2 Proteinexpression unter pharmakologischer pro-hypertropher Stimulation <i>in vitro</i>	47
Abbildung 14: Veränderung der Kardiomyozytengröße unter PE und ANG II Stimulation nach Herunterregulation von GRK2.	48
Abbildung 15: Einfluss einer adenoviralen Überexpression von GRK2 auf die Kardiomyozytengröße.	49
Abbildung 16: GRK2 Einfluss auf die Expression fetaler Gene unter pro-hypertropher Stimulation <i>in vitro</i>	50
Abbildung 17: Analyse der GRK2-mRNA Expression unter ANG II Stimulation in Fibroblasten.....	52
Abbildung 18: Quantitative Untersuchung der fibrotischen Wachstumsgene CTGF und TGF β unter ANG II Stimulation in der Mischkultur.....	53
Abbildung 19: Analyse der NFAT Promotoraktivität und Darstellung der NFAT Translokation in NRVCMS nach GRK2 <i>knockdown</i>	55
Abbildung 20: Calcineurinexpression unter pro-hypertropher Stimulation.....	56
Abbildung 21: Calcineurinexpression nach GRK2 Überexpression.....	57
Abbildung 22: Der Effekt der siGRK2 auf den MAPK Kinase Signaltransduktionsweg in der pathologischen Hypertrophie.	58
Abbildung 23: Phosphorylierungsstatus von GSK3 β unter GRK2 Einfluss und pharmakologischer pro-hypertropher Stimulation.	59
Abbildung 24: pGSK3 β unter dem Einfluss von AdGRK2.	60
Abbildung 25: Einfluss der GRK2 auf den Phosphorylierungsstatus von GSK3 β unter pro-hypertropher Stimulation mittels ANG II und Inhibition der GSK3 β durch LiCl.....	61
Abbildung 26: Einfluss der siGRK2 auf die Kardiomyozytengröße nach GSK3 β Inhibition.	62

Abbildung 27: Einfluss der siGRK2 auf die AKT Phosphorylierung nach PE und ANG II Stimulation.....	64
Abbildung 28: Die Phosphorylierung von AKT unter dem Einfluss von AdGRK2.....	65
Abbildung 29: Einfluss der GRK2 Überexpression auf die Kardiomyozytengröße nach PI3Ky Inhibition.....	66
Abbildung 30: Einfluss der GRK2 Überexpression auf die Phosphorylierung von AKT nach Inhibition der PI3Ky.....	67
Abbildung 31: Einfluss der AdGRK2 auf GSK3 β /AKT Signalweg nach PI3Ky Inhibition. ...	68
Abbildung 32: Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen GRK2 undPI3Ky in An und Abwesenheit von Wortmannin.....	70
Abbildung 33: Interaktion der GRK2 mit G α q unter pro-hypertropher Stimulation.....	71
Abbildung 34: Putativer Mechanismus der GRK2 in der pathologischen Myokardhypertrophie	80

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Adenoviren	20
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Primersequenzen.....	20
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten siRNA Sequenzen	21
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primärantikörper.....	26
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.....	27
Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Zellkulturansätze	31
Tabelle 7: Temperatur-Zeit-Profil der reversen Transkription	39
Tabelle 8: Übersicht des quantitativen Real-Time PCR Programms.....	40

Abkürzungsverzeichnis

<p>A</p> <p>Ad: Adenovirus</p> <p>Ad: auffüllen bis</p> <p>ANP: Atriales natriuretisches Peptid</p> <p>AT1R: Angiotensin 1 Rezeptor</p> <p>ANG II: Angiotensin II</p> <p>ACE: <i>Angiotensin converting enzyme</i></p> <p>ATP: Adenosintriphosphat</p> <p>AS: Aminosäuren</p> <p>AAV: Adenoassoziierter Adenovirus</p> <p>B</p> <p>BNP: B-natriuretisches Peptid</p> <p>BSA: Rinderserumalbumin</p> <p>bzw.: beziehungsweise</p> <p>β-ARK1: β-adrenerge Rezeptorkinase 1</p> <p>C</p> <p>CMV: Cytomegalovirus</p> <p>CSQ: Calsequestrin</p> <p>Ct-Wert: <i>Cycle Treshold</i>-Wert</p> <p>CTGF: <i>Connective tissue growth factor</i></p> <p>CaMK: Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Kinase</p> <p>cAMP: cyclisches Adenosinmonophosphat</p> <p>cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat</p> <p>ct: c-terminal</p> <p>CaM: Calmodulin</p> <p>CPE: cytopathischer Effekt</p> <p>D</p> <p>DTT: Dithiothreitol</p>	<p>J</p> <p>JNK: <i>c-Jun amino-terminal kinase</i></p> <p>L</p> <p>LacZ Gen: codiert für das Enzym β-Galactosidase</p> <p>LiCl: Lithiumchlorid</p> <p>LVEDD: linksventrikulärer endidastolischer Durchmesser</p> <p>M</p> <p>β-MHC: <i>Myosin heavy chain</i></p> <p>mTOR: <i>Mammalian Target of Rapamycin</i></p> <p>mTORC2: mTOR Komplex 2</p> <p>MCIP: <i>myocyte-enriched calcineurin-interacting protein</i></p> <p>N</p> <p>NFAT: nukleärer Transkriptionsfaktor aktivierter T-Zellen</p> <p>NRVCM: <i>Neonatale rat cardiomyocytes</i></p> <p>nt: n-terminal</p> <p>P</p> <p>PBS: <i>phosphate buffered saline</i></p> <p>PFA: Paraformaldehyd</p> <p>PI3Kγ: Phosphoinositid 3 Kinase</p> <p>PP: Polypropylen</p> <p>PVDF: Polyvinylidenfluorid</p> <p>PE: Phenylephrin</p> <p>PMSF: Phenylmethylsulfonylfluorid</p> <p>PCR: Polymerasekettenreaktion</p> <p>P/S: Penicilin/Streptomycin</p>
--	--

DEPC: Diethylpyrocarbonat	PIP ₂ : Phosphatidylinositol-4,5- bisphosphat
ddH ₂ O: doppelt destilliertes Wasser	PIP ₃ : Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat
DMEM: <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	PH Domäne: <i>Pleckstrin homology domain</i>
DNA: Deoxyribonucleic acid	PDK1: <i>Phosphoinositide-dependent kinase-1</i>
DAG: Diacylglycerol	PTEN: <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
E	PKB: Proteinkinase B
ERK: extracellular-signal regulated kinase	R
EDTA: Ethylendiamintetraacetat	Rev: <i>reverse</i>
ET-1: Endothelin-1	RAAS: Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
F	Raf: <i>Rapidly accelerated fibrosarcom</i>
For: <i>forward</i>	RGS: <i>Regulator of G-Protein Signaling</i>
FCS: <i>Foetal calf serum</i>	S
G	SEM: Standardfehler des Mittelwertes
GAPDH: Glycerinaldehyd 3 phosphat	Ser: Serin
GSK3 β : Glykogen synthase kinase 3 β	SDS: Natriumdodecylsulfat
GRK2: G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2	siRNA: <i>Small interfering RNA</i>
GRK2KO: GRK2 <i>knockout</i>	Scr: <i>Scrambled</i>
GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor	T
GDP: Guanosindiphosphat	TBS: <i>Tris buffered Saline</i>
GTP: Guanosintriphosphat	TCID ₅₀ : <i>tissue culture infectious dose 50</i>
GEF: <i>Guanine-nucleotide exchange factor</i>	TGF- β : <i>Transforming Growth Factor β1</i>
H	TBST: TBS und Tween
HBSS: <i>Hank's Balanced Salt Solution</i>	TAC: transversale aortale Konstriktion
HEPES-Puffer: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure-Puffer	TEY: Phosphorylierung an Threonin183 und Tyrosin185
I	Thr: Threonin
IgG: Immunglobulin G	
IGF1: <i>Insulin-like growth factor 1</i>	
IP ₃ : Inositoltrisphosphat	

1 Einleitung

1.1 Herzmuskelhypertrophie

Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Haupttodesursache in den westlichen Industrieländern [1]. Dabei stellt die chronische Herzinsuffizienz unter den internistischen Erkrankungen mit mehreren Millionen Patienten weltweit die häufigste Diagnose dar [2, 3]. Trotz intensiver Forschungen sind die Mechanismen, die zu einer Herzinsuffizienz führen bislang unzureichend aufgeklärt und die therapeutischen Ansätze beziehungsweise Möglichkeiten begrenzt. Ein frühzeitiges Eingreifen in den Prozess der Herzinsuffizienzentwicklung ist daher notwendig um einen therapeutischen Erfolg zu erzielen.

Im Verlauf einer sich entwickelnden Herzinsuffizienz nimmt die myokardiale Hypertrophie eine zentrale Rolle ein. Sie ist häufig ein Prädiktor einer sich später entwickelnden Herzinsuffizienz [4]. Die myokardiale Hypertrophie wird generell als adaptiver Prozess des Myokards verstanden, der vor allem zur Kompensation der verminderten Herzauswurfleistung beiträgt [5]. Charakterisiert ist die Myokardhypertrophie durch eine Zunahme der Herzmuskelmasse, die durch eine chronisch erhöhte Druck- oder Volumenbelastung entsteht. In einem gesunden Myokard ist dieser Anpassungsprozess reversibel, das heißt, wenn die Auslösefaktoren nicht weiter bestehen, findet eine Rückbildung der strukturellen Adaptation statt [6]. In diesem Fall wird von einer physiologischen oder adaptiven Hypertrophie gesprochen, wie sie zum Beispiel bei Sportlerherzen, Schwangerschaften oder in der Entwicklungshypertrophie beim postnatalen Wachstum zu beobachten ist. Von einer pathologischen bzw. maladaptiven Hypertrophie wird gesprochen, wenn das Herz einer dauerhaften mechanischen Überlastung oder permanenten neuroendokrinen Stimulation ausgesetzt ist [4, 7]. Es kommt zu irreversiblen Remodelingprozessen im Myokard, die mit einer Wandsteifigkeit und einem Kontraktionsverlust verbunden sind und letztendlich zur Abnahme der Herzleistung führen [5, 8]. Wird das Herz anhaltend mehrbelastet, geht die anfänglich reversible Hypertrophie in eine dekompensierte Herzinsuffizienz mit Dilatation über [9, 10]. Da das Mortalitätsrisiko bei Patienten mit einer kardialen Hypertrophie, unabhängig von Alter, Geschlecht und anderen Risikofaktoren um das Zwei- bis Vierfache ansteigt, ist es von großer Relevanz die kardiale Hypertrophie durch therapeutische Maßnahmen zu verringern [11].

1.1.1 Pathophysiologie der Herzhypertrophie

Wird das Myokard geschädigt oder einer erhöhten hämodynamischen Belastung ausgesetzt, finden entsprechende Anpassungsmechanismen im Myokard statt. Es kommt zu einer gesteigerten Kontraktilität durch Erhöhung der Herzfrequenz (Bowditch-Effekt), um das Schlagvolumen des Herzens aufrecht zu erhalten. Zudem findet eine Aktivierung des Frank-Starling-Mechanismus, sowie die Flüssigkeitsretention durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) statt. Des Weiteren wird eine Erhöhung des peripheren Widerstandes durch eine gesteigerte Katecholaminausschüttung beobachtet. Allgemein wird die Hypertrophie eines Organs als dessen Größenzunahme verstanden (Abbildung 1).

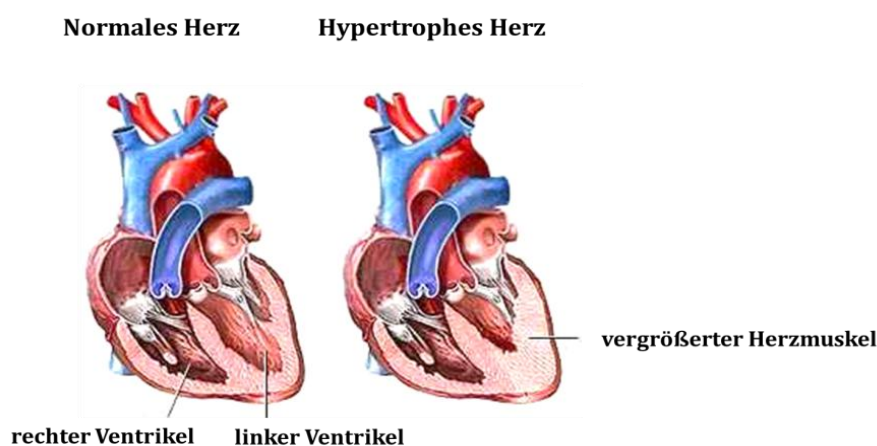


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines gesunden und hypertrophierten Herzens. Bei der Hypertrophie sind die Wände des linken Ventrikels im Vergleich zu dem des gesunden Herzens verdickt. Modifiziert nach www.healthcare.com.

Im Falle einer chronischen Mehrbelastung soll gemäß dem Laplace-Gesetz erreicht werden, dass der Anstieg der Wandspannung durch Zunahme der Wanddicke ausgeglichen wird [12, 13]. Die Zunahme der Myokardmasse ist auf eine Vergrößerung der Kardiomyozyten zurückzuführen sowohl in der Länge als auch in der Breite, die in Begleitung einer Vielzahl komplexer Veränderungen erfolgt. Da der Durchmesser des Myokards trotz gleichbleibender Kapillarisation zunimmt, findet ein Ungleichgewicht zwischen der Myokardmasse und der Sauerstoffversorgung statt. Es wird dann von einer pathologischen Myokardhypertrophie gesprochen. Die Folge ist eine Unterversorgung des Herzens mit Sauerstoff. Die Diffusionsstrecke für den Sauerstoff wird immer größer und die Größenzunahme des Herzens ist begrenzt. In diesem Stadium spricht man bereits von einem kritischen Herzgewicht (>500 g).

Je nachdem ob das Herz einer Druck- oder Volumenbelastung ausgesetzt ist, wird pathophysiologisch zwischen zwei Formen der kardialen Hypertrophie unterschieden [13]. Im Zuge einer arteriellen Hypertension oder Aortenklappenstenose kommt es infolge einer linksventrikulären Druckerhöhung zu einer konzentrischen Hypertrophie der Ventrikelkammer. Um das Schlagvolumen aufrechtzuerhalten muss eine größere Wandspannung aufgebracht werden. In diesem Fall erhöht sich entsprechend dem Laplace-Gesetz die Wandspannung, nicht jedoch der Kammerradius [14]. Charakteristisch für die Druckbelastung ist der Einbau parallel angeordneter Sarkomere, der mit der Vergrößerung des Kardiomyozytendurchmesser einhergeht [15]. Von einer exzentrischen Hypertrophie wird gesprochen, wenn es durch eine linksventrikuläre Volumenbelastung im Herzen in Folge von Mitral- oder Aortenklappeninsuffizienz, Vorhof- oder Kammerseptumdefekt zu einer Vergrößerung des linksventrikulären Durchmessers (LVEDD) kommt. Das Schlagvolumen ist bei der exzentrischen Hypertrophie erhöht, um das im linken Ventrikel verbleibende Blutvolumen zu kompensieren [16]. Die Wandspannung nimmt proportional zum Radius zu [15, 17]. Zudem sind auf zellulärer Ebene der Einbau von Sarkomeren und eine Längenzunahme der Kardiomyozyten zu beobachten. Die aus diesen beiden Hypertrophieformen resultierenden strukturellen Veränderungen werden als Remodeling bezeichnet. Beide Kompensationsformen können letztendlich zu einer Dilatation des Herzens und somit zu einer Herzinsuffizienz führen. Trotz der morphologischen Unterteilung ist die Myokardhypertrophie keine uniforme Reaktion des Herzens, sondern unterliegt einer ausgeprägten Heterogenität in Abhängigkeit vieler unterschiedlicher Auslöser wie beispielsweise mechanische Reize und neurohumorale Stimuli.

1.1.2 Zelluläre und molekulare Veränderungen in der pathologischen Herzhypertrophie

Zu den zellulären Hauptbestandteilen des Herzens gehören zu einem Drittel die Kardiomyozyten (Herzmuskelzellen), die für die Kontraktilität des Herzens verantwortlich sind. Kardiomyozyten sind die größten Zellen im Herzmuskel und machen bis zu 75 % des Herzvolumens aus [18]. Weiterhin befinden sich im Herzmuskel unter anderen Fibroblasten, Endothelzellen und glatte Muskelzellen sowie Mastzellen und Makrophagen [19]. Umgeben ist das Myokard von einer extrazellulären Matrix. Im postnatalen Herzen von Säugetieren geht die Fähigkeit der Kardiomyozyten zu proliferieren verloren und sie befinden sich in einem postmitotischen Zustand [20]. Die Vergrößerung des Herzens resultiert von da an primär aus der Größenzunahme der Kardiomyozyten [21-23]. Neben der Vergrößerung der Kardiomyozyten und der Neuorganisation der Sarkomere findet

eine gesteigerte Proteinsynthese statt [24]. Die zelluläre Umgestaltung wird zudem durch molekulare Veränderungen, wie der kardial spezifischen Reexpression des fetalen Genprogramms „*fetal shift*“ und der Aktivierung diverser Signalkaskaden, begleitet [25, 26]. Zur Reprogrammierung embryonaler Gene gehört die Expression von β -MHC (β -*myosin heavy*) und Skelett- α -Aktin, die an der Kontraktilität der Herzmuskelzellen beteiligt sind [27-30]. Auch die Peptidhormone ANF (atrialer natriuretischer Faktor) und BNP (B-natriuretisches Peptid) sind durch wichtige Markergene kodiert, die eine signifikante Veränderung der Genexpression im hypertrophierten Herzen aufweisen [26, 27, 31]. Über die Ursache für das Auslösen der charakteristischen Reprogrammierung wird derzeit noch spekuliert. Die Aktivierung und Stimulation der molekularen Ereignisse sind für den veränderten Phänotyp im Herzen verantwortlich und sind daher typische Attribute bzw. ein „*readout*“ für eine pathologische Hypertrophie [10].

Nicht nur Kardiomyozyten spielen eine entscheidende Rolle in der Progression einer pathologischen Hypertrophie, auch kardiale Fibroblasten sind maßgeblich an den strukturellen Veränderungen im Herzen verantwortlich und beeinflussen die molekularen Mechanismen. Eine durch Angiotensin II (ANG II) gesteigerte *Transforming Growth Factor* β 1-Expression (TGF- β 1) wird nicht nur in den Kardiomyozyten induziert, sondern wirkt auch auf den Angiotensin 1 Rezeptor (AT1R) in den Fibroblasten. Die verstärkte Synthese dieses para- und autokrinen Signalfaktors führt zu einer vermehrten Einlagerung von Extrazellulärmatrix [32]. Durch TGF- β 1 kommt es zudem durch die Proliferation der Fibroblasten zu einer verstärkten Fibrosebildung und führt ebenso zum Fortschreiten der kardialen Hypertrophie.

1.1.3 Signalwege in der pathologischen Myokardhypertrophie

Infolge einer hämodynamischen Überbelastung werden die Kardiomyozyten nicht nur mechanischem Stress, sondern auch zahlreichen parakrinen und autokrinen humoralen Faktoren wie ANG II, Endothelin (ET-1), Phenylephrin (PE), *insulin-like growth factor 1* (IGF1), TGF- β und Cardiotrophin ausgesetzt. Durch ihre Bindung an Membranrezeptoren werden zahlreiche intrazelluläre Signalwege aktiviert, die letztendlich die Modulation der Genexpression, wie die Reexpression des fetalen Genprogramms, beeinflussen und zu dem pathologischen Phänotyp der Kardiomyozyten führen [25, 33].

Die Arbeiten der letzten Jahre zeigen eine starke Zunahme der Identifizierung diverser hypertropher Signalwege im Myokard. Ebenso konnte deutlich gemacht werden, dass nicht nur ein, sondern mehrere Signalwege infolge einer Mehrbelastung des Herzens aktiviert werden und somit eine hypertrophe Antwort induzieren [5, 10, 34-36]. Die zahlreichen Querverbindungen zwischen den verschiedenen Signaltransduktionskaskaden

führen zu einer erheblichen Signalamplifikation, -modulation und -integration. Am Ende dieser Signalwege steht die Aktivierung zahlreicher nukleärer Transkriptionsfaktoren.

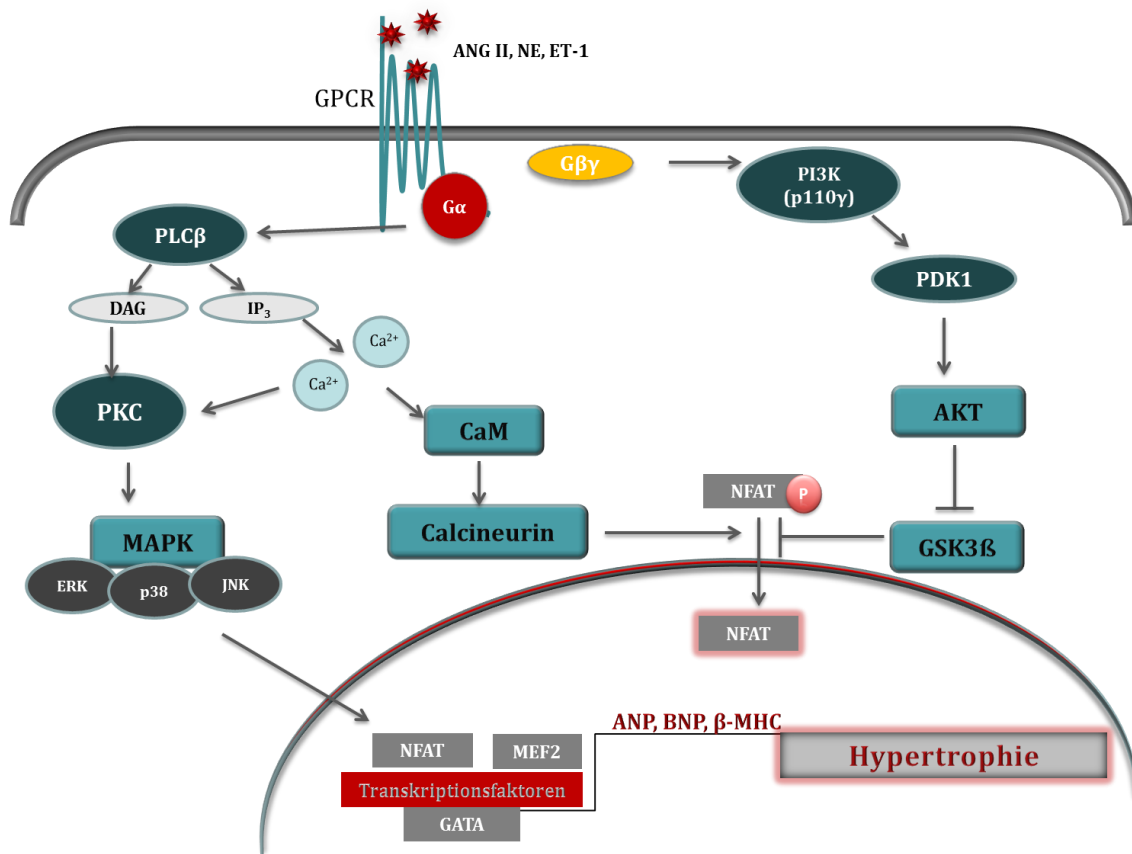


Abbildung 2: Illustrierte Darstellung der prominentesten Signaltransduktionswege in der pathologischen Myokardhypertrophie. Dargestellt sind die GPCR induzierten Signalwege, wie der Calcineurin-regulierte NFAT Signalweg, der MAPK Signalweg und der PI3K/AKT/GSK3β Signalweg, die an der Modulation von NFAT beteiligt sind. Modifiziert nach Frey *et al.* [10].

Diese modulieren wiederum die Bindung an Promoter- bzw. Enhancer-Regionen und beeinflussen so die Transkription einer Vielzahl von Genen. Die Komplexität der Signalkaskaden oder der Rezeptoren, die für die kardiale Hypertrophie verantwortlich sind und den zellulären Stoffwechsel regulieren, lässt sich nur erahnen. In der Abbildung 2 sind exemplarisch die bekanntesten und am besten charakterisierten Signalkaskaden, die Auslöser einer pathologischen Myokardhypertrophie sind, dargestellt. Zu den prominentesten Signalkaskaden, die in den letzten Jahren aufgedeckt wurden, gehören der *mitogen activated protein kinases* (MAPK), der Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K-p110γ)/AKT und der Calcineurin Signaltransduktionsweg. Im Weiteren soll genauer auf die Regulation und Funktion der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Signalwege im Zuge der pathologischen Hypertrophie eingegangen werden.

1.1.3.1 Calcineurin in der pathologischen Myokardhypertrophie

Calcineurin ist ein zentrales Protein in der Regulierung der kardialen Funktion. Beginnt man mit dem Herzschlag so ist dieser assoziiert mit dem Einstrom von Calcium in die Kardiomyozyten. Calcium ist essentiell um die kontraktile Funktion und das Wachstum des Herzens zu kontrollieren. Verantwortlich für diesen Prozess sind *second messenger* aber auch Phosphatasen wie Calcineurin und Kinasen wie die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase (CaMKs), die über das GPCR Signaling aktiviert werden [45, 46]. Calcineurin ist eine Serin/Threoninphosphatase, die sich aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit zusammensetzt [47]. Ihre Aktivierung erfolgt durch Ca^{2+} und dem Kalziumsensor Calmodulin, der nach Bindung von Ca^{2+} seine Konformation ändert und somit in seinen aktivierten Zustand übergeht [48].

Ein wichtiges Substrat von Calcineurin, das vor allem in der pathologischen Myokardhypertrophie eine Rolle spielt, ist der Transkriptionsfaktor NFAT. Dieser moduliert die Calcineurinaktivierung dahingehend, dass der Calcineurininhibitor MCIP (*myocyte-enriched calcineurin-interacting protein*) exprimiert wird.

Calcineurin ist allerdings nicht ausschließlich für die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT verantwortlich. Es bestehen zahlreiche Verbindungen ausgehend von Calcineurin zu anderen Signalmolekülen, z. B. GSK-3 β und MAPK, die an der Induktion der Hypertrophie beteiligt sind [49].

1.1.3.2 Die MAPK-Signaltransduktion in der pathologischen Myokardhypertrophie

Die MAPK-Kinasen werden in 3 Subfamilien unterteilt, *extracellular signal-regulated kinase* (ERK), p38-MAPK und *c-Jun amino-terminal kinase* (JNKs). Sie alle sind für die Phosphorylierung und Regulierung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren verantwortlich und sind daher auch an der Induktion und Hochregulation hypertropher Gene beteiligt [37, 38]. Die Aktivierung der MAPK-Kinasen erfolgt nach Bindung der G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) Agonisten an ihre entsprechende Rezeptoren wie AT1 Rezeptor, Endothelin Rezeptor und α 1-adrenerger Rezeptor. Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um G α q gekoppelte Rezeptoren [39]. Nachdem es zu einer Aktivierung der Rezeptoren an der Membran kommt, wird eine Kaskade von Kinasen ausgelöst, die in der Phosphorylierung und Aktivierung der drei MAPKs münden.

ERK1/2

Bei den ERKs, auch als p42/44-MAPK bezeichnet, handelt es um ubiquitär exprimierte Proteinkinasen, die nicht nur zytosolische Substrate, sondern auch nukleäre Proteine phosphorylieren können [40]. Die primäre Funktion der ERK1/2 liegt im Gegensatz zur JNK und p38 vor allem in der Vermittlung anaboler Prozesse wie der Hypertrophie, der Zellteilung und der Zelldifferenzierung [41]. Die ERK1/2-Aktivierung erfolgt über MAPK-Kinasen (MAPKK), welche sich oberhalb im Signaltransduktionsweg der ERK1/2 befinden. MAPK phosphorylieren ERK1/2 innerhalb des TEY Motifs an den Threonin- und Tyrosinresten. Zu den MAPKK gehören zum Beispiel *mitogen activated ERK activating kinase* (MEK1/2) und SAPK Kinase (SEK), die wiederum durch MAPKK Kinasen, wie MEKK und Raf, aktiviert werden können [42, 43].

Die Arbeit von *Lorenz et al.* aus dem Jahr 2009 zeigte, dass eine Autophosphorylierung der ERK1/2 an Thr188 die Translokation in den Zellkern unterstützt und somit hypertrophe Initiatoren phosphoryliert und dadurch die Transkription hypertropher Gene veranlasst. Wichtig ist hierbei, dass es im Zuge einer Autophosphorylierung im Vergleich zu einer Phosphorylierung im TEY Motif der ERK, zu einer Interaktion des Raf/MEK/ERK Komplex mit der G β -Untereinheit kommt [44].

1.1.3.3 PI3K/AKT/GSK3 β Signaling

Unter den Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) gibt es drei Isoformen, die PI3K α (p110 α), PI3K β (p110 β) und PI3K γ (p110 γ). Die PI3Ks können durch verschiedene 7-Helixtransmembranrezeptoren aktiviert werden. Im Vergleich zu den ersten beiden Isoformen wird die PI3K γ über GPCRs wie den adrenergen Rezeptor, den Angiotensin II-Rezeptor oder Endothelinrezeptor aktiviert [45, 46]. Dabei spielen vor allem die G-Proteinuntereinheiten G α s/G α i/G α q eine wesentliche Rolle. Durch Induzierung einer pathologischen Hypertrophie kommt es selektiv zu einer Hochregulation der PI3K γ im Herzen und PI3K γ wird dann zum Hauptaktivator von AKT (PKB) [45, 47]. Nach Assoziation der PI3K-Untereinheit p110 γ mit der β -Untereinheit der G α q-Untereinheit kommt es zu einer Aktivierung der PI3K. Diese phosphoryliert das membranständige Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP $_3$). Die Phosphorylierung von PIP $_2$ zu PIP $_3$ veranlasst die Rekrutierung der PDK1 und AKT an die Zellmembran. Die Pleckstrin Homologie (PH) Domäne der AKT und dessen Aktivator PDK1 (*3-phosphoinositiddependent protein kinase-1*) assoziieren mit dem 3'-phosphorylierten Lipid und ermöglichen so PDK1 durch dessen Phosphorylierung AKT zu aktivieren.

Ein Gegenspieler dieser Kinase ist PTEN (*Phosphatase and Tensin homolog*). Dabei handelt es sich um eine Phosphatase, die ebenfalls mit der Zellmembran assoziiert ist. Sie katalysiert die Hydrolyse verschiedener Phosphorsäureester. In diesem Fall dephosphoryliert PTEN PIP₃ und hemmt so zum Beispiel den PI3K/AKT/PKB Signalweg.

AKT

Die AKT, auch unter dem Namen Proteinkinase B bekannt, ist eine Serin/Threonin Kinase und ein wichtiges Zielprotein der PI3Kinase. Es gibt drei AKT-Gene, wobei nur AKT1 und AKT2 im Herzen verstärkt exprimiert werden. Die Phosphorylierung von AKT durch PDK1 findet am Threoninrest 308 innerhalb der katalytischen Domäne statt [48]. Eine weitere Phosphorylierungsstelle ist der Serinrest 473, der sich in der regulatorischen Domäne befindet. Nach Phosphorylierung von PDK1 ist der mTOR Komplex 2 mTORC2 (*mammalian target of Rapamycin complex 2*) in der Lage die Phosphorylierung von Ser 473 zu katalysieren [49].

Beide Phosphorylierungen sind für eine vollständige Aktivierung der AKT nötig. Eine Phosphorylierung allein am Threoninrest führt nur teilweise zur Regulierung seiner Substrate. Ein wichtiges Zielprotein von AKT ist die Glykogensynthase Kinase 3 (GSK3 β).

GSK3 β

Die GSK3 β wurde ursprünglich als Kinase identifiziert, welche die Glykogensynthase phosphoryliert und somit inaktiviert. Heute betrachtet man GSK3 β als einen wichtigen Regulator verschiedenster Prozesse und ist am Zellwachstum und der Apoptose beteiligt. Im Herzen beeinflusst GSK3 β sowohl nach physiologischen als auch pathologischen Stimuli das kardiale Wachstum negativ. In einer Arbeit von Haq *et al.* konnte gezeigt werden, dass eine konstitutiv aktive Form von GSK3 β das kompensatorische Wachstum nach Drucküberbelastung oder chronischer β -adrenerger Stimulation reduziert [50]. Die hypertrophiehemmende Wirkung entfaltet GSK3 β durch die Inhibition von Transkriptionsfaktoren, die eine Hypertrophie fördern. So ist GSK3 β zum Beispiel für die Phosphorylierung von NFAT verantwortlich und verhindert so dessen Translokation in den Nukleus. GSK3 β ist konstitutiv aktiv. *In vitro* und *in vivo* Arbeiten zeigten, dass unter hypertrophen Bedingungen GSK3 β im Vergleich zu Ihrer Isoform GSK3 α inaktiviert wird [50]. Eine Inhibierung und folgende Inaktivierung der GSK3 β erfolgt durch Phosphorylierung am Serinrest-9 durch die Kinase AKT.

Verschiedene Studien zeigen, dass eine Inaktivierung des AKT-Substrats GSK3 β bei der Induktion der pathologischen Hypertrophie eine wichtige Rolle spielt. Verschiedenste GPCR-aktivierende Hypertrophiestimuli führen zur PI3K/AKT-abhängiger

Phosphorylierung von GSK3 β . Ein Austausch von Serin-9 gegen Alanin, der die Phosphorylierung und damit die Inaktivierung von GSK3 β verhindert, blockiert die GPCR-induzierte Hypertrophie [51, 52].

1.1.3.4 Transkriptionsfaktor NFAT

NFAT (nukleärer Transkriptionsfaktor aktivierter T-Zellen) Proteine, von denen es fünf Formen gibt, spielen eine zentrale Rolle in der induzierbaren Gentranskription der pathologischen Myokardhypertrophie. Trotz ihres Namens kommen sie nicht nur in T-Zellen sondern in sehr vielen Geweben vor. In nicht stimulierten Zellen verbleiben die NFAT Proteine im Zytoplasma. In einem hyperphosphorylierten Stadium zeigen sie eine niedrige Affinität zur DNA. Die Dephosphorylierung von NFAT, wie es im hypertrophen Herzen durch Calcineurin beispielsweise geschieht, erlaubt es NFAT, in den Nukleus zu translozieren. Zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren wie GATA4 und MEF2 bewirken die NFAT Proteine im Nukleus eine Umprogrammierung der Genexpression mit einem deutlichen Anstieg von hypertrophieassoziierten Genen wie β -MHC und den natriuretisch wirkenden Peptiden ANP und BNP [53, 54]. Die Phosphorylierung von NFAT durch die Kinase GSK3 β dagegen verhindert eine Translokation von NFAT in den Nukleus und somit auch die Reexpression der pro-hypertrophen Gene.

1.2 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) und G-Proteine

Bei der Induzierung pathologischer Signalwege und der Weiterleitung extrazellulärer hypertropher Signale im kardiovaskulären System nimmt das GPCR Signaling (GPCR), welches von verschiedenen Agonisten wie ANG II, ET-1 und Katecholaminen aktiviert wird, eine zentrale Rolle ein. G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind aus sieben Transmembran Helices aufgebaut. Durch die Interaktion mit heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteinen (G-Proteinen) werden Signale an nachgeschaltete Effektormoleküle wie die Adenylatcyclase (AC), die Phospholipase C (PLC), die Mitogen Activated Protein Kinasen (MAPK), die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K) oder Ras Proteine übertragen und aktiviert [47, 55]. Beim Menschen wurden derzeit über 800 verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren entdeckt [56]. Im kardiovaskulären System spielen vor allem die GPCRs wie ANG II-, ET1- und α - und β -adrenerge-Rezeptoren eine zentrale Rolle.

Sie sind im Herzen an der Kontraktion und Herzfrequenz, sowie am Wachstum der Zellen wesentlich beteiligt. Vor allem die Signalweiterleitung über die G α_q -Proteine spielt eine zentrale Rolle bei der hypertrophen Antwort des Herzens auf pathologische Reize.

GPCRs sind an G-Proteine gekoppelt. Diese bestehen aus drei Untereinheiten, einer α -Untereinheit mit einem Molekulargewicht von 39-46 kDa, einer β -Untereinheit (36 kDa) und einer γ -Untereinheit (8 kDa) [57]. Die α -Untereinheit verfügt über eine Bindungsstelle für Guanosintriphosphat (GTP)/Guanosindiphosphat (GDP). Im inaktiven Zustand liegt $G\alpha$ als $G\alpha$ -GDP vor, im aktivierten Zustand liegt nach Interaktion mit einem aktivierten Liganden-Rezeptor-Komplex als $G\alpha$ -GTP vor. Die β - und γ -Untereinheit bilden einen festen Komplex [57, 58]. Alle Untereinheiten sind Bestandteil der Signalweiterleitung und zeichnen sich durch eine große Diversität aus [57, 59, 60].

Nach Bindung eines Agonisten an dem membrangebundenen G-Protein-gekoppelten Rezeptor, findet zunächst dessen Konformationsänderung und Interaktion des Liganden-Rezeptor-Komplexes mit einem heterotrimeren G-Protein statt. Diese Interaktion veranlasst einen Austausch von GDP zu GTP an der $G\alpha$ -Untereinheit, wobei der G-Protein-gekoppelte Rezeptor als Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) wirkt [57, 59, 61]. Gleichzeitig dissoziiert die $G\alpha$ -Untereinheit von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit [62]. Woraufhin diese freien G-Protein Untereinheiten nachgeschaltete Effektormoleküle wie zum Beispiel Adenylatzyklasen, Phospholipasen und zyklische Guanosinmonophosphat (cGMP)-abhängige Phosphodiesterasen, regulieren bzw. aktivieren können [58, 63].

Diese aktivierten Effektormoleküle führen wiederum zur Freisetzung von sogenannten *second messenger* wie zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP), Diacylglycerol (DAG), Inositoltrisphosphat (IP3) und Ca^{2+} , die ihrerseits wieder Reaktionen auslösen [57]. Aufgrund der intrinsischen GTPase Aktivität der α -Untereinheit findet die Terminierung der Signaltransduktion statt, da durch die Hydrolyse von GTP zu GDP die Reassoziierung der G-Protein-Untereinheiten α , β und γ erfolgt.

Die wichtigsten G-Proteine, die im Herzen exprimiert werden, sind die $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha i/0}$ und $G_{\alpha q}$. Die β -adrenergen Rezeptoren, die an $G_{\alpha s}$ -Proteinen oder $G_{\alpha i}$ -Proteinen gekoppelt sind, verbinden das sympathische Nervensystem mit der Myokardfunktion und regulieren die Kontraktionskraft und die Herzfrequenz [64, 65]. Rezeptoren, wie Angiotensin II-, Endothelin-, und α -adrenergen-Rezeptoren, welche an $G_{\alpha q}$ -Proteine gekoppelt sind, spielen eine zentrale Rolle bei der hypertrophen Antwort des Herzens auf pathologische Stimuli [66-70]. Nach Bindung des Liganden an den Rezeptor findet durch Dissoziation der $G\alpha$ - von der $G\beta\gamma$ -Untereinheit die Aktivierung des Effektormoleküls Phospholipase C durch $G\alpha$ -Untereinheit statt. Dieser ist für die Spaltung des Substrats Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PIP2) verantwortlich und setzt dadurch die beiden *second messenger* IP3 und DAG frei [57, 67, 71]. Das membranständige DAG aktiviert wiederum die membranständige Proteinkinase C, die verschiedene Substrate phosphoryliert und somit verschiedenste Signalkaskaden auslöst, welche an der Regulation der Transkription und

kardialer Hypertrophie beteiligt sind. Die G β -Untereinheit wiederum aktiviert ebenso Signalmoleküle und initiiert Signaltransduktionswege wie zum Beispiel den PI3K/AKT Signalweg.

1.3 G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2)

Unter den G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen gibt es sieben verschiedene Isoformen, die hauptsächlich die agonist-besetzte Form der GPCRs als Substrat erkennen.

Charakteristisch für GRKs ist deren großer Amino- und Carboxyterminus, der sich in bestimmten Subdomänen deutlich von den anderen Kinasen unterscheidet. Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus des C-Terminus und des Mechanismus der Membrantranslokation werden die GRKs in Subfamilien gegliedert: a) die Rhodopsinkinasen zu denen die GRK1 und GRK7 zählen werden am C-Terminus prenyliert und dadurch in der Membran verankert, b) die β -adrenergen Rezeptorkinasen GRK2 und GRK3, die als einzige Subfamilie eine PH Domäne im C-Terminus aufweisen und c) die Subfamilie GRK4 mit ihren Isoformen GRK4, GRK5 und GRK6. Dabei werden GRK4 und GRK6 im C-Terminus palmyliert. Am C-Terminus der GRK5 befinden sich positiv geladene Aminosäuren [72]. Die GRK2 war die erste GRK, deren Nukleotidsequenz 1989 von der Gruppe von Robert J. Lefkowitz aufgeklärt werden konnte [73]. Als Substrat wurde damals hauptsächlich der β_2 -adrenerge Rezeptor eingesetzt, weshalb die GRK2 ursprünglich β -adrenerge Rezeptorkinase 1 (β -ARK1) genannt wurde. Heute werden laut Nomenklatur die Kinasen allgemeiner als G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen (GRK) bezeichnet und die Nummerierung richtet sich nach dem Zeitpunkt ihrer Entdeckung.

Die GRK2 gehört zur Familie der Serin/Threonin Kinasen, die bevorzugt Serin und Threonin in der Nachbarschaft von neutralen und sauren Aminosäureresten phosphorylieren [74]. Als ubiquitär vorkommendes zytosolisches Protein wird die GRK2, neben der GRK3 und GRK5 als häufigste Isoform im Myokard exprimiert. Wie genau die Expression der GRK2 reguliert wird, ist noch nicht geklärt und Gegenstand intensiver Forschung. Im Vergleich zu den anderen Isoformen stellt die GRK2 ein Schlüsselmolekül in der Regulation der Physiologie des Herzens dar [72, 75]. Ihre Expression ist bei einer Vielzahl von Erkrankungen verändert so auch bei Patienten mit Herzinsuffizienz, Hypertrophie, Myokardinfarkt und Hypertonie [76-82]. Die GRK2 gehört, wie auch die GRK5 zu den variabelsten GRKs in Bezug auf ihre Substratspezifität. Vor allem die physiologisch wichtigen GPCR-Rezeptoren wie β -adrenerge Rezeptoren, α_2 -adrenerge Rezeptoren, Angiotensin II Typ 1-Rezeptoren werden von GRK2 phosphoryliert und reguliert [83]. Es ist bis heute nicht geklärt wie die Rezeptorspezifität von GRK bzw. die Präferenz für bestimmte GPCR vermittelt wird. Es wird vermutet, dass die biologisch

relevante Rezeptorspezifität durch Co-Expression und Co-Lokalisation von GRK und ihre GPCR und zusätzliche regulatorische Mechanismen erreicht werden [72]. Aber auch nicht GPCR Proteine stehen unter der Modulation von GRK2 [83-85].

1.3.1 Aufbau von GRK2

Grundsätzlich unterscheidet sich der Aufbau der 78-80 kDa großen GRK2 nicht von denen der anderen GRKs. Die katalytische Domäne wird von einer aminoterminalen (N-Terminus, ~185 AS) und einer variablen carboxyterminalen (C-Terminus, ~105-230 AS) Domäne flankiert. Zudem ist die Proteinsequenz der katalytischen Domäne zwischen den einzelnen GRKs stark konserviert (~45 %) und besteht aus ca. 270 Aminosäuren, deren Zentrum ein Lysin darstellt, welches für die Bindung von ATP verantwortlich ist (Abbildung 3).

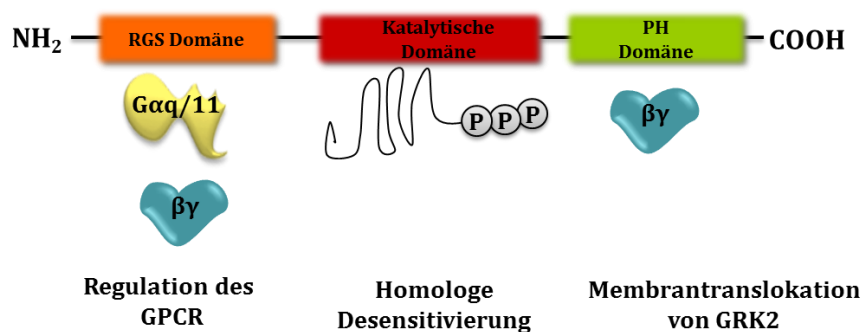


Abbildung 3: Aufbau und Funktion der einzelnen Domänen von GRK2. Modifiziert nach Rebas *et al.* [86].

Anders verhält es sich mit dem C- und N-Terminus. Hier gibt es starke Unterschiede vor allem im C-Terminus, der sowohl in seiner Aminosäuresequenz als auch in seiner Länge zwischen den einzelnen Familien der GRKs sehr verschieden ist.

Der C-Terminus der GRK2 geht eine Bindung mit freien Gβγ Untereinheiten an der Membran ein, nachdem es zu einer agonistabhängigen Membrantranslokation von GRK2 nach GPCR Aktivierung kommt [87, 88]. Untersuchungen konnten diese Interaktion auf einen kleinen Teil des C-Terminus, den Bereich der Aminosäuren 648 bis 665, kartieren [89, 90]. Dabei überlappt der kleine Teil mit einer sowohl in GRK2 als auch in GRK3 vorhandenen Domäne, der Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne), die sich ebenfalls am C-Terminus befindet [91]. Die PH-Domäne ist zudem für die Interaktion der GRK2 mit Phospholipiden, wie PIP₂ verantwortlich [87]. Die Interaktion zwischen Phospholipiden und der PH Domäne der GRK2 ist nicht von der Aktivierung durch GPCRs abhängig, wie es zum Beispiel bei der Interaktion zwischen GRK2 und Gβγ zu beobachten ist [92].

Außerdem wird die katalytische Aktivität der Kinase PKC negativ durch die PH- Domäne beeinflusst [93].

Innerhalb des N-Terminus gibt es eine ca. ~120 AS lange Domäne, die eine starke Homologie zu den sogenannten RGS Proteinen (*Regulator of G-protein signaling*) aufweist, die sogenannte RGS-Domäne. RGS Proteine, die die GTPase-Aktivität der GTP-gebundenen α -Untereinheiten erhöhen, indem sie an diese binden und so die Hydrolyse von α -GTP zu α GDP beschleunigen. Dabei kommt es zu einer tausendfach beschleunigten Inaktivierung des G-Proteins gefolgt von einer Signalterminierung.

Analysen konnten zeigen, dass die RGS Domäne der GRK2 spezifisch auf α q/11 wirkt und es so zu einer schnelleren Abschaltung der gekoppelten Rezeptorsignale kommt [66]. Die Aktivität der RGS Domäne von GRK2 bleibt dabei unbeeinflusst von der katalytischen Aktivität der Kinase, ebenso wie das Phosphorylierungsstadium der Rezeptoren keinen Einfluss darauf nimmt [94-100].

Neuere Arbeiten zeigen, dass auch der N-Terminus der GRK2 eine $G\beta\gamma$ -Bindestelle besitzt und so nicht nur die katalytische Aktivität, sondern auch die $G\beta\gamma$ -induzierte Signaltransduktionen beeinflusst [101, 102]. Welche der beiden Bindungsstellen der GRK2 für $G\beta\gamma$ -Untereinheiten die physiologisch bedeutendere ist, bleibt zu erforschen.

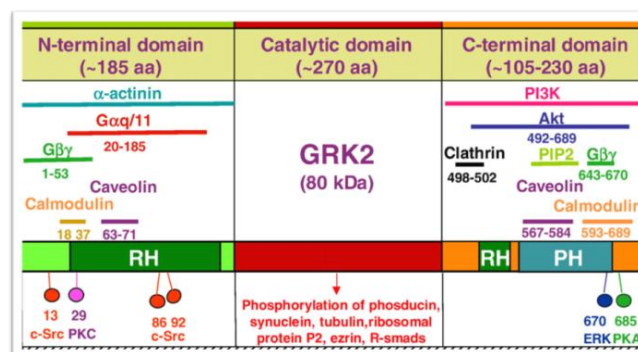


Abbildung 4: Interaktome der GRK2. Modifiziert nach Ribas *et al.* [86].

1.3.2 Funktionelle Rolle von GRK2

Ist das biologische System dauerhaft Reizen ausgesetzt, so werden physiologische Prozesse, wie Desensibilisierung oder Adaptation in Gang gesetzt um die Ansprechbarkeit auf neue oder stärker werdende Reize zu vermindern. Die G-Protein-gekoppelte Signalweiterleitung über die GPCR wird in diesem Zusammenhang durch die GRKs moduliert.

Durch die Aktivierung der GPCRs werden die GRKs an die Zellmembran rekrutiert, wo sie vor allem Zielproteine phosphorylieren. Die Rezeptorererkennung ist dabei zwischen den GRKs sehr unterschiedlich [103]. Zum einen liegt das an den unterschiedlichen Affinitäten

zu den verschiedenen $G\beta\gamma$ -Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins, zum anderen an der direkten Rezeptor-GRK-Interaktion [104]. Die Phosphorylierung der GPCRs durch die GRKs erfolgt ausschließlich über eine durch Agonisten aktivierte Form der GPCRs.

Nach Aktivierung des GPCRs durch entsprechende Bindungspartner kommt es zu einer Konformationsänderung der Rezeptoren. Diese Strukturänderung sorgt für eine rasche Translokation der GRKs an die Zellmembran und Membranverankerung (Abbildung 5). Im Falle der GRK2 scheint der C-Terminus eine essentielle Rolle zu spielen. Arbeiten belegen, dass durch Expression des C-Terminus von GRK2 nicht nur die Translokation der GRK2, sondern auch die Rezeptorphosphorylierung und die damit einhergehende Desensibilisierung verhindert wird [89]. Nach Translokation der GRK2 an die Zellmembran wird der Rezeptor an den Serin- und Threoninrest des zytoplasmatischen C-Terminus phosphoryliert. Dies führt zu einer Senkung der Affinität des Rezeptors für G-Proteine und erhöht gleichzeitig die Affinität zu dem Adapterprotein β -Arrestin, welches nach Phosphorylierung an die Membran rekrutiert wird. Die Bindung durch β -Arrestin verhindert die Interaktion mit den G-Proteinen (Desensibilisierung) und der Rezeptor wird internalisiert. Die anschließende Dephosphorylierung des Rezeptors und seine Rekrutierung an die Membran (*recycling*) oder proteolytische Degradation (*downregulation*) bewirkt eine Abnahme der Rezeptordichte an der Zelloberfläche, welche mit einer verminderten Ansprechbarkeit der Zelle auf den spezifischen Agonisten einhergeht [104]. Würde dieser Prozess nicht stattfinden, käme es zu einer überschießenden Reaktion der Zelle. Die GPCRs werden in das Zytoplasma aufgenommen und abgebaut bzw. rezirkulieren an die Membran. Neben ihrer Funktion als Kinase kann die GRK2 auch durch direkte Interaktion mit Proteinen diese phosphorylierungsunabhängig regulieren. So konnte gezeigt werden, dass eine Interaktion von GRK2 mit der $G\alpha_q$ Untereinheit die GPCR desensitiviert und somit die GTPase Aktivität von $G\alpha_q$ stimuliert, was die $G\alpha_q$ -vermittelte PLC-Aktivierung hemmt [97]. Auch die $G\beta\gamma$ -Untereinheiten werden durch GRK2 beeinflusst [89, 105]. Dahingegen ist keine Interaktion mit $G\alpha_s$, $G\alpha_i$, $G\alpha_o$, $G\alpha_{12/13}$ oder $G\alpha_{16}$ zu beobachten [97, 98, 106]. Neuere Untersuchungen zeigen, dass GRK2 auch mit $G\alpha_{14}$ interagiert [106]. Einen ganz anderen Weg verfolgt die Phosphorylierung von P2, einen ribosomalen Protein, durch GRK2. Nach Rezeptoraktivierung und Phosphorylierung wird die Proteinneusynthese gesteigert und so die translationale Aktivität indirekt durch GPCRs beeinflusst [107]. Hier hat die Phosphorylierung durch GRK2 ähnliche Effekte wie bei der Phosphorylierung anderer GPCRs. Es kommt zur Desensibilisierung und zu einer verringerten Oberflächenexpression sowie zu einer verstärkten MAP-Kinase-Aktivierung [108]. In der Abbildung 4 sind die Interaktionspartner von GRK2 dargestellt.

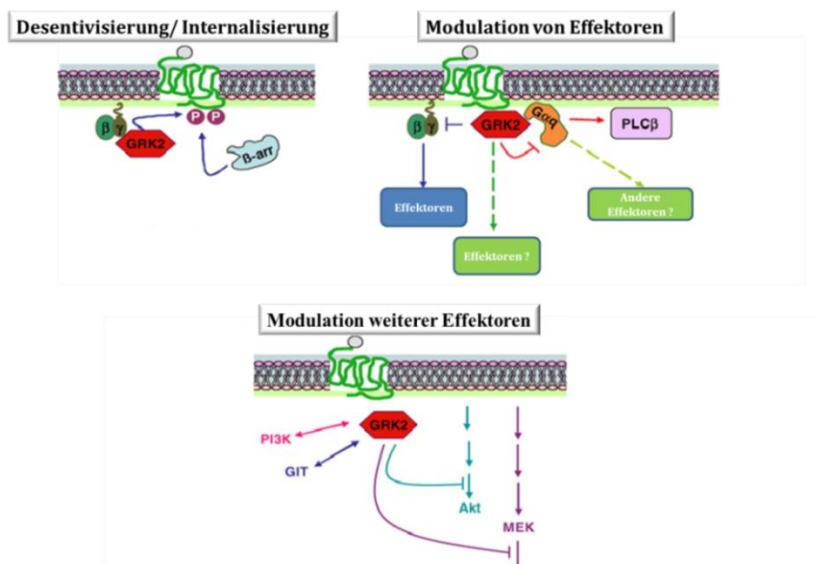


Abbildung 5: Darstellung der unterschiedlichen Mechanismen, durch die GRK2 verschiedene Signalwege moduliert. Modifiziert nach Ribas *et al.*[86].

1.3.3 Die kardiale Bedeutung von GRK2

Die zentrale Rolle der GRK2 im kardiovaskulären System beruht auf der Modulation der GPCRs durch deren Desensibilisierung. Im Fokus steht hierbei ihre Bedeutung in der Herzinsuffizienz. Aufgrund der eingeschränkten Herzleistung kommt es zu einer vermehrten Ausschüttung von Katecholaminen, gefolgt von einer erhöhten Desensibilisierung der β -adrenergen Rezeptoren, was wiederum zu einer verstärkten Herunterregulation und zu einer gehäuften Entkopplung von Gas führt [64, 109]. Aufgrund einer veränderten Aktivität und Expression der GRK2 in der Pathogenese der Herzinsuffizienz variiert die pathophysiologische Rolle der GRK2 im Verlauf der Erkrankung. So zeigen verschiedene Studien, dass Menschen mit einer Herzinsuffizienz eine erhöhte GRK2-Aktivität und eine vermehrte GRK2-mRNA Produktion aufweisen, was die Ursache für eine verstärkte Rezeptordesensibilisierung ist und zu einer Abnahme der kardialen Leistungskraft führt [77, 78]. Darüber hinaus gibt es Arbeiten, die eine Korrelation der GRK2-Expression und Aktivität mit einer Dysregulation von α_2 -Adrenozeptoren, wie sie bei Herzinsuffizienz auftritt, zeigen. Eine Dysregulation der Rezeptoren wird hier durch einen Anstieg der GRK2-Expression verstärkt, was die GRK2 als mögliches sympatholytisches Zielmolekül identifiziert [110]. Weitere Studien belegen, dass eine hohe GRK2-Konzentration mit erhöhten Angiotensin II-Konzentrationen und einer Hypertension einhergeht [111]. Um in den maladaptiven Prozess der GRK2 einzugreifen, wurden verschiedene Therapieansätze verfolgt. Neben einer Inhibierung der GRK2 durch das pharmakologische Peptid M119, gehören zu den neuesten therapeutischen Ansätzen die Überlegungen über den gentherapeutischen Einsatz, der im

Mausmodell und Großtiermodell getesteten GRK2-Inhibitoren, β ARK-ct und β ARK-nt [112-114]. Eine gezielte Überexpression dieser GRK2 Domänen würde ein verlängertes Rezeptorsignal in den pathologischen Prozessen fördern.

1.4 Stand der Forschung

Im Rahmen der Herzinsuffizienz kommt es zu einer Hochregulation von GRK2 im Herzen. Dies konnte bereits die Arbeitsgruppe um Prof. Lohse 1993 aufzeigen [76]. Arbeiten von Raake *et al.* konnten zudem darlegen, dass GRK2 als zentraler Regulator der β -adrenergen Signaltransduktion maßgeblich zur Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz beiträgt [115-117]. Nicht nur bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz, sondern auch in einem Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie konnte gezeigt werden, dass eine Zunahme von GRK2 und ihrer Aktivität zu beobachten ist. Durch genetische Ablation von GRK2 (konditionelle *knockout* Maus) konnte eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate herzinsuffizienter Mäuse erzielt werden [115, 117]. Interessanterweise konnte auch das adverse Remodeling in den GRK2KO Mäusen unterdrückt werden. *In vivo* Daten an konditionellen GRK2KO Mäusen, die zuvor einer transversalen Aortenkonstriktion als Modell der pathologischen Myokardhypertrophie unterzogen wurden, lieferten erste Hinweise auf eine Beteiligung von GRK2 in der pathologischen Myokardhypertrophie.

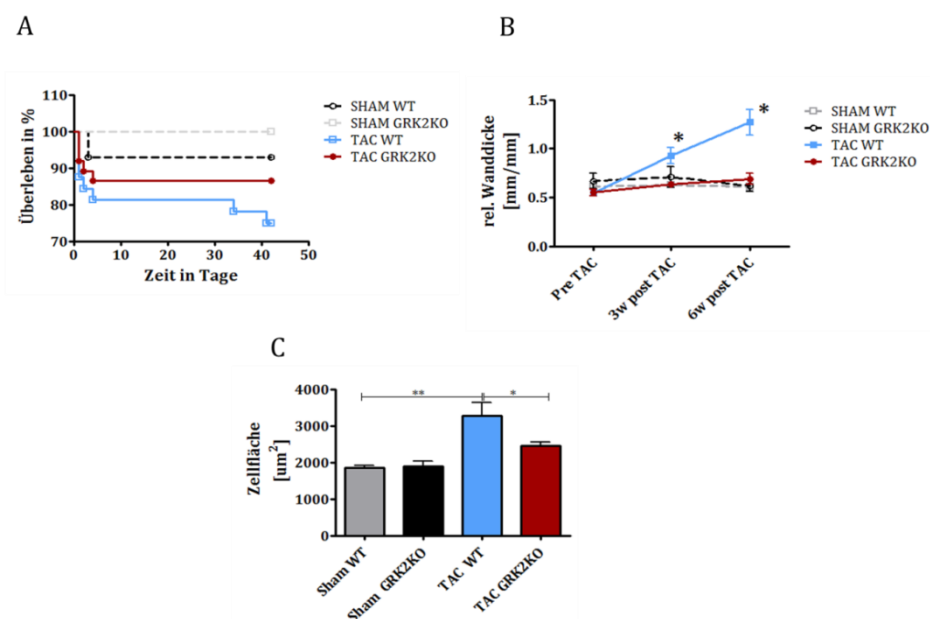


Abbildung 6: Genetische GRK2-Inhibition reduziert die pathologische Myokardhypertrophie. (A) Überlebenskurve nach TAC in männlichen WT und GRK2KO Mäusen, (B) Relative Wanddicke gemessen in mm/mm, (C) Zellfläche post TAC isolierter Kardiomyozyten in μm^2 , Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One-way Anova (Prism); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Die GRK2KO Tiere zeigten in diesem Hypertrophiemodell neben einem im Trend verbesserten Gesamtüberleben eine signifikant verringerte myokardiale Hypertrophie. Zudem zeigten erste Analysen auf mRNA Ebene eine deutliche Hochregulation der GRK2 bei Tieren, die einer transversalen Aortenkonstriktion unterzogen wurden (Abbildung 7). Im Vergleich zur maladaptiven Hypertrophie zeigen GRK2KO Mäuse unter physiologischer Stimulation durch regelmäßiges Schwimmtraining keine Unterschiede der GRK2-Expression verglichen mit untrainierten Kontrolltieren, was darauf hinweist, dass GRK2 nur in der pathologischen und nicht in der physiologischen Hypertrophie eine Rolle spielt (Abbildung 7).

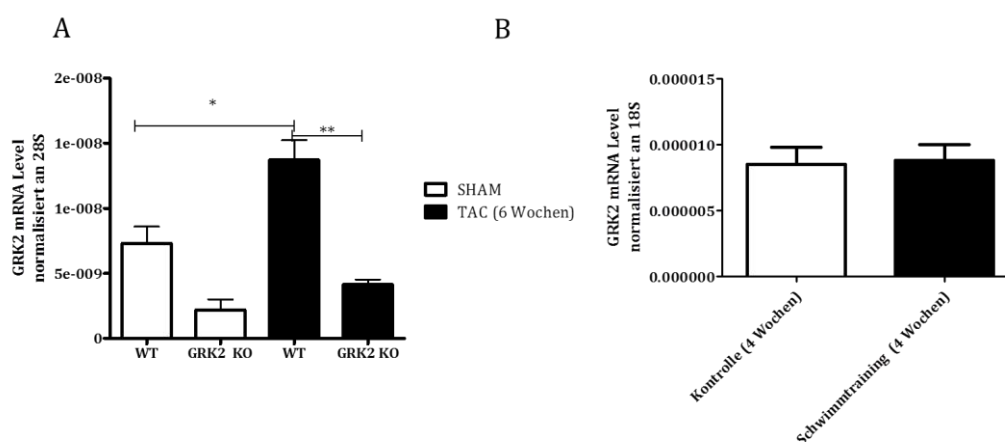


Abbildung 7: Vermehrte GRK2-Expression im Rahmen der pathologischen nicht jedoch der physiologischen Myokardhypertrophie. Vergleich der GRK2-mRNA Werte in einem Modell der physiologischen sowie in einem Modell der pathologischen Myokardhypertrophie *in vivo*. (A) GRK2-mRNA Level 6 Wochen nach TAC in Wildtyp- und GRK2KO Mäusen. (B) GRK2-mRNA-Werte in Wildtypmäusen nach 4 Wochen regelmäßigen Schwimmtrainings und in untrainierten Kontrollmäusen. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One-way Anova (Prism); * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Trotz der Erkenntnis, dass die linksventrikuläre Masse ein unabhängiger Risikoprädiktor für fatale Ereignisse bei Patienten mit Herzinsuffizienz darstellt, ist bislang keine klinische Therapie verfügbar, die speziell auf die Behandlung der pathologischen Myokardhypertrophie ausgerichtet ist [118]. Etablierte Herzinsuffizienztherapien, wie β -Blocker, ACE-Inhibitoren oder Aldosteron-Antagonisten blockieren neurohormonale Systeme, die als Folge der Herzinsuffizienz moduliert werden. Obwohl die Blockade dieser neurohormonalen Systeme die Prognose in der Herzinsuffizienz verbessern, ist es wahrscheinlich, dass sowohl maladaptive als auch adaptive nachgeschaltete Prozesse gehemmt werden [119]. Somit wäre die pathologische Myokardhypertrophie ein früher Ansatzpunkt für eine therapeutische Intervention und könnte die Entstehung der Herzinsuffizienz gar verhindern.

1.5 Ziel dieser Arbeit

Die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) galt bislang vor allem als ein zentraler Regulator der β -adrenergen Signaltransduktion. In Vorarbeiten konnte aufgezeigt werden, dass GRK2 in dieser Funktion maßgeblich zur Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz beiträgt.

Eine Vielzahl von kardiovaskulären Störungen, wie der Myokardinfarkt, die arterielle Hypertonie und die durch Mutationen sarkomerischer Proteine veränderte Kontraktilität provozieren eine pathologische Hypertrophie der Kardiomyozyten. Diese Stressinduzierte Myokardhypertrophie normalisiert zunächst die Wandspannung des linken Ventrikels, was eine vorübergehende Entlastung des linken Ventrikels bedeutet. Ein andauernder hypertropher Stimulus mit dann überschießender, pathologischer Myokardhypertrophie führt letztlich zu einer Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen und plötzlichem Herztod.

In der vorliegenden Arbeit soll der bislang unerforschte und mögliche kausale Zusammenhang von GRK2 bei der Entstehung der pathologischen Myokardhypertrophie charakterisiert werden.

Die *in vivo* an einer konditionellen GRK2KO Maus untersuchten Veränderungen hypertropher Parameter sollen an Hand eines Zellkulturmodells mit neonatalen Kardiomyozyten nachvollzogen werden. Hierbei wird die pathologische Hypertrophie durch pharmakologische Stimulation induziert und gentechnische Ansätze durch virale Überexpression bzw. *silencing* der GRK2 herangezogen. Zudem soll die Rolle von GRK2 bezüglich ihrer Einflussnahme auf hypertrophe Signaltransduktionskaskaden entschlüsselt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Neonatale ventrikuläre Kardiomyozyten aus der Ratte

Die in der Zellkultur eingesetzten ventrikulären Kardiomyozyten wurden aus ein bis drei Tage alten männlichen und weiblichen neonatalen Ratten der Rasse Wistar isoliert. Die trächtigen Muttertiere wurden von der Firma Janvier bezogen und in die Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung der Universität Heidelberg geliefert.

2.1.2 Zellkulturmaterialien

CaCl 1 mM	Sigma Aldrich, München
DNase I 10.000 U/ml	Sigma Aldrich, München
DMEM High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamin	PAA, Cölbe
Dulbecco's PBS (10x) ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	PAA, Cölbe
FCS-Gold	PAA, Cölbe
L-Glutamin 200 mM	PAA, Cölbe
HEPES Puffer 1 M	PAA, Cölbe
HBSS (ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ mit Phenolrot)	PAA, Cölbe
Medium-199 ohne L-Glutamin	Sigma Aldrich, München
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Cölbe
Trypsin 1:250 Unit 100 GM	Invitrogen, Karlsruhe
Trypsin-EDTA 0,25 %, Phenolrot	Invitrogen, Karlsruhe

2.1.3 Adenoviren

Der NFAT-Luziferase-Virus (Ad5-NFAT-Luz) wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Johannes Backs, Universitätsklinikum Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Der Ad5-CMV-LacZ und der Ad5-CMV-GRK2 wurde aus dem Labor von Prof. Walther Koch in Philadelphia bezogen.

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Adenoviren

Ad5-CMV-LacZ	Replikationsdefizient (Deletion des E1- und E3-Gens) LacZ Gen unter Kontrolle des CMV Promotors
Ad5-CMV-GRK2	Replikationsdefizient (Deletion des E1- und E3-Gens) GRK2 Gen unter Kontrolle des CMV Promotors
Ad5-NFAT-Luz	Replikationsdefizient (Deletion des E1- und E3-Gens) NFAT-Gen unter Kontrolle des Luziferase Promotors

2.1.4 Primersequenzen für die quantitative Real-Time PCR

Zur Durchführung der quantitativen Real-Time PCR erfolgte zunächst die Erstellung der benötigten Primer mit dem Programm Primer-BLAST (NCBI, Bethesda, MD, USA) (siehe Tabelle 2). Die optimale Annealingtemperatur der Primer wurde über einen Temperaturgradienten bestimmt. Die Primer wurden anschließend in Vorversuchen getestet und anhand der DNA-Agarosegelelektrophorese validiert.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Primersequenzen

Primerbezeichnung	Sequenz
CSQ2 For	5`-TCA AAG ACC CAC CCT ACG TC-3`
CSQ2 Rev	5`-GGG TCA ATC CAC AAG ATG CT-3`
BNP For	5`-CTG AAG GTG CTG TCC CAG AT-3`
BNP Rev	5`-CCT TGG TCC TTC AAG AGC TG-3`
β -MHC For	5`-GCC AAC ACC AAC CTG TCC AAG TTC-3`
β -MHC Rev	5`-TGC AAA GGC TCC AGG TCT GAG GGC-3`
ANP For	5`-TGC CGG TAG AAG ATG AGG TC-3`
ANP Rev	5`-TGC TTT TCA AGA GGG CAG AT-3`
GRK2 For	5`-CCC TCT CAC CAT CTC TGA GC-3`
GRK2 Rev	5`-CGG TTG GGG AAC AAG TAG AA-3`

2.1.5 siRNA Sequenzen

Die verwendeten siRNA-Sequenzen (siehe Tabelle 3) wurden von der Firma Ambion synthetisiert.

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten siRNA Sequenzen

siRNA Bezeichnung	Sequenz
sense-siRNA-Negativkontrolle	5' AGC AUU CAU UCG CGU UGG 3'
antisense-siRNA-Negativkontrolle	3' CCA ACG CGA AUG AAU GCU 5'
sense-siRNA-GRK2 (2.1)	5' AGA UCA UCC UGG GCC UUG A 3'
antisense-siRNA-GRK2 (2.1)	3' UCA AGG CCC AGG AUG AUC U 5'
sense-siRNA-GRK2 (2.3)	5' UCA AGU UAC UGG ACA GUG A 3'
antisense-siRNA-GRK2 (2.3)	3' UCA CUG UCC AGU AAC UUG A 5'

2.1.6 Medien, Puffer, Lösungen

Sofern nicht anders beschrieben wurden alle Puffer und Lösungen in doppelt destilliertem Wasser (ddH₂O) angesetzt. Vor Gebrauch wurden die Lösungen entweder durch Filtration oder im Autoklav sterilisiert.

Verdaulösung Trypsin-HBSS

3 % Trypsin (v/v)
 3 % DNase I (v/v)
 0,04 M HEPES Puffer
 4 mM NaOH
 2 % P/S (v/v)
 ad 50 ml HBSS

Stopplösung Antitrypsin-HBSS

4 % FCS-Gold (v/v)
 3 % DNase I
 (Endkonzentration 300 U/ml)
 2 % P/S (v/v)
 0,06 M HEPES
 ad 50 ml HBSS

Kulturmedium (10 % FCS)

Medium 199
 10 % FCS-Gold (v/v)
 1 % P/S (v/v)
 1 % L-Glutamin
 1 mM Ca²⁺

Kulturmedium (0,5 % FCS)	Medium 199 0,5 % FCS-Gold 1 % P/S 1 % L-Glutamin 1 mM Ca ²⁺
Wachstumsmedium für AD 293 (10 % FCS)	DMEM 10 % FCS 1 % P/S
Kulturmedium für AD 293 (2 % FCS)	DMEM 2 % FCS 1 % P/S
Einfriermedium Ad 293	DMEM 10 % FCS 10 % DMSO
6x Agarose Gel-Ladepuffer	30 % Glycerol (v/v) 0,25 % Bromphenol Blau (m/v) 0,05 % SDS (m/v)
Blocking Puffer (iBlock)	0,2 % iBlock (m/v) 0,1 % Tween 20 (m/v) 0,04 % Natriumazid
RIPA Lysepuffer	150 mM NaCl 50 mM Tris 50 mM EDTA 1 % NP40 (v/v) 0,5 % Desoxycholat 10 mM NaF 10 mM Na ₂ -Pyrophosphat

Semi-Dry Transferpuffer	48 mM Tris 39 mM Glycin 20 % Methanol (v/v)
10x TBS	0,25 M Tris 1,5 M NaCl 10 mM CaCl ₂ → pH 7,5 ad 2,5 L mit dest. H ₂ O
10x Anodenpuffer	1 M Tris ad 1 L mit dest. H ₂ O
1x Kathodenpuffer	0,1 M Taurin 0,1 M Tris 0,1 % SDS ad 2,5 L mit dest. H ₂ O
1x TBST	20 % 10x TBS (v/v) ad 0,5 L mit dest. H ₂ O 0,1 % Tween 20 (v/v)
5x SDS-PAGE Probenpuffer (Laemmli-Puffer)	30 % Glycerol (v/v) 50 mM TRIS 10 % SDS (v/v) 250 mM DTT 10 mM EDTA 0,1 % Bromphenol Blau (w/v) → pH 6,8; ad 1 L mit dest. H ₂ O
4 % Paraformaldehyd	4 % PFA (m/v) 4 % Sacharose 1x PBS bei 60 °C erhitzen, pH 7-8

Cäsiumchlorid-leicht	1,25 g/ml
Cäsiumchlorid-schwer	1,45 g/ml

2.1.7 Chemikalien und Reagenzien

Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
ANG II	Merck Calbiochem, Darmstadt
BSA	Sigma Aldrich, München
Cäsiumchlorid	Carl-Roth, Karlsruhe
Chloroform	Sigma Aldrich, München
DC™ Protein Assay Reagent Kit	BioRad, München
DEPC H ₂ O	Carl-Roth, Karlsruhe
DNS Längenstandard 100 bp	Thermo Scientific, Schwert
DTT	Sigma Aldrich, München
EDTA	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ethanol 99 % vergällt mit 1 % Petrolether	Sigma Aldrich, München
Ethidiumbromid	Carl-Roth, Karlsruhe
Formaldehyd (37 %)	Sigma Aldrich, München
Glutaraldehyd (25 %)	SERVA GmbH, Heidelberg
Glycerin	Carl-Roth, Karlsruhe
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
HiPerfect Transfektionsreagenz	Qiagen, Hilden
HCl	VWR, Darmstadt
iBlock Reagenz	AppliedBiosystems, Carlsbad, USA
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad, München
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
iQ SYBR Green Supermix	BioRad, München
KCl	Sigma Aldrich, München
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt
LiCl	Sigma Aldrich, München
Laminin	Sigma Aldrich, München
MeOH	Sigma Aldrich, München

NaCl	Sigma Aldrich, München
Na-Deoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaF	AppliChem GmbH, Darmstadt
NaOH	Sigma Aldrich, München
Na ₂ HPO ₄	AppliChem GmbH, Darmstadt
Na ₂ Pyrophosphat	Merck, Darmstadt
NP40 (Nonidet P40)	Sigma Aldrich, München
(R)-(-)-Phenylephrinhydrochlorid	Sigma Aldrich, München
Phenylephrin	Sigma Aldrich, München
PMSF	SERVA GmbH, Heidelberg
Phosphatase Inhibitor Cocktail 2,3	Sigma Aldrich, München
Polyacryl-Carrier	Molecular Research Center, USA
Proteinmarker (7-175 kDa)	NEB GmbH, Frankfurt am Main
Proteaseinhibitor Complete Mini EDTA- free	Roche, Mannheim
Rothiphorese 10x TBE	Carl Roth, Karlsruhe
Saccharose	Carl-Roth, Karlsruhe
SDS	SERVA GmbH, Heidelberg
Tris	Carl-Roth, Karlsruhe
Triton X100	Sigma Aldrich, München
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Carl-Roth, Karlsruhe
Vectashield® Hard Mounting Medium/Dapi	Linaris Biologische Produkte

2.1.8 Antikörper

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung	Größe	Spezies
anti-GAPDH monoklonal, Klon 6C5 Millipore	1:20000	38 kDa	Maus
anti-GRK2 (C-15) polyklonal, sc-562 Santa Cruz	1:1000	80 kDa	Kaninchen
anti-GRK2 (C-20) polyklonal, sc-18409 Santa Cruz	1:1000	80 kDa	Ziege
anti-Pan-Calcineurin A polyklonal, #2614 Cell Signaling	1:1000	59 kDa	Kaninchen
anti-GSK3 β (H-76) polyklonal, sc-9166 Santa Cruz	1:1000	47 kDa	Kaninchen
anti-phospho-GSK3 β (Ser 9) monoklonal, sc-373800 Santa Cruz	1:1000	47 kDa	Maus
anti-AKT polyklonal, #9272 Cell Signaling	1:1000	60 kDa	Kaninchen
anti-phospho-AKT (Ser 473) monoklonal, 587F11, #4051 Cell Signaling	1:500	60 kDa	Kaninchen IgG
anti-phospho-AKT (Thr 308) monoklonal, C31E5E, #2965 Cell Signaling	1:500	60 kDa	Kaninchen IgG2b

anti- α -Actinin monoklonal, Klon EA-53 Sigma-Aldrich	1:800	100 kDa	Maus IgG1
anti-phospho-ERK1/2 monoklonal, (E10), #9106S Cell Signaling	1:500	42 kDa 44 kDa	Maus IgG1
ERK1/2 polyklonal, #9106S Cell Signaling	1:1000	42 kDa 44 kDa	Kaninchen
anti-G α_q (E-17) polyklonal, sc-393 Santa Cruz	1:30	45 kDa	Maus
anti-NFATc4 (H-74) polyklonal, sc-13036 Santa Cruz	1:30	140 kDa	Kaninchen
anti-NFATc1 (K-18) polyklonal, sc-1149 Santa Cruz	1:30	90/110/140 kDa	Ziege
anti-PI3Ky (H-199) polyklonal, sc-7177 Santa Cruz	1:30	58-68 kDa	Kaninchen

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

Sekundärantikörper	Verdünnung
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor® 680, A-21057 Invitrogen	1:10000
Kaninchen anti-Ziege IgG (H+L) Alexa Fluor® 680, A-21088 Invitrogen	1:10000
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L)	

IRDye800® Rockland	1:10000
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor®488, A-11001 Invitrogen	1:200
Ziege anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa Fluor®568, A-11011 Invitrogen	1:200
Ziege anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor®568, A-11011 Invitrogen	1:200

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Whatmanpapier	GE Healthcare, Freiburg
Deckgläser rund, ø 15 mm	neo lab, Heidelberg
Dialysekassetten Slide-A-Lyzer	Thermo Scientific, Karlsruhe
Duolink II PLA probe anti-Ziege PLUS	Sigma Aldrich, München
Duolink II PLA probe anti-Kaninchen MINUS	Sigma Aldrich, München
Duolink Detection Reagents Green	Sigma Aldrich, München
Eppis 1,5 ml RNase-, DNase-, Pyrogenfrei	nerbe plus, Winsen/Luhe
Eppis 1,5 ml; 2ml	Sarstedt, Nümbrecht
Falcons	Sarstedt, Nümbrecht
Filter	Sartorius, Göttingen
Kanülen	BD, Heidelberg
Konische Zentrifugengefäße, 500 ml	Corning;, Kaiserslautern
Kryoröhrchen, 1,5 ml	neo lab, Heidelberg
Kulturschalen, ø 145 cm, ø 6 cm	greiner bio-one, Frickenhausen
Luziferasesubstrat	Promega, Mannheim
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel, Braunschweig
PCR Gefäße, 0,2 ml	kisker Biotech, Steinfurt

PCR-Platte PP natur 96 Well	nerbe plus, Winsen/Luhe
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
ProGel Tris Glycin 4-20 %	anamed Gele, Groß- Bieberau
Röhrchen, 5 ml 75 x 12 mm	Sarstedt, Nümbrecht
Scraper	greiner bio-one, Frickenhausen
Serologische Pipetten	Sarstedt, Nümbrecht
Sterilfilter 0,45 µm, 0,33 mm Millex GS	Merck Millipore, Darmstadt
Spritzen	BD, Heidelberg
Transfermembranen Porengröße 0,45 µm	Merck Millipore, Darmstadt
6 Well Platten	greiner bio-one, Frickenhausen
12 Well Platten	Corning, Kaiserslautern
96 Well Platten	greiner bio-one, Frickenhausen
Zellsiebe 100 Mikron Nylon Gewebe	neo lab, Heidelberg

2.1.10 Sonstige Materialien

Präparationsbesteck

Zählkammer nach Neubauer

2.1.11 Laborgeräte

Agarose-Gelkammer	Biorad, München
Brutschrank, 37 °C	HEREUS, Kleinostheim
CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Karlsruhe
Elektrophoresegerät	Biorad, München
Feinwaage	Mettler, Gießen
Fluoreszenzmikroskop IX81	Olympus, Hamburg
Kühlzentrifuge 1-15 PK	Sigma Aldrich, München
Konfokales Laserscan Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Luminometer	Berthold, Bad Wildbach
Magnetrührer Model L-71	Labor Brand, Gießen
MyIQ ICycler (PCR-Gerät)	Biorad, München

Nanodrop	Thermo Scientific, Karlsruhe
Odyssey CLX	Licor, Bad Homburg
Pipetboy	neo lab, Heidelberg
pH-Meter MP220	Mettler Toledo, Gießen
SemiDry Blot	Biorad, München
Spektrophotometer U-2000	Hitachi, Mannheim
Sterilwerkbank	Thermo Scientific, Karlsruhe
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	neo lab, Heidelberg
Transilluminator Alpha DigiDoc	Alpha Innotech, Santa Clara, CA, USA
Ultrazentrifuge & Rotor	Thermo Scientific, Karlsruhe
Vortexgerät	neo lab, Heidelberg
Waage EW 6000-1M	Kern, Balingen
Wasserbad E100	Lauda, Lauda-Königshofen
Widefield-Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Wippe	neo lab, Heidelberg

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Isolierung neonataler Rattenkardiomyozyten und kardialer Fibroblasten

Zur Präparation der neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRVCMs) und der kardialen Fibroblasten wurden ein bis zwei Tage alte neonatale Ratten verwendet. Zunächst wurden 20-30 Tiere dekapiert um ihnen anschließend durch Öffnung des Brustkorbes die Herzen zu entnehmen. Die isolierten Herzen wurden in eiskalten HBSS Puffer überführt, von Vorhöfen und Blutgerinnseln entfernt und anschließend in HBSS gewaschen. Nach Zerkleinerung der Herzen wurden die Gewebestücke in ein 50 ml Falcon überführt, das HBSS abgezogen und kurz mit 5 ml Verdaulösung gespült, bevor sie in 10 ml Verdaulösung für 10 min auf einem Schüttler inkubiert wurden. Nach der Inkubationszeit wurde zu der Verdaulösung 10 ml Stopplösung gegeben. Nach Absetzen des unverdauten Gewebes wurde der Überstand in ein neues 50 ml Falcon mit 2,5 ml FCS auf Eis überführt. Der Verdau- und Stoppvorgang wurde achtmal wiederholt, so dass je acht Falcons mit

Zellsuspension vorlagen. Anschließend erfolgte die Zentrifugation für 15 min bei 610 rpm und 4 °C. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Zellpellets wurden mit je 4 ml Kulturmedium homogenisiert, ineinander überführt und mit 10 %-igem Kulturmedium auf 50 ml aufgefüllt. Nach Zugabe von 2 ml DNase wurde die Zellsuspension durch ein Zellsieb auf eine 145 cm große Kulturschale gegeben und für 90 min in einem Inkubator inkubiert. Durch dieses sogenannte *Preplating* wurden die Kardiomyozyten durch dreimaliges Schlagen der Schale auf den Tisch von den bereits adhärenen „Nicht-Myozyten-Zellen“ getrennt. Das Überführen des Überstandes in ein neues Gefäß ermöglichte die Trennung der NRVCMS von den kardialen Fibroblasten. Der Überstand mit den Zellen wurde mit 10 %-igem Kulturmedium auf 50 ml aufgefüllt. Die Zellzahl wurde mittels einer Neubauerkammer bestimmt und in verschiedenen Wellformaten ausgesät (siehe Tabelle 6). Für die Immunfluoreszenzversuche wurde die Zellsuspension zusätzlich mit Laminin (1:200) versetzt, damit eine Adhärenz der Zellen gewährleistet wird. Für die Fibroblastenversuche wurden die adhärenen Fibroblasten mit frischem Medium versetzt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte die Aussaat mit 10 %-igem Kulturmedium in größere Kulturflaschen. Nachdem die Fibroblasten bis zu einer Konfluenz von 70 % herangewachsen waren, wurden die Zellen entsprechend der Versuche ausgesät.

Die Isolierung der Zellen erfolgte unter sterilen Bedingungen. Bei den Kardiomyozyten wurde der Tag der Präparation als Tag 0 bezeichnet. Am Tag 1 erfolgte ein Medienwechsel und an den weiteren Tagen wurden die Zellen auf 0,5 %-iges Medium gesetzt und entsprechend den Versuchen behandelt. Bei den Fibroblasten wurde der Tag der Aussaat in die entsprechende Zellkulturschalen als Tag 0 definiert.

Tabelle 6: Übersicht der verwendeten Zellkulturansätze

Zellkulturschale	Zellzahl	Experiment
6-Well Platte	2x10 ⁶ Zellen/ml	Western Blot
6-Well Platte	1x10 ⁶ Zellen/ml	Real-Time PCR
12-Well Platte	1,5x10 ⁵ Zellen/ml	Immunfluoreszenz
12-Well Platte	3x10 ⁵ Zellen/ml	Luziferase Assay

2.2.1.2 siRNA Behandlung der NRVCMS

Ein zellspezifischer *knockdown* von Zielgenen, wie der GRK2, wurde mittels der siRNA (*small interfering RNA*) durchgeführt. Dabei handelt es sich um kurze doppelsträngige

RNA-Fragmente, die dazu führen, dass komplementäre mRNA bindet und durch bestimmte Proteine abgebaut wird.

Nachdem die NRVCs isoliert und ausplattiert wurden (Tag 0), erfolgte am Tag 2 und Tag 4 die siRNA Behandlung. Je nach Versuchsvorhaben wurden neonatale Rattenkardiomyozyten in unterschiedlicher Dichte ausgesät. Nach dem Absaugen des 10%-igen Mediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend mit 1,1 ml reduziertem Medium (0,5 %) versetzt.

Die Transfektion erfolgte mit dem Transfektionsreagenz HiPerFect. Die eingesetzte Endkonzentration der siRNA betrug $2,5 \times 10^{-5}$ M. Der Transfektionsansatz pro Well betrug dabei 100 μ l. Zu der siRNA wurden 6 μ l HiPerFect gegeben und mit 0,5 %-igem Medium auf 100 μ l aufgefüllt. Der *Mastermix* wurde invertiert und anschließend bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert, bevor dieser auf die Zellen gegeben wurde.

2.2.1.3 Pro-hypertrophe Stimulation der NRVCs und Fibroblasten

Für die Induzierung einer pathologischen Hypertrophie in den NRVCs und kardialen Fibroblasten wurden die GPCR Agonisten Angiotensin II (ANG II) und Phenylephrin (PE) verwendet. Die Stimulation der Zellen erfolgte am Tag 5 nach dem Medienwechsel (0,5 %). Das Gesamtvolumen betrug 1,5 ml. Beide Stimulantien wurden in HPLC Wasser gelöst, PE wurde anschließend noch steril filtriert. Die Endkonzentration von PE war 10^{-4} M und von ANG II 10^{-7} M. Für die quantitative Real-Time PCR und für die Immunfluoreszenzversuche wurden die NRVCs für 24 Stunden stimuliert. Für die Proteinanalyse mittels Western Blot wurden die Zellen für 48 Stunden behandelt. Während dieser Zeit fand kein weiterer Medienwechsel statt.

Die Versuche mit den Fibroblasten erfolgten kongruent zu denen mit den NRVCs.

2.2.1.4 Einsatz von Inhibitoren in den NRVCs

In den Versuchsansätzen, bei denen zusätzlich ein Inhibitor eingesetzt wurde, erfolgte die Zugabe der Inhibitoren 60 min vor der Stimulation. Die Endkonzentration von Lithiumchlorid (LiCl) betrug 10 mM, von Wortmannin 0,1 μ M.

2.2.1.5 Auftauen und Einfrieren der Zelllinie 293

Für die Kultivierung der AD-293 Zellen wurden diese zunächst im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und unmittelbar danach in eine Zellkulturflasche mit frischem Kulturmedium gegeben (siehe 2.2.1.6). Da das Einfriermedium sehr toxisch für die Zellen ist, ist es wichtig, dass sich die Zellen so kurz wie möglich im Einfriermedium befinden. Nach erfolgreicher Adhärenz der Zellen wurde das Medium durch neues ersetzt.

Zum Wegfrieren wurden die Zellen, wie unter 2.2.1.7 beschrieben, trypsiniert und resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension bei Raumtemperatur für 4 min und 310x g abzentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Gefriermedium resuspendiert, in 1,5 ml Kryoröhrchen überführt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Für eine Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in einen Stickstofftank überführt.

2.2.1.6 Kultivierung der Zelllinie AD-293

Die Kultivierung der AD-293 Zellen erfolgte im Wachstumsmedium DMEM (10 %) im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

2.2.1.7 Passagieren der permanenten Zelllinie AD-293 und Primärzellen

Die Zelllinie AD-293 und die Primärzellen (kardiale Fibroblasten) wurden, nachdem sie zu 80-100 % konfluent vorlagen, passagiert. Hierzu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml einer Trypsin-EDTA Lösung versetzt und im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellen von der Zellkulturflasche gelöst hatten, wurde der Verdau mit 7 ml Kulturmedium abgestoppt. Zur Vereinzelung der Zellen wurde die Zellsuspension mehrmals resuspendiert und in einer 1:10 Verdünnung auf neue Kulturschalen bzw. Flaschen verteilt. Die kardialen Fibroblasten wurden ebenso geerntet und in einem Falcon gesammelt. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und entsprechend dem Versuchsansatz ausgesät (Tabelle 6).

2.2.1.8 Adenovirale Infektion der NRVCs

Für entsprechende Überexpressionsversuche wurden die NRVCs, wie in 2.2.1.1 beschrieben, isoliert und in 6 Well-Platten zu je 2 Mio. Zellen/ml ausplattiert. Am Tag 1 erfolgte der Medienwechsel mit frischen 10 %-igen Kulturmedium, am Tag 2 wurden die Zellen auf reduziertes Medium (0,5 %) gesetzt und am Tag 4 erfolgte mit dem Medienwechsel (0,5 %) die Zugabe des Adenovirus (Ad). Dabei wurde der AdGRK2 und AdLacZ mit einer MOI (*Multiplicity of Infection*) von 50 eingesetzt. Bei zusätzlicher Verwendung eines Inhibitors erfolgte die Zugabe des Inhibitors 60 min vor Viruszugabe. Die Ernte der Zellen fand 48 Stunden nach Viruszugabe statt.

Für den NFAT-Luziferase Assay wurde vergleichbar vorgegangen. Hier wurden die Zellen 60 min vor der ANG II Stimulation mit dem NFAT-Luziferase Virus mit einer MOI von 100 transfiziert. Die Ernte der Zellen erfolgte 24 Stunden nach ANG II Stimulation (10⁻⁷ M).

2.2.1.9 Luziferase Assay in NRVCs

Das NFAT-Luziferase Konstrukt enthält 9 NFAT-Bindungsstellen, gefolgt von einer Luziferase kodierenden DNS Sequenz, deren Transkription durch den NFAT Promotor reguliert wird. Wird NFAT aktiviert, folgt die Translokation in den Zellkern der Kardiomyozyten. Dort werden die NFAT Bindungsstellen besetzt und führen so über den NFAT Promotor die Expression des Luziferaseenzym aus. Die Expression der Luziferase wird in Abhängigkeit von der NFAT-Aktivität reguliert. Für die Luziferase Experimente in Kardiomyozyten wurden die NRVCs, wie unter 2.2.1.8 beschrieben, in 12 Well Platten (3×10^5 Zellen/ml) ausplattiert. Nach der Lyse der NRVCs in 100 μ l Ripapuffer wurden die Proteine isoliert und die Messung der Luziferaseaktivität vorgenommen. Hierzu wurden im Assay 20 μ l des Zellysats und 25 μ l des Luziferasesubstrats Luziferin eingesetzt. Zur Messung der Aktivität wurde das Luminometer verwendet.

2.2.1.10 Immunfluoreszenzfärbung in NRVCs

Für die Zytoskelettfärbung in den NRVCs wurden 150.000 Zellen/ml in 12 Well Plattenformat ausgesät und wie in 2.2.1.2 und 2.2.1.3 beschrieben, entsprechend behandelt. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Fixierung der Zellen mit 500 μ l 4 %-igem PFA für 10 min. Nach der Fixierung und dreimaligem Waschen mit PBS für je 5-10 Minuten wurden die Zellen mit 0,2 % Triton X permeabilisiert. Danach erfolgten erneut drei Waschschritte für je 10 min. Die Anfärbung des Zytoskeletts erfolgte mit dem Primärantikörper α -Actinin (1:800) über Nacht bei 4 °C. Am nächsten Tag wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen und mit dem entsprechenden Sekundärantikörper (1:200) für drei Stunden bei 4 °C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS (+0,002 %-iges TritonX) erfolgte die Eindeckelung im *Mounting* Medium. Die Untersuchung und Aufnahme der Actinfärbung erfolgte an einem konfokalen Mikroskop.

2.2.1.11 Duolink Assay

Der Duolink Assay *in situ* ist eine Nachweismethode bei den Interaktionen von endogenen Proteinen, wie zum Beispiel Ligandenbindungen von Membranproteinen und intrazellulären Proteinen mittels Immunfluoreszenz visualisiert werden können.

Die Methode basiert auf der Bindung eines primären Antikörperpaares, welches spezifisch am zu untersuchenden Protein bindet. Befinden sich diese Proteine bzw. Antikörper in räumlicher Nähe zueinander, kann mit Hilfe von PLA Sonden (Zweitantikörper) und DNS Amplifizierung die Interaktion visuell durch Zugabe von Fluoreszenzsonden sogenannten „Dots“ dargestellt werden. Die anschließende Quantifizierung erfolgte nach

mikroskopischer Aufnahme anhand der Auszählung der einzelnen fluoreszierenden „Dots“. Das Prinzip des Duolink Assays ist in Abbildung 8 dargestellt.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Duolink Assay basierend auf dem Herstellerprotokoll leicht modifiziert. Die Antikörper wurden in einer Konzentration von 6,7 µg/ml eingesetzt. Die Aktinfärbung erfolgte vor der Durchführung des Duolink Assays. Dabei wurde der Primärantikörper (1:800) für drei Stunden und der Sekundärantikörper (1:200) für eine Stunde inkubiert (2.2.1.10).

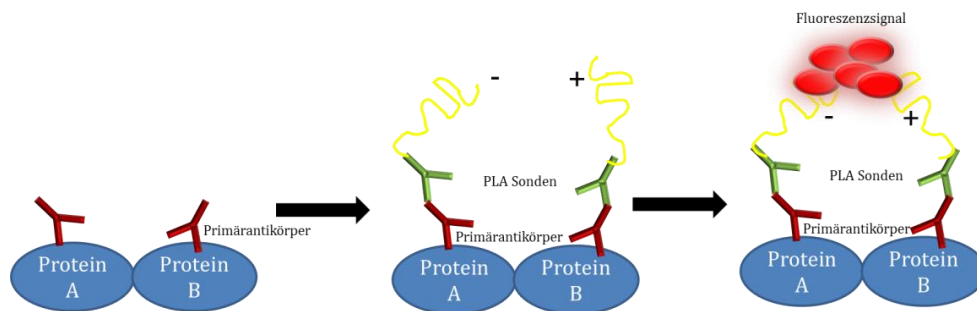


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Duolink Assay.

2.2.2 Virologische Methoden

2.2.2.1 Produktion rekombinanter Adenoviren

Für die Überexpressionsversuche von GRK2 und für die Untersuchung der NFAT Translokation wurden Adenoviren verwendet. Adenoviren sind in der Lage Kardiomyozyten zu infizieren und somit klonierte Gene in den infizierten Zellen zu exprimieren. Die verwendeten Adenoviren sind E1 und E3 deletiert ($\Delta E1/\Delta E3$) und demzufolge replikationsdefizient. Allerdings bleiben sie weiterhin infektiös. Ausgehend von einem Virusstock ($\sim 1 \times 10^7$ pfu/ml) wurde die Virusproduktion im großen Maßstab, der sogenannten *Large Scale Virus Preparation*, durchgeführt. Eine erfolgreiche Infektion lässt sich mit dem Eintritt des zytopathischen Effektes (CPE) darstellen. Das bedeutet, dass es während der Virusreplikation und Produktion durch einen lytischen adenoviralen Infektionszyklus zum Absterben der Zellen kommt und somit neue Partikel freigesetzt werden. Der zytopathische Effekt zeigte sich, je nach Virusqualität, bereits 24 Stunden nach Infektion hauptsächlich in der Abkuglung der virusinfizierten Zellen. Bis zur Lyse der Zellen waren die Adenoviren in den Zellen eingeschlossen.

Für die Produktion der Adenoviren wurde die humane embryonale Nierenkarzinom-Zelllinie AD-293 verwendet, da diese im Vergleich zu den HEK-293 eine bessere Adhärenz aufweist. Die Aussaat der AD-293 Zellen erfolgte in T75 Flaschen. Bei einer Konfluenz von ca. 80 % wurden die Zellen mit 10^7 pfu/ml oder mit einer Viruslösung von 2-5 µl infiziert.

Sowohl für die Kultivierung als auch für die Infektion wurde das Wachstumsmedium (10 % FCS) verwendet. Parallel zu der AD-293 Zellaussaat in den T75 Flaschen wurden 20 Zellkulturschalen (à 175 cm²) mit den AD-293 Zellen ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 70 % kultiviert (37 °C, 5 % CO₂). Nach 24-30 Stunden konnten die infizierten AD-293 Zellen geerntet werden. Dazu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit 3 ml Trypsin versetzt und mit 7 ml Medium abgestoppt. Der geerntete Zellansatz wurde in einem 50 ml Falcon gesammelt und bei 1200 rpm und 4 °C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit frischem Medium auf ca. 5 ml aufgefüllt und resuspendiert. Anschließend folgten 3 Frier-Tau-Zyklen, wodurch die Zellen lysiert und der Virus aus den Verpackungszellen freigesetzt wurde. Hierzu wurde die Zellsuspension abwechselnd in flüssigem Stickstoff eingefroren und umgehend danach in 37 °C Wasserbad aufgetaut. Nach dem Zellaufschluss und Freisetzung der Viren erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 4 °C und 4500 rpm um die Zelltrümmer abzuzentrifugieren. Im Überstand befand sich der konzentrierte Virusansatz, der in ein neues Falcon überführt wurde und mit 20 ml Medium resuspendiert wurde. Auf den bereits zu 80 % konfluenten Zellrasen in den Kulturschalen wurde je 1 ml der Viruslösung gegeben. Nach Eintreten der Lyse der AD-293 Zellen, nach der Transfektion mit dem Virus, erfolgte wie bereits beschrieben die Ernte der infizierten Zellen. Der virushaltige Überstand (ca. 15 ml) wurde anschließend bei -80 °C gelagert.

2.2.2.2 Aufreinigung der Adenoviren

Die produzierte Virussuspension besteht neben den funktionellen viralen Partikeln aus defekten Viruspartikeln und Zelltrümmerresten. Um eine möglichst reine Viruslösung mit infektiösen Partikeln zu erhalten, wurde die Virussuspension über einen Cäsiumchlorid-Gradienten aufgereinigt. Hierfür wurden *quick Seal* Zentrifugenröhrchen zunächst mit 3 ml der schweren Cäsiumchloridlösung (Dichte 1,4 g/cm³) befüllt und mit 3 ml der leichten Cäsiumchloridlösung (Dichte 1,2 g/cm³) unterschichtet. Anschließend wurden ca. 2-3 ml der Virussuspension vorsichtig auf die leichte Cäsiumchloridlösung gegeben. Der Gradient wurde für 4 Stunden bei 4 °C und 220000 g zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation entstandene Bande mit den infektiösen Viruspartikeln wurde eluiert und erneut über einen Cäsiumchlorid-Gradienten aufgereinigt (Abbildung 9). Die Zentrifugationszeit der zweiten Aufreinigung betrug mindestens 18 Stunden. Im nächsten Schritt wurden die Cäsiumchloridreste durch Dialyse aus der Viruslösung entfernt. Für die Dialyse wurde der Virus in Dialysekassetten (*Slight-a-lyzer membrane*) gegeben und mit 1x PBS Dialysepuffer über Nacht inkubiert. Nach der Dialyse wurden je 100 µl des Virus aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

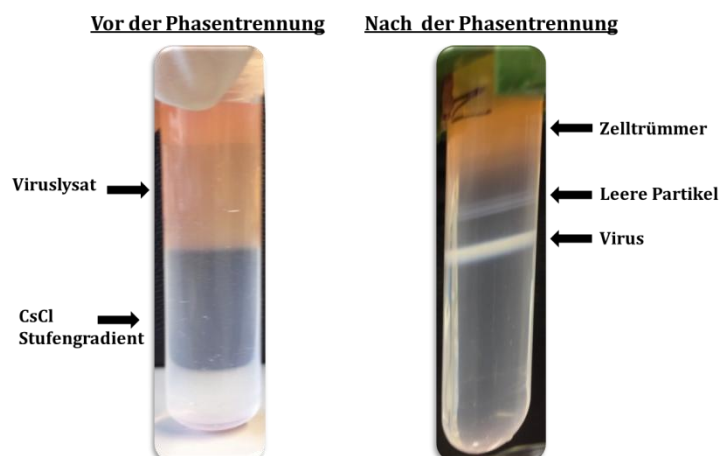


Abbildung 9: Aufreinigung der Adenoviren. Darstellung des CsCl-Gradienten vor und nach Zentrifugation.

2.2.2.3 Titerbestimmung mittels TCID₅₀

Zur Bestimmung des adenoviralen Titers wurde der *tissue culture infectious dose 50* (TCID₅₀) Test angewandt. Dieser Test basiert auf der Ausprägung des CPE in 293A Zellen nach Infektion einer Verdünnungsreihe des Adenovirus. Hierzu wurden die 293A Zellen standardgemäß in 96 Well Platten in einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well und jeweils ein Volumen von 100 µl in 2 % DMEM ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch neues Medium (je 90 µl) ersetzt. Direkt im Anschluss erfolgte die Zugabe des Virus mit 10 µl. Da es sich um eine Verdünnungsreihe handelte, wurden aus der ersten Wellreihe 10 µl der Viruslösung in die nächste Reihe pipettiert. So entstand eine sequentielle Verdünnungsreihe. Jeweils 8 Wells wurden mit derselben Virenkonzentration infiziert. Zwei weitere Spalten wurden nicht infiziert und stellten die Negativkontrolle dar. Nach der Infektion wurde die Platte bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach 10 Tagen erfolgte die Auswertung durch Auszählung der CPE positiven Wells. Dabei wurden die infizierten Zellen mit den Negativkontrollen verglichen. Typische Infektionszeichen sind große Löcher in dem sonst noch intakten Zellrasen. Auch kleine Bereiche in denen ein CPE zu finden war, wurden als positiv bewertet. Anschließend erfolgte die Berechnung des Virustiters.

Die Berechnung fand nach folgender Formel statt:

$$T=10^{1+d(S-0,5)}$$

Dabei gilt:

d= log 10 (Verdünnungsfaktor)

S= Anzahl der CPE-Wells/Anzahl der Wells gesamt in einer Spalte

Zur Umrechnung des TCID-Titer in *Plaque forming unit* (pfu) gilt:

$$\text{Pfu/ml} = \text{TCID}_{50}/\text{ml} * 0,7$$

2.2.2.4 Replikationstest der Adenoviren

Die Replikationskompetenz der Adenoviren wurde ebenfalls in AD-293 Zellen durchgeführt. Fünf T75 Flaschen wurden mit 293A Zellen ausgesät und bei 37 °C im CO₂-Brutschrank inkubiert. Bei einer Konfluenz von 70 % wurden die Zellen beimpft. Für die Kultivierung der Zellen wurde DMEM (10 % FCS) benutzt. Für die anschließenden Infektionen bzw. Virusreplikation wurde DMEM (2 % FCS) verwendet.

Nach folgendem Schema wurden die 5 Flaschen beimpft:

Flasche 1: MOCK Kontrolle (Inokuliert mit 100 µl Medium, keine Viren vorhanden)

Flasche 2: Gentherapievektor (Adenovirus) unverdünnt (100 µl, >10⁸ Virionen)

Flasche 3: Gentherapievektor (Adenovirus) verdünnt (100 µl, 1:100)

Flasche 4: AV5-Virus (100 µl, 10⁴ TCID, 1:100 Verdünnung)

Flasche 5: Gemisch aus AV5 und Adenovirus-Gentherapievektor

Die beimpften Zellen wurden für drei Tage inkubiert und regelmäßig bezüglich des cytopathischen Effekts (CPE) beobachtet. Nach drei Tagen wurden die Flaschen bei -80 °C für drei Stunden eingefroren und anschließend für ca. 30 min im CO₂-Inkubator aufgetaut. Anschließend wurden 200 µl aus Passage 1 entnommen und in eine neue konfluent bewachsene Zellkulturflasche gegeben (Passage 2) und erneut für 3 Tage inkubiert. Dieser Vorgang wurde wiederholt (Passage 3). In Passage 3 erfolgte die CPE Auswertung. Entscheidend hierbei war, dass in Flasche 1, 2 und 3 keine CPE beobachtet wurde. Die Flaschen 4 und 5 zeigten CPE. Der Gentherapievektor war somit nicht replikationskompetent.

2.2.3 Molekularbiologische Methoden

2.2.3.1 RNA-Extraktion

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus den NRVCMS erfolgte mit dem Trizolreagenz, basierend auf dem einstufigen RNA-Isolations-Protokoll von Chomczynski und Sacchi [120]. Nach Isolierung der Gesamt-RNA und Resuspension in RNase-freiem Wasser wurde der Gesamt-RNA-Gehalt ermittelt. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA-Proben erfolgte mittels des Nano Drop-Spektrophotometers. Der Absorptionsquotient

A_{260}/A_{280} lag bei einer reinen RNA bei 1,9-2,1. Absorptionsquotienten von $A_{260}/A_{280} < 1,7$ und $A_{260}/A_{230} > 2,2$ waren auf Verunreinigungen in der isolierten Probe zurückzuführen.

2.2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Für die Qualitätskontrolle der RNA-Isolierung und zur Untersuchung der Primerspezifität der quantitativen Real-Time PCR wurden sowohl die isolierten RNA-Fragmente als auch die amplifizierten DNA-Fragmente entsprechend ihrer Größe aufgetrennt.

Für die Analyse der RNA-Qualität und der Analyse der quantitativen Real-Time PCR Produkte wurde ein 2 %-iges Agarosegel hergestellt und mit 1x TAE Puffer aufgeköcht und mit 2 µl/50 ml Ethidiumbromid versetzt. Nachdem die Agarose fest geworden war, fand die Beladung mit den RNA-Proben und den DNA/RNA Größenstandard statt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei einer angelegten Spannung von 130 Volt. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde am Transilluminator unter UV-Licht dokumentiert.

2.2.3.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Bei der reversen Transkription verläuft die Transkription in umgekehrter Richtung. Hierbei dient die RNA als Matrize und wird in DNS umgeschrieben. Die so entstandene DNS ist komplementär zu der verwendeten RNA-Matrize. Nach erfolgreicher Isolierung der Gesamt-RNA und der Konzentrationsbestimmung erfolgte im weiteren Versuchsschritt die Transkription der RNA in komplementäre DNA (cDNA). Hierbei wurde das Transkriptionskit *iScript cDNA Synthese Kit* nach dem Protokoll des Herstellers verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurde 1 µg/µl an Gesamt-RNA eingesetzt und entsprechend dem Herstellerprotokoll erfolgte die reverse Transkription der RNA für 45 min im Thermocycler. Das Temperatur-Zeit-Profil ist in der Tabelle 7 dargestellt. Nach erfolgreicher Umschreibung wurde die cDNA für weitere Vorhaben bei -20 °C gelagert.

Tabelle 7: Temperatur-Zeit-Profil der reversen Transkription

Zeit	Temperatur
5 min	25 °C
30 min	42 °C
5 min	85 °C
∞	4 °C

2.2.3.4 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) ermöglicht durch Vergleich der Amplifikationsmengen einer Gensequenz, rückwirkend quantitative Aussagen über die Genexpression in der Probe abzuleiten. Die in dieser Arbeit verwendete Methode beruht auf der Messung der Fluoreszenz einer Chemikalie namens SYBR Green. Durch die Anregung mit ultraviolettem Licht emittiert SYBR Green ein spezifisches Lichtsignal, wenn es mit der DNS interkaliert. Bei jedem Reaktionszyklus der PCR wird die aktuelle Fluoreszenz bestimmt, die direkt proportional zu der Menge des gebildeten PCR Produktes ist. Die Versuchsauswertung erfolgt anhand des *Cycle Threshold-Wertes* (Ct-Wert). Dieser Wert gibt die Anzahl der Zyklen an, bei der das Fluoreszenzsignal des Amplifikationsproduktes das erste Mal signifikant über das unspezifische Hintergrundsignal ansteigt und somit ein spezifisches und messbares PCR-Produkt kennzeichnet. Für die Quantifizierung wurde das Verhältnis der Zielmoleküle zur Anzahl der ubiquitär endogenen gene (CSQ) bestimmt. Die Auswertung erfolgte unter der Berechnung der Δ Ct-Werte [121].

Bevor ein Primer für die quantitative Real-Time PCR eingesetzt wurde, erfolgte eine sogenannte Primervalidierung. Hierzu wurden die entsprechenden cDNA-Proben von NRVCs über einen Temperaturgradienten von 54-94 °C getestet.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1 µg cDNA und 3 µM der spezifischen Primer für die quantitative Real-Time PCR eingesetzt und mit dem iQ SYBR Green Supermix Kit nach dem Herstellerprotokoll durchgeführt. Der Zyklenablauf der quantitativen Real-Time PCR ist in Tabelle 8 dargestellt. Die Annealingtemperatur der verwendeten Primer lag bei 57 °C.

Tabelle 8: Übersicht des quantitativen Real-Time PCR Programms

Zyklus	Schritt	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
1	1	95 °C	3 min	1x
2	1	95 °C	10 Sek.	40x
	2	57 °C	45 Sek.	
	3	72 °C	30 Sek.	
3	1	95 °C	1 min	1x
4	1	55 °C	1 min	1x
5	1	55 °C	10 Sek.	80x
6	1	4 °C	∞	

2.2.4 Proteinbiochemische Methoden

2.2.4.1 Proteinisolierung und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Proteinisolierung wurden die NRVCMS in je 50 μl Ripapuffer (Phosphataseinhibitorcocktail 1, 2 und Proteaseinhibitor) mit Hilfe eines Zellschabers von der Platte gelöst und lysiert. Um eine ausreichende Proteinkonzentration zu bekommen, wurden 2 Wells à 2 Mio. Zellen/ml, gepoolt. Nach Überführung des Zelllysats in ein Eppendorf-Reagenzgefäß wurde das Zelllysats zur Pelletierung von Zelltrümmern bei 4 °C und 14000 rpm für 15 min abzentrifugiert. Der Überstand mit den enthaltenden Proteinen wurde in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reagenzgefäß überführt. Aus dem Überstand erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration nach Lowry *et al.* mit Hilfe des „RC DC Protein Assays“ durch photometrisches Auslesen der Farbumschlagsintensität bei 750 nm [122]. Nach Messung der Absorption wurde auf Grund der unterschiedlichen Ausgangskonzentrationen die Proteinkonzentration auf dieselbe Konzentration (mind. 3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) mit dem RIPA-Lysepuffer eingestellt.

2.2.4.2 SDS-Gelelektrophorese

Im Anschluss an die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte die Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Es wurde mindestens 60 μg Protein eingesetzt, mit Dithiothreitol (DTT)-haltigem Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 85 °C denaturiert. Direkt im Anschluss erfolgte die Auftragung der Proben und des Längenstandards auf ein Tris-Glycerin-Gradientengel (4-20 %). Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgte in der Gelkammer bei 100 V. Da die zu trennenden Moleküle eine Ladung besitzen, wandern sie beim Anlegen einer Spannung durch das Polymer und werden abhängig von der Ladung, Größe, Molmasse und Beschaffenheit des Trennmediums elektrophoretisch aufgetrennt.

2.2.4.3 Western Blot

Zur Detektion der gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurde das Western Blot Verfahren herangezogen. Hierbei wurden die Proteine mittels des *Semi-Dry* Verfahrens unter Einfluss eines elektrischen Feldes auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid) übertragen.

Für den Proteintransfer wurde die Semi-Dry Blot Kammer verwendet. Zuerst wurden zwei Whatmanpapierstücke, sowie eine PVDF-Membran in der Größe des zu analysierenden Tris-Glycin Proteingels zugeschnitten. Das Filterpapier und das Gel, welches zuvor aus der

Gelapparatur entnommen wurde, wurde in Semi-Dry Puffer für 1-2 min auf dem Schüttler inkubiert. Die PVDF-Membran wurde zuvor für ein paar Minuten in Methanol äquilibriert, bevor sie ebenfalls im Semi-Dry Puffer inkubiert wurde. Im Anschluss daran erfolgt der Aufbau des Western Blots nach dem „Sandwich-Prinzip“. Dazu wurde auf die Anode der Semi-Dry-Blot-Kammer zuerst ein in Transfer Puffer getauchtes Whatmanpapier, gefolgt von einer äquilibrierten PVDF-Membran, gelegt. Als weitere Schichten folgten das Tris-Glycin Proteingel, ein weiteres befeuchtetes Whatmanpapier und schließlich die Kathodenplatte. Der Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 15 V bei einer maximalen Stromstärke von 5,5 mA/cm² für 48 min. Auf Grund der senkrecht zur Gelebene angelegten Spannung und der negativen Ladung der Proteine wandern diese in Richtung der Anode und damit in das Netz der PVDF Membran.

Im Anschluss daran wurden das Tris-Glycin Proteingel und die PVDF-Membran der Blotting-Apparatur entnommen. Die PVDF-Membran wurde für die darauffolgende Immundetektion zunächst in Blockingpuffer (iBlock) für mindestens 1 h bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Dies verhindert, dass offene unspezifische Bindungsstellen der Membran verschlossen werden und die Proteine zudem in ihrer Position fixiert werden.

2.2.4.4 Immundetektion

Nach der Membranblockierung erfolgte die Inkubation mit dem in Blockingpuffer verdünnten Erstantikörper bei Raumtemperatur über Nacht auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit PBST gewaschen, um ungebundene Antikörper zu entfernen. Danach erfolgte die Inkubation für eine Stunde bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz mit dem in Blockingpuffer verdünnten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper. Nach anschließendem dreimaligem Waschen der Membran mit TBST erfolgte die Detektion der Fluoreszenz mittels *Odyssey Infrared Imaging Systems*.

2.2.5 Statistik

Die statistische Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe des Programms GraphPad Prism (Version 5.0). Zur Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde beim Vergleich von zwei Gruppen der Student's t-Test angewandt. Wurden mehrere Gruppen hinsichtlich der Signifikanz getestet, so wurde der One-Way ANOVA mit anschließendem Turkey-Test durchgeführt. Die in den Graphiken dargestellten Fehlerbalken entsprechen, soweit im Abbildungstext nicht anders angegeben, dem Standardfehler (SEM).

3 Ergebnisse

Beobachtungen an Vorversuchen mit GRK2 *knockout* (GRK2KO) Mäusen bei denen, nach einer transversalen Aortenkonstriktion (TAC), ein im Trend verbessertes Gesamtüberleben und eine signifikant verringerte myokardiale Hypertrophie verzeichnet werden konnten, begründen die nähere Untersuchung von GRK2 in einem *in vitro* Modell an isolierten neonatalen Rattenkardiomyozyten (NRVCs) (Abbildung 6). Zur Modulation der GRK2 wurden zwei Versuchsansätze herangezogen, zum einen ein siRNA vermittelter *knockdown* und zum anderen die Überexpression von GRK2 durch Adenoviren.

a) Analyse verschiedener siRNA Sequenzen zum gezielten GRK2 *knockdown*

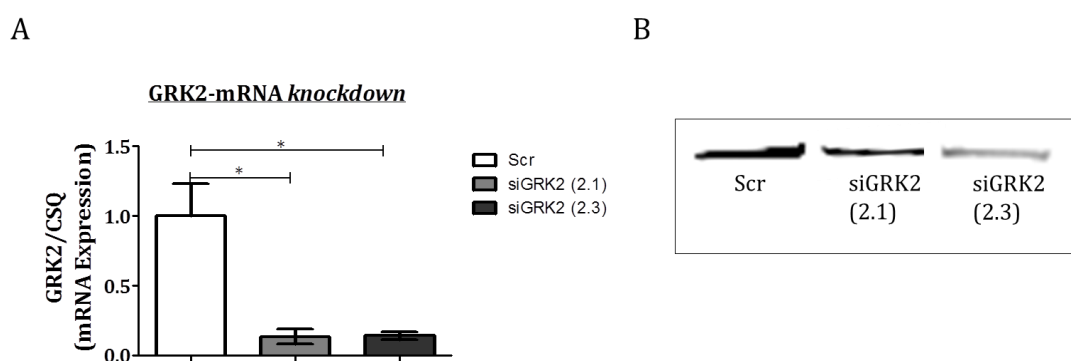


Abbildung 10: Analyse verschiedener siRNA Sequenzen zum gezielten GRK2 *knockdown* in NRVCs. Vergleich zwei verschiedener siRNA Sequenzen unter Basalbedingungen. NRVCs wurden zweimal mit 5 nM siRNA für jeweils 48 h transfiziert. (A) Quantitative Auswertung der GRK2-mRNA Expression nach siRNA Behandlung mittels quantitativer Real-Time PCR. (B) Grafische Darstellung der Herunterregulation von GRK2 mittels Western Blot. Die GRK2-mRNA Expression wurde gegen die Expression des Referenzgens CSQ normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); $* < 0,05$; $n = 2$.

Um eine signifikante Herunterregulation von GRK2 auf Genexpressions- und Proteinebene in den NRVCs zu erzielen, wurden zunächst zwei verschiedene siRNA Sequenzen für GRK2 getestet. Verglichen wurde die siGRK2 (2.1) und die siGRK2 (2.3) mit der *Scrambled* siRNA (Scr). Beide siGRK2 Sequenzen zeigten auf mRNA Ebene einen GRK2 *knockdown* von 70 %. (Abbildung 10 A). Dabei unterlag die GRK2-mRNA Expression mit siGRK2 2.1 größeren Schwankungen. Auf translationaler Ebene konnte eine stärkere Inhibition der GRK2 Expression mit der siGRK2 2.3 erzielt werden (Abbildung 10 B). Die GRK2 *knockdown* Versuche wurden daher mit der siGRK2 2.3 durchgeführt.

b) Adenovirale Überexpression der kardialen GRK2

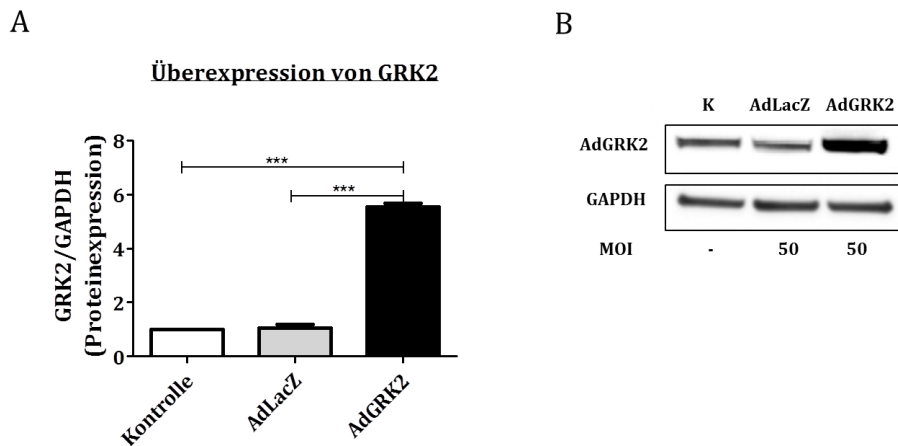


Abbildung 11: Adenovirale Überexpression von GRK2. Die NRVCs wurden mit AdGRK2 und AdLacZ (MOI 50) für 48 h transduziert. Nach Proteinisolierung erfolgte die quantitative Auswertung der GRK2 Überexpression auf Proteinebene mittels der Western Blot Analyse. Als Kontrolle dienten zum einen nicht transduzierte Zellen und zum anderen Zellen, die mit einem Kontrollvirus (AdLacZ) transduziert wurden. (A) Grafische Darstellung der quantitativen Auswertung von GRK2. (B) Qualitative Darstellung eines repräsentativen Blots. Die Expression von GRK2 wurde in der quantitativen Analyse gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die Normierung der transduzierten Probe erfolgte an AdLacZ. Statistik: One way Anova (Prism); *** $<0,001$; n=2.

Eine gezielte Überexpression von GRK2 erfolgte mit Hilfe des adenoviralen Gentransfers (AdGRK2). Die Expression der β -Galaktosidase diente hierbei als Kontrolle (AdLacZ). Wie densitometrisch ermittelt, konnte mit einer MOI von 50 eine 5-fache GRK2 Überexpression beobachtet werden (Abbildung 11). Ein Anstieg in der GRK2 Proteinexpression durch die Virusgabe per se war nicht zu beobachten. Dementsprechend wurden die NRVCs mit einer MOI von 50 in den nachfolgenden Versuchen transduziert.

Teil 1

3.1 Die Untersuchung der kardialen GRK2 in der pathologischen Hypertrophie

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die GRK2 Expression sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene in pro-hypertrophen NRVCMs untersucht. Dazu wurden isolierte primäre Kardiomyozyten neonataler Ratten (1-2 Tage alt) mit Phenylephrin (PE), einem α 1-adrenergen Rezeptor-Agonisten als Mediator der pathologischen Hypertrophie, und mit Angiotensin II (ANG II) als nicht-adrenergen pro-hypertrophen Agonist stimuliert [66, 123]. Die zusätzliche Transfektion der Kardiomyozyten mit einer siGRK2 und die Transduktion mit AdGRK2 sollte die Rolle von GRK2 in der pathologischen Hypertrophie determinieren, indem die pro-hypertrophen Parameter, wie Zellgröße und fetale Genexpression nach GRK2 Modulation untersucht wurden.

3.1.1 Die GRK2 Expression unter pro-hypertrophen Bedingungen

In *in vivo* Vorversuchen wurde in hypertrophen Mäuseherzen eine erhöhte GRK2-mRNA Expression gemessen. Um diese Beobachtung *in vitro* zu bekräftigen, wurden NRVCMs mit PE (10^{-4} M) und ANG II (10^{-7} M) stimuliert. Für die Analyse der GRK2-mRNA Expression wurden die Zellen 24 Stunden nach Stimulation mit den Agonisten geerntet. Für die Untersuchung der GRK2 Proteinexpression erfolgte, 48 Stunden nach Stimulation der NRVCMs, die Termination des Versuches. Im Hinblick auf nachfolgende Versuche wurden die Zellen 24 Stunden vor Zugabe der pro-hypertrophen Agonisten mit einer Kontroll-siRNA behandelt (Scr).

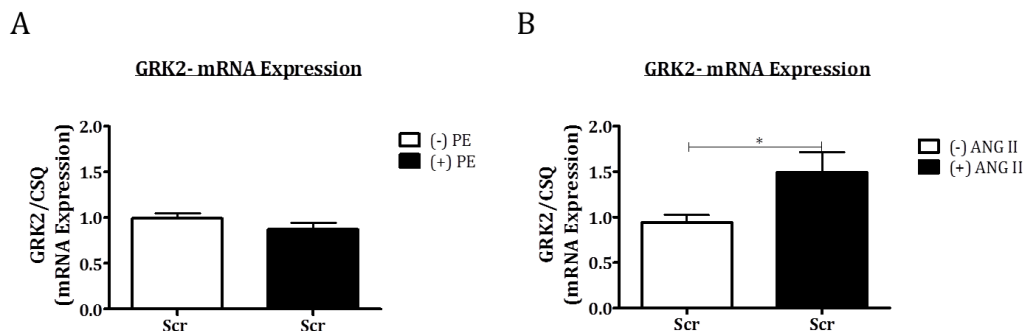


Abbildung 12: GRK2-mRNA Expression unter pro-hypertropher Stimulation *in vitro*. NRVCs wurden nach Transfektion mit Scr (5 nM) für 24 h mit PE (10^{-4} M) und ANG II stimuliert (10^{-7} M). (A) Auswertung der mittels quantitativer Real-Time PCR analysierten GRK2-mRNA Expression nach Behandlung der NRVCs mit Scr und PE und (B) nach Behandlung mit Scr und ANG II. Nicht stimulierte Kardiomyozyten dienten jeweils als Kontrolle. Die Expression der GRK2-mRNA wurde gegen die Expression des Referenzgens CSQ normalisiert und in Relation zu der normalisierten Expression nicht stimulierter Zellen (Scr Kontrolle) gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: t-Test (Prism); * $<0,05$; PE: n=12, ANG II: n=7.

Bei der Stimulation der NRVCs mit PE wurde keine Zunahme in der GRK2-mRNA Expression beobachtet. Der Anstieg der GRK2-mRNA blieb hier auf dem Basalniveau, wohingegen nach Stimulation mit ANG II eine signifikante Hochregulation (~ 23 %) der GRK2-mRNA in den NRVCs verzeichnet werden konnte (Abbildung 12). Eine Zunahme der GRK2-mRNA, wie sie im Modell der transversalen aortalen Konstriktion (TAC) bei Mäusen beobachtet wurde, konnte *in vitro* bestätigt werden (siehe Kapitel 1.4).

Anders als auf mRNA Ebene konnte im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen nach PE Stimulation ein Anstieg von 29 % in den GRK2-Proteinlevels gemessen werden (Abbildung 13 A). Ebenso wurde durch ANG II eine Zunahme der GRK2 Proteinexpression von 29 % festgestellt (Abbildung 13 B).

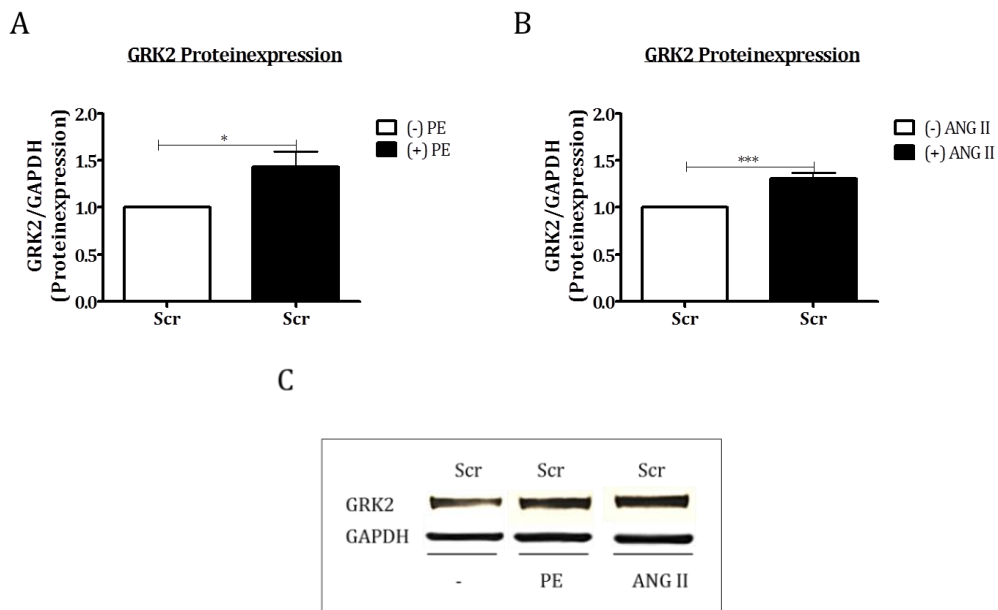


Abbildung 13: GRK2 Proteinexpression unter pharmakologischer pro-hypertropher Stimulation *in vitro*. NRVCs wurden mit hypertrophen Agenzien für 48 h nach Scr siRNA Transfektion stimuliert. (A) Auswertung der mittels Western Blot analysierten GRK2 Proteinexpression nach Behandlung der NRVCs mit Scr (5 nM) und PE (10^{-4} M) und (B) nach Behandlung mit Scr (5 nM) und ANG II (10^{-7} M). Nicht stimulierte Kardiomyozyten dienten jeweils als Kontrolle. (C) Repräsentativer Western Blot der GRK2 Proteinexpression. Die Expression der GRK2 wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert und in Relation zur normalisierten Expression nicht stimulierter Zellen gesetzt. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: t-Test (Prism); * $<0,05$, *** $<0,001$; PE: n=10, ANG II: n=11.

3.1.2 GRK2 und die pathologische Hypertrophieantwort

Pro-hypertrophe Agenzien wie PE und ANG II führen nicht nur zu zellulären Veränderungen, sondern beeinflussen ebenso den Phänotyp der Zellen [66]. Welchen Einfluss GRK2 auf die pro-hypertrophe Zellantwort hat, sollte im Folgenden untersucht werden. Charakteristische Ausleseparameter waren hierbei die Größenveränderung der Kardiomyozyten und die Expression des fetalen Genprogramms. Die Untersuchung einer möglichen Modulation von GRK2 auf die pathologischen Veränderungen in den Kardiomyozyten erfolgte zum einen durch den Einsatz einer gegen GRK2 gerichteten siRNA und zum anderen durch die adenovirale Überexpression von GRK2.

Für die GRK2 *knockdown* Versuche wurden die NRVCs mit siRNA behandelt und anschließend mit den pharmakologischen Agenzien PE und ANG II stimuliert. Die Terminierung des Versuches erfolgte 24 Stunden nach Zugabe der Agonisten. Für eine erfolgreiche GRK2 Überexpression wurden die NRVCs mit einer MOI von 50 transduziert. Der Versuch wurde 48 Stunden nach Viruszugabe beendet und die Größe der

NRVCMs mit Hilfe der Immunfluoreszenz bestimmt. Die Analyse der mRNA Expression der fetalen Gene ANP, BNP und β -MHC erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR.

3.1.2.1 Einfluss des GRK2 *knockdowns* auf die Kardiomyozytengröße unter prohypertropher Stimulation

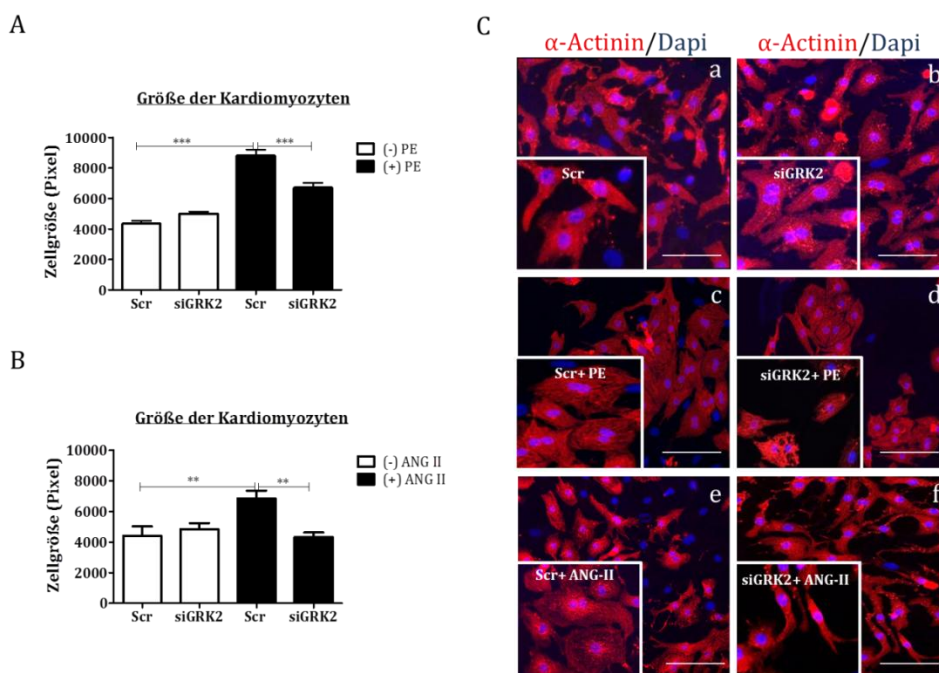
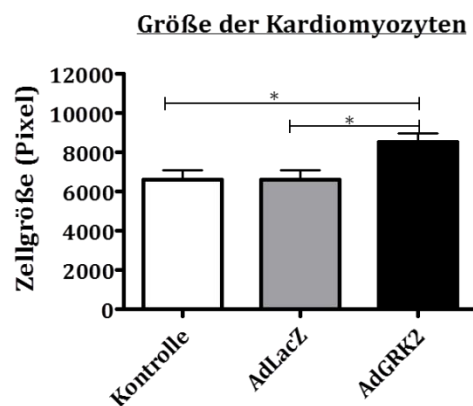


Abbildung 14: Veränderung der Kardiomyozytengröße unter PE und ANG II Stimulation nach Herunterregulation von GRK2. Nach Transfektion der NRVCMS mit Scr und siGRK2 (5 nM) erfolgte die Stimulation mit PE (10^{-4} M) und ANG II (10^{-7} M) für 24 h (repräsentative Bilder in Abbildung C). Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen α -sarkomerisches Actinin (rot). Die Färbung des Nukleus erfolgte mit DAPI (blau). Nicht stimulierte Kardiomyozyten dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden mikroskopisch in 20-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe von Sigma Scan durch Messung der Zellgröße in Pixel quantitativ ausgewertet (Abbildung A und B). Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); $** < 0,01$, $*** < 0,001$; PE: n=4; ANG II: n=5 mit je 80-100 Zellen pro Ansatz.

Die Zunahme der Kardiomyozytengröße ist ein physiologischer Parameter für die *in vitro* Untersuchung der Hypertrophie [22, 23]. Die Zugabe von PE bewirkte eine Größenzunahme der Zellen um 100 % (Abbildung 14 A). In den ANG II behandelten Zellen wurde eine Zunahme der Kardiomyozytengröße um 87 % gemessen (Abbildung 14 B). In den NRVCMS, in denen zusätzlich ein *knockdown* von GRK2 induziert wurde, wurde keine Vergrößerung der Kardiomyozyten beobachtet. Trotz prohypertropher Stimulation konnte die Größe der Zellen auf dem Basalniveau (Scr) gehalten werden. Der alleinige GRK2 *knockdown* hatte keine Auswirkungen auf die Zellgröße.

3.1.2.2 Einfluss der GRK2 Überexpression auf die Kardiomyozytengröße

A



B

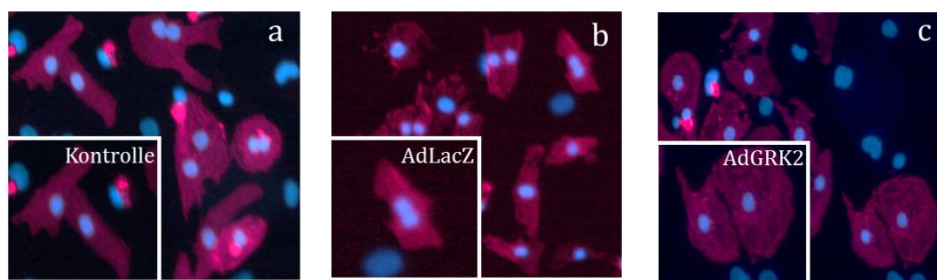


Abbildung 15: Einfluss einer adenoviralen Überexpression von GRK2 auf die Kardiomyozytengröße.

Die NRVCs wurden mit AdGRK2 und AdLacZ (MOI 50) für 48 h transduziert. Anschließend erfolgte eine Immunfluoreszenzfärbung gegen α -sarkomerisches Actinin (rot). Die Färbung des Nukleus erfolgte mit DAPI (blau). Die Zellgröße wurde mikroskopisch in 20-facher Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe von Sigma Scan durch Messung der Zellgröße in Pixel quantitativ ausgewertet. (A) Quantitative Darstellung der Zellgröße. (B) Repräsentative Bilder der Kardiomyozyten. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); $* < 0,05$; $n=3$ mit je 80-100 Zellen pro Ansatz.

Die Zunahme der Zellgröße, wie sie unter pro-hypertropher Stimulation zu verzeichnen war, wurde ebenso während einer GRK2 Überexpression beobachtet. Die Überexpression von GRK2 bewirkte im Vergleich zu den AdLacZ transduzierten Zellen, welche als Kontrolle dienten, eine Größenzunahme der NRVCs um bis zu 58 %. Eine Vergrößerung der Kardiomyozyten durch die Virusgabe per se war nicht zu beobachten (Abbildung 15).

3.1.2.3 Einflussnahme der GRK2 auf das fetale Genprogramm unter prohypertropher Stimulation

Ein wichtiger Marker der pathologischen Myokardhypertrophie ist die Re-Expression fetaler Gene, die im Laufe der Entwicklung des Herzens heraufreguliert werden [26]. Unter pathologischen Bedingungen werden natriuretische Peptide, wie das Peptid des Typ B (BNP) und das atrial natriuretische Peptid (ANP) exprimiert, aber auch die Expression kontraktiler Proteine wie β -Myosin Heavy Chain (β -MHC) wird reaktiviert.

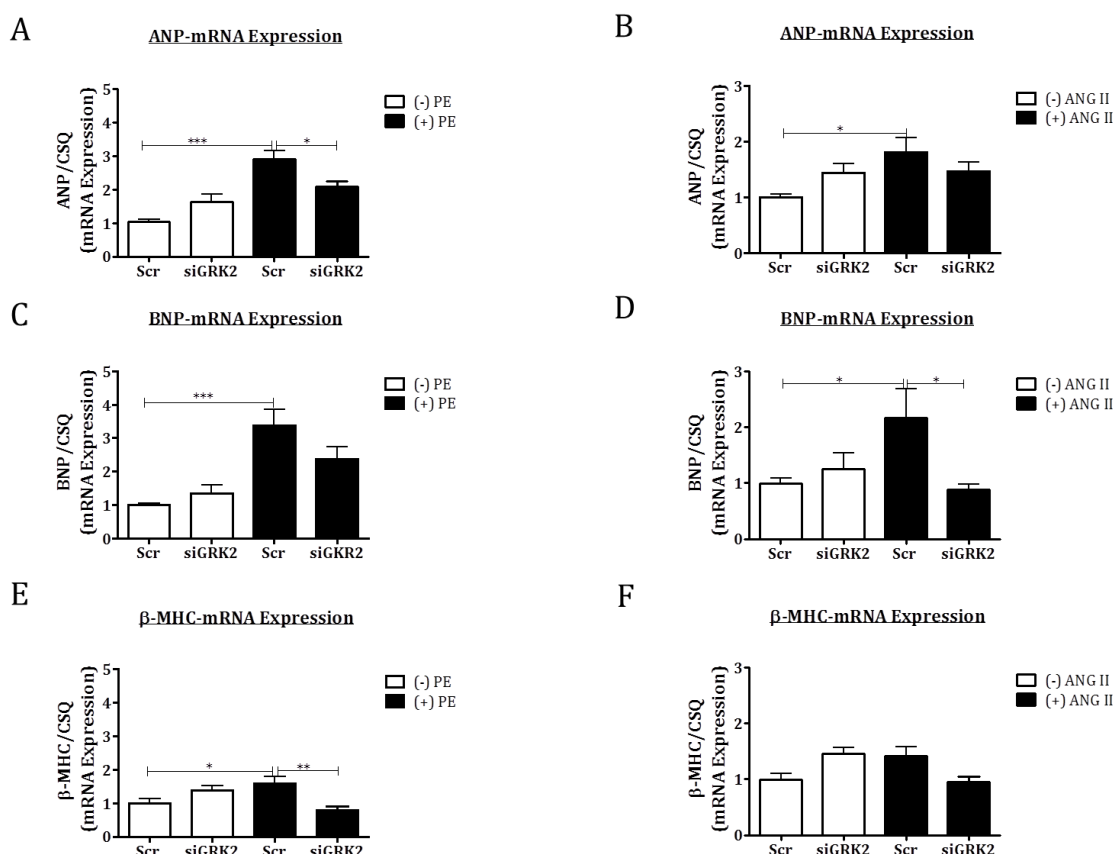


Abbildung 16: GRK2 Einfluss auf die Expression fetaler Gene unter prohypertropher Stimulation *in vitro*. Nach Behandlung der NRVCs mit Scr und siGRK2 (5 nM) und anschließender PE (10^{-4} M) bzw. ANG II (10^{-7} M) Stimulation für 24 h erfolgte die quantitative Auswertung mittels Real-Time PCR. (A, B) ANP-mRNA Expression, (C, D) BNP-mRNA Expression und (E, F) β -MHC-mRNA Expression. Die Expression der mRNA wurde in der quantitativen Analyse gegen die Expression des Referenzgens CSQ normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$; n>4.

Im folgenden Versuch wurde die mRNA Expression der fetalen Gene mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR ermittelt. Die prohypertrophe Zellantwort wurde durch Zunahme der ANP-, BNP- und β -MHC-mRNA Level nach PE und ANG II Stimulation bewertet. Die Behandlung der NRVCs mit PE bewirkte eine 3-fache Zunahme der ANP-mRNA Level im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen. Zellen die zuvor mit einer siGRK2 behandelt wurden, zeigten keinen signifikanten Anstieg in der ANP-mRNA. Es

wurde eine 45 %-ige verringerte ANP-mRNA Expression beobachtet. Wurden die Zellen mit ANG II stimuliert, wurde eine Zunahme der ANP-mRNA von 1 auf 1,8 beobachtet. Anders als bei den PE stimulierten Zellen, war auch nach einem *knockdown* von GRK2 ein Anstieg in der ANP-mRNA zu messen (Abbildung 16 A und B). Die Untersuchungen bezüglich der BNP-mRNA zeigten nach PE Stimulation einen 3-fachen Anstieg, welcher trotz siGRK2 nicht signifikant verhindert verändert war. Nach ANG II Stimulation waren die BNP-mRNA Level um das 2-fache erhöht, die durch den *knockdown* von GRK2 auf dem Basalniveau blieben (Abbildung 16 C und D). Die Expression des β -MHC Gens wurde in den PE stimulierten Zellen um das 1,5-fache gesteigert. Die zusätzliche Behandlung mit der siGRK2 bewirkte, dass die β -MHC-mRNA Level auf dem Basalniveau blieben (Abbildung 16 E). Eine signifikante Hochregulation des β -MHC Gens unter ANG II Stimulation konnte nicht induziert werden (Abbildung 16 F).

3.1.3 Die Bedeutung von GRK2 für die Entstehung der pathologischen Hypertrophie in Fibroblasten

Da bei der verwendeten Methode zur Isolierung der neonatalen Rattenkardiomyozyten, von einem Fibroblastenanteil von 30-35 % auszugehen war, wurde zur Komplettierung des ersten Teils der vorliegenden Arbeit die GRK2-mRNA Expression in der reinen Fibroblastenkultur untersucht, da diese ebenso GRK2 exprimieren. Darüber hinaus wurden spezifische Markergene des Fibroblastenwachstums in der Mischkultur in dem Modellansatz untersucht.

Es sollte zum einen ausgeschlossen werden, dass eine erhöhte GRK2-mRNA Expression, induziert durch pro-hypertrophe Stimulation, auf die Fibroblasten zurückzuführen ist. Zum anderen weisen nicht nur Kardiomyozyten, sondern auch Fibroblasten Angiotensinrezeptoren auf. Endogene Stimuli wie ANG II und *Transforming Growth Factor* (TGF β) vermitteln unter anderem die Proliferation der Fibroblasten und führen zu einer vermehrten Expression des *connective tissue growth factors* (CTGF), ein Wachstumsmarker der Fibroblasten. Dieser wiederum reguliert die Hypertrophie von Kardiomyozyten sowie die Proliferation und Synthese extrazellulärer Matrixproteine in kardialen Fibroblasten [124].

3.1.3.1 GRK2-mRNA Expression unter ANG II Stimulation in Fibroblasten

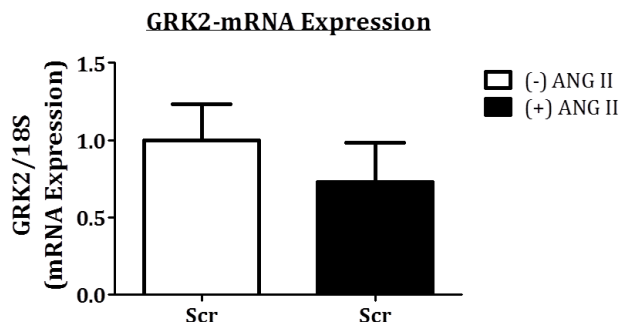


Abbildung 17: Analyse der GRK2-mRNA Expression unter ANG II Stimulation in Fibroblasten. Die Fibroblastenmonokultur wurde für 24 h mit ANG II (10^{-7} M) stimuliert. Die Auswertung der GRK2-mRNA Expression in den Fibroblasten erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR. Die Expression der mRNA wurde gegen die Expression des Referenzgens 18S normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$, ** $<0,01$; n=3.

Um der Frage nachzugehen, ob die Hochregulation der GRK2 auf die Kardiomyozyten zurückzuführen ist und nicht auf die Fibroblasten, wurde der GRK2-mRNA Gehalt einer reinen Fibroblastenkultur unter pro-hypertrophen Bedingungen untersucht. Verglichen mit den Beobachtungen aus den Versuchen im Kapitel 3.1.1 war in den Fibroblasten keine Hochregulation der GRK2-mRNA nach ANG II Stimulation zu erkennen (Abbildung 17).

3.1.3.2 Analyse der Wachstumsfaktoren der Fibroblasten unter ANG II Stimulation

Um auszuschließen, dass Fibroblasten möglicherweise durch vermehrte Proliferation die Hypertrophie in den Kardiomyozyten beeinflussen, erfolgte die Untersuchung der Expression zweier Wachstumsgene der Fibroblasten unter ANG II Stimulation. Dazu wurden in der „Mischkultur“, bestehend aus Kardiomyozyten und einen gewissen Anteil an Fibroblasten, die Gene CTGF und TGF β auf mRNA Ebene nach siRNA und ANG II Behandlung mittels quantitativer Real-Time PCR untersucht.

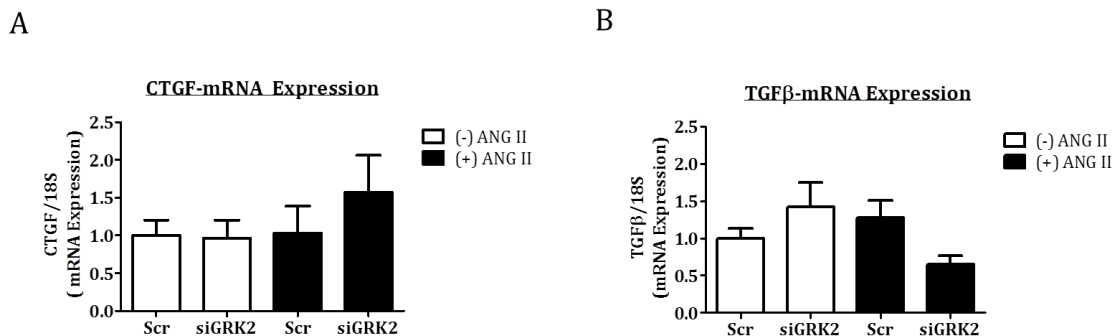


Abbildung 18: Quantitative Untersuchung der fibrotischen Wachstumsgene CTGF und TGFβ unter ANG II Stimulation in der Mischkultur. Zellen wurden mit ANG II (10^{-7} M) für 24 h nach siRNA (5 nM) Behandlung stimuliert. Die Auswertung der mRNA Expression der Wachstumsmarker der Fibroblasten erfolgte mittels quantitativer Real-Time PCR. (A) Quantitative Auswertung der CTGF-mRNA. (B) Quantitative Auswertung der TGFβ-mRNA. Die Expression der mRNA wurde gegen die Expression des Referenzgens 18S normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); $n=4$.

Eine erhöhte mRNA Expression sowohl von CTGF als auch von TGFβ war unter prohypertropher ANG II Stimulation im Vergleich zum Basallevel nicht zu beobachten. Auch die siGRK2 Behandlung hatte keinen signifikanten Effekt auf die CTGF- und TGFβ-mRNA Expression (Abbildung 18).

Der erste Teil der Ergebnisse kann folgendermaßen zusammengefasst werden. Eine erhöhte GRK2 Expression sowohl auf transkriptionaler als auch auf translationaler Ebene konnte in hypertrophen neonatalen Kardiomyozyten beobachtet werden. Eine Herunterregulation von GRK2 verminderte die PE und die ANG II induzierte Zunahme der Kardiomyozytengröße und die Re-Expression fetaler Gene im Rahmen der pathologischen Hypertrophie. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von GRK2 auch zu einem hypertrophen Phänotyp führt.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die beobachteten Effekte wahrscheinlich nicht auf die Fibroblasten zurückzuführen waren. Ein Anstieg der GRK2-mRNA Expression konnte in der reinen Fibroblastenkultur unter hypertrophen Bedingungen nicht beobachtet werden. Ebenso waren Wachstumsmarker der Fibroblasten in dem angewandten Hypertrophiemodell unter GRK2 *knockdown* unbeeinflusst.

Die beobachteten Effekte von GRK2 in dem *in vitro* Hypertrophiemodell waren somit mit den *in vivo* Beobachtungen kongruent.

Teil 2

3.2 Einfluss von GRK2 auf relevante Signaltransduktionswege in der pathologischen Hypertrophie

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit erfolgte die Untersuchung relevanter Signaltransduktionswege in der pathologischen Hypertrophie in Bezug auf ihre Modulation durch GRK2. In den letzten Jahren wurde immer deutlicher, dass vor allem Proteine wie Calcineurin, MAPK und GSK3 β eine zentrale Rolle in der Weiterleitung prohypertropher Signale spielen, indem sie spezifische Signaltransduktionskaskaden aktivieren und modulieren [125-127].

Wie im ersten Teil der Arbeit wurden auch hier primäre neonatale Rattenkardiomyozyten verwendet und die pathologische Hypertrophieantwort durch Stimulation mit den pharmakologischen Agenzien PE und ANG II induziert. Eine Inhibition von GRK2 erfolgte durch siGRK2, eine GRK2 Überexpression wurde durch AdGRK2 induziert.

3.2.1 Der Einfluss von GRK2 auf den Transkriptionsfaktors NFAT

Transkriptionsfaktoren wie der *nuclear factor of activated T-cells* (NFAT) sind an der Umprogrammierung der fetalen Genexpression in der pathologischen Myokardhypertrophie beteiligt und werden durch zahlreiche Signaltransduktionswege moduliert. Unter prohypertrophen Bedingungen wird NFAT dephosphoryliert und kann so in den Zellkern transloziert werden, um mit Hilfe weiterer Transkriptionsfaktoren die fetale Genexpression zu aktivieren. Im folgenden Versuch sollte mittels einer Reporter-Luziferase-Analyse unter ANG II Stimulation untersucht werden, ob eine Inhibition von GRK2 die NFAT Translokation in den Zellkern beeinflusst. Die NRVCs wurden, wie unter 2.2.1.2 bereits beschrieben, zunächst mit siGRK2 transfiziert. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion mit dem AdNFAT-Luziferase Virus, gefolgt von einer ANG II Stimulation. Parallel wurde der Duolink Assay herangezogen, um die Translokation von NFAT in den Zellkern nach ANG II Zugabe und nach Modulation der GRK2 durch siGRK2 auf Immunfluoreszenzebene darzustellen.

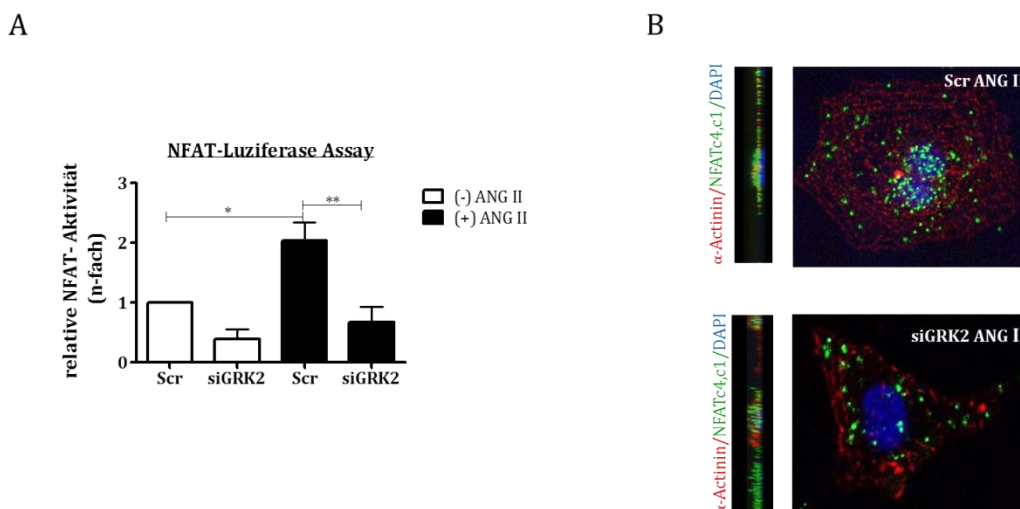


Abbildung 19: Analyse der NFAT Promotoraktivität und Darstellung der NFAT Translokation in NRVCMs nach GRK2 knockdown. Es wurde ein Reporter-Luziferase-Assay zum Nachweis der Luziferaseaktivität herangezogen. Wie in den Experimenten zuvor erfolgte eine Transfektion der Zellen mit siRNA (5 nM). Die AdNFAT Transduktion (MOI 100) erfolgte eine Stunde vor ANG II (10^{-7} M) Stimulation. Die Ernte der Zellen fand 24 h nach Stimulation statt. (A) Quantitative Auswertung der Luziferaseaktivität. (B) Darstellung der NFAT Detektion auf Immunfluoreszenzebene mit dem Duolink Assay. Hier erfolgte keine AdNFAT Transduktion. Rot: Actininfärbung der Kardiomyozyten, Grün: NFAT Molekül, Blau: Dapifärbung. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$, ** $<0,01$; n=4.

Im Vergleich zu den nicht stimulierten AdNFAT transduzierten Kardiomyozyten wurde in den mit ANG II stimulierten Zellen eine 2-fach erhöhte Luziferaseaktivität gemessen. Ein durch ANG II induzierter Anstieg der Luziferaseaktivität konnte durch einen *knockdown* von GRK2 signifikant verhindert werden. Die Aktivität der Luziferase lag hier auf Basalniveau (Scr). Ebenso wurde beobachtet, dass die Behandlung der Zellen mit siGRK2 in Abwesenheit von ANG II, verglichen mit den Scr-Kontrollen, zu einer Abnahme der Luziferase führte (Abbildung 19). Die verminderte NFAT Translokation in den Zellkern unter GRK2 *knockdown* und pro-hypertropher Stimulation mit ANG II ist in Abbildung 19 B dargestellt. In Abwesenheit von GRK2 befanden sich mehr NFAT Moleküle im Zytoplasma als im Zellkern, wie anhand der grünen Punkte aus der Abbildung 19 B zu entnehmen ist.

3.2.2 Untersuchung der Einflussnahme von GRK2 auf den Calcineurin Signaltransduktionsweg

Die NFAT-Translokation in pro-hypertrophen NRVCMs wird durch die Phosphatase Calcineurin induziert, indem diese den Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert und somit dessen Rekrutierung in den Nucleus veranlasst [10, 128]. Basierend auf den Beobachtungen (3.2.1), dass eine verminderte NFAT Promotoraktivität, trotz pro-hypertropher Bedingungen, durch Inhibition der GRK2 gemessen werden konnte, wurde

die Expression der Phosphatase Calcineurin näher untersucht. Dazu wurde nach PE und ANG II Stimulation die Calcineurinexpression auf Proteinebene unter Einflussnahme der siGRK2 analysiert. Ebenso erfolgte die Analyse der Calcineurinexpression nach adenoviraler Überexpression von GRK2.

3.2.2.1 Einfluss von GRK2 auf die Calcineurinexpression unter pro-hypertrophen Bedingungen

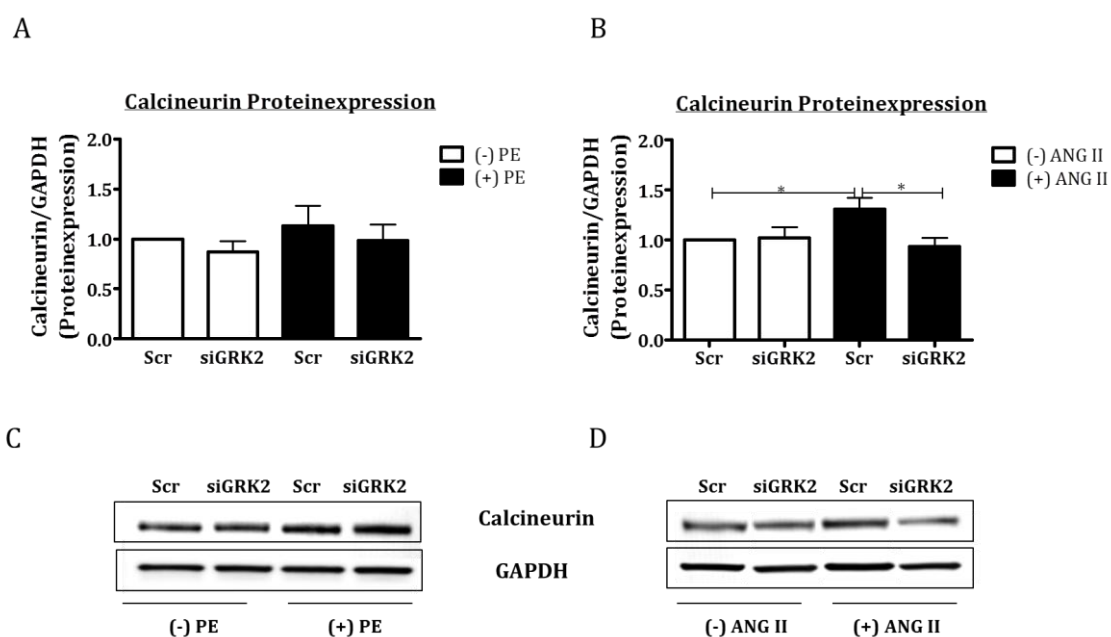


Abbildung 20: Calcineurinexpression unter pro-hypertropher Stimulation. NRVCMs wurden zunächst mit siRNA (5nM) behandelt und anschließend für 48 h mit PE (10^{-4} M) und ANG II (10^{-7} M) stimuliert. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Western Blot Analyse. (A) Darstellung der Proteinexpression von Calcineurin nach PE und (B) nach ANG II Stimulation. (C, D) Repräsentative Blots der Calcineurinexpression. Die Proteinexpression wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); $* < 0,05$; $n=5$.

In den NRVCMs wurde nach PE Stimulation kein signifikanter Anstieg in der Calcineurinexpression gemessen. In Gegenwart von ANG II wurde ein Anstieg der Calcineurinexpression um 40 % beobachtet. Kardiomyozyten, die zuvor mit einer siGRK2 behandelt wurden, zeigten keinen Anstieg in der Calcineurinexpression. Das Expressionslevel in den ANG II stimulierten siGRK2 Proben blieb auf dem Kontrollniveau der Scr Probe ohne ANG II Stimulation. Ein alleiniger *knockdown* von GRK2 hatte keinen Einfluss auf die Calcineurinexpression. Das Expressionslevel war unverändert verglichen mit den Scr-Kontrollen (Abbildung 20).

3.2.2.2 Einfluss der GRK2 Überexpression auf die Calcineurinexpression

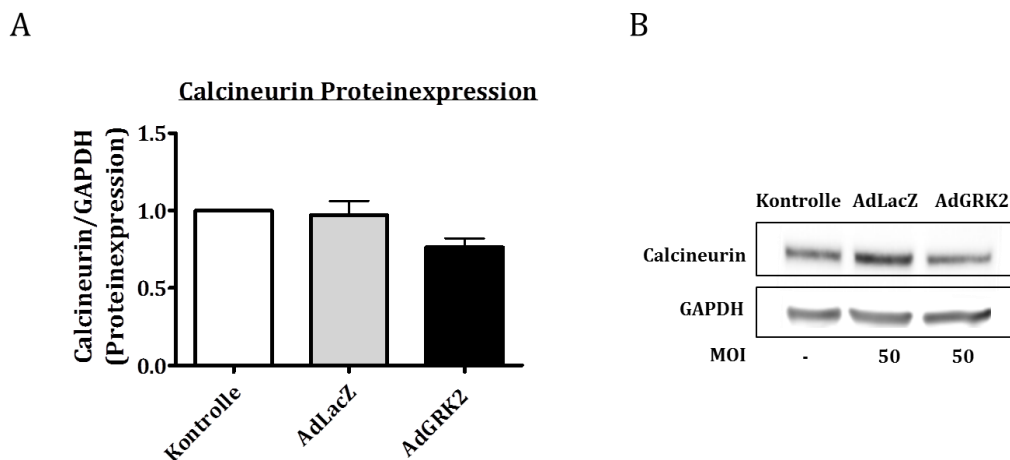


Abbildung 21: Calcineurinexpression nach GRK2 Überexpression. Die NRVCs wurden mit AdGRK2 und AdLacZ (MOI 50) für 48 h transduziert. Nach Isolierung der Proteine erfolgte die quantitative Bestimmung der Calcineurinexpression mittels der Western Blot Analyse. Als Kontrolle dienten zum einen eine nicht transduzierte Probe (K) und die AdLacZ Probe. (A) Quantitative Auswertung von Calcineurin. (B) Qualitative Darstellung eines repräsentativen Blots. Die Normierung der Proteinexpression von Calcineurin wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Werte von Calcineurin wurden in Relation zur Kontrolle gesetzt. n=4.

Die adenovirale Überexpression von GRK2 in den NRVCs zeigte keine Erhöhung der Calcineurinexpression, wie sie nach pro-hypertropher Stimulation zu beobachten war. Die Überexpression von GRK2 zeigte die Tendenz einer Abnahme der Calcineurinexpression im Vergleich zu den AdLacZ transduzierten Zellen. Eine signifikante Abnahme in der Calcineurinexpression wurde nicht gemessen (Abbildung 21).

3.2.3 Der Einfluss von GRK2 auf den MAPK Kinase Signaltransduktionsweg

Zur Klärung der Frage, ob der anti-hypertrophe Effekt durch Herunterregulation der GRK2 neben den Calcineurin Signaltransduktionsweg noch weitere pro-hypertrophe Signalkaskaden beeinflusst, wurde die Aktivität der zu der Familie der mitogen aktivierenden Protein Kinase (MAPK) gehörenden ERK 1/2 untersucht. In einer pathologischen Hypertrophie wird ERK 1/2 nach einer Phosphorylierung der Threonin- und Tyrosin-Seitenketten (Thr-X-Tyr-Motiv) durch MAPK-Kinasen (MAPKK) aktiviert. MAPKs, wie ERK1/2 sind ebenso für die NFAT Translokation in den Zellkern verantwortlich [129].

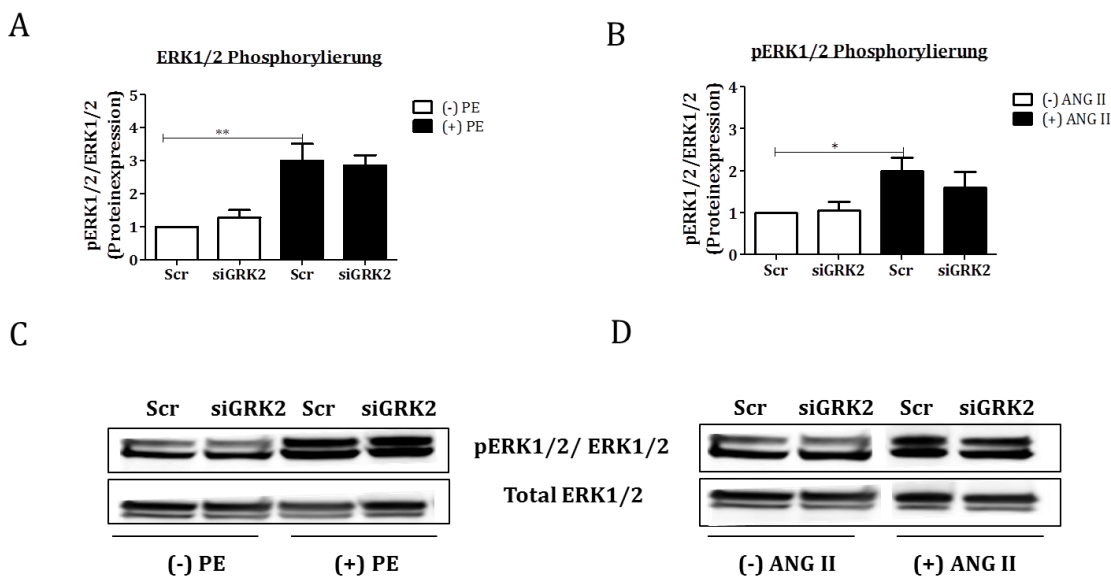


Abbildung 22: Der Effekt der siGRK2 auf den MAPK Kinase Signaltransduktionsweg in der pathologischen Hypertrophie. Isolierte NRVCs wurden mit Scr und siGRK2 (5 nM) behandelt und anschließend für 30 min mit PE (10^{-4} M) und ANG II (10^{-7} M) stimuliert. Die Quantifizierung erfolgte mittels Antikörper gegen pERK1/2. (A) Quantitative Auswertung der Western Blots des pERK1/2. nach PE-Stimulation und (B) nach ANG II Stimulation. (C, D) Repräsentative Blots der pERK1/2 Expression und ERK1/2 Expression. Die Normierung der pERK1/2 erfolgte an ERK1/2. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$, ** $<0,01$; PE: n=7, ANG II: n=6.

Sowohl PE als auch ANG II bewirken eine signifikante Zunahme der Phosphorylierung von ERK1/2. Dabei war die Phosphorylierung unter PE Stimulation im Vergleich zum Basalniveau um das 3,5-fache erhöht. Unter ANG II Stimulation konnte eine Zunahme in der Phosphorylierung von ERK1/2 um das 2,5-fache gemessen werden. Der *knockdown* von GRK2 zeigte keinen signifikanten Effekt auf die PE und ANG II induzierte ERK1/2 Phosphorylierung gegenüber den stimulierten Scr Proben. Eine verringerte Expression nach der siGRK2 Transfektion, wie sie bei Calcineurin unter pro-hypertropher Stimulation gemessen wurde, war hier nicht zu verzeichnen.

3.2.4 Die Bedeutung von GRK2 für die GSK3 β -Aktivierung

Molekulare Veränderungen in Folge pro-hypertropher Aktivierung, wie die NFAT-Translokation, unterliegen einer strengen, vielfältigen Kontrolle durch anti-hypertrophe Mechanismen. Zu ihnen zählt die Glykogensynthase Kinase 3 β (GSK3 β), welche ihre Hypertrophie-hemmende Wirkung durch Phosphorylierung von NFAT erzielt. Sie ist somit ein Gegenspieler der Phosphatase Calcineurin, welche eine Phosphorylierung von NFAT und dessen Import in den Zellkern verhindert. Eine durch NFAT induzierte Aktivierung der pro-hypertrophen Gene wird somit unterbunden [50].

3.2.4.1 Einflussnahme des GRK2 *knockdowns* auf die GSK3 β -Aktivierung unter prohypertrophen Bedingungen

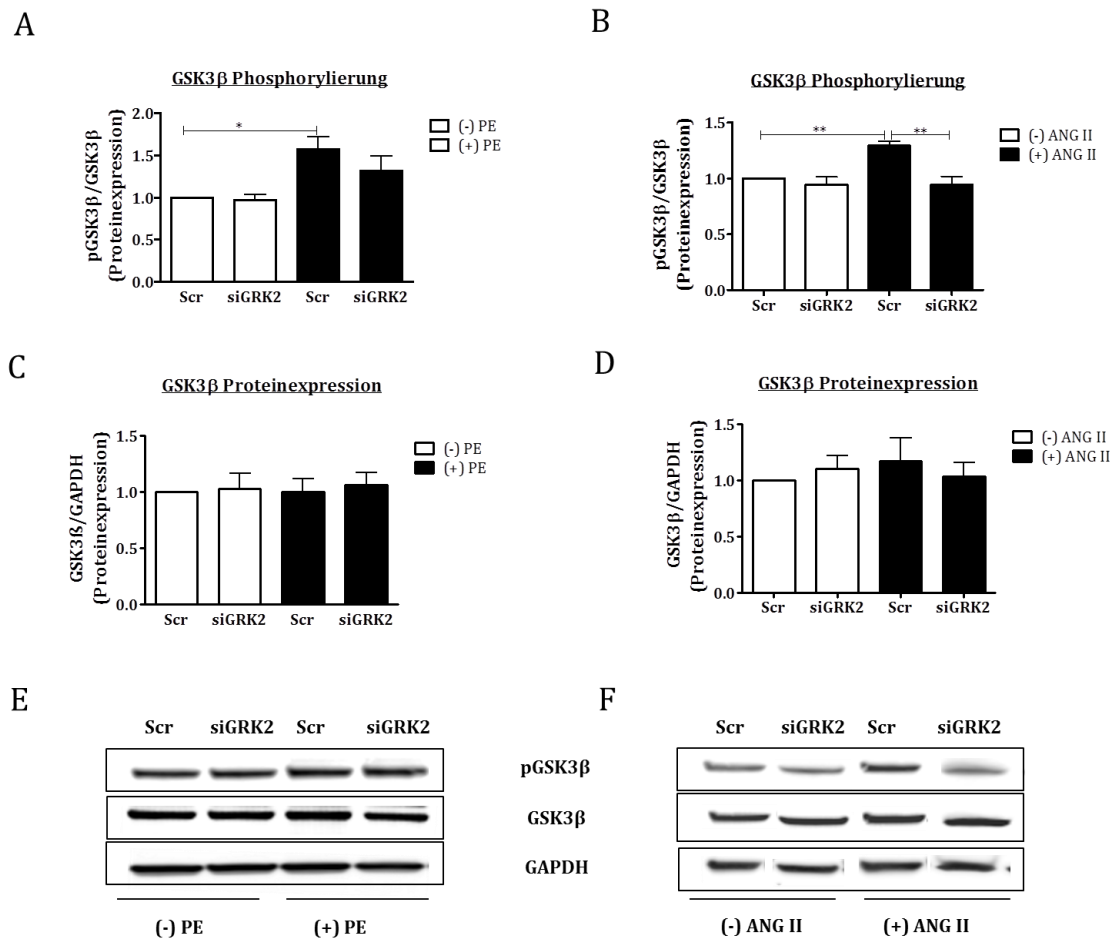


Abbildung 23: Phosphorylierungsstatus von GSK3 β unter GRK2 Einfluss und pharmakologischer prohypertropher Stimulation. NRVCs wurden mit Scr und siGRK2 (5 nM) behandelt und anschließend für 48 h mit PE (10^{-4} M) und ANG II (10^{-7} M) stimuliert. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Western Blot Analyse. (A) Expression der pGSK3 β nach siGRK2 Transfektion und PE Stimulation. (B) Expression der pGSK3 β nach siGRK2 Transfektion und ANG II Stimulation. (C, D) Proteinexpression von GSK3 β . (E, F) Repräsentative Blots von pGSK3 β und GSK3 β . Die Normierung der pGSK3 β erfolgte an GSK3 β . GSK3 β wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism): * $<0,05$, ** $<0,01$; PE: n=3; ANG II: n=6.

Kardiomyozyten, die mit PE oder ANG II stimuliert wurden, zeigten eine Zunahme in der Phosphorylierung von GSK3 β von bis zu 60 %, verglichen mit den Werten aus nicht stimulierten Zellen. Der *knockdown* von GRK2 verhinderte in den ANG II stimulierten Kardiomyozyten eine Zunahme der GSK3 β Phosphorylierung. Das Phosphorylierungsniveau blieb auf dem Niveau, welches in den nicht stimulierten Zellen gemessen wurde. Im Gegensatz zu den ANG II behandelten NRVCs war in den mit PE behandelten Zellen keine signifikante Verringerung der GSK3 β Phosphorylierung durch siGRK2 zu beobachten.

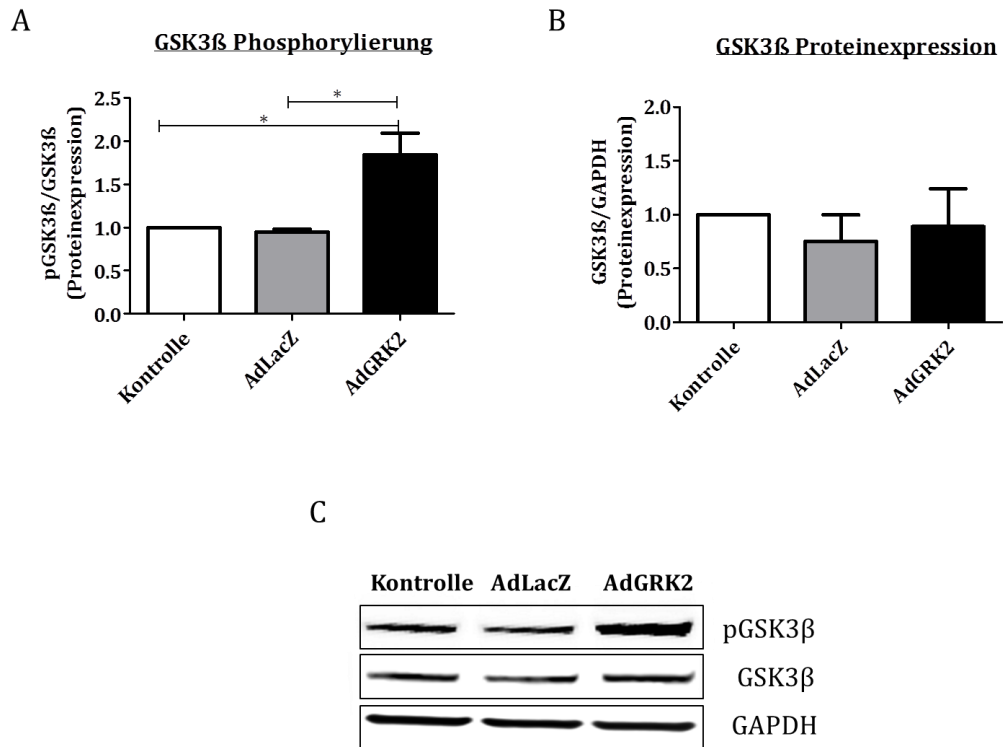
3.2.4.2 Einfluss der GRK2 Überexpression auf die GSK3 β -Aktivierung

Abbildung 24: pGSK3 β unter dem Einfluss von AdGRK2. Die NRVCs wurden mit AdGRK2 und AdLacZ (MOI 50) für 48 h transduziert. Nach der Ernte der Zellen erfolgte die quantitative Bestimmung der pGSK3 β und GSK3 β auf Proteinebene mittels der Western Blot Analyse. Als Kontrolle dienten zum einen die nicht transduzierte Probe und die AdLacZ Probe. (A) Quantitative Auswertung von pGSK3 β und (B) GSK3 β . (C) Grafische Darstellung der quantitativen Auswertung. Die Normierung der pGSK3 β erfolgte an GSK3 β . Die Proteinexpression von GSK3 β wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$; n=3.

Eine Überexpression der GRK2 bewirkte eine 2-fache Zunahme der GSK3 β Phosphorylierung in den Kardiomyozyten, im Vergleich zu denen, die mit einem Kontrollvirus induziert wurden. Das Phosphorylierungsniveau zwischen den mit dem Kontrollvirus behandelten Zellen und den unbehandelten Zellen blieb unverändert. Die erhöhte GSK3 β Phosphorylierung ist somit auf die alleinige GRK2 Überexpression zurückzuführen und nicht auf eine mögliche Aktivierung durch den Adenovirus (Abbildung 24 A). Zudem war zu beobachten, dass die GRK2 Überexpression keinen Einfluss auf die Proteinexpression von GSK3 β hatte. Die Phosphorylierung lag auf dem Niveau der Kontrollen (Abbildung 24 B).

3.2.4.3 Einflussnahme des GRK2 *knockdowns* auf die GSK3 β Inhibition unter prohypertrophen Bedingungen

Die konstitutiv aktive Kinase GSK3 β kann durch den pharmakologischen Inhibitor Lithiumchlorid (LiCl) inhibiert werden. Die Bindung von LiCl am N-Terminus der GSK3 β verursacht eine Konformationsänderung der GSK3 β und führt zu einer Autophosphorylierung der Kinase. Dadurch befindet sich die GSK3 β in einem inaktiven Zustand, was wiederum zu einer Inhibition der antihypertrophen Wirkung von GSK3 β führt. Die Phosphorylierung der GSK3 β am Serinrest wurde als Parameter für das Maß der Inhibition von GSK3 β durch LiCl herangezogen.

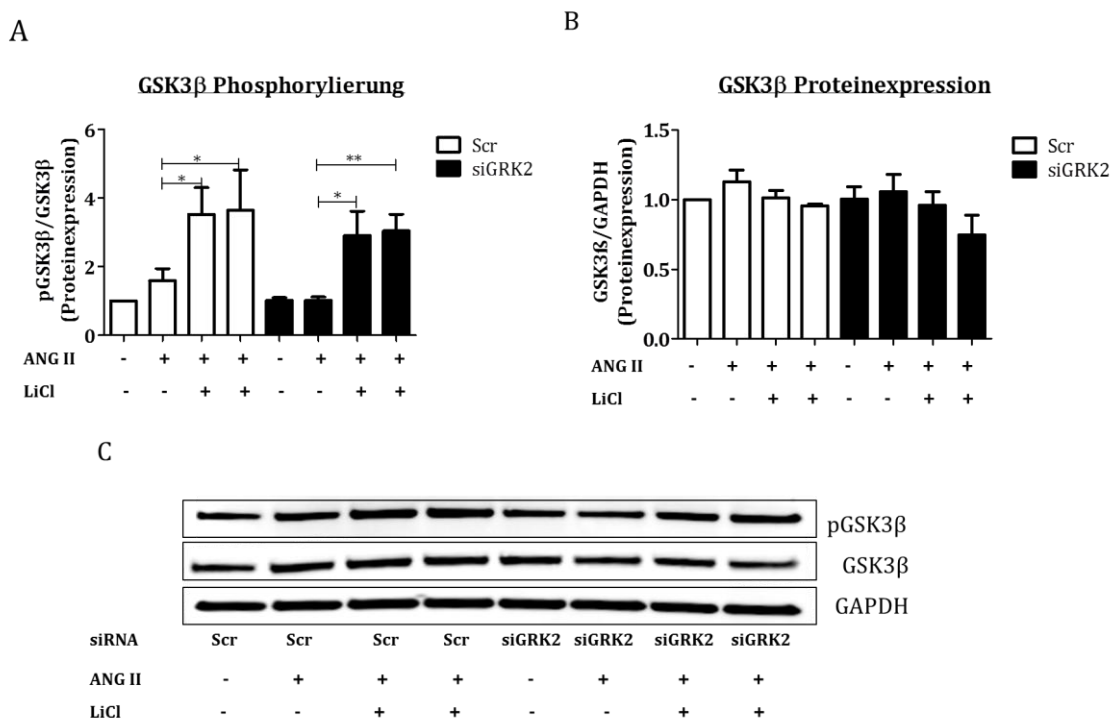


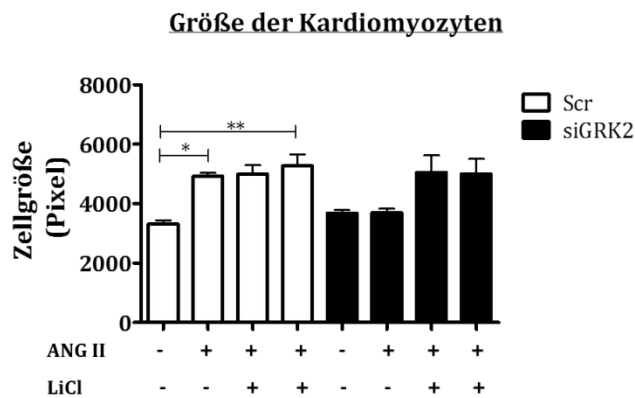
Abbildung 25: Einfluss der GRK2 auf den Phosphorylierungsstatus von GSK3 β unter prohypertropher Stimulation mittels ANG II und Inhibition der GSK3 β durch LiCl. NRVCs wurden zunächst mit siRNA (5 nM) behandelt. Das LiCl (10 mM) wurde 60 min vor der ANG II (10⁻⁷ M) Stimulation zu den NRVCs gegeben. 48 h nach ANG II Gabe erfolgte die Ernte der Zellen und die quantitative Auswertung mittels Western Blot. (A) Expression der GSK3 β Phosphorylierung nach siRNA Transfektion, LiCl Zugabe und ANG II Stimulation. (B) Darstellung der Proteinexpression von GSK3 β nach siRNA Transfektion, LiCl Zugabe und ANG II Stimulation. (C) Repräsentative Blots von pGSK3 β und deren Gesamtproteinexpression. Die Normierung der pGSK3 β erfolgte an GSK3 β total. GSK3 β total wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$, ** $<0,01$; n=6.

Als Ausleseparameter für eine prohypertrophe Zellantwort wurde die Größe der Kardiomyozyten bestimmt. Die zusätzliche Transfektion der Zellen mit der siGRK2 sollte klären, ob GRK2 direkt in den GSK3 β Signaltransduktionsweg eingreift. LiCl wurde 60 min

vor der ANG II Stimulation zu den NRVCMs gegeben. Die Ernte der Zellen und die Analyse der Phosphorylierung von GSK3 β erfolgte 48 Stunden nach ANG II Behandlung. Parallel wurde mit Hilfe der Immunfluoreszenz die Größe der Kardiomyozyten nach LiCl Behandlung und ANG II Stimulation untersucht.

Die alleinige Zugabe von LiCl verursachte eine bis zu 4-fache Zunahme der GSK3 β Phosphorylierung. Die Phosphorylierung der GSK3 β durch den Inhibitor fällt mit einem 2-fachen Phosphorylierungsanstieg der GSK3 β dabei wesentlich stärker aus, als die Phosphorylierung unter ANG II Stimulation. Eine zusätzliche Stimulation der LiCl behandelten Zellen mit ANG II konnte die GSK3 β Phosphorylierung nicht weiter erhöhen. Eine Inhibition der GSK3 β Phosphorylierung, wie sie nach einem GRK2 *knockdown* gemessen wurde, wurde in den Zellen, die zusätzlich mit LiCl behandelt wurden, nicht mehr beobachtet. Die Phosphorylierung der GSK3 β unterschied sich trotz siGRK2 nicht von den Scr Proben, die zuvor mit LiCl behandelt wurden (Abbildung 25).

A



B

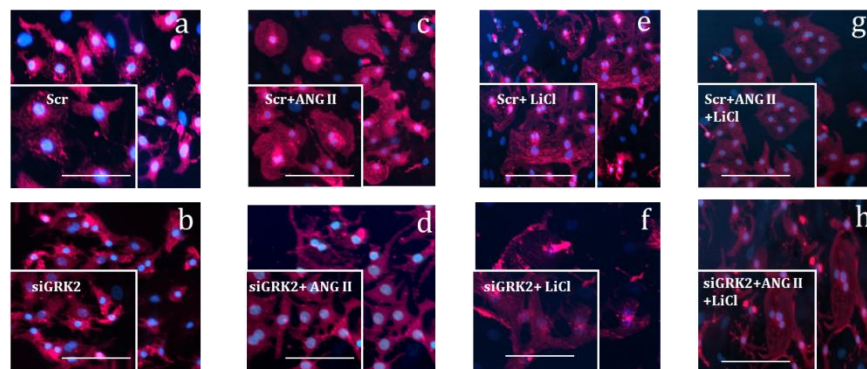


Abbildung 26: Einfluss der siGRK2 auf die Kardiomyozytengröße nach GSK3 β Inhibition. NRVCMs wurden mit siRNA (5 nM) behandelt und 60 min vor ANG II (10^{-7} M) Stimulation erfolgte die Gabe von LiCl (10 mM) für 24 h. (A) Quantitative Auswertung der Zellgröße in Pixel. (B) Repräsentative Bilder der Kardiomyozyten in Anwesenheit von GRK2 (B obere Reihe) und in Abwesenheit von GRK2 (B untere Reihe). Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit Alexa Red gekoppelten α -sarkomerischen Actinin Antikörper durchgeführt. Die Färbung des Nukleus der Zellen erfolgte mit DAPI (blau). Die Zellen wurden mikroskopisch in 20-facher Vergrößerung aufgenommen und die Zellgröße mit Hilfe von Sigma Scan in Pixel quantitativ ausgewertet. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$, ** $<0,01$; n=3, mit je 70-80 Zellen pro Ansatz.

Eine Inhibition der GSK3 β durch den Inhibitor LiCl bewirkte eine Zunahme der Kardiomyozytengröße um das 3-fache im Vergleich zu den nicht stimulierten, nicht LiCl behandelten Scr-Proben. Eine zusätzliche Stimulation mit ANG II führte zu keiner weiteren Größenzunahme der Zellen. Die Verhinderung des pro-hypertrophen Wachstums der Kardiomyozyten durch den GRK2 *knockdown*, wurde durch die LiCl Behandlung wieder aufgehoben. Wie Abbildung 26 zu entnehmen ist, konnte trotz siGRK2 in den ANG II behandelten NRVCs nach LiCl Zugabe die Zunahme der Zellgröße nicht verhindert werden.

3.2.5 Die Bedeutung von GRK2 für die AKT-Aktivierung

Aufgrund der Beobachtung, dass eine siGRK2 vermittelte Inhibition von GRK2 die GSK3 β Phosphorylierung beeinflusst, erfolgten Untersuchungen bezüglich der Kinasen, die an der Modulation der GSK3 β und dessen Signaltransduktion beteiligt sind. Eine Phosphorylierung der GSK3 β am Serinrest (Ser9) wird durch die Serin/Threonin Kinase AKT durchgeführt. Diese im Zytosol vorliegende Kinase wird wiederum unter pro-hypertrophen Bedingungen an zwei Stellen phosphoryliert, am Serin 473 und am Threoninrest 308. Für eine vollständige Aktivierung der AKT ist eine Phosphorylierung an beiden Stellen erforderlich [130]. Im vorliegenden Versuch wurde der Phosphorylierungsstatus der AKT unter pro-hypertrophen Bedingungen nach GRK2 *knockdown* und nach einer Überexpression der GRK2 untersucht.

3.2.5.1 Der Einfluss von GRK2 auf die AKT-Phosphorylierung unter pro-hypertrophen Bedingungen

Nach Stimulation der Kardiomyozyten mit ANG II wurde eine bis zu 50 %-ige Zunahme der AKT-Phosphorylierung am Serinrest 473 beobachtet und blieb durch den GRK2 knockdown auf dem Basalniveau. Nach PE Stimulation war der Anstieg nicht signifikant. Allerdings konnte mit PE ein signifikanter Anstieg (~ 50 %) in der AKT-Phosphorylierung am Threoninrest 308 gemessen werden, der mit einem GRK2 knockdown verhindert wurde. Auch hier blieb die Phosphorylierung auf Basalniveau. Unter ANG II Stimulation fand keine signifikante Zunahme in der Serinphosphorylierung von AKT statt. Die AKT Proteinexpression war sowohl unter PE als auch unter ANG II Stimulation unbeeinflusst. Ebenso hatte die alleinige siRNA Behandlung keinen Einfluss auf die Proteinexpression (Abbildung 27).

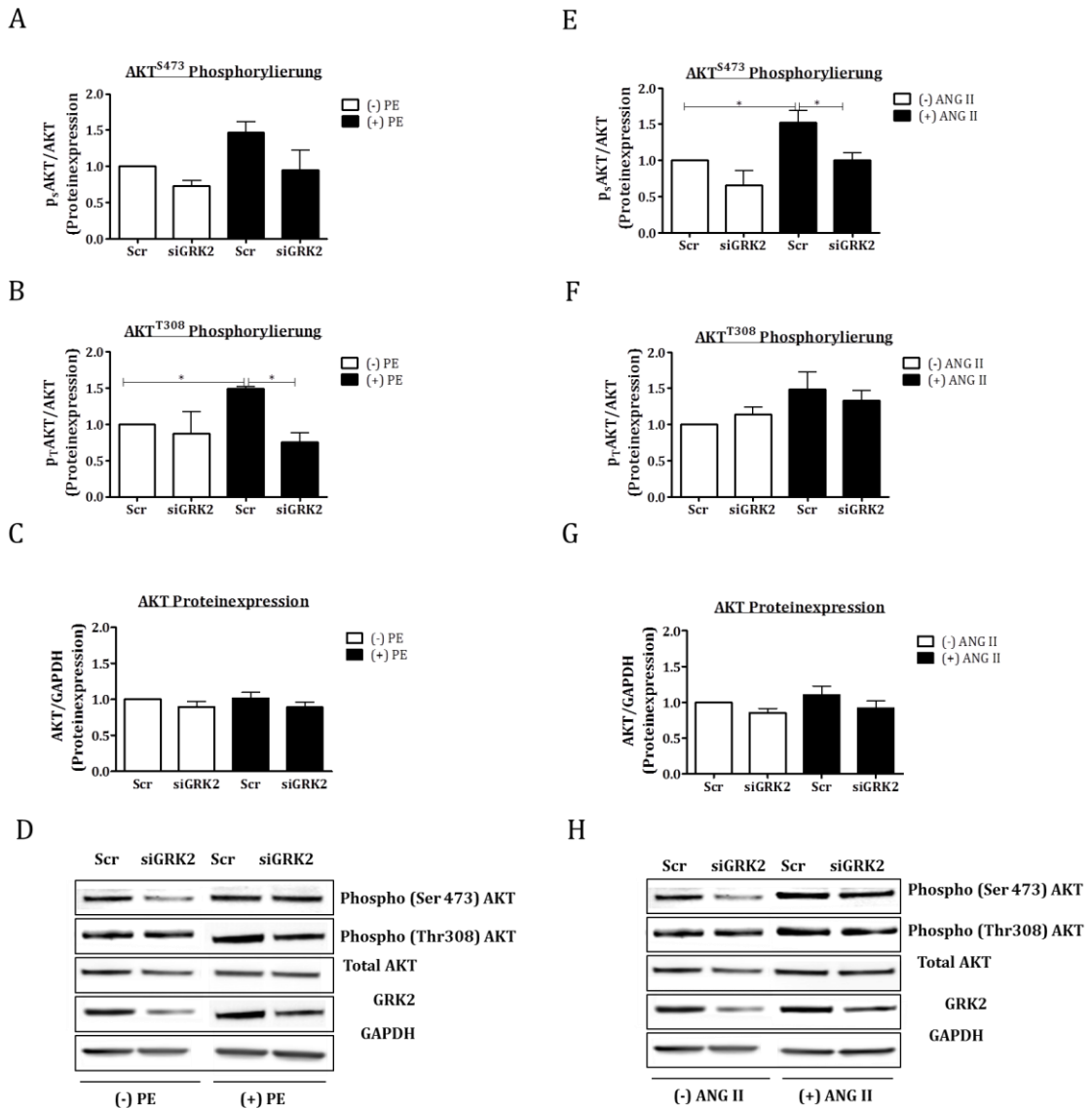


Abbildung 27: Einfluss der siGRK2 auf die AKT Phosphorylierung nach PE und ANG II Stimulation.

NRVCMs wurden zunächst mit siRNA (5 nM) behandelt und anschließend für 48 h mit ANG II (10^{-7} M) stimuliert. Die quantitative Auswertung erfolgte mittels Western Blot Analyse. (A, E) Effekt der siGRK2 auf die Phosphorylierung am Serinrest 473 von AKT. (B, F) Effekt der siGRK2 auf die Phosphorylierung am Threoninrest 308 von AKT. (C, G) Darstellung der Proteinexpression von AKT. (D, H) Repräsentative Blots von pAKT und deren Gesamtproteinexpression. Ebenso ist die GRK2 Expression dargestellt. Die Normierung der Phosphorylierung von AKT erfolgte an der AKT Proteinexpression. Die Proteinexpression von AKT wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Die Daten sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$; p_s AKT: $n=4$; p_T AKT: $n=3$.

3.2.5.2 Der Einfluss der GRK2 Überexpression auf die AKT-Phosphorylierung

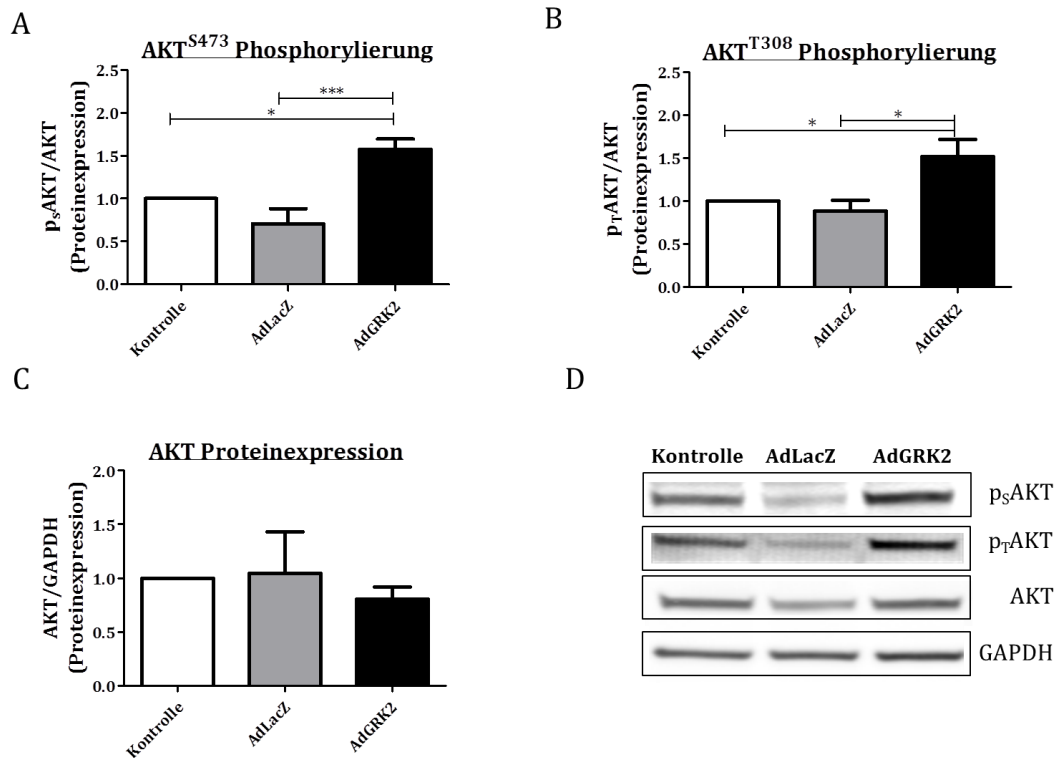


Abbildung 28: Die Phosphorylierung von AKT unter dem Einfluss von AdGRK2. Die NRVCs wurden mit AdGRK2 und AdLacZ (MOI 50) für 48 h transduziert. Nach Isolierung der Proteine erfolgte die quantitative Bestimmung der p_SAKT (B) und p_TAKT (A). (C) Quantitative Auswertung von AKT. (D) Qualitative Darstellung eines repräsentativen Blots. Die Normierung der Phosphorylierung der AKT erfolgte an AKT total. Die Proteinexpression von AKT wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$; p_SAKT: n=4; p_TAKT: n=3-5.

Ausgelöst durch die Überexpression von GRK2 wurde eine Zunahme in der AKT Phosphorylierung am Serinrest von über 100 % beobachtet. Ebenso wurde eine bis zu 70 %-ige Zunahme in der AKT^{T308} Phosphorylierung nach adenoviraler GRK2 Überexpression beobachtet. Wie in den Versuchen zuvor war die Veränderung in der Phosphorylierung nicht auf eine adenovirale Infektion per se zurückzuführen. Auch in der AKT Proteinexpression wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen beobachtet.

3.2.6 Der Effekt von GRK2 auf die PI3Ky vermittelte Signaltransduktion

Für die weitere Untersuchung des AKT/GSK3 β Signaltransduktionswegs und dessen Modulation durch GRK2, wurde die im Signaltransduktionsweg oberhalb von AKT liegende Kinase PI3Ky näher untersucht. Während einer pathologischen Hypertrophie kommt es zu einer Hochregulation der PI3Ky im Herzen und wird zum Hauptaktivator von AKT [45, 47].

Eine Inhibition der PI3Ky durch Wortmannin und eine zusätzliche GRK2 Überexpression sollte bei der mechanistischen Aufklärung von GRK2 in der pathologischen Hypertrophie helfen. Es sollte geklärt werden, ob eine GRK2 Überexpression trotz PI3Ky Inhibition zu einer Zunahme der Kardiomyozytengröße führt. Ebenso sollte untersucht werden, ob die GRK2 vermittelte Modulation des AKT/GSK3 β Signaltransduktionswegs unter dem Einfluss der PI3Ky Inhibition steht.

Da es sich bei Wortmannin um einen starken PI3Ky Inhibitor handelt und eine zusätzliche Inhibition der AKT Phosphorylierung und des Zellwachstums durch den GRK2 *knockdown* nicht beobachtet werden konnte, wurde die adenovirale Überexpression von GRK2 herangezogen.

3.2.6.1 Einfluss von GRK2 auf die Kardiomyozytengröße nach PI3Ky Inhibition

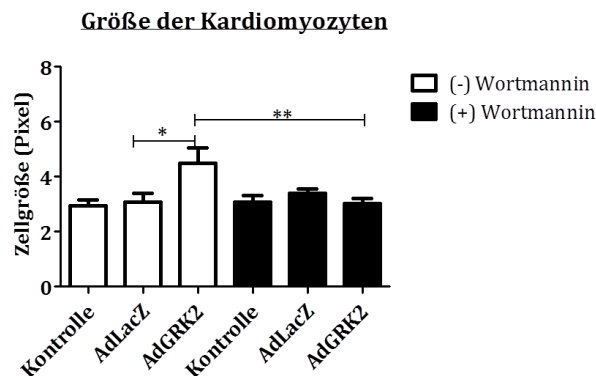


Abbildung 29: Einfluss der GRK2 Überexpression auf die Kardiomyozytengröße nach PI3Ky Inhibition.

NRVCMs wurden eine Stunde vor Virusgabe mit Wortmannin (0,1 μ M) behandelt und für 48 h mit einem AdLacZ und AdGRK2 (MOI 50) transduziert. Anschließend erfolgte die Alexa Red gekoppelte Immunfärbung gegen α -sarkomerisches Actinin. Die Färbung des Nukleus erfolgte mit DAPI (blau). Nachdem die Zellen in 40-facher Vergrößerung aufgenommen wurden, erfolgte die quantitative Auswertung der Zellgröße mit ImageJ durch Messung der Zellgröße in Pixel. Statistik: One way Anova; * $<0,05$, ** $<0,01$, n=2, mit je 8-10 Zellen pro Ansatz.

Eine 2-fache Größenzunahme der Zellen, ausgelöst durch eine adenovirale Überexpression von GRK2, wurde durch den PI3Ky Inhibitor Wortmannin verhindert. Die Größe der Kardiomyozyten war im Vergleich zu den AdLacZ transfizierten Zellen unverändert.

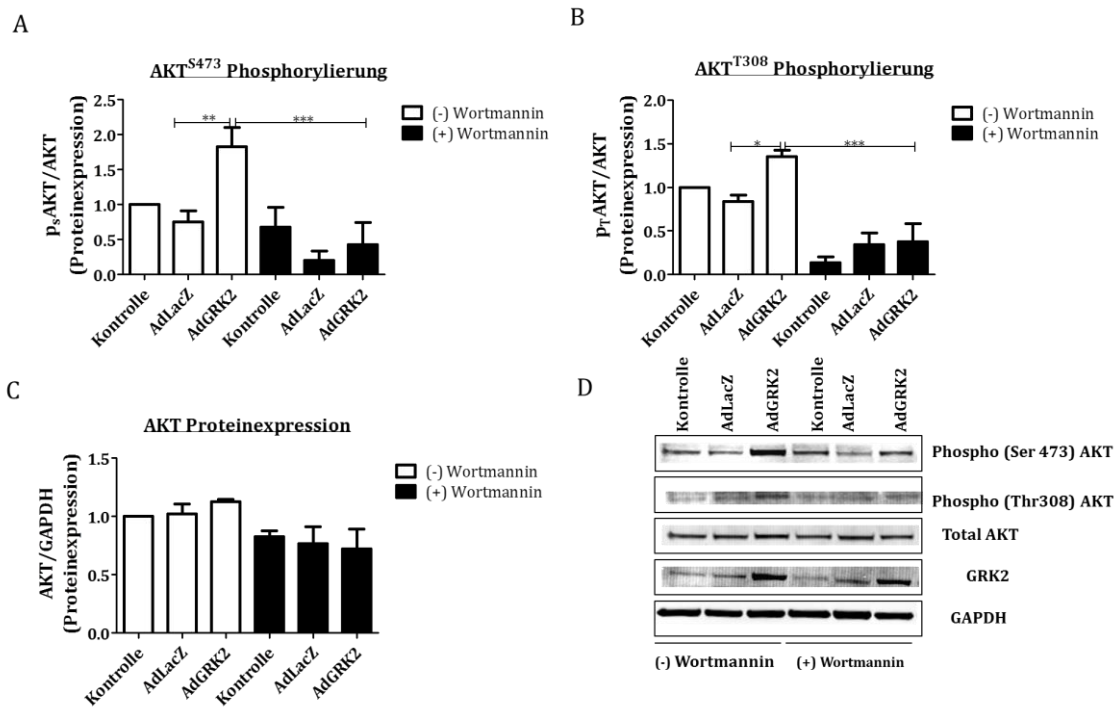


Abbildung 30: Einfluss der GRK2 Überexpression auf die Phosphorylierung von AKT nach Inhibition der PI3Ky. NRVCs wurden eine Stunde vor Virusgabe mit Wortmannin (0,1 μ M) behandelt und für 48 h mit einem AdLacZ und AdGRK2 (MOI 50) transduziert. Die quantitative Bestimmung der pAKT und AKT erfolgte auf Proteinebene mittels der Western Blot Analyse. Als Kontrolle dienten zum einen nicht transduzierte Zellen und zum anderen Zellen, die mit einem Kontrollvirus (AdLacZ) transduziert wurden. (A) Quantitative Auswertung von p_SAKT und (B) von p_TAKT. (C) Quantitative Auswertung von AKT. (D) Qualitative Darstellung eines repräsentativen Blots. Die Normierung der Phosphorylierung der AKT erfolgte an AKT gesamt. Die Proteinexpression von AKT wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Statistik: One way Anova (Prism); * $<0,05$, ** $<0,01$, *** $<0,001$; p_SAKT: n=4-8, p_TAKT: n=4.

Eine Behandlung der NRVCs mit dem PI3Ky Inhibitor Wortmannin verhinderte eine durch GRK2 induzierte Zunahme der Phosphorylierung von AKT sowohl am Serin- als auch am Threoninrest. Die Gabe von Wortmannin verhinderte nicht nur, sondern verminderte sogar im Vergleich zu den Kontrollen die Phosphorylierung am Serin- und Threoninrest von AKT. Ebenso wurde ein abnehmender Trend bezüglich der AKT Proteinexpression in Gegenwart von Wortmannin beobachtet.

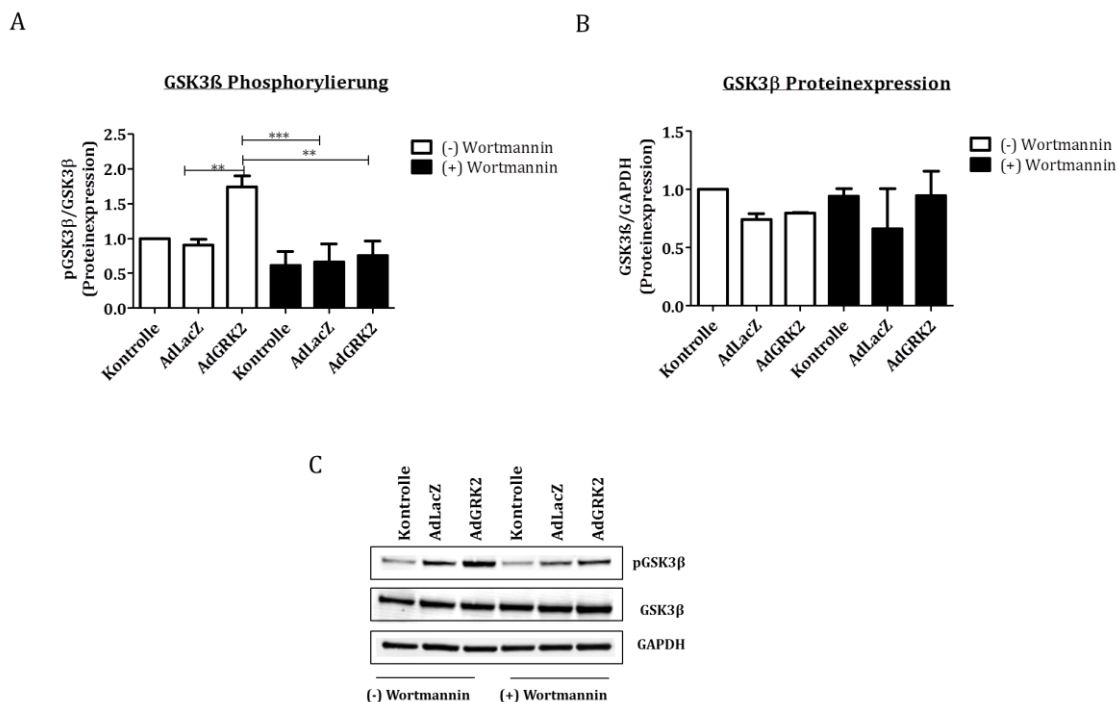


Abbildung 31: Einfluss der AdGRK2 auf GSK3β/AKT Signalweg nach PI3Ky Inhibition. NRVCMs wurden eine Stunde vor Virusgabe mit Wortmannin (0,1 μ M) behandelt und für 48 h mit AdLacZ und AdGRK2 (MOI 50) transduziert. Die quantitative Bestimmung der pGSK3β und GSK3β erfolgte auf Proteinebene mittels der Western Blot Analyse. Als Kontrolle dienten zum einen nicht transduzierte Zellen und zum anderen Zellen, die mit einem Kontrollvirus (AdLacZ) transduziert wurden. (A) Die quantitative Auswertung von pGSK3β und (B) von GSK3β. (C) Qualitative Darstellung eines repräsentativen Blots. Die Normierung der Phosphorylierung der GSK3β erfolgte an GSK3β total. Die Proteineexpression von GSK3β wurde gegen die Expression des Referenzgens GAPDH normalisiert. Statistik: One way Anova (Prism); **<0,01, ***<0,001; pGSK3β; n=4-6.

Eine Inhibition von PI3Ky durch Wortmannin, gefolgt von einer inhibierenden Wirkung auf AKT, führte zu einer verminderten GSK3β Phosphorylierung. Die signifikante Zunahme der GSK3β Phosphorylierung, welche durch die GRK2 Überexpression induziert werden konnte, wurde in Gegenwart von Wortmannin aufgehoben (Abbildung 31).

Nach den Untersuchungen bezüglich der Einflussnahme von GRK2 auf die relevanten Signaltransduktionswege kann zusammengefasst werden, dass GRK2 unter ANG II Stimulation die pathologische Hypertrophie über den Transkriptionsfaktor NFAT moduliert. Zudem wurde beobachtet, dass GRK2 nicht nur Einfluss auf die GSK3β Phosphorylierung hat, sondern auch die AKT Phosphorylierung moduliert. Darüber hinaus wurde beobachtet, dass eine GRK2 induzierte Größenzunahme der Kardiomyozyten und Aktivierung der AKT und GSK3β, durch Hemmung der PI3Ky mit Wortmannin, inhibiert wurde.

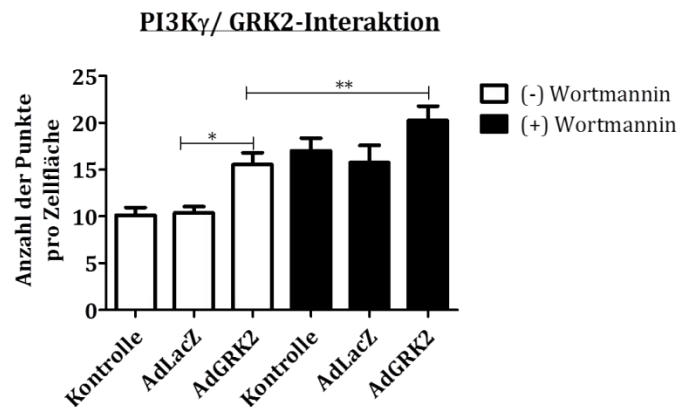
3.2.7 Untersuchung möglicher Bindungspartner von GRK2 und deren Einflussnahme auf die pathologische Hypertrophie

Die zuvor dargestellten Ergebnisse veranlassten die Hypothese, dass eine mögliche Interaktion der GRK2 mit PI3K γ besteht und somit die pro-hypertrophe Antwort begünstigt. Die PI3K γ ist eine Kinase, welche nach G-Protein-gekoppelter Rezeptor (GPCR) Aktivierung durch die G $\beta\gamma$ -Untereinheit aktiviert wird und die Phosphorylierung von AKT durch *3-phosphoinositide dependent protein kinase-1* (PDK1) induziert. Die PI3K γ ist neben den G-Proteinuntereinheiten wie G α_q ein zentraler Initiator in der Ausbildung einer pathologischen Myokardhypertrophie. Zudem ist bekannt, dass GRK2 Bindungsstellen für beide Moleküle aufweist [86]. Ob eine Interaktion zwischen der PI3K γ und GRK2 besteht oder vielleicht doch ein Komplex zwischen GRK2 und G α_q zu beobachten ist, wurde im Folgenden untersucht.

3.2.7.1 Untersuchung der Interaktion zwischen PI3K γ und GRK2

Basierend auf den Beobachtungen, dass eine durch GRK2 vermittelte AKT- und GSK3 β -Aktivierung durch Wortmannin inhibiert wurde und ebenso die Zellgröße der Kardiomyozyten trotz GRK2 Überexpression durch Wortmannin abnahm, wurde postuliert, dass GRK2 seine pro-hypertrophe Funktion an der Membran ausübt. Daher wurde eine mögliche Interaktion zwischen GRK2 und PI3K γ untersucht. Es sollte der Frage nachgegangen werden, ob GRK2 eine Bindung mit PI3K γ eingeht und diese Bindung durch Wortmannin unterbrochen werden kann. Die Zellen wurden hierfür mit Wortmannin behandelt und mit AdGRK2 beziehungsweise AdLacZ transduziert. Die Untersuchung der Interaktion zwischen PI3K γ und GRK2 erfolgte mit dem Duolink Assay.

A



B

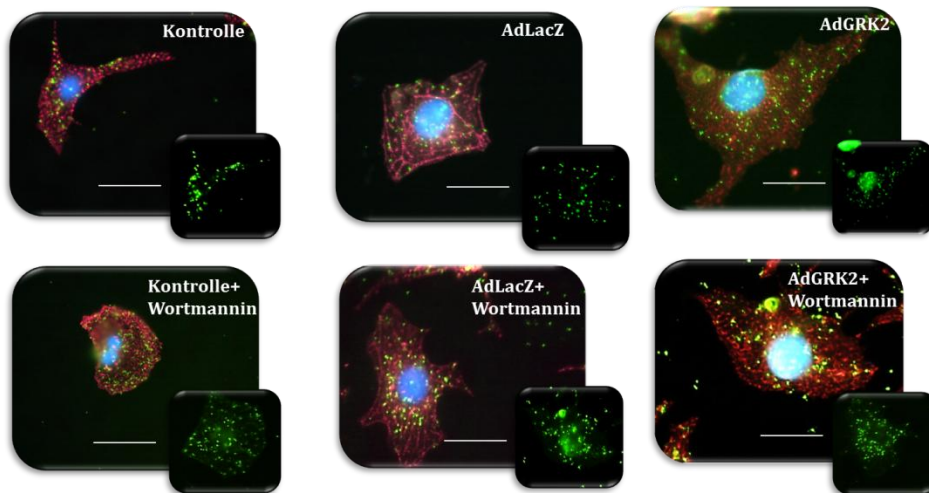


Abbildung 32: Untersuchung einer möglichen Interaktion zwischen GRK2 und PI3K γ in An und Abwesenheit von Wortmannin. NRVCMs wurden eine Stunde vor Virusgabe mit Wortmannin (0,1 μ M) behandelt und für 48 h mit AdLacZ und AdGRK2 (MOI 50) transduziert. Die Immunfluoreszenzfärbung wurde mit Alexa Red gekoppelten α -sarkomerischen Actinin Antikörper durchgeführt. Die Färbung des Nukleus der Zellen erfolgte mit DAPI (blau). (A) Durch Anwendung des Duolink Assay erfolgte die quantitative Auswertung der Interaktion zwischen GRK2 und PI3K γ (grüne Punkte) pro Zellfläche. (B) Repräsentative Bilder der Kardiomyozyten in Ab- und Anwesenheit von Wortmannin. Statistik: One way Anova gegen Scr (Prism); * $<0,05$, ** $<0,01$; n=2 mit je 8-10 Zellen pro Ansatz.

Eine Interaktion zwischen GRK2 und PI3K γ konnte im Vergleich zu den AdLacZ transduzierten Zellen mit einer GRK2 Überexpression um 80 % erhöht werden (Abbildung 32). Diese vermehrte Interaktion ging mit einer Zunahme der Kardiomyozytengröße einher (Abbildung 29). Darüber hinaus fand eine weitere zunehmende Interaktion zwischen diesen beiden Molekülen in Anwesenheit von Wortmannin statt, obwohl sich die Größe der Kardiomyozyten um das 3-fache verringerte (Abbildung 29 und Abbildung 32).

3.2.7.2 Untersuchung der Interaktion zwischen GRK2 und $G\alpha_q$

Da bekannt ist, dass GRK2 eine Bindungsdomäne für $G\alpha_q$ aufweist und die G-Proteinuntereinheit $G\alpha_q$ maßgeblich an der Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie beteiligt ist, fanden, unabhängig von einer möglichen GRK2/PI3K γ Interaktion Untersuchungen bezüglich der Interaktion von GRK2 mit $G\alpha_q$ unter prohypertrophen Bedingungen statt. Hierzu wurden NRVCMs mit ANG II stimuliert und eine mögliche Interaktion zwischen der Kinase und der G-Protein Untereinheit $G\alpha_q$ mit dem Duolink Assay untersucht.

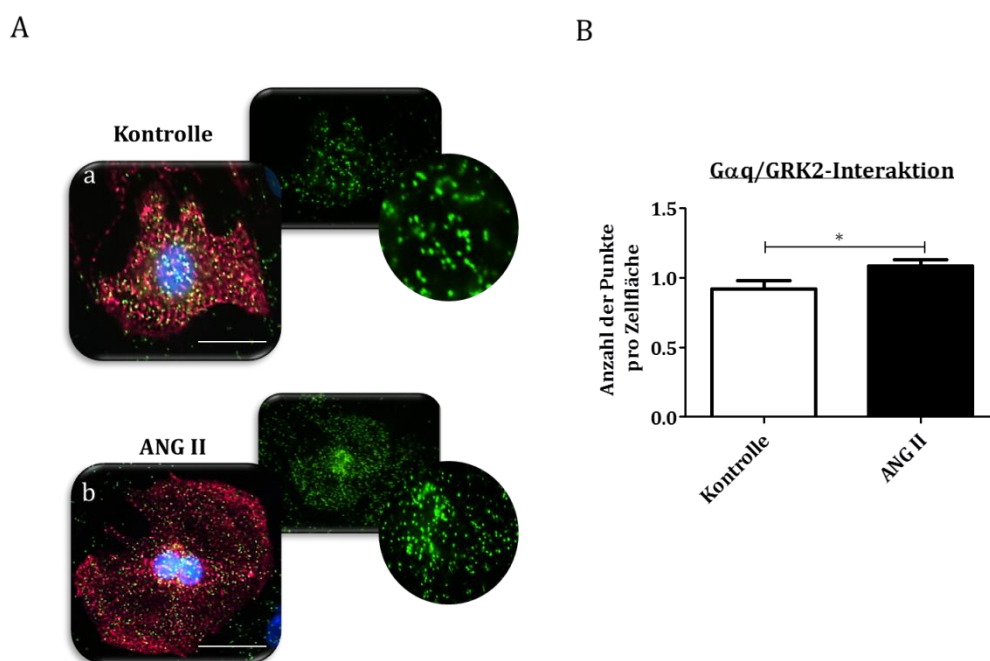


Abbildung 33: Interaktion der GRK2 mit $G\alpha_q$ unter pro-hypertropher Stimulation. NRVCMs für 24 h mit ANG II stimuliert. (A) Die Zellen wurden einer Alexa Red gekoppelten Immunfärbung gegen α -sarkomerisches Actinin unterzogen. Die Färbung des Nukleus der Zellen erfolgte mit DAPI (blau angefärbt). (B) Durch Anwendung des Duolink Assay erfolgte die quantitative Auswertung der Interaktion zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ mit ImageJ (grüne Punkte) pro Zellfläche Statistik. One way Anova (Prism); $* < 0,05$; $n=2$, mit je 8-10 Zellen pro Ansatz.

Eine Interaktion zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ konnte, wie aus Abbildung 33 ersichtlich, beobachtet werden. Eine zunehmende Interaktion zwischen GRK2 und $G\alpha_q$ wurde nach Stimulation der Kardiomyozyten mit ANG II beobachtet, gezeigt durch die grünen Punkte, welche einen Interaktionskomplex dieser beiden Proteine darstellt. Im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen, war unter ANG II Stimulation eine Zunahme in der Anzahl der Interaktionskomplexe um 30 % zu beobachten.

4 Diskussion

Die Myokardhypertrophie ist ein Anpassungsmechanismus des Herzens auf biomechanischen und neurohumoralen Stress und stellt zunächst einen adaptiven Prozess dar, um eine erhöhte Wandspannung zu kompensieren. Eine andauernde Belastung des Herzens durch eine Vielzahl von kardiovaskulären Störungen einschließlich Myokardinfarkt, arterielle Hypertonie und veränderte Kontraktilität durch Mutationen sarkomerischer Proteine provoziert jedoch eine Hypertrophie der Kardiomyozyten. Dilatative Myopathie, Herzrhythmusstörungen und Herzinsuffizienz sind die Folge und führen häufig zum plötzlichen Herztod der Patienten [131, 132].

Trotz des Wissens darüber, dass die linksventrikuläre Massenzunahme ein unabhängiger Risikoprädiktor bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz darstellt, gibt es derzeit keine spezifischen Therapieansätze, die zur Behandlung der pathologischen Myokardhypertrophie führen [133]. Bestehende Herzinsuffizienztherapien wie β -Blocker, ACE-Inhibitoren oder Aldosteron-Antagonisten blockieren neurohormonale Systeme, die in der Herzinsuffizienz moduliert werden. Obwohl diese Therapieansätze die Prognose in der Herzinsuffizienz verbessern konnten, ist nicht bekannt, inwieweit sowohl maladaptive als auch adaptive nachgeschaltete Prozesse beeinflusst werden [134]. Die pathologische Myokardhypertrophie wäre ein früher Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen um die Entstehung der Herzinsuffizienz zu verhindern.

4.1 GRK2, ein neuer Regulator der pathologischen Hypertrophie

Dass GRK2 eine entscheidende Rolle bei kardialen Erkrankungen spielt, konnte bereits die Arbeitsgruppe um Prof. Lohse 1993 aufzeigen [76]. Sie bewies, dass die GRK2 im Herzen bei Patienten mit einer Herzinsuffizienz (dilatative und ischämische Kardiomyopathie) hochreguliert ist [76, 79]. Auch Versuche an einem Mausmodell der ischämischen Kardiomyopathie zeigten eine Zunahme in der GRK2 Expression und Aktivität [115]. Allerdings war es relativ lange unverstanden, ob die GRK2 Hochregulation einen adaptiven oder doch einen maladaptiven Prozess darstellt. Eine genetische Ablation von GRK2 (GRK2KO), die in herzinsuffizienten Mäusen zu einer signifikanten Verbesserung der Überlebensrate und der kardialen Funktion im Vergleich zu den Wildtypmäusen führte, zeigte, dass es sich bei der GRK2 Hochregulation um einen maladaptiven Prozess handeln muss. Neben einer verbesserten Pumpfunktion in den GRK2KO Mäusen konnte

zudem das adverse Remodeling in den insuffizienten Mäusen unterdrückt werden [115, 117].

Nicht nur in infarzierten GRK2KO Mäusen konnte eine Hypertrophieausbildung in Folge eines Herzinfarktes vermindert werden. Raake *et al.* zeigten an Hand von *in vivo* Daten an konditionellen GRK2KO Mäusen, die zuvor einer transversalen Aortenkonstriktion als Modell der pathologischen Myokardhypertrophie unterzogen wurden, nicht nur ein im Trend verbessertes Gesamtüberleben, sondern ebenso eine signifikant verringerte myokardiale Hypertrophie (Abbildung 6).

Im ersten Teil der Arbeit sollte daher die bislang unerforschte und mögliche kausale Rolle von GRK2 bei der Entstehung der pathologischen Myokardhypertrophie charakterisiert werden. Um die Funktion der GRK2 in Folge pro-hypertropher Stimulation näher zu untersuchen, wurde der Effekt einer GRK2 Inhibition auf die pro-hypertrophe Antwort *in vitro* untersucht. Dazu wurden primäre neonatale Rattenkardiomyozyten mit einer gegen GRK2 gerichteten siRNA behandelt und anschließend mit dem α -adrenergen Agonisten PE und dem neurohumoralen Agens ANG II stimuliert. Die so induzierte pro-hypertrophe Antwort wurde durch Zunahme der Kardiomyozytengröße und der fetalen Genexpression bestimmt. Ebenso wurde die GRK2 Expression auf mRNA und Proteinebene unter hypertropher Stimulation untersucht. Zusätzlich sollte die adenovirale Überexpression endogener GRK2 Aufschluss darüber geben, ob sich allein durch die GRK2 Überexpression eine pro-hypertrophe Antwort induzieren lässt. Hierzu wurde die Zunahme der Kardiomyozytengröße als Ausleseparameter herangezogen.

Interessanterweise konnte festgestellt werden, dass eine Herunterregulation der GRK2 nach siRNA Zugabe zu einer verminderten pro-hypertrophen Antwort in den Kardiomyozyten sowohl nach PE als auch nach ANG II Stimulation führte. Während die Expressionsanalysen von GRK2 auf mRNA Ebene unter PE Stimulation im Gegensatz zu den ANG II stimulierten Zellen keine Zunahme der GRK2 Expression zeigten, lässt sich auf Proteinebene eine signifikante Hochregulation der GRK2 sowohl in den PE als auch ANG II behandelten Zellen beobachten (Abbildung 13). Eine mögliche Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse zwischen mRNA und Proteinexpression nach PE Stimulation könnte in der höheren Translationsrate der GRK2 liegen. Aber auch posttranslationale Modifikationen können beispielsweise zur Stabilität des Proteins beitragen und so für eine stärkere Proteinexpression verantwortlich sein. Die Beobachtungen, die bereits in einem TAC Modell an Mäusen bezüglich der Veränderung der GRK2 Level, aber auch der pathophysiologischen Veränderungen in konditionellen *knockout* Mäusen zu sehen waren, konnte durch die *in vitro* Studien verifiziert werden. So wurde gezeigt, dass die zellulären Veränderungen, die im Zuge einer pathologischen Hypertrophie entstehen, durch eine

GRK2 Inhibition unterdrückt werden konnten. Ebenso interessant war, dass durch eine GRK2 Überexpression die pathologische Hypertrophie induziert wurde, wie anhand der Größenzunahme der Kardiomyozyten gezeigt werden konnte (Abbildung 15).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass bereits in der pathologischen Myokardhypertrophie von einer maladaptiven Rolle der GRK2 auszugehen ist. Während eine GRK2 Hochregulation mit einer verstärkten Hypertrophieantwort einhergeht, konnte durch einen *knockdown* von GRK2 die Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie verhindert werden.

4.2 GRK2 provoziert die pathologische Myokardhypertrophie über den GSK3 β /AKT Signaltransduktionsweg

Die molekularen Mechanismen, die für das Wachstum der Kardiomyozyten verantwortlich gemacht werden, sind sehr komplex. Als Antwort auf mechanische und neurohormonale Stimuli werden über verschiedene Membranrezeptoren, *second messenger* und Transkriptionsfaktoren, molekulare Signaltransduktionswege aktiviert, deren genetische Antwort durch Re-Expression fetaler Gene und Größenzunahme der Kardiomyozyten charakterisiert ist. Sie stellen somit einen Marker für die pathologische Hypertrophie im Herzen dar [33].

Es gibt eine Vielzahl humoraler Faktoren, die als hypertrophe Stimuli in den Kardiomyozyten agieren, sich aber in ihrer Wirkung unterscheiden. Vor allem die Aktivierung heptahelikaler G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (GPCRs), wie der β_1 -adrenerge Rezeptor, der AT1 Rezeptor und der α -adrenerge Rezeptor sind an der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie und der Progression der Herzinsuffizienz beteiligt [66, 123]. In den letzten Jahren wurden zahlreiche Signaltransduktionswege, die der pathologischen Myokardhypertrophie von Kardiomyozyten zugrunde liegen, aufgeklärt (Abbildung 2).

Als G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase ist GRK2 hauptsächlich als Modulator von GPCRs bekannt. So konnten zahlreiche Studien aufzeigen, dass GRK2 durch Einflussnahme auf das β -adrenerge *Signaling* eine entscheidende Bedeutung in der Herzinsuffizienz hat [76, 135-137]. Den Beweis dafür, dass GRK2 bereits in der pathologischen Hypertrophie eine maladaptive Rolle einnimmt, konnte anhand einer gesteigerten Expression der fetalen Gene und einer hypertrophen Zellgrößenzunahme im ersten Teil der Arbeit gezeigt werden. Wie genau aber GRK2 den Signaltransduktionsweg in der pathologischen Hypertrophie moduliert beziehungsweise pathologisch beeinflusst, soll im Folgenden diskutiert werden.

4.2.1 GRK2 moduliert den NFAT-Influx in den Nukleus durch GSK3 β -Inhibition

Arbeiten von Onohara *et al.* konnten belegen, dass in einer ANG II induzierten Hypertrophie die NFAT Translokation in den Nukleus durch eine Überexpression des N-Terminus (RGS Domäne) von GRK2 in NRVCs verhindert wird [138]. Dass GRK2 an der Translokation von NFAT in den Zellkern beteiligt ist, belegen ebenfalls die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit (Abbildung 19). Eine durch ANG II induzierte nukleäre NFAT Translokation und der damit verbundene Anstieg der NFAT Aktivität im Zellkern konnte durch einen GRK2 *knockdown* verhindert werden. Die zentrale Rolle von NFAT als einer der wichtigen Transkriptionsfaktoren in der Aktivierung der pathologischen Myokardhypertrophie zeigen zahlreiche Arbeiten [54, 139]. Eine Vielzahl an Signaltransduktionsmechanismen sind für die Modulation der NFAT Aktivierung in der pathologischen Hypertrophie verantwortlich [44, 125]. Aufgrund der Beobachtung, dass GRK2 für die NFAT Modulation mitverantwortlich ist, erfolgte die genauere Untersuchung der Aktivatoren wie auch Inhibitoren von NFAT unter GRK2 Einfluss. Zwei zentrale Gegenspieler der NFAT Translokation standen dabei im Fokus, zum einen die Phosphatase Calcineurin und zum anderen die Kinase GSK3 β .

Diverse Studien belegen, dass Calcineurin in der Hypertrophie aktiviert wird und im aktiven Zustand den Transkriptionsfaktor NFAT dephosphoryliert. Die Folge ist dessen Translokation in den Zellkern. So zeigten Arbeiten an Mäusen nach TAC eine vermehrte Calcineurinexpression und Aktivität auf, die zudem proportional zu der NFAT Aktivierung verlief [140, 141]. Auch die *in vitro* Daten der vorliegenden Arbeit bewiesen, dass Calcineurin in Folge pro-hypertropher Stimulation vermehrt exprimiert wurde (Abbildung 20). Interessant war hierbei, dass ein Anstieg von Calcineurin durch einen GRK2 *knockdown* verhindert werden konnte. Allerdings führte eine GRK2 Überexpression zu keinem signifikanten Anstieg der Calcineurinexpression (Abbildung 21). Dies deutet darauf hin, dass Calcineurin nur in einem pro-hypertrophen Milieu durch GRK2 beeinflusst wird beziehungsweise die Modulation der Calcineurinexpression durch GRK2 unter pro-hypertropher Stimulation anders verläuft, als nach einer GRK2 Überexpression. Die genaue Aufklärung des Mechanismus von GRK2 in der Regulation von Calcineurin wäre daher sicherlich interessant zu erforschen.

Auch andere Proteine wie die MAPK sind an der NFAT Translokation beteiligt und spielen als weitere Effektoren eine zentrale Rolle in der Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie. Der MAPK Signaltransduktionsweg ist nicht nur direkt an der NFAT-Modulation beteiligt, sondern reguliert über Verknüpfungen mit den anderen

Signaltransduktionswegen wie über den Calcineurin/NFAT Signalweg die prohypertrophe Zellantwort [129, 142]. Es ist bekannt, dass MAPK wie ERK1/2 durch ANG II und Katecholamine aktiviert werden. So wiesen Studien in neonatalen Rattenkardiomyozyten auf, dass eine erhöhte ERK1/2 Phosphorylierung zu einer prohypertrophen Antwort führte [126]. Eine Zunahme der ERK1/2 Phosphorylierung konnte auch in den *in vitro* Studien der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Allerdings hatte ein *knockdown* von GRK2 keinen Einfluss auf die ERK1/2 Phosphorylierung (Abbildung 22). Es muss daher davon ausgegangen werden, dass GRK2 keinen Einfluss auf den ERK induzierten prohypertrophen Signalweg hat. In diesem Zusammenhang wäre es interessant zu untersuchen, ob nicht andere Phosphorylierungsstellen der ERK, wie Thr188, doch unter dem Einfluss der GRK2 stehen [44].

Als Antagonist der Calcineurin induzierten NFAT Aktivierung fungiert die Kinase GSK3 β . Arbeiten von Antos *et al.* haben gezeigt, dass eine kardial-spezifische GSK3 β Überexpression zu einer Reduzierung des pathologischen Hypertrophiewachstums der Kardiomyozyten führte, indem GSK3 β den Transkriptionsfaktor NFAT an der N-terminalen Domäne phosphoryliert. Diese Phosphorylierung antagonisiert den Effekt von Calcineurin und inhibiert den nukleären Import von NFAT [50, 51, 143]. Auf Grund der Beobachtung, dass GRK2 die NFAT Translokation unter ANG II Stimulation beeinflusst und die Ergebnisse daraufhin deuteten, dass GRK2 nicht über NFAT Agonisten auf den Transkriptionsfaktor wirkt, erfolgte die nähere Untersuchung der GSK3 β Aktivität. Als konstitutiv aktive Kinase ist GSK3 β im phosphorylierten Zustand beziehungsweise unter prohypertropher Stimulation inaktiv. Neonatale Rattenkardiomyozyten zeigten, nachdem sie mit verschiedenen prohypertrophen Agenzien stimuliert wurden, eine Zunahme der GSK3 β Phosphorylierung (Abbildung 23). Interessanterweise konnte eine verstärkte GSK3 β Inhibierung, gemessen am Phosphorylierungsstatus, durch den GRK2 *knockdown* vermindert werden. Ergänzend dazu erfolgte die Untersuchung der GSK3 β Phosphorylierung unter einer adenoviralen Überexpression von GRK2. Entscheidend war hierbei, dass im Vergleich zu der Calcineurinexpression eine verstärkte GSK3 β Phosphorylierung vorzufinden war. Daher war davon auszugehen, dass GRK2 über GSK3 β ihren prohypertrophen Effekt ausführt.

Durch die Anwendung eines GSK3 β Inhibitors sollte geklärt werden, ob GRK2 an der direkten Phosphorylierung von GSK3 β beteiligt ist oder ob die Modulation auf weiter oben im Signaltransduktionsweg liegende Effektoren zurückzuführen war. Hierzu wurden NRVCs mit LiCl behandelt. Anhand des Phosphorylierungslevels von GSK3 β und der Zellgröße der NRVCs konnten Rückschlüsse auf die Inhibierung und die pathologische Zellantwort gezogen werden. Lithiumchlorid besitzt eine kompetitive Wirkung auf

Magnesiumionen, welche für die Substratphosphorylierung wichtig sind. GSK3 β kann ihre Phosphorylierung auf vielen Substraten nur in Abhängigkeit von Mg²⁺-ATP katalysieren. LiCl aktiviert aber auch GSK3 β -phosphorylierende Kinasen (PKC α , AKT), die daraufhin GSK3 β verstärkt phosphorylieren und somit inaktivieren [144, 145]. Die in der Abbildung 26 dargestellten Beobachtungen zeigen, dass in den LiCl behandelten Zellen trotz Abwesenheit der GRK2 keine Verringerung in der Zellgröße festzustellen war. Somit wurde postuliert, dass GRK2 oberhalb der GSK3 β Signalweiterleitung ihren Einfluss haben muss.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ein Anstieg der GRK2 Expression mit einer verstärkten GSK3 β Phosphorylierung einherging. Der anti-hypertrophe Effekt der GSK3 β konnte somit unterbunden werden, was an einer erhöhten NFAT Aktivität gezeigt werden konnte. Die Behandlung hypertropher Kardiomyozyten mit der siGRK2 führte zu einer erhöhten GSK3 β Aktivität verbunden mit einem Export von NFAT aus dem Zellkern und einer Abnahme der NFAT Aktivität. Die Inhibition der GSK3 β Aktivität konnte somit aufgehoben werden. Ebenso konnte durch eine Inhibierung der GSK3 β durch LiCl verdeutlicht werden, dass GRK2 oberhalb von GSK3 β die pro-hypertrophe Antwort in den Kardiomyozyten moduliert.

4.2.2 GRK2 inhibiert GSK3 β durch eine verstärkte AKT-Aktivierung

Dass der PI3K γ /AKT/GSK3 β Signaltransduktionsweg eine wichtige Rolle in der Entstehung der pathologischen Hypertrophie spielt, geriet erst in den letzten Jahren stärker in den Fokus der wissenschaftlichen Forschung [50, 127, 146-148].

Interessant ist, dass dieser Signalweg nicht nur eine Bedeutung bei der Entwicklung der physiologischen Myokardhypertrophie hat, sondern ebenso an der Ausbildung einer pathologischen Hypertrophie beteiligt ist. Wie an einem ersten *in vivo* Versuch an Schwimmmäusen gezeigt werden konnte, ist eine Hochregulation der GRK2-mRNA nicht zu beobachten (Abbildung 7). Von einer GRK2 Beteiligung in der physiologischen Hypertrophie ist daher nicht auszugehen.

Während in der physiologischen Hypertrophie die Signaltransduktion durch Wachstumsrezeptoren wie IGF Rezeptoren oder Tyrosinkinase Rezeptoren über PI3K α zu einer Aktivierung von AKT führt, verläuft unter pro-hypertropher Stimulation die Signalmaschinerie über GPCRs, welche PI3K γ aktivieren und somit Einfluss auf die AKT Aktivierung nehmen.

Die unter 4.2.1 diskutierten Daten gaben Anlass zu der Annahme, dass GRK2 oberhalb der GSK3 β Signalkaskade eingreift und so möglicherweise den anti-hypertrophen Effekt der GSK3 β inhibiert.

Studien an transgenen Mäusen belegten, dass mittels einer AKT Überexpression eine verstärkte pathologische Hypertrophie induziert wird. Zahlreiche Arbeiten zeigten zudem auf, dass GSK3 β nach pro-hypertropher Stimulation direkt durch AKT phosphoryliert und inaktiviert wird [149-151]. Die AKT Phosphorylierung erfolgt hierbei am Serin- und Threoninrest. Darüber hinaus ist zu erwähnen, dass eine vollständige AKT-Aktivierung nur vorhanden ist, wenn sowohl die Phosphorylierung am Serin als auch am Threoninrest stattfindet. Eine alleinige Threoninphosphorylierung führt nicht zu einer vollständigen AKT-Aktivierung [152]. Da GRK2 eine Bindungsdomäne für AKT aufweist, war es naheliegend zu untersuchen, ob GRK2 an der Aktivierung von AKT beteiligt ist [153]. Daher wurden die Phosphorylierungsstellen der AKT unter siGRK2 in Gegenwart pro-hypertropher Stimulantien untersucht.

Wie unter 3.2.4 gezeigt, fand sowohl unter α -adrenerger Stimulation als auch unter ANG II Stimulation eine verstärkte Phosphorylierung von AKT statt. Interessant hierbei war, dass je nach Art der Stimulation der Zellen, der GRK2 *knockdown* eine unterschiedliche Auswirkung auf die Phosphorylierungsstellen von AKT hat. Ebenso war interessant zu beobachten, dass die Überexpression von GRK2 zu einer vollständigen AKT Phosphorylierung führte. Da die pathologische Myokardhypertrophie nicht nur durch einen bestimmten, sondern durch verschiedene Signaltransduktionswege reguliert wird, kann vermutet werden, dass GRK2 bei der AKT Modulation weiteren Signaltransduktionsmechanismen unterliegt.

4.2.3 GRK2 vermittelt seinen hypertrophen Effekt an der Membran über G α q und PI3K γ

Aufgrund der Beobachtungen, dass GRK2 zum einen die GSK3 β Phosphorylierung beeinflusst und zum anderen, dass die AKT Aktivität ebenso unter der Modulation von GRK2 steht, wurde postuliert, dass GRK2 seine pro-hypertrophe Rolle an der Zellmembran ausführen muss und somit den antihypertrophen Signalweg über GSK3 β negativ beeinflusst. Oberhalb des AKT Signaltransduktionsweges liegt die PI3K γ . Es ist bekannt, dass die PI3K γ im Vergleich zur PI3K α in der pathologischen Myokardhypertrophie aktiviert wird [45, 46, 146]. Durch ihre Phosphorylierung am Threoninrest der AKT ist sie maßgeblich an der Ausprägung der pro-hypertrophen Zellgrößenzunahme beteiligt und provoziert die pathologische Hypertrophie. Eine Inhibierung der PI3K γ durch Wortmannin sollte klären, ob GRK2 durch direkte Interaktion mit der PI3K γ diese in ihrer

Aktivität beeinflusst, da auch hier bekannt ist, dass GRK2 eine Bindungsdomäne für PI3K γ aufweist [153]. Wortmannin verhindert sowohl die Threonin- als auch die Serinphosphorylierung der AKT durch Inhibition der PI3K γ , was zu einer verringerten AKT Aktivierung und zu einer verstärkten GSK3 β Aktivierung führt und somit den antihypertrophen Effekt der GSK3 β begünstigt [152].

Die zentrale Frage war, ob mittels einer GRK2 Überexpression der inhibitorische Effekt des Wortmannins, gemessen an der Zellgröße, aufgehoben werden würde. Gleichzeitig wurde eine mögliche Interaktion der GRK2 mit PI3K γ untersucht (Abbildung 32).

Anders als erwartet zeigten die Versuche, dass kein hypertrophes Wachstum trotz GRK2 Überexpression in den Wortmannin behandelten NRVCs zu beobachten war (Abbildung 29). Allerdings konnte eine verstärkte Interaktion zwischen GRK2 und der PI3K γ gemessen werden (Abbildung 32). Interessant war hierbei, dass in Gegenwart von Wortmannin die Interaktion zwischen GRK2 und PI3K γ verstärkt wurde. Die Vermutung liegt daher nahe, dass es sich dabei um einen Feedback Mechanismus von GRK2 handelt. Aufgrund der Inhibierung von PI3K γ durch Wortmannin kommt es zu einer vermehrten Rekrutierung der GRK2 an die Membran. Das trotz Interaktion keine Veränderung in der Vergrößerung der Zellen zu beobachten ist, könnte an der pharmakologischen Wirkungsstärke des Inhibitors liegen, so dass die Wirkung von GRK2 unbeeinflusst bleibt.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine verstärkte Interaktion von GRK2 mit der G α q-Untereinheit unter ANG II Stimulation vorzufinden war (Abbildung 33). Welche Auswirkungen das auf die PI3K γ Aktivität beziehungsweise auf die AKT Phosphorylierung hat, muss in weiteren Versuchen untersucht werden.

Allerdings führen diese Beobachtungen zu der Annahme, dass GRK2 als *Scaffold* Protein agiert und so den AKT/GSK3 β Signaltransduktionsweg moduliert. Dies bestätigten auch die Versuche bezüglich der AKT Phosphorylierung, wie bereits unter 4.2.2 diskutiert.

Die Tatsache, dass die PI3K γ über die G $\beta\gamma$ Untereinheit an die Membran rekrutiert und aktiviert wird und die G α q Untereinheit ebenso pro-hypertrophe Signaltransduktionswege induziert, lässt die interessante Frage offen, ob GRK2 durch eine Interaktion mit beiden Initiatoren die pathologische Hypertrophie moduliert [154].

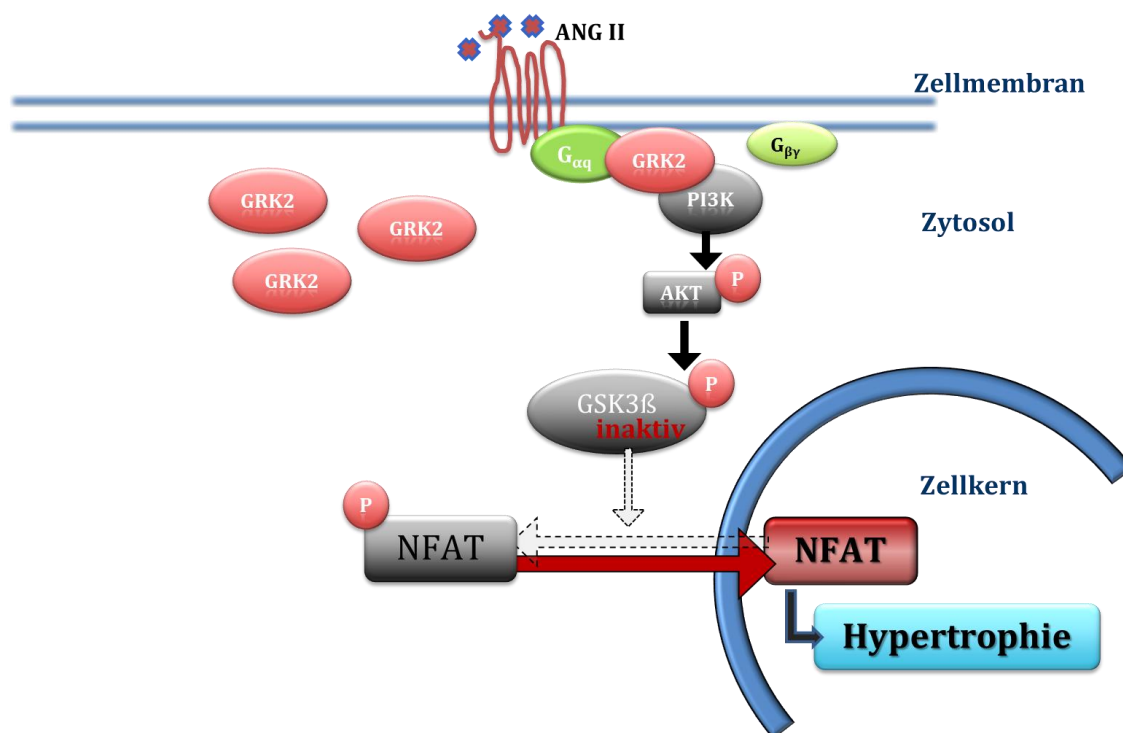


Abbildung 34: Putativer Mechanismus der GRK2 in der pathologischen Myokardhypertrophie

Vereinfachte Darstellung der G-Protein vermittelten PI3K/AKT Signalkaskade durch die GRK2 möglicherweise die Ausbildung der kardialen pathologischen Hypertrophie beeinflusst. Nachdem es in Folge einer GPCR Aktivierung zu der Dissoziation der G-Protein Untereinheiten $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ kommt, wird GRK2 an die Membran rekrutiert. GRK2 geht dabei nicht nur eine Bindung mit $G\alpha$, sondern auch eine Bindung mit der PI3K ein. Dieser Interaktionskomplex führt zu einer Aktivierung von AKT. GSK3 β wird daraufhin durch AKT phosphoryliert und inaktiviert. Aufgrund der inaktivierten GSK3 β befindet sich NFAT im nicht phosphorylierten Zustand. NFAT wird daraufhin in den Zellkern transloziert, wo es die pathologische Hypertrophie induziert. GPCR: G-Protein-gekoppelter Rezeptor; Ang II: Angiotensin II; PE: Phenylephrin; GRK2: G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2; PI3K γ : Phosphoinositid-3-Kinase gamma; GSK3 β : Glykogensynthase Kinase 3 β ; NFAT: *Nuclear factor of activated T-cells*

4.3 Ausblick

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass GRK2 in Folge pathologischer prohypertropher Reize vermehrt exprimiert wird und eine Schlüsselrolle in der Vermittlung der pathologischen Myokardhypertrophie einnimmt. Interessant wäre jetzt zu untersuchen, welche Domänen von GRK2 für die Hypertrophieausbildung relevant sind. Diese Experimente würden neue Erkenntnisse zum differenzierten *Signaling* in der pathologischen Myokardhypertrophie zulassen und könnten außerdem neue Therapiemöglichkeiten bieten. Mögliche Ansätze wären hier der Vergleich der molekularen Inhibition des $G\alpha$ -GRK2-Interaktoms durch Expression der GRK2-RGS-Domäne (AAV9.GRK2-RGS) mit einer Inhibition des $G\beta\gamma$ -GRK2-Interaktoms durch

Expression des G $\beta\gamma$ -bindenden C-Terminus von GRK2 (AAV9. β ARKct) und einem kompletten GRK2 *knockdown*.

Da die pathologische Myokardhypertrophie als Vorstufe zur Entwicklung einer klinisch manifesten Herzinsuffizienz zu betrachten ist, gilt es diese therapeutisch möglichst früh zu unterdrücken. Die in dieser Arbeit präsentierten Ergebnisse stellen GRK2 als ein interessantes Ziel einer präventiven Therapie dar. Als nächster Schritt ist daher dringend die Durchführung eines gentherapeutischen Ansatzes zum *knockdown* von GRK2 in einem *in vivo* Modell der pathologischen kardialen Hypertrophie geboten. Dies wäre ein vielversprechender Ansatz um frühzeitig die pathologische Myokardhypertrophie und damit langfristig die Entwicklung der Herzinsuffizienz präventiv zu hemmen.

5 Zusammenfassung/Summary

Die pathologische myokardiale Hypertrophie ist eine Anpassungsreaktion des Herzens auf eine Vielzahl mechanischer und auch hormoneller Stimuli, die ein erster Indikator für eine sich später entwickelnde chronische Herzinsuffizienz (Herzschwäche) darstellt und letztendlich zu einer erhöhten Mortalität führt.

Die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2) galt bislang vor allem als ein zentraler Regulator der β -adrenergen Signaltransduktion. In Vorarbeiten konnte bereits gezeigt werden, dass GRK2 in dieser Funktion maßgeblich zur Entstehung und Progression der Herzinsuffizienz beiträgt. Ebenso konnte an einem Mausmodell (TAC) gezeigt werden, dass GRK2 im Rahmen der pathologischen Myokardhypertrophie hochreguliert wird, nicht jedoch bei der physiologischen Hypertrophie nach Schwimmtraining bei Mäusen. In einer kardial-spezifischen konditionellen GRK2 *knockout* (GRK2KO) Maus nach TAC wurde zudem eine signifikante Repression der pathologischen Myokardhypertrophie nachgewiesen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die bislang unerforschte, mögliche kausale Rolle von GRK2 bei der Entstehung der pathologischen Myokardhypertrophie und ihr Eingreifen in die Signaltransduktionskaskaden untersucht.

Die *in vivo* an einer konditionellen GRK2KO Maus untersuchten Veränderungen prohypertropher Parameter wurden in einem Zellkulturmodell mit neonatalen Kardiomyozyten reproduziert. Ebenso konnte eine Zunahme der GRK2 Level, unter prohypertrophen Bedingungen nachgewiesen werden. Es konnte gezeigt werden, dass durch einen siRNA- vermittelten *knockdown* von GRK2 die prohypertrophe Zellantwort vermindert wurde.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass GRK2 über $G\alpha_q$ und PI3K Einfluss auf die PI3K/AKT/GSK3 β induzierte NFAT Aktivierung nimmt und als eine Art *Scaffold* Protein die pathologische Hypertrophie moduliert. Die Entschlüsselung der Rolle der GRK2 in der pathologischen Myokardhypertrophie eröffnet die Möglichkeit neuer Therapieansätze nicht nur in Hinsicht auf die Hypertrophie im Herzen, sondern auch in der Prävention der Entwicklung einer Herzinsuffizienz.

Summary

The pathological myocardial hypertrophy is an adaptive response of the heart to a variety of mechanical and hormonal stimuli and a precursor of chronic heart failure which leads to increased mortality.

In preliminary work it has already been shown that GRK2 is a central regulator of the β -adrenergic signal transduction and contributes significantly to the development and progression of heart failure. In a mouse model (of transaortic constriction, TAC) it has been demonstrated that GRK2 is upregulated under pathological myocardial hypertrophy, but not in physiological hypertrophy after swimming exercise in mice. In a conditional cardiac-specific GRK2KO mice displayed a significant repression of pathological myocardial hypertrophy was shown after TAC.

In the present study the previously unexplored, possible causal role of GRK2 in the development of pathological cardiac hypertrophy and its role into the signal transduction have been investigated.

The changes in pro-hypertrophic parameters that had been observed *in vivo* in a conditional GRK2KO were reproduced in a cell culture model of neonatal rat cardiomyocytes. Stimulation of NRVCs with pro-hypertrophic substances resulted in a pro-hypertrophic phenotype (measured by cell size) and in an upregulation of GRK2. Moreover, it was demonstrated that GRK2 influences the PI3K/AKT/GSK3 β induced NFAT activation by direct interaction with G α q and PI3K γ and modulates the pathological hypertrophy as a kind of scaffold protein. Revealing the role of GRK2 in pathological myocardial hypertrophy opens up the possibility of new therapeutic approaches not only in terms of the hypertrophy of the heart, but also in preventing the development of heart failure.

Literaturverzeichnis

1. Bundesamt, S. *10 häufigsten Todesursachen der ICD-10*. 2013.
2. Levy, D., et al., *Long-term trends in the incidence of and survival with heart failure*. The New England journal of medicine, 2002. **347**(18): p. 1397-402.
3. Hobbs, R.E., *Management of decompensated heart failure*. American journal of therapeutics, 2004. **11**(6): p. 473-9.
4. Levy, D., et al., *Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study*. The New England journal of medicine, 1990. **322**(22): p. 1561-6.
5. Sugden, P.H. and A. Clerk, *Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy*. Journal of molecular medicine, 1998. **76**(11): p. 725-46.
6. Pluim, B.M., et al., *Correlation of heart rate variability with cardiac functional and metabolic variables in cyclists with training induced left ventricular hypertrophy*. Heart, 1999. **81**(6): p. 612-7.
7. Berenji, K., et al., *Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?* American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2005. **289**(1): p. H8-H16.
8. Wakatsuki, T., J. Schlessinger, and E.L. Elson, *The biochemical response of the heart to hypertension and exercise*. Trends in biochemical sciences, 2004. **29**(11): p. 609-17.
9. Holtz, J., *[The significance of myocardial hypertrophy in heart failure]*. Zeitschrift fur Kardiologie, 1992. **81 Suppl 4**: p. 41-8.
10. Frey, N. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly*. Annual review of physiology, 2003. **65**: p. 45-79.
11. Artham, S.M., et al., *Clinical impact of left ventricular hypertrophy and implications for regression*. Progress in cardiovascular diseases, 2009. **52**(2): p. 153-67.
12. Hood, W.P., Jr., C.E. Rackley, and E.L. Rolett, *Wall stress in the normal and hypertrophied human left ventricle*. The American journal of cardiology, 1968. **22**(4): p. 550-8.
13. Grossman, W., D. Jones, and L.P. McLaurin, *Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle*. The Journal of clinical investigation, 1975. **56**(1): p. 56-64.
14. Carabello, B.A., *Concentric versus eccentric remodeling*. Journal of cardiac failure, 2002. **8**(6 Suppl): p. S258-63.
15. Anversa, P., R. Ricci, and G. Olivetti, *Quantitative structural analysis of the myocardium during physiologic growth and induced cardiac hypertrophy: a review*. Journal of the American College of Cardiology, 1986. **7**(5): p. 1140-9.
16. Carabello, B.A., et al., *Hemodynamic predictors of outcome in patients undergoing valve replacement*. Circulation, 1986. **74**(6): p. 1309-16.
17. Gerdes, A.M., S.E. Campbell, and D.R. Hilbelink, *Structural remodeling of cardiac myocytes in rats with arteriovenous fistulas*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 1988. **59**(6): p. 857-61.

18. Weber, K.T. and C.G. Brilla, *Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system*. Circulation, 1991. **83**(6): p. 1849-65.
19. Nag, A.C., *Study of non-muscle cells of the adult mammalian heart: a fine structural analysis and distribution*. Cytobios, 1980. **28**(109): p. 41-61.
20. MacLellan, W.R. and M.D. Schneider, *Genetic dissection of cardiac growth control pathways*. Annual review of physiology, 2000. **62**: p. 289-319.
21. Soonpaa, M.H., et al., *Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development*. The American journal of physiology, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2183-9.
22. Dorn, G.W., 2nd, J. Robbins, and P.H. Sugden, *Phenotyping hypertrophy: eschew obfuscation*. Circulation research, 2003. **92**(11): p. 1171-5.
23. Cooper, G.t., *Cardiocyte adaptation to chronically altered load*. Annual review of physiology, 1987. **49**: p. 501-18.
24. Ritter, O. and L. Neyses, *The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure*. Trends in molecular medicine, 2003. **9**(7): p. 313-21.
25. Parker, T.G., *Molecular biology of myocardial hypertrophy and failure: gene expression and trophic signaling*. New horizons, 1995. **3**(2): p. 288-300.
26. Bruneau, B.G. and A.J. de Bold, *Selective changes in natriuretic peptide and early response gene expression in isolated rat atria following stimulation by stretch or endothelin-1*. Cardiovascular research, 1994. **28**(10): p. 1519-25.
27. Schoenfeld, J.R., et al., *Distinct molecular phenotypes in murine cardiac muscle development, growth, and hypertrophy*. Journal of molecular and cellular cardiology, 1998. **30**(11): p. 2269-80.
28. Razeghi, P., et al., *Hypoxia-induced switches of myosin heavy chain iso-gene expression in rat heart*. Biochemical and biophysical research communications, 2003. **303**(4): p. 1024-7.
29. Clement, S., C. Chaponnier, and G. Gabbiani, *A subpopulation of cardiomyocytes expressing alpha-skeletal actin is identified by a specific polyclonal antibody*. Circulation research, 1999. **85**(10): p. e51-8.
30. Young, M.E., et al., *Calcitonin gene-related peptide is not essential for the development of pressure overload-induced hypertrophy in vivo*. Molecular and cellular biochemistry, 2001. **225**(1-): p. 43-9.
31. Winer, J., et al., *Development and validation of real-time quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction for monitoring gene expression in cardiac myocytes in vitro*. Analytical biochemistry, 1999. **270**(1): p. 41-9.
32. Rosenkranz, S., *TGF-beta1 and angiotensin networking in cardiac remodeling*. Cardiovascular research, 2004. **63**(3): p. 423-32.
33. Sadoshima, J. and S. Izumo, *The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress*. Annual review of physiology, 1997. **59**: p. 551-71.
34. McKinsey, T.A. and E.N. Olson, *Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry*. Current opinion in genetics & development, 1999. **9**(3): p. 267-74.
35. Yamazaki, T., et al., *Angiotensin II mediates mechanical stress-induced cardiac hypertrophy*. Diabetes research and clinical practice, 1996. **30 Suppl**: p. 107-11.
36. Rockman, H.A., W.J. Koch, and R.J. Lefkowitz, *Cardiac function in genetically engineered mice with altered adrenergic receptor signaling*. The American journal of physiology, 1997. **272**(4 Pt 2): p. H1553-9.

37. Garrington, T.P. and G.L. Johnson, *Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways*. Current opinion in cell biology, 1999. **11**(2): p. 211-8.
38. Hefti, M.A., et al., *Signaling pathways in cardiac myocyte hypertrophy*. Journal of molecular and cellular cardiology, 1997. **29**(11): p. 2873-92.
39. Tilley, D.G., *G protein-dependent and G protein-independent signaling pathways and their impact on cardiac function*. Circulation research, 2011. **109**(2): p. 217-30.
40. Chen, B.C. and W.W. Lin, *PKC- and ERK-dependent activation of I kappa B kinase by lipopolysaccharide in macrophages: enhancement by P2Y receptor-mediated CaMK activation*. British journal of pharmacology, 2001. **134**(5): p. 1055-65.
41. Yue, T.L., et al., *Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances Ischemia/Reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart*. Circulation research, 2000. **86**(6): p. 692-9.
42. Anderson, N.G., et al., *Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase*. Nature, 1990. **343**(6259): p. 651-3.
43. Payne, D.M., et al., *Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase)*. The EMBO journal, 1991. **10**(4): p. 885-92.
44. Lorenz, K., et al., *A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy*. Nature medicine, 2009. **15**(1): p. 75-83.
45. Patrucco, E., et al., *PI3Kgamma modulates the cardiac response to chronic pressure overload by distinct kinase-dependent and -independent effects*. Cell, 2004. **118**(3): p. 375-87.
46. Oudit, G.Y. and Z. Kassiri, *Role of PI3 kinase gamma in excitation-contraction coupling and heart disease*. Cardiovascular & hematological disorders drug targets, 2007. **7**(4): p. 295-304.
47. Naga Prasad, S.V., et al., *Gbetagamma-dependent phosphoinositide 3-kinase activation in hearts with in vivo pressure overload hypertrophy*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(7): p. 4693-8.
48. Alessi, D.R., et al., *Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha*. Current biology : CB, 1997. **7**(4): p. 261-9.
49. Sarbassov, D.D., et al., *Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex*. Science, 2005. **307**(5712): p. 1098-101.
50. Haq, S., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta is a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy*. The Journal of cell biology, 2000. **151**(1): p. 117-30.
51. Antos, C.L., et al., *Activated glycogen synthase-3 beta suppresses cardiac hypertrophy in vivo*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(2): p. 907-12.
52. Webb, I.G., et al., *Constitutive glycogen synthase kinase-3alpha/beta activity protects against chronic beta-adrenergic remodelling of the heart*. Cardiovascular research, 2010. **87**(3): p. 494-503.
53. Passier, R., et al., *CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo*. The Journal of clinical investigation, 2000. **105**(10): p. 1395-406.

54. Molkenkin, J.D., et al., *A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy*. Cell, 1998. **93**(2): p. 215-28.
55. Crespo, P., et al., *Ras-dependent activation of MAP kinase pathway mediated by G-protein beta gamma subunits*. Nature, 1994. **369**(6479): p. 418-20.
56. Fredriksson, R., et al., *The G-protein-coupled receptors in the human genome form five main families. Phylogenetic analysis, paralogon groups, and fingerprints*. Molecular pharmacology, 2003. **63**(6): p. 1256-72.
57. Krauss, ed. *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. 2003, Wiley-VCH GmbH & Co.KGaA
58. Gautam, N., et al., *The G-protein betagamma complex*. Cellular signalling, 1998. **10**(7): p. 447-55.
59. Neer, E.J., *Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals*. Cell, 1995. **80**(2): p. 249-57.
60. Jones, A.M. and S.M. Assmann, *Plants: the latest model system for G-protein research*. EMBO reports, 2004. **5**(6): p. 572-8.
61. Surya, A., J.M. Stadel, and B.E. Knox, *Evidence for multiple, biochemically distinguishable states in the G protein-coupled receptor, rhodopsin*. Trends in pharmacological sciences, 1998. **19**(7): p. 243-7.
62. Simon, M.I., M.P. Strathmann, and N. Gautam, *Diversity of G proteins in signal transduction*. Science, 1991. **252**(5007): p. 802-8.
63. Hamm, H.E., *The many faces of G protein signaling*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(2): p. 669-72.
64. Lohse, M.J., S. Engelhardt, and T. Eschenhagen, *What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?* Circulation research, 2003. **93**(10): p. 896-906.
65. Castellano, M. and M. Bohm, *The cardiac beta-adrenoceptor-mediated signaling pathway and its alterations in hypertensive heart disease*. Hypertension, 1997. **29**(3): p. 715-22.
66. Molkenkin, J.D. and G.W. Dorn, 2nd, *Cytoplasmic signaling pathways that regulate cardiac hypertrophy*. Annual review of physiology, 2001. **63**: p. 391-426.
67. Scholz, J., *[Inositol trisphosphate, a new "second messenger" for positive inotropic effects on the heart?]*. Klinische Wochenschrift, 1989. **67**(5): p. 271-9.
68. Scholz, J., et al., *Alpha-1 adrenoceptor-mediated positive inotropic effect and inositol trisphosphate increase in mammalian heart*. The Journal of pharmacology and experimental therapeutics, 1988. **245**(1): p. 327-35.
69. Maruyama, Y., *Galpha12/13 Mediates alpha1-Adrenergic Receptor-Induced Cardiac Hypertrophy*. Circulation research, 2002. **91**(10): p. 961-969.
70. Sugden, P.H. and A. Clerk, *"Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium*. Circulation research, 1998. **83**(4): p. 345-52.
71. Wu, D., et al., *Activation of phospholipase C by alpha 1-adrenergic receptors is mediated by the alpha subunits of Gq family*. The Journal of biological chemistry, 1992. **267**(36): p. 25798-802.
72. Gurevich, E.V., et al., *G protein-coupled receptor kinases: more than just kinases and not only for GPCRs*. Pharmacology & therapeutics, 2012. **133**(1): p. 40-69.
73. Benovic, J.L., et al., *Beta-adrenergic receptor kinase: identification of a novel protein kinase that phosphorylates the agonist-occupied form of the receptor*. Proceedings of

- the National Academy of Sciences of the United States of America, 1986. **83**(9): p. 2797-801.
74. Onorato, J.J., et al., *Role of acidic amino acids in peptide substrates of the beta-adrenergic receptor kinase and rhodopsin kinase*. *Biochemistry*, 1991. **30**(21): p. 5118-25.
75. Aragay, A.M., et al., *G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2): mechanisms of regulation and physiological functions*. *FEBS letters*, 1998. **430**(1-2): p. 37-40.
76. Ungerer, M., et al., *Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart*. *Circulation*, 1993. **87**(2): p. 454-63.
77. Ungerer, M., et al., *Expression of beta-arrestins and beta-adrenergic receptor kinases in the failing human heart*. *Circulation research*, 1994. **74**(2): p. 206-13.
78. Ungerer, M., et al., *Activation of beta-adrenergic receptor kinase during myocardial ischemia*. *Circulation research*, 1996. **79**(3): p. 455-60.
79. Choi, D.J., et al., *Mechanism of beta-adrenergic receptor desensitization in cardiac hypertrophy is increased beta-adrenergic receptor kinase*. *The Journal of biological chemistry*, 1997. **272**(27): p. 17223-9.
80. Gros, R., et al., *G-protein-coupled receptor kinase activity is increased in hypertension*. *The Journal of clinical investigation*, 1997. **99**(9): p. 2087-93.
81. Petrofski, J.A. and W.J. Koch, *The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure*. *J Mol Cell Cardiol*, 2003. **35**(10): p. 1167-74.
82. Rengo, G., et al., *Blockade of beta-adrenoceptors restores the GRK2-mediated adrenal alpha(2) -adrenoceptor-catecholamine production axis in heart failure*. *British journal of pharmacology*, 2012. **166**(8): p. 2430-40.
83. Pitcher, J.A., et al., *The G protein-coupled receptor kinase 2 is a microtubule-associated protein kinase that phosphorylates tubulin*. *The Journal of biological chemistry*, 1998. **273**(20): p. 12316-24.
84. Carman, C.V., et al., *Binding and phosphorylation of tubulin by G protein-coupled receptor kinases*. *The Journal of biological chemistry*, 1998. **273**(32): p. 20308-16.
85. Ruiz-Gomez, A., et al., *Phosphorylation of phosducin and phosducin-like protein by G protein-coupled receptor kinase 2*. *The Journal of biological chemistry*, 2000. **275**(38): p. 29724-30.
86. Ribas, C., et al., *The G protein-coupled receptor kinase (GRK) interactome: role of GRKs in GPCR regulation and signaling*. *Biochimica et biophysica acta*, 2007. **1768**(4): p. 913-22.
87. Evron, T., T.L. Daigle, and M.G. Caron, *GRK2: multiple roles beyond G protein-coupled receptor desensitization*. *Trends in pharmacological sciences*, 2012. **33**(3): p. 154-64.
88. Penela, P., C. Ribas, and F. Mayor, Jr., *Mechanisms of regulation of the expression and function of G protein-coupled receptor kinases*. *Cell Signal*, 2003. **15**(11): p. 973-81.
89. Koch, W.J., et al., *The binding site for the beta gamma subunits of heterotrimeric G proteins on the beta-adrenergic receptor kinase*. *The Journal of biological chemistry*, 1993. **268**(11): p. 8256-60.
90. Pitcher, J.A., et al., *Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid*. *The Journal of biological chemistry*, 1995. **270**(20): p. 11707-10.

91. Lodowski, D.T., et al., *Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma*. Science, 2003. **300**(5623): p. 1256-62.
92. Murga, C., et al., *The basal subcellular distribution of beta-adrenergic receptor kinase is independent of G-protein beta gamma subunits*. FEBS letters, 1997. **409**(1): p. 24-8.
93. Ji, S., et al., *PH domain of G protein-coupled receptor kinase-2 binds to protein kinase C (PKC) and negatively regulates activity of PKC kinase*. Front Biosci, 2003. **8**: p. a34-9.
94. Olivares-Reyes, J.A., et al., *Agonist-induced signaling, desensitization, and internalization of a phosphorylation-deficient AT1A angiotensin receptor*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(41): p. 37761-8.
95. Garcia-Higuera, I., et al., *Association of the regulatory beta-adrenergic receptor kinase with rat liver microsomal membranes*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(2): p. 1348-55.
96. Murga, C., et al., *High affinity binding of beta-adrenergic receptor kinase to microsomal membranes. Modulation of the activity of bound kinase by heterotrimeric G protein activation*. The Journal of biological chemistry, 1996. **271**(2): p. 985-94.
97. Carman, C.V., et al., *Selective regulation of Galpha(q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(48): p. 34483-92.
98. Sallese, M., et al., *Selective regulation of Gq signaling by G protein-coupled receptor kinase 2: direct interaction of kinase N terminus with activated galphaq*. Molecular pharmacology, 2000. **57**(4): p. 826-31.
99. Dhami, G.K., et al., *Phosphorylation-independent regulation of metabotropic glutamate receptor signaling by G protein-coupled receptor kinase 2*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(28): p. 25266-72.
100. Penn, R.B., A.N. Pronin, and J.L. Benovic, *Regulation of G protein-coupled receptor kinases*. Trends in cardiovascular medicine, 2000. **10**(2): p. 81-9.
101. Willets, J.M., R.A. Challiss, and S.R. Nahorski, *Non-visual GRKs: are we seeing the whole picture?* Trends Pharmacol Sci, 2003. **24**(12): p. 626-33.
102. Eichmann, T., et al., *The amino-terminal domain of G-protein-coupled receptor kinase 2 is a regulatory Gbeta gamma binding site*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8052-7.
103. Boekhoff, I., et al., *Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(1): p. 37-40.
104. Daaka, Y., et al., *Receptor and G betagamma isoform-specific interactions with G protein-coupled receptor kinases*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(6): p. 2180-5.
105. Tesmer, V.M., et al., *Snapshot of activated G proteins at the membrane: the Galphaq-GRK2-Gbetagamma complex*. Science, 2005. **310**(5754): p. 1686-90.
106. Day, P.W., et al., *Differential interaction of GRK2 with members of the G alpha q family*. Biochemistry, 2003. **42**(30): p. 9176-84.
107. Freeman, J.L., et al., *Beta 2-adrenergic receptor stimulated, G protein-coupled receptor kinase 2 mediated, phosphorylation of ribosomal protein P2*. Biochemistry, 2002. **41**(42): p. 12850-7.

108. Miller, W.E., et al., *G-protein-coupled receptor (GPCR) kinase phosphorylation and beta-arrestin recruitment regulate the constitutive signaling activity of the human cytomegalovirus US28 GPCR*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(24): p. 21663-71.
109. Lohse, M.J., et al., *Mechanisms of beta-adrenergic receptor desensitization: from molecular biology to heart failure*. Basic research in cardiology, 1996. **91 Suppl 2**: p. 29-34.
110. Lympopoulos, A., et al., *Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure*. Nature medicine, 2007. **13**(3): p. 315-23.
111. Cohn, H.I., et al., *G protein-coupled receptor kinase 2 expression and activity are associated with blood pressure in black Americans*. Hypertension, 2009. **54**(1): p. 71-6.
112. Iaccarino, G. and W.J. Koch, *Transgenic mice targeting the heart unveil G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets*. Assay and drug development technologies, 2003. **1**(2): p. 347-55.
113. Koch, W.J., et al., *Cardiac function in mice overexpressing the beta-adrenergic receptor kinase or a beta ARK inhibitor*. Science, 1995. **268**(5215): p. 1350-3.
114. Lehmann, D.M., A.M. Seneviratne, and A.V. Smrcka, *Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation*. Molecular pharmacology, 2008. **73**(2): p. 410-8.
115. Raake, P.W., et al., *G protein-coupled receptor kinase 2 ablation in cardiac myocytes before or after myocardial infarction prevents heart failure*. Circulation research, 2008. **103**(4): p. 413-22.
116. Raake, P.W., et al., *AAV6.betaARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model*. European heart journal, 2013. **34**(19): p. 1437-47.
117. Raake, P.W., et al., *Cardiac G-protein-coupled receptor kinase 2 ablation induces a novel Ca²⁺ handling phenotype resistant to adverse alterations and remodeling after myocardial infarction*. Circulation, 2012. **125**(17): p. 2108-18.
118. Gosse, P., *Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk*. J Hypertens Suppl, 2005. **23**(1): p. S27-33.
119. Diez, J., et al., *Effects of antihypertensive agents on the left ventricle: clinical implications*. Am J Cardiovasc Drugs, 2001. **1**(4): p. 263-79.
120. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Analytical biochemistry, 1987. **162**(1): p. 156-9.
121. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
122. Lowry, O.H., et al., *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 1951. **193**(1): p. 265-75.
123. Hunter, J.J. and K.R. Chien, *Signaling pathways for cardiac hypertrophy and failure*. The New England journal of medicine, 1999. **341**(17): p. 1276-83.
124. Carreno, J.E., et al., *[Cardiac hypertrophy: molecular and cellular events]*. Revista espanola de cardiologia, 2006. **59**(5): p. 473-86.
125. Olson, E.N. and R.S. Williams, *Calcineurin signaling and muscle remodeling*. Cell, 2000. **101**(7): p. 689-92.

126. Bueno, O.F., et al., *The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice*. The EMBO journal, 2000. **19**(23): p. 6341-50.
127. Matsui, T., T. Nagoshi, and A. Rosenzweig, *Akt and PI 3-kinase signaling in cardiomyocyte hypertrophy and survival*. Cell cycle, 2003. **2**(3): p. 220-3.
128. Pu, W.T., Q. Ma, and S. Izumo, *NFAT transcription factors are critical survival factors that inhibit cardiomyocyte apoptosis during phenylephrine stimulation in vitro*. Circulation research, 2003. **92**(7): p. 725-31.
129. Molkenkin, J.D., *Calcineurin-NFAT signaling regulates the cardiac hypertrophic response in coordination with the MAPKs*. Cardiovascular research, 2004. **63**(3): p. 467-75.
130. Shiojima, I. and K. Walsh, *Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway*. Genes & development, 2006. **20**(24): p. 3347-65.
131. Aronson, D., et al., *Ischemic mitral regurgitation and risk of heart failure after myocardial infarction*. Archives of internal medicine, 2006. **166**(21): p. 2362-8.
132. Ho, Y.L., et al., *Assessment of the coronary artery disease and systolic dysfunction in hypertensive patients with the dobutamine-atropine stress echocardiography: effect of the left ventricular hypertrophy*. Cardiology, 1998. **89**(1): p. 52-8.
133. Gosse, P., *Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk*. Journal of hypertension. Supplement : official journal of the International Society of Hypertension, 2005. **23**(1): p. S27-33.
134. Diez, J., et al., *Effects of antihypertensive agents on the left ventricle: clinical implications*. American journal of cardiovascular drugs : drugs, devices, and other interventions, 2001. **1**(4): p. 263-79.
135. Harris, C.A., T.T. Chuang, and C.A. Scorer, *Expression of GRK2 is increased in the left ventricles of cardiomyopathic hamsters*. Basic research in cardiology, 2001. **96**(4): p. 364-8.
136. Dzimiri, N., et al., *Differential functional expression of human myocardial G protein receptor kinases in left ventricular cardiac diseases*. European journal of pharmacology, 2004. **489**(3): p. 167-77.
137. Petrofski, J.A. and W.J. Koch, *The beta-adrenergic receptor kinase in heart failure*. Journal of molecular and cellular cardiology, 2003. **35**(10): p. 1167-74.
138. Onohara, N., et al., *TRPC3 and TRPC6 are essential for angiotensin II-induced cardiac hypertrophy*. The EMBO journal, 2006. **25**(22): p. 5305-16.
139. Wilkins, B.J., et al., *Targeted disruption of NFATc3, but not NFATc4, reveals an intrinsic defect in calcineurin-mediated cardiac hypertrophic growth*. Molecular and cellular biology, 2002. **22**(21): p. 7603-13.
140. Lim, H.W., et al., *Calcineurin expression, activation, and function in cardiac pressure-overload hypertrophy*. Circulation, 2000. **101**(20): p. 2431-7.
141. Hogan, P.G., et al., *Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT*. Genes & development, 2003. **17**(18): p. 2205-32.
142. De Windt, L.J., et al., *Calcineurin promotes protein kinase C and c-Jun NH2-terminal kinase activation in the heart. Cross-talk between cardiac hypertrophic signaling pathways*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(18): p. 13571-9.
143. Beals, C.R., et al., *Nuclear export of NF-ATc enhanced by glycogen synthase kinase-3*. Science, 1997. **275**(5308): p. 1930-4.

144. Kirshenboim, N., et al., *Lithium-mediated phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta involves PI3 kinase-dependent activation of protein kinase C-alpha*. Journal of molecular neuroscience : MN, 2004. **24**(2): p. 237-45.
145. O'Brien, W.T., et al., *Glycogen synthase kinase-3 is essential for beta-arrestin-2 complex formation and lithium-sensitive behaviors in mice*. The Journal of clinical investigation, 2011. **121**(9): p. 3756-62.
146. Oudit, G.Y., et al., *Phosphoinositide 3-kinase gamma-deficient mice are protected from isoproterenol-induced heart failure*. Circulation, 2003. **108**(17): p. 2147-52.
147. Crackower, M.A., et al., *Regulation of myocardial contractility and cell size by distinct PI3K-PTEN signaling pathways*. Cell, 2002. **110**(6): p. 737-49.
148. Morisco, C., et al., *The Akt-glycogen synthase kinase 3beta pathway regulates transcription of atrial natriuretic factor induced by beta-adrenergic receptor stimulation in cardiac myocytes*. The Journal of biological chemistry, 2000. **275**(19): p. 14466-75.
149. Haq, S., et al., *Stabilization of beta-catenin by a Wnt-independent mechanism regulates cardiomyocyte growth*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003. **100**(8): p. 4610-5.
150. Buss, S.J., et al., *Chronic Akt blockade aggravates pathological hypertrophy and inhibits physiological hypertrophy*. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 2012. **302**(2): p. H420-30.
151. Hardt, S.E., *Glycogen Synthase Kinase-3beta: A Novel Regulator of Cardiac Hypertrophy and Development*. Circulation research, 2002. **90**(10): p. 1055-1063.
152. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1*. The EMBO journal, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
153. Penela, P., et al., *The complex G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) interactome unveils new physiopathological targets*. British journal of pharmacology, 2010. **160**(4): p. 821-32.
154. Aoyagi, T. and T. Matsui, *Phosphoinositide-3 kinase signaling in cardiac hypertrophy and heart failure*. Curr Pharm Des, 2011. **17**(18): p. 1818-24.

Publikationsverzeichnis

1. Targeting GRK2 by gene therapy for heart failure: benefits above b-blockade. **J Reinkober**, H Tscheschner, ST Pleger, P Most, HA Katus, WJ Koch and PW Raake (Review, Gene Therapy 2012)
2. AAV6. β ARKct cardiac gene therapy ameliorates cardiac function and normalizes the catecholaminergic axis in a clinically relevant large animal heart failure model. Raake PW, Schlegel P, Ksienzyk J, **Reinkober J**, Barthelmes J, Schinkel S, Pleger S, Mier W, Haberkorn U, Koch WJ, Katus HA, Most P, Müller OJ. (Eur. Heart J. 2012)
3. Gene therapy targets in heart failure: the path to translation. Raake PW, Tscheschner H, **Reinkober J**, Ritterhoff J, Katus HA, Koch WJ, Most P (Review, Clin. Pharmacol. Ther. 2011)