

Medizinische Fakultät
der Universität Essen

Aus der
Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin

**Molekulare und funktionelle Analyse des *GRK2*-
Promotors in Kardiomyoblasten**

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades der Medizin
durch die Medizinische Fakultät
der Universität Essen

Vorgelegt von
Daniel Ecker
aus Bonn
2023

DuEPublico

Duisburg-Essen Publications online

UNIVERSITÄT
DUISBURG
ESSEN

Offen im Denken

ub | universitäts
bibliothek

Diese Dissertation wird via DuEPublico, dem Dokumenten- und Publikationsserver der Universität Duisburg-Essen, zur Verfügung gestellt und liegt auch als Print-Version vor.

DOI: 10.17185/duepublico/81821

URN: urn:nbn:de:hbz:465-20240419-101255-3

Alle Rechte vorbehalten.

Dekan: Herr Univ.-Prof. Dr. med. J. Buer
1. Gutachter: Herr Prof. Dr. med. U. Frey
2. Gutachter: Frau Prof. Dr. rer. nat. U. Hendgen-Cotta

Tag der mündlichen Prüfung: 17. November 2023

Wissenschaftliche Veröffentlichungen und Auszeichnungen

Publikation

Klenke S, Engler A, Ecker D, Ochsenfarth C, Danowski N, Peters J, Siffert W, Frey UH

The *GRK2* Promoter Is Regulated by Early-Growth Response Transcription Factor EGR-1 Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2018 Dec; 123(6):660-669. doi: 10.1111/bcpt.13055. Epub 2018 Jul 9

Präsentation

Eggert D, Klenke S, Engler A, Ochsenfarth C, Danowski N, Siffert W, Frey UH, Peters J

Posterbeitrag*, 12. Forschungstag der medizinischen Fakultät der Universität Duisburg-Essen am 22. November 2013

Molekulare und funktionelle Analyse des *GRK2*-Promotors in Kardiomyoblasten: Regulation durch Gq-vermittelte Signaltransduktion

*Dieser Beitrag wurde mit einem Posterpreis ausgezeichnet.

Stipendium

Diese Arbeit wurde durch das ELAN-Stipendium (Essener Ausbildungsprogramm „Labor und Wissenschaft“ für den ärztlichen Nachwuchs) von der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung gefördert.

Inhaltsverzeichnis

Seite

WISSENSCHAFTLICHE VERÖFFENTLICHUNGEN UND AUSZEICHNUNGEN	3
1. EINLEITUNG	7
1.1 Herzinsuffizienz	7
1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie	7
1.1.2 Pathophysiologie.....	9
1.2 Signaltransduktion in Kardiomyozyten	10
1.2.1 Bedeutung von GRK2 im kardiovaskulären System	13
1.2.2 Potentielle Regulationsmechanismen des <i>GRK2</i> -Promotors.....	17
1.3 Zielsetzung der Arbeit	20
2. MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 Material.....	21
2.1.1 Geräte.....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.3 Chemikalien, Pharmazeutika.....	22
2.1.4 Verwendete Medien	23
2.1.5 Verwendete Lösungen und Puffer	24
2.1.6 Zelllinien.....	25
2.1.7 Bakterienstämme	25
2.1.8 Plasmide	25
2.1.9 Primer	25
2.1.10 Antikörper	26
2.1.11 Kits.....	26
2.2 Methoden.....	27
2.2.1 Zellkulturarbeiten.....	27
2.2.3 Arbeiten mit RNA	30

2.2.4	Arbeiten mit DNA	34
2.2.5	Transiente Transfektion H9c2	38
2.2.6	Luciferase-Assay.....	39
2.2.7	Arbeiten mit Proteinen.....	40
2.2.8	Statistische Methoden.....	43
3.	ERGEBNISSE	45
3.1	Transfektion von H9c2-Zellen mit aktivem <i>GRK2</i> -Promotorkonstrukt führt zu starkem Anstieg der Luciferase-Aktivität.....	45
3.2	Der Einfluss vom PMA auf die endogenen Expression von <i>GRK2</i> in glatten Muskelzellen der Ratte.....	47
3.3	Der Einfluss von PMA auf die endogenen Expression von <i>GRK2</i> in Kardiomyoblasten der Ratte.....	48
3.4	Der Einfluss von PMA auf die endogene Expression von <i>EGR-1</i> in Kardiomyoblasten der Ratte.....	49
3.5	Untersuchung der <i>GRK2</i> -Expression in Kardiomyoblasten der Ratte nach Stimulation mittels inaktivem PMA (4 α -PMA)	49
3.6	Untersuchung der <i>EGR-1</i> -Expression in Kardiomyoblasten der Ratte nach Stimulation mittels inaktivem PMA (4 α -PMA)	51
3.7	Auswirkung der Transkriptionsblockade auf die <i>GRK2</i> -Expression	52
3.8	Auswirkung der Transkriptionsblockade auf die <i>EGR-1</i> -Expression.....	52
3.9	Nachweis der Proteinexpression von GRK2 und EGR-1 mittels Western-Blots.....	53
3.9.1	Steigerung der Proteinexpression von EGR-1 nach Stimulation mit PMA	53
3.9.2	Steigerung der Proteinexpression von GRK2 nach Stimulation mit PMA.	54
3.9.3	Steigerung der Expression von EGR-1 nach Stimulation mit Angiotensin II.....	54
3.9.4	Steigerung der Expression von GRK2 nach Stimulation mit Angiotensin II	55
4.	DISKUSSION.....	56
4.1	GRK2 spielt als Regulator von GPCRs eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Herzinsuffizienz.....	61
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	64

6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	65
7.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	72
8.	TABELLENVERZEICHNIS.....	73
9.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	74
10.	DANKSAGUNG.....	76
11.	LEBENS LAUF.....	77

1. Einleitung

1.1 Herzinsuffizienz

1.1.1 Definition, Epidemiologie und Ätiologie

Die Herzinsuffizienz stellt mit ca. 26 Millionen Betroffenen eine der häufigsten Erkrankungen der Welt dar (Ponikowski et al., 2014). Fortwährend ansteigende Lebenserwartungen sowie eine Verbesserung der medikamentösen und interventionellen Therapiemöglichkeiten führen in Deutschland dazu, dass die Herzinsuffizienz der häufigste Grund einer Hospitalisierung im Erwachsenenalter darstellt. Pathophysiologisch besteht ein Ungleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und –verbrauch. Abhängig vom Schweregrad der Erkrankung ist das Herz sowohl im Ruhezustand als auch unter Belastung nicht mehr in der Lage das Gewebe ausreichend zu perfundieren (Bundesärztekammer, 2019).

Abbildung 1 zeigt die statistische Auswertung der Hospitalisierung in Deutschland auf Grund einer Herzinsuffizienz für den Zeitraum der Jahre 2000 bis 2013. Es zeigt sich über alle Altersgruppen hinweg eine deutliche Zunahme der Fälle (Christ et al., 2016). Dies unterstreicht zunehmend die weitreichende sozioökonomische Bedeutung des Syndroms der Herzinsuffizienz.

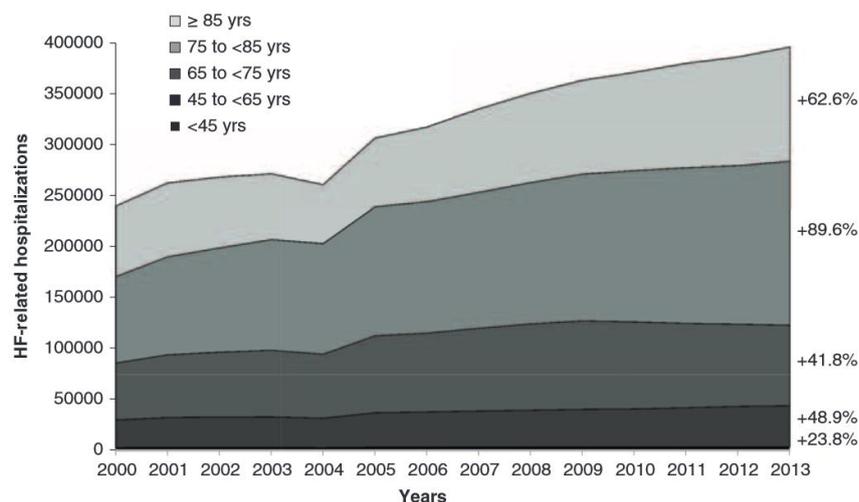


Abbildung 1: Hospitalisierungen auf Grund einer Herzinsuffizienz zwischen 2000 und 2013 in Deutschland. Aufgetragen sind unterschiedliche Altersgruppierungen sowie die prozentuale Zunahme zum Jahr 2000 (Christ et al., 2016).

Die Inzidenz sowie Prävalenz der Herzinsuffizienz steigen mit zunehmendem Alter an. So zeigt sich in Deutschland für Männer im Alter zwischen 60 und 74 Jahren im Jahr 2017 eine Diagnoseprävalenz von 7%, wohingegen Männer zwischen 75 und 84 Jahren eine Prävalenz von 16% aufweisen. Männer weisen annähernd in allen Altersgruppen eine höhere Prävalenz auf als Frauen (Holstiege J, 2018). Darüber hinaus befindet sich laut der Gesundheitsberichterstattung des Bundes für das Jahr 2015 die Herzinsuffizienz an dritter Stelle der Todesursachen (Robert-Koch-Institut, Abrufdatum: 07.01.2021).

Die größten prädisponierende Faktoren für das Entstehen einer Herzinsuffizienz sind neben einer bestehenden koronaren Herzkrankheit (KHK) ein Nikotinkonsum sowie eine arterielle Hypertonie. Darüber hinaus können auch Herzklappenvitien, sowie Adipositas und Diabetes mellitus als Risikofaktor genannt werden (He et al., 2001).

Die Einteilung der Herzinsuffizienz lässt sich anhand verschiedener Kriterien vornehmen:

Nach der Ejektionsfraktion (EF)

Die Ejektionsfraktion kann durch folgende Formel errechnet werden: $\text{Ejektionsfraktion} = \frac{\text{Schlagvolumen}}{\text{enddiastolisches Ventrikelvolumen}} \times 100$. Eine normwertige Ejektionsfraktion liegt bei über 50% vor. Anhand der krankhaften Verminderung der Pumpleistung des Herzens lässt sich eine Herzinsuffizienz drei Untergruppen einteilen:

HF_{Fr}EF Herzinsuffizienz mit reduzierter linksventrikulärer Ejektionsfraktion. Hierbei liegt die EF bereits unter 40%.

HF_{mr}EF Herzinsuffizienz mit geringgradig eingeschränkter (mid-range) linksventrikulärer Ejektionsfraktion. Hier liegt die Ejektionsfraktion zwischen 40-49%.

HF_pEF Herzinsuffizienz mit erhaltener (preserved) linksventrikulärer Ejektionsfraktion. In diesem Fall liegt die Ejektionsfraktion über 50%.

In den beiden zuletzt genannten Gruppen müssen neben den angegebenen Ejektionsfraktionen erhöhte natriuretische Peptide (BNP >35 pg/ml und/oder BT-proBNP >125 pg/ml) sowie eine via Echokardiographie nachgewiesene strukturelle oder funktionelle Störung des linken Vorhofs vorliegen. Alle drei Gruppen haben gemein, dass vor allem in den frühen Phasen der Erkrankung Symptome fehlen können. Dies gilt insbesondere für Patienten die bereits unter einer Therapie mit Diuretika stehen, wie z.B. Patienten mit vorausgehender arterieller Hypertonie (Ponikowski et al., 2016).

Weitere Möglichkeiten der Einteilungen sind nach dem Herzzeitvolumen (HZV), nach dem zeitlichen Verlauf (akute/chronische Herzinsuffizienz) sowie nach dem überwiegend betroffenen Ventrikel (Links-/Rechts-/Globalherzinsuffizienz). Als Möglichkeit der klinischen Einteilung hat sich die NYHA-Klassifikation durchgesetzt. Diese unterteilt die Erkrankung in vier Stadien nach dem Auftreten von Symptomen und Abnahme der körperlichen Leistungsfähigkeit.

1.1.2 Pathophysiologie

Bei der Pathophysiologie erleichtert die Unterscheidung in eine systolische und eine diastolischen Ventrikelfunktionsstörung das Verständnis. Eine systolische Ventrikelfunktionsstörung kann zum einen durch eine Kontraktionsschwäche hervorgerufen werden, zu der es im Rahmen eines Myokardinfarktes oder einer Kardiomyopathie kommen kann. Zum anderen ist eine erhöhte Ventrikelwandspannung bei arterieller Hypertonie durch den Anstieg des Afterloads zu nennen. Durch die chronische Druckbelastung kommt es zu einer konzentrischen Wandverdickung des Ventrikels. Ebenfalls kommt es durch eine Erhöhung der Vorlast, hervorgerufen durch z.B. Insuffizienzvitien, zu einer Erhöhung der Volumenbelastung und somit zu einer systolischen Ventrikelfunktionsstörung.

Diastolische Ventrikelfunktionsstörungen werden z.B. durch Einschränkungen der Ventrikelfüllung ausgelöst. Hier seien vor allem die Kardiomyopathien oder die akute Herzbeutelamponade zu nennen. Darüber hinaus können Herzrhythmusstörungen eine Ursache einer Herzinsuffizienz sein, es ist jedoch auch möglich, dass sie die Konsequenz einer bestehenden Herzinsuffizienz darstellen.

Als kardiales Remodeling wird die Strukturveränderung im Herzmuskel bezeichnet. Pathologisches Remodeling kommt zum Beispiel nach einem Myokardinfarkt zum Tragen. Auf Grund der durch die Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff entstehenden Narbe kommt es bereits nach wenigen Stunden zu ersten Veränderung in Richtung einer Hypertrophie und einer myokardialen Fibrose (Giannuzzi et al., 2001).

Neben den vor allem maladaptiven Anpassungen des Herzens an die bestehende Insuffizienz sind zudem neurohumoralen Veränderungen zu nennen. So wird das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert, indem zum einen über Angiotensin II eine Erhöhung der Nachlast durch Vasokonstriktion erreicht wird. Zum anderen wirkt Aldosteron auf die Natrium- und Wasserretention, welches eine Erhöhung der Vorlast auslöst. Eine ähnliche Wirkung zeigt auch die vermehrte Sezernierung des Anti-

Diuretische-Hormons (ADH). Durch eine verstärkte Aktivierung des Sympathikus kommt es zu einer progredienten Katecholaminausschüttung. Dies führt zu Beginn zu einer Kompensation der Insuffizienz durch initiale Stärkung der Kontraktionskraft der Kardiomyozyten und einem Anstieg der Herzfrequenz. Die Zunahme der Plasma-Katecholaminspiegel korreliert hierbei mit der Zunahme der Mortalität (Slavíková et al., 2007). Im Verlauf kommt es, bei Fortschreiten der Herzinsuffizienz, zu einer Verminderung der Expression der Betarezeptoren, die mit den steigenden Katecholaminkonzentrationen korreliert. Durch die Zunahme der Katecholaminkonzentration kann es neben einer verstärkten Arrhythmie neigung ebenfalls zu einer Verschlechterung der myokardialen Versorgung kommen (Port, 2001).

Das Gesamtbild der pathologischen Umbauprozesse am Myokard in Kombination mit den Veränderungen im Bereich der neurohumoralen Achse wird auch als kardiale Maladaptation bezeichnet.

1.2 Signaltransduktion in Kardiomyozyten

Die Kontraktilität der Kardiomyozyten wird vor allem durch β -adrenerge G-Proteingekoppelten Rezeptoren (GPCR) kontrolliert (Lymeropoulos et al., 2013). Die Ausbildung des kardialen Phänotyps und der Gewebemorphologie wird z.B. durch Angiotensin (AT_1 -GPCR) Rezeptoren in kardialen Fibroblasten oder Endothelzellen bewirkt (Billet et al., 2008). Die Herzfrequenz wird durch das Gleichgewicht von aktivierenden β -adrenergen GPCR und muskarinergen Acetylcholinrezeptoren im Erregungsbildungs- und Leitungssystem der Herzens beeinflusst (Siryk-Bathgate et al., 2013).

Bei GPCRs handelt es sich um die größte Gruppe der Transmembranrezeptoren, welche über ein GTP-bindendes Protein (G-Protein) u.a. eine Signaltransduktion ins Zellinnere veranlassen. Es werden verschiedene Subtypen der GPCRs unterschieden. Diese werden nach Ihrer Eigenschaft der α -Untereinheit in stimulierende (Gs) und inhibierende (Gi) G-Proteine eingeteilt. Darüber hinaus gibt es mit den Gq-Proteinen, GPCRs, die über eine second-messenger Kaskade die Proteinkinase C aktivieren.

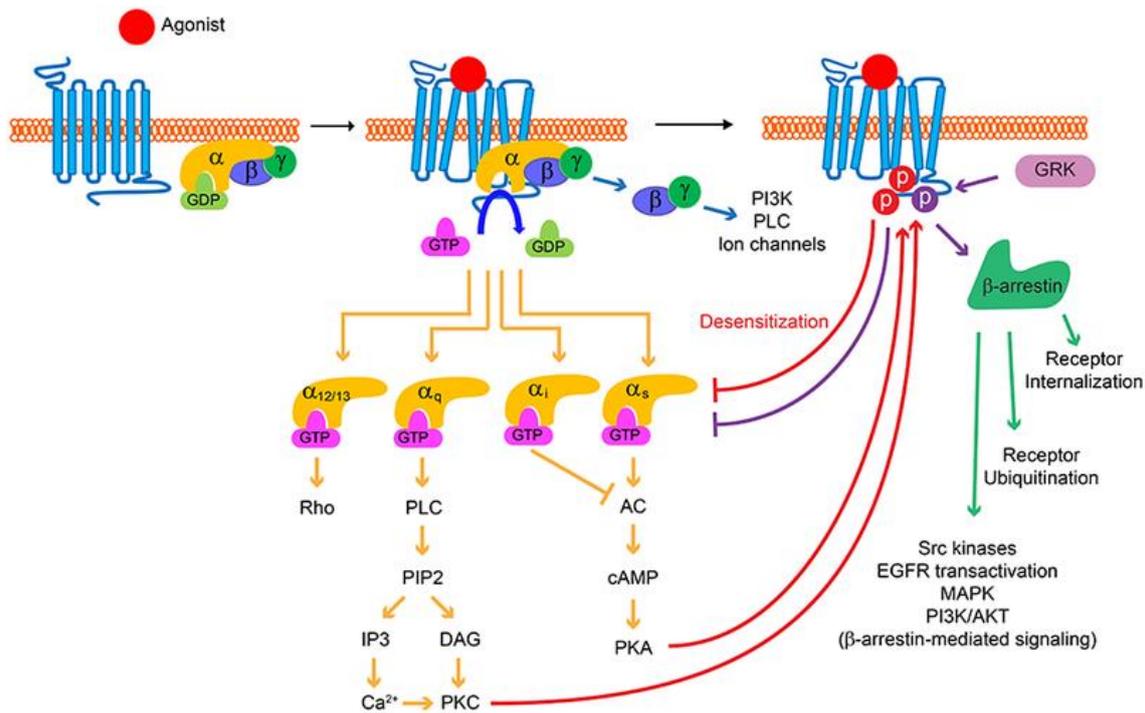


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion durch G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR)

Nach Bindung eines Agonisten am GPCR folgt der Austausch des gebundenen Guanosindiphosphat (GDP) durch Guanosintriphosphat (GTP). Dies führt über eine Konformationsänderung zur Dissoziation der α-Untereinheit und der βγ-Untereinheit des G-Proteins. Die βγ-Untereinheit wirkt direkt auf Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) und Phospholipase C (PLC) ein. Die α-Untereinheit wirkt abhängig vom Subtyp auf Phospholipase C (PLC), Adenylylcyclase (AC) oder über die GTPase Rho (Rho) auf Aktinfilamente ein. Durch die PLC2 wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) in Inositol-1,4,5-Trisphosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) gespalten. IP3 wirkt auf die Calciumhomöostase (Ca²⁺), DAG stimuliert die Proteinkinase C (PKC). Durch die AC erfolgt die Bildung von cyclischem AMP (cAMP), welches die Proteinkinase A (PKA) aktiviert. EGFR, epidermal growth factor rezeptor; MAPK, mitogen-aktivierende protein kinase; PI3K, Phosphoinositol 3-kinase. Mit freundlicher Genehmigung von Wolters Kluwer Health, Inc. (Wang et al., 2018)

Der GPCR befindet sich als 7-Transmembranhelixrezeptor sowohl in der Zellmembran (C-terminaler Bereich) als auch im Extrazellulärraum. An das extrazelluläre N-terminale Ende bindet ein Ligand. Wie in Abbildung 2 zu erkennen führt dies zu einer Transformation des angelagerten heterotrimeren G-Proteins welches aus einer α-Untereinheit, einer β- und einer γ-Untereinheit besteht. Nach Stimulation durch den Rezeptor kommt es zum Austausch des an die α-Untereinheit gebundenen energetisch niedrigen Guanosindiphosphat (GDP) mit dem energiereichen Guanosintriphosphat (GTP). Es kommt zu einer Konformationsänderung und einer Trennung der α-Untereinheit von der βγ-Untereinheit (Oldham & Hamm, 2008). Nun kommt es bei stimulierenden G_s-GPCR zu einer Aktivierung der Adenylatcyclase durch die mit GTP beladene α-Untereinheit. Hier wird nun die Umwandlung vom ATP zu cAMP und Phyrophosphat katalysiert. Das gebildete cAMP stellt einen wichtigen second messenger der weiteren intrazellulären

Signalkaskade dar. So bindet dieser an die Proteinkinase A (PKA) die wiederum eine Phosphorylierung weiterer Zielproteine auslöst (Rosenbaum et al., 2009).

Bei den inhibitorischen Gi-gekoppelten GPCR erfolgt eine Hemmung der Adenylatcyclase. Dies führt zur Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Rezeptoren vom Gq-Typ stimulieren über die dissoziierte α -Untereinheit eine membranständige Phospholipase C, welche eine Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4-5-bisphosphat in Inositoltrisphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) bewirkt. Durch IP_3 wird nun, nach Aktivierung eines Rezeptors am endoplasmatischem Retikulum, ein Calciumeinstrom in die Zelle ausgelöst (Berridge & Irvine, 1984). Das entstandene Diacylglycerol führt weiterhin zu einer Aktivierung der Proteinkinase C. Diese wiederum führt zu einer Beeinflussung von Membrankanälen und anderen Proteinen, so auch zur Aktivierung von G-Protein gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) wie der GRK2, auf welche im späteren Verlauf genauer eingegangen wird.

Ohne eine weitere Interaktion wird, bedingt durch eine GTP-Hydrolyse, die erneute Zusammensetzung der verschiedenen Untereinheiten zum Ursprungszustand und vollständigem heterotrimeren G-Protein erreicht.

Für die Gq-GPCR sind beispielsweise die Angiotensin-2-Rezeptoren oder der Endothelin-Rezeptor (Subtyp A) an glatten Muskelzellen der Koronarien zu nennen. Diese reagieren auf eine Ligandenbindung mit einer Vasokonstriktion. Dies führt nachfolgend zu einer Limitierung der koronaren Perfusion. Wohingegen die Ligandenbindung und Aktivierung der Endothelin-(Subtyp 2) Rezeptoren sowie der Gi-gekoppelten Acetylcholinrezeptoren auf Endothelzellen antagonistisch wirken und durch eine NO-Freisetzung eine Vasodilatation und somit Erhöhung der Perfusion bewirken. Dies zeigt exemplarisch, wie komplex das Verhältnis zwischen der Konzentration der Liganden und dem vorhandenen Gleichgewicht der Membranrezeptorkonzentration am Herzen ist, um eine bedarfsgerechte Perfusion und physiologische Funktion zu gewährleisten.

Beispiele für die stimulierenden Gs-Rezeptoren sind z.B. die β_1 -Rezeptoren. Diese sind überwiegend am Herzen zu finden. Eine Aktivierung der β_1 -Rezeptoren durch Adrenalin oder Noradrenalin führt zur sympathomimetischen Vermittlung einer Steigerung der Herzkraft, Herzfrequenz und Beschleunigung der AV-Überleitungszeit (positiv chronotrop, dromotrop und inotrop).

Ein Beispiel für im Herzen und Gefäßsystem vorkommende inhibitorische GPCR (Gi) wären die muskarinergen Acetylcholinrezeptoren M2- und M3-Rezeptorsubtypen. Der M2-Rezeptor vermittelt über ein inhibitorisches G-Protein eine vom Parasympathikus

ausgelöste Modulation eines rezeptorgekoppelten Kaliumkanals. Durch den vermehrten Kaliumausstrom aus der Zelle kommt es zu einer verminderten Erregbarkeit der Herzmuskelzelle und somit zu einer Verminderung der Herzleistung (negativ inotrop, chronotrop, dromotrop). Der im Endothel vorkommende M3-Rezeptor vermittelt nach Ligandenbindung (Acetylcholin) eine gesteigerte NO-Synthese, welche zu einer Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße und somit zu einer Vasodilatation führt. Einer Sonderstellung kommen β_2 -Rezeptoren zu. Deren Wirkung kann sowohl über den stimulierenden Gs-Signalweg als auch über inhibitorische Gi GPCRs vermittelt werden.

1.2.1 Bedeutung von GRK2 im kardiovaskulären System

G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen (GRKs), gehören zu einer Familie von sieben Serin/Threonin Kinasen, welche ubiquitär im Gewebe vorkommen. Im Herzen kommen die GRK2 und GRK5 am häufigsten vor und sind dort an einer Vielzahl von Steuerungsvorgängen der GPCRs beteiligt. GRK2 verfügt über zwei unterschiedliche Mechanismen eine Desensibilisierung der GPCRs auszulösen (Sun & Kim, 2021).

Die Desensibilisierung der GPCRs durch GRK2 kann zum einen durch Phosphorylierung des Rezeptors erfolgen. Im Zytosol lokalisiertes GRK2 bindet mit Hilfe der C-terminale Domäne an die $G_{\beta\gamma}$ -Untereinheit und an das entstandenen Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2). Hierdurch kommt es zu einer Verlagerung des GRK2-Moleküls in die Plasmamembran, infolge dessen es zur Phosphorylierung des GPCRs kommt. Dies führt zu einer β -Arrestin-vermittelten Endozytose des Rezeptors nach einer Ummantelung von Clathrin. Dies ist ein wesentlicher Steuerungsprozess der physiologischen β_1 -AR- und β_2 -AR-Desensibilisierung. Nach der Internalisierung der Vesikel kommt es entweder zur Zuführung der Degradation und somit Desensibilisierung oder zum Recycling im Rahmen eines so genannten Resensitizing (Sato et al., 2015).

Zum anderen kann eine Blockierung der Signaltransduktion allein durch Bindung an den GPCR erfolgen. Durch diese Bindung wird eine erneute Reassoziaton des heterotrimeren G-Proteins an den Rezeptor verhindert (Sun & Kim, 2021).

Im Rahmen einer Herzinsuffizienz zeigt sich, dass GRKs, vor allem GRK2 und GRK5, eine große Bedeutung an den Entwicklungen von pathologischen molekularen Prozessen in Kardiomyozyten zugesprochen werden kann.

Durch die Aktivierung des AT1-Rezeptors, einem GPCR vom Gq-Typ, kommt es zur Aktivierung der Proteinkinase C. Es konnte bisher gezeigt werden, dass es durch die daraus resultierende Phosphorylierung der GRK2 zu deren Aktivierung kommt (Krasel et

al., 2001). Dies führt dann über nachgeschaltete Signalkaskaden zu Veränderungen der Signaltransduktion und Verstärkung der oben genannten kardialen Maladaptation.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Veränderung der GRK2-Konzentration eine direkte Auswirkung auf protektive kardiale Faktoren hat. Eine erhöhte GRK2-Konzentration in HEK293-Zellen führt zu einer direkten Abnahme der Dichte von Rezeptoren für Sphingosin 1-phosphat (Cannavo et al., 2013). Sphingosin 1-phosphat führt am Herzen neben einer verbesserten Mobilisation von intrazellulärem Kalzium auch zu einer Protektion gegenüber einer Ischämie (Means & Brown, 2009).

Tierexperimentelle Studien mit GRK2-defizienten Mäusen zeigten 4 Wochen nach einem Myokardinfarkt eine deutlich erniedrigte Katecholaminkonzentration bei insgesamt niedriger sympathomimetischer Aktivität. Dies führte insgesamt zu einer verbesserten Herzfunktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Lympelopoulos et al., 2010).

Auch in klinischen Studien konnte ein Zusammenhang von erhöhter GRK2-Konzentration und einer Verschlechterung des klinischen Outcomes hergestellt werden. So zeigte eine zweijährige Nachuntersuchung von Patienten nach Myokardinfarkt mit ST-Streckenhebung, dass die gemessenen GRK2-Konzentrationen mit einer Verminderung der Ejektionsfraktion und des endsystolischen Volumen korrelierte (Santulli et al., 2011).

Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass es durch die Applikation eines ACE-Inhibitors bei Patienten mit einer chronischen Herzinsuffizienz zu einer deutlichen Herunterregulierung der *GRK2*-mRNA in peripheren Lymphozyten kommt (Oyama et al., 2006).

Weiterführend konnten Rengo et al. in einer prospektiven Studie an 257 Herzinsuffizienzpatienten nachweisen, dass der Anstieg von GRK2-Proteinen auf Lymphozyten einen deutlichen prognostischen Aussagewert über die kardiovaskuläre Sterblichkeit hat (Rengo et al., 2016).

Die vorliegenden Studien zeigen wie vielschichtig die Beeinflussung der Kardiomyozyten durch die GRK2 ist. Die GRK2-Konzentrationen korrelieren nicht nur mit einer Einschränkung der Herzfunktion im Rahmen einer Herzinsuffizienz, sondern haben darüber hinaus auch eine prognostische Aussagekraft.

Abseits der typischen Wirkung an GPCRs zeigt GRK2 auch weitere Einflussnahme auf andere Zellbestandteile. So konnten Huang et al. zeigen, dass GRK2 die endotheliale NO-Synthase binden kann und so eine Gefäßkontraktion und ein kardiales Remodeling einleitet (Huang et al., 2013). Weiterhin deaktiviert GRK2 durch Phosphorylierung die

Proteinkinase p38MAPK und mindert so deren kardioprotektive Funktion bei der Reaktion der Myozyten auf Stress (Peregrin et al., 2006).

Auch Bestandteile der Zellmatrix wie z.B. α -Tubulin werden durch GRK2 verändert und es kommt zu einer Unterstützung der Zellmobilität. Weiterhin beeinflusst GRK2 an der äußeren Membran der Mitochondrien die Steuerung der Apoptose (Sorriento et al., 2019). Darüber hinaus hat GRK2 weitreichende Einflüsse auf den Insulinstoffwechsel von Kardiomyozyten und trägt zur Insulinresistenz des Gewebes bei. Dies zeigte eine Arbeit von Ciccarelli und Koch et al. Hier wird das Insulin receptor Substrat-1 (IRS1) durch GRK2 phosphoryliert und inhibiert so den Einbau des Glucosetransporters GLUT 4 in die Zellmembran. Dies führte zu einer Insulinresistenz und Glucoseintoleranz der Zellen (Ciccarelli et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich GRK2 als einen zentralen Multiplikator mit Einfluss in zahlreiche Signalkaskaden bezeichnen. Dies zeigt auch die Übersichtsarbeit von Penela et al (Penela et al., 2019). Hier wird auf Grund der Komplexität zum einen in die Modulation von GPCRs durch GRK2 und zum anderen in die Beeinflussung von Nicht-GPCR-Molekülen unterschieden. Neben intrazellulären Kinasen sind auch ribosomale Proteine und Transkriptionsfaktoren Ziele der Interaktion mit GRK2. Aufgrund des strukturellen Aufbaus des GRK2-Proteins in drei unterschiedliche Domänen lassen sich die zahlreichen Interaktionen verstehen. Hierbei sind die Pleckstrin-Domäne (C-terminale Domäne) und die N-terminale Domäne nach Bindung von Zielstrukturen für die Regulation der katalytisch aktiven Kinase-Domäne verantwortlich.

Eine vereinfachte Übersicht der molekularen pathologischen Veränderungen zeigt Abbildung 3.

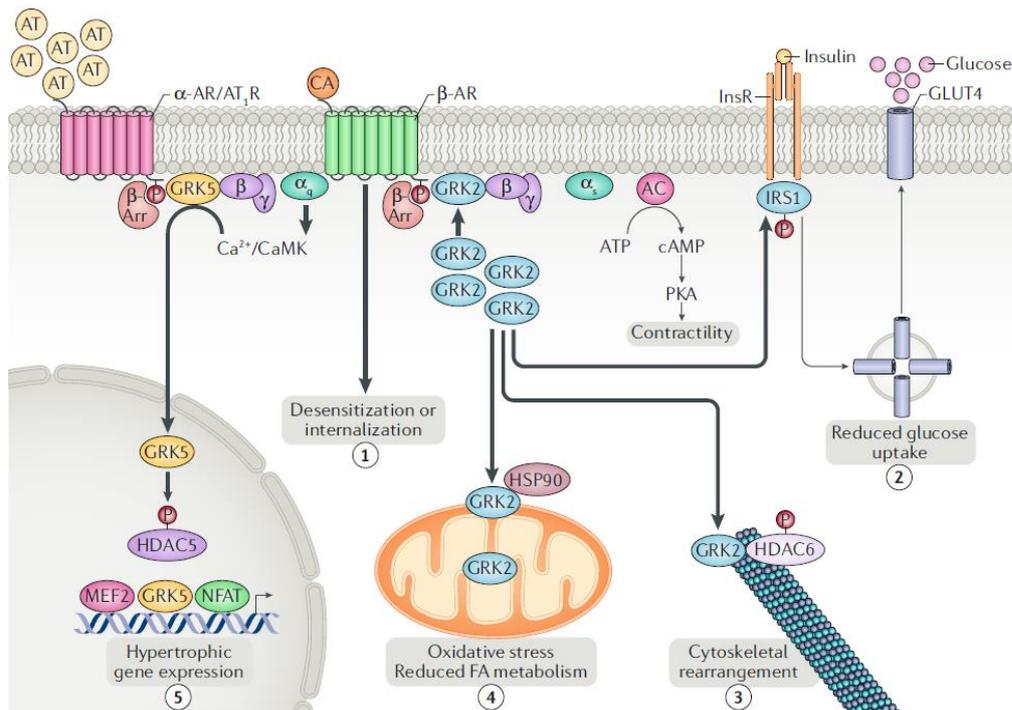


Abbildung 3: Die pathologischen Auswirkungen von GRK2 und GRK 5 auf die Zellfunktion von Kardiomyozyten. Gezeigt wird hier unter 1 zum einen die „klassische“ Internalisierung der GPCR nach Phosphorylierung. Nach Bindung von Angiotensin II (AT) an den Angiotensin 1-Rezeptor (AT₁R) kommt es zur β-Arrestin (β-Arr)-vermittelten Endozytose von GRK5 und zur Förderung der Expression von hypertrophieverstärkenden Genen im Zellkern über Myocyte enhancer factor-2 (MEF2) und Nuclear factor of activated T-cells (NFAT). Nach Bindung von Katecholaminen (CA) an den β-Rezeptor (β-AR) erfolgt zum einen die β-Arrestin-vermittelte Endozytose. Darüber hinaus wird unter 2 die Wirkung auf den Insulinstoffwechsel schematisch dargestellt. Nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor (InsR) phosphoryliert GRK2 das Insulinrezeptorsubstrat (IRS1). Darauf folgt ein verminderter Einbau des Glucosetransporter Typ 4 (GLUT4) in die Zellmembran. Punkt 3 zeigt die Beeinflussung der Cytoskelettelemente. Durch die Phosphorylierung der Histondeacetylase 6 (HDAC6) durch GRK2 kommt es zu Umbauprozessen im Zytoskelett. Punkt 4 zeigt die mitochondriale Wirkung mit z.B. reduziertem Fettsäuremetabolismus und Zunahme von oxidativem Stress unter Aktivierung des Heat-shock-protein 90 (HSP90), modifiziert nach Pflieger (Pflieger et al., 2019). Mit freundlicher Genehmigung von Springer Nature

1.2.1.1 Bedeutung des Transkriptionsfaktors EGR-1 im kardiovaskulären System

Bei *EGR-1* handelt es sich um einen so genannten „early growth response gene“, welches eine tragende Rolle bei multiplen pathologischen Vorgängen wie zum Beispiel kardiovaskuläre Erkrankungen oder Malignomen innehat (Barbolina et al., 2007). Es kann durch eine Vielzahl von Transmittern induziert werden. So können Wachstumsfaktoren, Hormone oder Stress zu einer vermehrten Ausschüttung führen (Fahmy et al., 2003). *EGR-1* ist im kardiovaskulären System als Transkriptionsfaktor an multiplen Differenzierungs- und Proliferationsprozessen beteiligt und stimuliert unter anderem die Ausschüttung der Wachstumsfaktoren PDGF-B, TGF-β sowie das Protein p53, welche an Proliferation, Inflammation und apoptotischer Dysregulation beteiligt sind (Khachigian, 2006). Abbildung 4 zeigt beispielhaft wie es durch diese Prozesse zu einem Remodeling

der pulmonalen Gefäße mit Läsionen der Neointima kommt, welche sich dann im Vollbild einer pulmonalen Hypertonie zeigen (Dickinson et al., 2014).

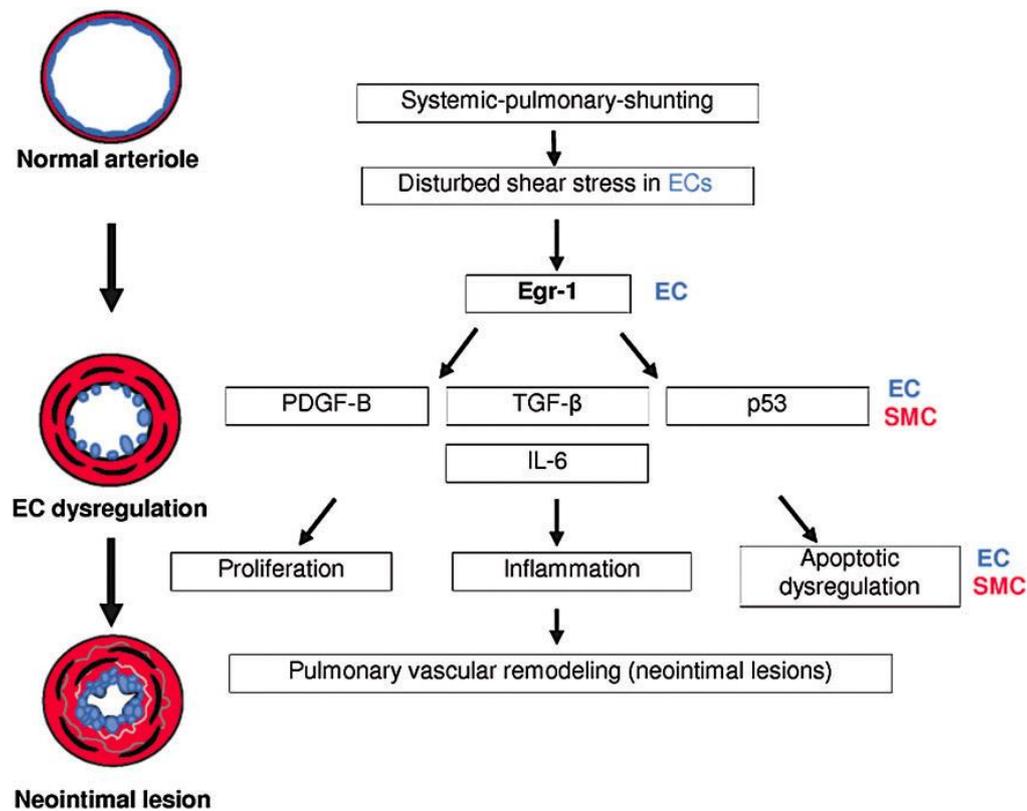


Abbildung 4: Schematische Darstellung der EGR-1 Wirkung auf Endothelzellen (EC) und glatte Muskelzellen (SMC). Durch vermehrten mechanischen Stress der Endothelzellen erfolgt vermehrte Expression von *EGR-1*. Dies führt zu einer vermehrten Bildung von Platelet-derived growth factor (PDGF-B), Transforming Growth Factor- β (TGF- β), Protein p53 (p53) sowie Interleukin 6 (IL-6). Dies führt über Aktivierung der Proliferation, Inflammation und Dysregulation der Apoptose zur sekundärem vaskulären Remodelling. Modifiziert nach Dickinson (Dickinson et al., 2014).

Weiterhin zeigen tierexperimentelle Studien mit *EGR-1* knock out Mäusen unter normaler Belastung keinen pathologischen kardialen Phänotyp, es scheint ferner auch nicht für die kardiale Embryogenese oder Aufrechterhaltung der kardialen Funktion unter normaler Belastung von entscheidender Bedeutung zu sein (Saadane et al., 2000).

1.2.2 Potentielle Regulationsmechanismen des *GRK2*-Promotors

Die exzessive Katecholaminausschüttung im Rahmen einer Herzinsuffizienz ist ein Versuch des menschlichen Körpers, die kardiale Funktion aufrechtzuerhalten. Dies führt zu einer verstärkten Stimulation von β -AR-Rezeptoren. Diese wiederum führen dann weiterhin zu zwei- bis dreifach erhöhten myokardialen GRK2-Protein- und mRNA-Konzentrationen (Ungerer et al., 1993). Welchen potentiellen Regulationsmechanismen der *GRK2*-Promoter unterliegt ist bisher nicht abschließend geklärt.

Die Arbeit von Malhotra et al. zeigt, dass auch mechanische Dehnung von Kardiomyozyten, als Äquivalent zur Drucküberladung des Ventrikels, zu einer Steigerung der GRK2-Aktivität bei gleichzeitig verminderter beta-adrenerger Signaltransduktion führt. Dies konnte auf eine Aktivierung des Angiotensin-Rezeptors (AT1-Rezeptor) zurückgeführt werden. Dieser Gq-GPCR reagiert auf mechanischen Stress mit der Aktivierung der Proteinkinase C, welche GRK2 durch Phosphorylierung aktiviert (Malhotra et al., 2010).

Beide Mechanismen, sowohl die exzessive Katecholaminausschüttung mit der konsekutiven Aktivierung des Gs-Signalweges, als auch die Drucküberladung des Ventrikels mit der konsekutiven Aktivierung des Gq-Signalweges führen zu einer verminderten beta-adrenergen Signaltransduktion durch erhöhte *GRK2*-Expression.

GRK2 phosphoryliert die GPCR und diese werden von β -Arrestinen gebunden. Dies führt zu einer Trennung des Rezeptors vom G-Protein und somit zu einer β -Arrestin-vermittelten Endozytose des Rezeptors. Dieser Schritt wird als Downsensitising oder Downregulation der kardialen β -Rezeptoren bezeichnet und scheint ein protektiver Vorgang gegen chronisch überschießende Katecholaminspiegel zu sein. Dies begründet unter anderem das verminderte Ansprechen auf endogene oder exogene Katecholamine (Ferguson, 2001).

Diese Aktivierung der Proteinkinase C durch den AT1- Rezeptor (Gq-GPCR) mit konsekutiver Phosphorylierung und damit Beeinflussung der β -Rezeptoren (Gs-GPCR) könnte ein Hinweis auf einen Crosstalk zwischen dem Gq-vermittelten Signaltransduktion und dem β AR-Signalweg sein.

Um die Signaltransduktion des Gq-Signalweges experimentell zu untersuchen eignet sich besonders der Phorbol-ester Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Er imitiert die Funktion von Diacylglycerol (DAG), einem Produkt der Phospholipase C. So kann die Signaltransduktion im Gq-Signalweg simuliert werden, ohne eventuelle Fehlerquellen oder Interaktionen anderer Substrate zu erzeugen. Darüber hinaus handelt es sich bei PMA um ein erprobtes und bewährtes Substrat zur Testung und Untersuchung des Gq-Signalweges.

Ramos-Ruiz et al. zeigten, durch die Transfektion eines aktiven Gq-Promotors in glatten Muskelzellen der Ratte, dass es nach Stimulation mittels Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) zu einer deutlichen Erhöhung der *GRK2*-Promotoraktivität kommt (Ramos-Ruiz et al., 2000).

Obwohl GRK2 eine zentrale Rolle in der Pathophysiologie der Herzinsuffizienz spielt ist bislang wenig über mögliche Regulationsmechanismen des Promotors durch Transkriptionsfaktoren bekannt.

Da in den oben genannten Untersuchungen von Ramos-Ruiz et al. die Stimulation mittels PMA erst nach 18-24h zu einer signifikanten Steigerung der *GRK2*-Promoteraktivität führt, deutet dies auf die Regulation bzw. Beeinflussung durch einen Transkriptionsfaktor wie z.B. EGR-1 hin.

Bei der vorangegangenen Sequenzierung des *GRK2*-Promotors innerhalb der Arbeitsgruppe wurden drei Einzelnukleotid-Polymorphismen (single nucleotide polymorphism, SNP) identifiziert. Zwei von Ihnen, SNP G(-1138)A und C(-1095)T waren bereits validiert. Darüber hinaus konnte unsere Arbeitsgruppe einen weiteren SNP, G(-43)A identifizieren (Danowski, 2012). Im Vorfeld durchgeführte *in silico* Analysen (www.genomatix.de) unserer Arbeitsgruppe zeigten bereits drei putative EGR-1-Bindungsstellen in der *GRK2*-Promotorregion des G-Allels wohingegen bei dem A-Allel nur eine EGR-1-Bindungsstelle nachzuweisen ist.

Ein weiterer Hinweis über einen Zusammenhang zwischen EGR-1 und GRK2 ergibt sich aus den Untersuchungen der Arbeitsgruppe Malakooti et al.. Sie konnte zeigen, dass in menschlichen Enterozyten die mRNA und Proteinexpression des Transkriptionsfaktor EGR-1 ebenfalls durch PMA gesteigert werden kann (Malakooti et al., 2006).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist die Charakterisierung des *GRK2*-Promotors. Es soll analysiert werden, ob die Aktivierung des Gq-Signalweges auch die *GRK2*-Expression beeinflusst und somit einen Crosstalk dieser beiden Signalwege darstellt. Dazu waren folgende Versuche geplant:

1. Zunächst sollte der *GRK2*-Promotor auf Promotoraktivität geprüft werden. Transfektionsversuche mit einem aktiven *GRK2*-Promotorkonstrukt sollten die Charakterisierung des *GRK2*-Promotors unterstützen.
2. Im Folgenden war es Ziel der Arbeit zu untersuchen, ob die Aktivierung des Gq-Signalweges zu einer Hochregulation des *GRK2*-Promotors führt. Die Aktivierung des Gq-Signalweges erfolgte mittels PMA sowie mittels Angiotensin II. Die Expression wurde auf Gen- und Proteinebene untersucht.
3. Analog zu 2. sollten etwaige Auswirkungen einer Aktivierung des Gq-Signalweges auf die *EGR-1*-Expression nachgewiesen werden und in einen möglichen Zusammenhang gestellt werden.
4. Durch Stimulationsversuche mit einem Transkriptionshemmstoff sollte nachgewiesen werden, dass es sich bei den Veränderungen in Expressionsmuster von *EGR-1* und *GRK2* um eine spezifische, transkriptionsvermittelte Wirkung der Gq-Aktivierung handelt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Cellstar cell culture dishes 10cm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkulturtestplatten 6-Well , 12-Well Plates, 96-Well Plates	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Autoklav KSG 25-2-3	KSG Sterilisatoren, Olching
Autoklav Systec - 3850 EL	Systec GmbH, Linden
Axio Vert.A1 Mikroskop	Zeiss, Jena
BioPhotometer plus	Eppendorf, Hamburg
Einmalpipetten mit Spitze (5ml, 10ml, 15ml, 30ml), steril	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Einmalspritzen (20ml) Terumo® Syringe	Terumo Deutschland GmbH, Eschborn
Feinwaage Sartorius Entris®	Sartorius AG, Göttingen
Gel IX Imager	Intas Science Imaging GmbH, Göttingen
Thermoinkubationsmischer Thriller ®	VWR International GmbH, Erlangen
HeraSafe™ KS Sicherheitswerkbank	Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
Integra Vacusafe	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal
Multipette stream®	Eppendorf, Hamburg
Nalgene™ Mr.Frosty™ Cryo 1°C Freezing Container	Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
Pipettierhilfe Pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
StepOnePlus™ Real-Time PCR System	Applied Biosystems™, Life Technologies, Darmstadt
Thermo Scientific™ Heracel™ 150i CO2/ O2- Inkubator	Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
TProfessional Thermocycler	Biometra GmbH
TriStar LB 941 Multimode Mikroplattenleser	Berthold, Bad Wildbad
Wasserbad Typ 1003	GFL, Burgwedel
Zählkammer Neubauer improved	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Zellkulturflaschen TPP 150cm ² , 75 cm ² , 25 cm ²	TPP AG, Trasadingen, Schweiz
Zentrifuge Rotina 48 R	Andreas Hettich GmbH & Co.KG, Tuttlingen
Zentrifugen 5810R, 5415R und 5424	Eppendorf, Hamburg
Inkubationsschüttler Gallenkamp orbital incubator	SANYO, Gallenkamp, England
Bunsenbrenner Labogaz® 206	Camping Gaz GmbH, Hattersheim
Mini-PROTEAN® Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Cellstar® Tubes (50ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Cryo.s™, Einfrierröhrchen (2ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
DNA LoBind Tubes (5ml), PCR-clean	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon® Tubes (15ml)	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Fujifilm Super RX-N	Fujifilm, Düsseldorf
MicroAmp® Fast 96- Well Reaction Plate (0,1ml)	Applied biosystems®, Life Technologies Darmstadt
Minisart Streifilter ,0,2µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Pipettenspitzen Biosphere® (0,1-10µl; 1-20µl; 10-100µl;101-1000µl)	Sarstedt AG, Nümbrecht
Protran BA85 Nitrocellulose Blotting Membrane, 0.45 µm, 82 mm	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Safe-Lock Tubes (1ml, 2ml, 5ml), PCR-clean	Eppendorf AG, Hamburg
Zellkultur Microplatte 96 Well µClear®,F-Boden	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
MicroAmp optical adhesive film	Applied biosystems®, Life Technologies Darmstadt
Einmal-Impföse	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.3 Chemikalien, Pharmazeutika

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Pharmazeutika

Substanz	Hersteller
4α-Phorbol 12-myristate 13-acetate	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Accutase® Cell Detachment Solution	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Actinomycin D	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Bright-Glo Luciferase Assay System	Promega
BSA (Bovine-Serum-Albumin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dimethylsulfoxide (DMSO) for molecular biology	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethanol (70%, 99%)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Fast qPCR MasterMix Plus	Eurogentec, Belgien
FKS (Fetales Kälberserum)	PAA, Cölbe
FuGENE 6 Transfection reagent	Promega, Mannheim
FuGENE HD Transfection Reagent	Promega, Mannheim
Incidin Foam Desinfektion	Ecolab Deutschland GmbH, Monheim
Lipofectamine LTX with Plus Reagent	Life Technologies, Darmstadt
MESA GREEN qPCR MasterMix Plus	Eurogentec, Belgien
Methanol	J.T.Baker®, VWR International GmbH, Erlangen

Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega, Mannheim
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Precision Plus Protein™ Dual Color Standards	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Röntgen-Entwicklerkonzentrat	ADEFO-CHEMIE GmbH, Dietzenbach
Röntgen-Fixierkonzentrat	ADEFO-CHEMIE GmbH, Dietzenbach
Roti®-Load Protein Loading Buffer	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SignalFire™ ECL Reagent	Cell Signaling (Leiden, Niederlande)
TEMED	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Trypanblau 0,5%	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
TrypLE® Express, ohne Phenolrot	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
Tween® 20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Agar-Agar, Kobe I	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis-Lösung 30 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
D(+)-Glucose-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Magnesium chloride hexahydrate (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
SYBR® Safe DNA Gel Stain	Life Technologies, Darmstadt
Orange DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Braunschweig
Lambda DNA/HindIII Marker	Thermo Scientific, Braunschweig
peqFECT DNA	VWR International GmbH, Erlangen

2.1.4 Verwendete Medien

Tabelle 4: Verwendete Medien

Substanz	Hersteller / Inhaltstoffe
Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX™ high glucose	Gibco, Life Technologies Darmstadt
OptiMEM® reduced Serum medium, ohne Phenolrot	Gibco, Life Technologies Darmstadt
S.O.C. Medium	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
LB-Medium (Luria/Miller), granuliert	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

2.1.4.1 Medium für A-10-Zellen und H9c2-Zellen

Dulbecco's Modified Eagle Medium mit GlutaMAX™ high glucose (Gibco)

+ 10 % fetales Kälberserum (FKS)

2.1.4.2 Bakterienmedium (LB-Medium)

Hefeextrakt 5 g/l

NaCl 10 g/l

Trypton 10 g/l

ad 1 l demineralisiertes Wasser, Sterilisation bei 20 min 120°C und 1,4 bar im Autoklav, Aufbewahrung bei 4°C im Kühlraum.

Für das feste Bakterienmedium wurde vor dem Autoklavieren 15 g/l Agar-Agar (Kobe, Firma Roth) zugesetzt und in noch flüssigem Zustand in Kulturschalen gegossen. Diese wurden ebenfalls bei 4°C im Kühlraum aufbewahrt.

2.1.4.3 modifiziertes SOC-Medium

Das für die Transformation benötigte SOC-Medium wurde aus 1 ml flüssigem LB-Medium, 5 µl 2 M MgCl₂ (Sigma-Aldrich) sowie 20 µl D(+)-Glucose-Monohydrat (Merck) hergestellt.

2.1.4.4 Selektionsmedium für Bakterienkultur

Für die Selektion der Bakterienkultur wurde dem flüssigen LB-Medium nach Autoklavieren und Kühlung 15 g/l Agar-Agar (Kobe, Firma Roth) und 50 mg/ml Kanamycin bzw. 100 mg/ml Ampicillin hinzugegeben.

2.1.5 **Verwendete Lösungen und Puffer**

Tabelle 5: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Hersteller / Inhaltsstoffe
DPBS (1x)	Gibco, Life Technologies, Darmstadt
TBS-Puffer (10x)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TRIS-Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
SB-Puffer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

2.1.6 Zelllinien

Tabelle 4: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Herstellernachweis	Kulturbedingungen
A-10	ATCC: CRL-1476™	DMEM, 10 % FKS, 37 °C; 5 % CO ₂
H9c2	ATCC: CRL-1446™	DMEM, 10 % FKS, 37 °C; 5 % CO ₂

2.1.7 Bakterienstämme

Tabelle 5: : Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Hersteller
Library Efficiency DH5α™ Competent Cells	Life Technologies, Darmstadt

2.1.8 Plasmide

Tabelle 6: Verwendete Plasmide

Plasmid	Hersteller
pcDNA3.1_EGR-1	Invitrogen, Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
pGI4.74	Promega GmbH, Mannheim
pEGFP	BD Bioscience, Heidelberg
pGL4.10	Promega GmbH, Mannheim
Die Plasmide wurden freundlicherweise von PD Dr. med. Stefanie Klenke und dem Institut für Pharmakogenetik des Universitätsklinikums Essen zu Verfügung gestellt	

2.1.9 Primer

Tabelle 7: Verwendete Primer für die reverse Transkription

Primer	Hersteller
Oligo(dT) ₁₅ Primer	Promega GmbH, Mannheim
Random Hexamers	Promega GmbH, Mannheim
dNTP	Promega GmbH, Mannheim

Tabelle 8: Verwendete Primer für die quantitative rtPCR von *GRK2*

Primer	Sequenz	Hersteller
Vorwärtsprimer	5'-CCCTGGACTGGCAGATGGT-3'	Eurogentec, Belgien
Rückwärtsprimer	5'-CAAAGGAGCCAATGTCAAAGG-3'	Eurogentec, Belgien
Probe	5'-TACAGAAGTACCCTCCTCCACTGATCCCC-3'	Eurogentec, Belgien

Tabelle 9: Verwendete Primer für die quantitative rtPCR von *EGR-1*

Primer	Sequenz	Hersteller
Vorwärtsprimer	5'-CAGCGGCGGCAATAA-3'	Eurogentec, Belgien
Rückwärtsprimer	5'-GAGCGATGTCAGAAAAGGAC-3'	Eurogentec, Belgien

Tabelle 10: Verwendete Primer für die quantitative rtPCR von Actin beta

Primer	Sequenz	Hersteller
Vorwärtsprimer	5'-GACGGTCAGGTCATCACTATCG-3'	Eurogentec, Belgien
Rückwärtsprimer	5'-TAGTTTCATGGATGCCACAGGAT-3'	Eurogentec, Belgien
Probe	5'-TCGGGGCATCGGAACCGCT-3'	Eurogentec, Belgien

2.1.10 Antikörper

Tabelle 11: Verwendete Antikörper für Western Blots

Antikörper	Hersteller
anti-EGR-1-antibody	#4154, Cell Signaling, Leiden, Niederlande
anti-GRK2-antibody	#3928S, Cell Signaling, Leiden, Niederlande
anti-β-Actin-antibody	sc-47778, Santa Cruz Biotechnology, CA

2.1.11 Kits

Tabelle 12: Verwendete Kits

Bezeichnung	Hersteller
peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit	VWR International GmbH, Erlangen
Dual-Glo® Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
peqGold DNase 1 Digest Kit	VWR International GmbH, Erlangen
EndoFree®, Plasmid Purification	Qiagen, Hilden
CellLytic® NuClear® Extraction Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturarbeiten

2.2.1.1 A-10-Zelllinie

Bei der verwendeten A-10-Zelllinie handelt es sich um glatte Muskelzellen einer thorakalen embryonalen Rattenaorta (*Rattus norvegicus*) die in einem einschichtigen Zellrasen wachsen (*monolayer*). Diese 1976 durch B. Kimes und B. Brandt etablierte Zelllinie besitzt typische Eigenschaften glatter Muskelzellen. Auch *in vitro* zeigen A-10-Zellen spontane Aktionspotentiale sowie eine vermehrte Aktivität von Myosin- und Kreatinphosphokinase. In ihrer Morphologie ähneln sie vor allem Fibroblasten und epithelialen Zellen.

Die adhärent wachsenden A-10-Zellen wurden in 75 cm² und 150 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und wasserdampfgesättigter Raumluftatmosphäre kultiviert. Als Medium wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* mit *GlutaMAX™ high glucose* (DMEM, Gibco) und 10 % fetalem Kälberserum (FKS) verwendet.

Die A-10-Zellen dienen vor allem dem Erlernen der Zellkulturtechnik und der Etablierung weiterer Methoden.

2.2.1.2 H9c2-Zelllinie

Bei den verwendeten H9c2-Zellen handelt es sich um Myokardzellen einer embryonalen Ratte (*Rattus norvegicus*) die in einschichtigem Zellrasen (*monolayer*) wachsen. Im Jahre 1976 von B. Kimes und B. Brandt etabliert, stammt die Zelllinie vor allem aus Gewebe der Ventrikel von 13 Tage alten embryonalen Rattenherzen.

Die adhärent wachsenden H9c2-Zellen wurden ebenfalls in 75 cm² und 150 cm² Zellkulturflaschen bei 37°C, 5% CO₂ und wassergesättigter Raumluftatmosphäre kultiviert. Als Medium wurde *Dulbecco's Modified Eagle Medium* mit *GlutaMAX™ high glucose* (DMEM, Gibco) mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) verwendet.

2.2.1.3 Zellkultur: Passagen, Aussaat, Kryokonservierung

Um eine Zellveränderung durch zu dichtes Wachstum zu minimieren und um gleiche Kultivierungsbedingungen für alle Versuche zu ermöglichen wurden beide Zelllinien bei ca. 80 % Konfluenz passagiert. Zunächst wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml DPBS (Gibco) zweifach gewaschen. Zum Lösen der adhären Zellen wurde

anschließend 5 ml TrypLE (Gibco) auf die Zellen pipettiert. Nach fünf Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion mittels 15 ml vorgewärmtem DMEM mit 10 % FKS gestoppt und die Zellen durch mehrfaches pipettieren abgelöst. Es erfolgte der Transfer in ein 50 ml Röhrchen und die Zentrifugation 5 Minuten bei 700 rpm. Das überständige Medium wurde abgenommen und die Zellen mittels 5 ml DMEM (Gibco) resuspendiert und umgehend wieder in Kultur genommen oder zur Zählung vorbereitet.

Die A-10-Zellen wurden alle 4-5 Tage im Verhältnis 1:3 gesplittet. Bedingt durch beschleunigtes Zellwachstum bei den H9c2- Zellen erfolgte hier die Passage alle 3-4 Tage im Verhältnis 1:4 bis 1:5.

Die Erhebung der Zellzahl wurde mittels Neubauer improved Zählkammer (Brand) durchgeführt. Eine Vitalitätskontrolle erfolgte mit 0,5% Trypanblau im Verhältnis 1:5. So wurde zu 80 µl Zellsuspension 20 µl Trypanblau pipettiert und 3min bei Raumtemperatur inkubiert. Blau gefärbte Zellen wurden als Nachweis der Schädigung der Zellmembran bei der Berechnung nicht miteinbezogen.

Es wurde unter dem Mikroskop mit 10 x Vergrößerung die einzelnen Quadrate ausgezählt und der Mittelwert gebildet. Die Zellzahl wurde dann wie folgt berechnet: Anzahl der Zellen in Eckquadraten x Verdünnungsfaktor (1,2) = Anzahl der Zellen pro 1 ml.

Die gewünschte Zelldichte wurde berechnet und nachfolgend in Lochplatten für Versuche oder zur Kultivierung in Zellkulturflaschen pipettiert. Für die Kultivierung in 75 cm² Zellkulturflaschen wurden 15 ml DMEM mit 10 % FKS verwendet.

Zur Kryokonservierung wurden nach ausgiebiger Kontrolle ausgewählte Zellpopulationen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Hierbei wurde besonders auf etwaige Änderung der Zellmorphologie sowie Kontamination und frühe Passagenanzahl geachtet. Die Zellen wurden zusammen mit dem Gefriermedium bestehend aus DMEM + 10 % FKS sowie 10 % DMSO in Cryo.s™ Einfrier Röhrchen (Greiner Bio-One) gegeben. Bevor die Zellen in die Gasphase des flüssigen Stickstoffes gelagert wurden, erfolgte die Übernachtslagerung bei -80° C in einem Einfrierkontainer welcher mit Isopropanol gefüllt war. Dies diente dem schonenderen Einfrieren der Zellen.

2.2.2 In vitro Stimulation

Für die *in vitro* Stimationsversuche wurden die H9c2-Zellen wie unter Punkt 2.2.1.3 beschrieben kultiviert.

Die im Folgenden beschriebenen Stimationsversuche wurden in 6-Loch-Platten mit einer Zelldichte von 150.000 Zellen je well durchgeführt.

An Tag 1 erfolgte die Aussaat der Zellen in gewünschter Zelldichte. Als Gesamtvolumen wurde 2 ml Medium je well eingestellt. Nach 24 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel auf DMEM ohne FKS. Dieser Serumentzug ermöglicht, dass bedingt durch den Wachstumsfaktormangel die Zellen in die G₀-Phase ihres Zellzyklusses eintreten (Zellzyklussynchronisation). So sollten etwaige Schwankungen im Reaktionsverhalten der Zellen minimiert werden.

Als Stock wurde für die PMA-Lösung (Sigma-Aldrich) eine 20 µM- Konzentration mittels DMSO eingestellt. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert. Gleiches gilt für das verwendete 4α-PMA (4α-Phorbol-12-myristate 13-acetate, Sigma-Aldrich). Die Stockkonzentration von Actinomycin D (Sigma-Aldrich) wurde ebenfalls mit DMSO auf 5 µg/ml eingestellt.

2.2.2.1 Stimulation mit Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)

Nach 24 Stunden Serumentzug wurde je 10 µl einer 20 mM PMA-Lösung in jedes der wells gegeben. Bei 2 ml Zellkulturmedium ergibt sich eine PMA-Konzentration von 100 nM je well. Es erfolgte die vorsichtige Durchmischung durch Schwenken der Platte. Als Negativkontrolle wurden Zellen die nur DMSO ohne PMA zugesetzt bekamen mitgeführt.

Nach dem Ablauf gewünschten Stimationszeitraumes wurden die Platten für zehn Minuten bei 500 x g und 22° C herunterzentrifugiert. Überstehendes Medium wurde anschließend abgenommen und 400 µl des Lyse-Puffer des peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit (VWR) je well hinzugegeben. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation sowie eine quantitative real-time PCR (vgl. Punkt 2.2.3.2).

2.2.2.2 Stimulation mit 4α-Phorbol 12-myristate 13-acetate (4-α-PMA)

Nach 24 Stunden Serumentzug wurde den Zellen, die zuvor wie unter Punkt 2.2.1.3 beschrieben kultiviert wurden, 10 µl einer 20 mM 4-α-PMA-Lösung hinzugegeben. Es erfolgte die vorsichtige Durchmischung durch Schwenken der Platte. Bei 2 ml Zellkulturmedium ergibt sich eine 4-α-PMA-Konzentration von 100 nM je well. Als

Negativkontrollen wurden zum einen Zellen die mit 10 µl DMSO behandelt wurden, sowie Zellen die mit 10 µl einer 20 mM-PMA-Lösung stimuliert wurden, mitgeführt.

Für die RNA-Isolation aus den Zellen erfolgte das Abzentrifugieren bei 500 x g und 22° C für zehn Minuten. Der Mediumüberstand wurde abgenommen. Daraufhin wurden 400 µl Lyse-Puffer des peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit (VWR) je well hinzugegeben. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation sowie eine quantitative real-time PCR (vgl. Punkt 2.2.3.1).

2.2.2.3 Stimulation mit Actinomycin D und PMA

Die Kultivierung der Zellen erfolgte wie unter Punkt 2.2.1.3 beschrieben. Nach 24-stündigem Serumentzug erfolgte eine halbe Stunde vor Stimulation mit PMA das Hinzufügen von 10 µg Actinomycin D zu 2 ml Medium. Die Kulturplatten wurden durch vorsichtiges Schwenken durchmischt. Nach 30 Minuten Inkubationszeit erfolgte die Stimulation mit 10 µl einer 20 mM-PMA-Lösung. Somit ergibt sich auch hier eine Konzentration des PMA's von 100 nM. Die Kultur während der Stimulationszeiten erfolgte unter den oben genannten Standard-Kulturbedingungen im Inkubator (Thermo Scientific).

Zur Vorbereitung der RNA-Isolation aus den Zellen erfolgte nach Ablauf des Stimulationszeitraumes das Abzentrifugieren bei 500xg und 22° C für zehn Minuten. Der Mediumüberstand wurde entfernt. Daraufhin wurden 400 µl Lyse-Puffer des peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit (VWR) je well hinzugegeben. Anschließend erfolgte die RNA-Präparation sowie eine quantitative real-time PCR (vgl. Punkt 2.2.3.1).

2.2.3 Arbeiten mit RNA

2.2.3.1 Isolation von RNA und DNase -Verdau

Die Gewinnung von RNA aus den Zellen erfolgte mittels peqGOLD MicroSpin Total RNA Kit (VWR). Hierzu wurde eine laut Protokoll berechnete Menge des Lyse-Puffers direkt auf die Zellen in den Kulturplatten gegeben, von denen vorher das Kulturmedium abgesaugt wurde. Anschließend wurden die Zellsuspension umgehend in ein 2 ml Sammelbehälter gegeben und gemäß Herstellerprotokoll die RNA-Präparation durchgeführt.

Um die RNA von etwaigen DNA-Resten zu reinigen wurde ein DNase- Verdau durchgeführt. Dies erfolgte mittels peqGold DNase 1 Digest Kit (VWR) gem. Herstellerangaben.

Vorrausgegangene Testungen zeigten, dass das Elutionsvolumen von 22 µl zur verbesserten RNA-Gewinnung zweimal durch die PerfectBind MS RNA-Column gegeben werden musste. Die Quantifizierung der RNA-Menge erfolgte photometrisch.

Die RNA Proben wurden entweder direkt mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben oder zur späteren Verfügbarkeit bei -80°C eingelagert.

2.2.3.2 Reverse Transkription

Die gewonnenen RNA wurde mittels reverser Transkription in die korrespondierende cDNA umgeschrieben.

Als vorbereitende Arbeit wurde ein Primer-Mix aus gleichen Mengen Oligo(dT)₁₅-Primer (0,125 µg/µl) sowie Random Hexamers (0,5 µg/µl) erstellt, so dass eine Endkonzentration in der reversen Transkription von 1 µM Oligo(dT)₁₅ und 10 µM Random Hexamers entstand.

Anschließend wurde die M-MLV Reverse Transcriptase (Promega) nach folgendem Protokoll verwendet:

- 0,7 µg gesamt RNA mit RNase-freies H₂O auf 14 µl verdünnt
- + 1,25 µl dNTPs (10 mM)
- + 2 µl des vorher eingestelltem Primer-Mix Oligo(dT)₁₅ und Random Hexamers.

Zunächst erfolgte die Denaturierung der Sekundärstruktur der RNA bei 65°C für 5 Minuten.

Es erfolgte der Ansatz des Master Mixes gem. Protokoll mit:

- + 5 µl M-MLV 5X Reaction Buffer (Promega)
- + 0,6 µl RNasin RNase Inhibitor (40 U/µl, Promega)
- + 1 µl M-MLV Reverse Transcriptase (200 U, Promega)
- + 1,15 µl RNase-freies H₂O

Nach dem Denaturieren wurden die Proben auf Eis gekühlt und je Probe 7,75 µl des Mastermix hinzugegeben, kurz gevortext und herunterzentrifugiert.

Im Thermocycler erfolgte dann die reverse Transkription (Tabelle 13). Im Anschluss wurden die cDNA-Proben 1:1 mit RNase-freies H₂O verdünnt und bei -20° eingelagert.

Tabelle 13: Programm der reversen Transkription im Thermocycler

Zeitintervall	Temperatur
10 Minuten	25° C
60 Minuten	42° C
10 Sekunden	70° C
∞ Hold	10 °C

2.2.3.3 Quantitative real-time PCR (quantitative RT-PCR)

Bei der quantitativen *real-time PCR* handelt es sich um eine Methode der Messung der Genexpression eines bestimmten DNA-Abschnittes. Es erweitert die polymerase Kettenreaction (polymerase chain reaction, PCR) um die Messung eines spezifisch amplifizierten DNA-Abschnittes mittels Fluoreszenz-Detektion. Es wird die gemessene Fluoreszenz in der exponentiellen Phase des Prozesses mit einem vorher definierten Housekeeping-Gen verglichen. In dieser Arbeit wurde als Housekeeping-Gen *Beta-Actin (ACTB)* gewählt.

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Systeme verwendet. Zum einen das TaqMan-System für die *GRK2*- und *ACTB*-Genexpression sowie das SYBRGreen-System für die *EGR-1*-Genexpression. Beide Systeme arbeiten mit Fluorophoren (Fluoreszenzfarbstoffe) welche durch eine CCD-Kamera detektiert werden.

Die Quantifizierung der *GRK2*- sowie der *ACTB*-Genexpression erfolgte analog des Herstellerprotokolls des FAST qPCR MasterMix plus (Eurogentec) mit folgender Zusammensetzung für einen Ansatz:

ACTB 7.5 µl FAST qPCR MasterMix (2X)
 + 0.9 µl Vorwärtsprimer (*forward primer*) (10 µM)
 + 1.35 µl Rückwärtsprimer (*Reverse primer*) (10 µM)
 + 0.3 µl Probe (10 µM)
 + 3.95 µl H₂O

GRK2 7.5 µl FAST qPCR MasterMix (2X)
 + 1.35 µl Vorwärtsprimer (*forward primer*) (10 µM)

- + 1.35 µl Rückwärtsprimer (*reverse primer*) (10 µM)
- + 0.3 µl Probe (10 µM)
- + 3.5 µl H₂O

Die Quantifizierung der *EGR-1*- Genexpression erfolgte gemäß des Herstellerprotokolls des MESAGREEN qPCR MasterMIX plus (Eurogentec) mit folgender Zusammensetzung:

- EGR-1* 10 µl Mesa Green qPCR MasterMix (2X)
- + 0,8 µl Vorwärtsprimer (*forward primer*) (10 µM)
 - + 0,8 µl Rückwärtsprimer (*reverse primer*) (10 µM)
 - + 7.4 µl H₂O

Zunächst erfolgte eine Temperaturreihe zur Optimierung des SYBRGREEN-Assays bei der sich zeigte, dass 60°C die optimale *annealing*-Temperatur der *EGR-1*-Primer ist. Diese wurde für die folgenden Versuche beibehalten.

Eingesetzt wurden 1µl einer 1:1 verdünnten cDNA (s.o.). Somit erhielt man ein Gesamtvolumen pro Ansatz von 15 µl (*GRK2* bzw. *ACTB*) bzw. 20 µl (*EGR-1*). Jede Probe wurde zweifach auf einer 96-well Mikrotiterplatte (applied Biosystems) angesetzt. Darüber hinaus wurden bei jeder quantitativen RT-PCR, um eventuelle Kontaminationen zu detektieren, Leerwertkontrollen des MasterMixes mitgeführt, die als NTC (*non template control*) bezeichnet wurden.

Die Programme des Thermocyclers StepOnePlus™ (Applied Biosystems™) unterscheiden sich zwischen den beiden Methoden und sind in Tabelle 14 und Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 14: qRT-PCR Programm *ACTB*- und *GRK2*- Genexpression

	Zeitintervall	Temperatur	Zyklen (cycles)
UNG- Step	2 Minuten	50° C	
Taq-Aktivierung	5 Minuten	95° C	
Denaturierung	3 Sekunden	95° C	40x
Annealing	40 Sekunden	60° C	

Tabelle 15: qRT-PCR Programm *EGR-1*- Genexpression

	Zeitintervall	Temperatur	Zyklen (cycles)
Taq- Aktivierung	5 Minuten	95° C	

Denaturierung	3 Sekunden	95° C	40x
Annealing	40 Sekunden	60° C	
Schmelzkurve	1 Minute	60° C bis 95° C +0,5° C	

Für die Ermittlung des Ct-Wertes (*cycle threshold*) auf den die Quantifizierung beruht, wurde der threshold in der *Step-One Software* so gewählt, dass er bei allen Versuchen im exponentiellen Bereich der Kurven lag. Dies war bei allen Versuchen bei einem *threshold* von 0,15 für *ACTB*, *GRK2* sowie *EGR-1* gegeben. Die daraus resultierenden Ct-Werte wurden zur Normalisierung auf das Housekeeping-Gen *Beta-Actin (ACTB)* normiert und mittels $2^{-\Delta Ct}$ ausgewertet (Livak & Schmittgen, 2001) (vgl. Statistische Methoden 2.2.8).

2.2.4 Arbeiten mit DNA

Die in Tabelle 6 aufgelisteten Promotorkonstrukte wurden freundlicherweise von Frau Priv. Doz. Dr. med. Stefanie Klenke sowie dem Institut für Pharmakogenetik des Universitätsklinikums Essen zur Verfügung gestellt.

Auf Grund des unterschiedlichen Bindungsverhaltens der verschiedenen Allele (vgl. 1.2.2) erfolgten die nachfolgenden Experimente mit Promotorkonstrukten des G-Allels G(-43)A, da diese insgesamt drei der vier nachgewiesenen putativen EGR-1-Bindungsstellen beinhaltet.

Das verwendete *GRK2*-Promotorkonstrukt -402/+72 (relativ zum Translationsstartpunkt) liegt im pGL 4.10 Vektor vor.

Um eine ausreichende Anzahl an Transfektionen der Zelllinien durchführen zu können, mussten die verwendeten Konstrukte in kompetente Bakterien transformiert und anschließend kloniert werden.

2.2.4.1 Plasmide

Plasmide sind ringförmige doppelsträngige DNA-Moleküle die sich in kompetenten Bakterienstämmen unabhängig vom bakteriellen Genom vermehren lassen. Sie dienen als Klonierungsvektoren zur Vervielfachung der Promotorkonstrukte.

2.2.4.2 Herstellung der Bakterienmedien

Der Ansatz von LB-Medium erfolgte gem. dem o.g. Protokoll (vgl. 2.1.4.2). Um diesen zu verfestigen wurde nach dem Autoklavieren 15 g/l Agar-Agar (Kobe, Firma Roth) hinzugegeben.

Zur Selektion wurde dem autoklavierten LB-Medium nach Agar-Zugabe 100 µl/ml Ampicillin für die verwendeten Vektoren pGL4.10, pGL4.74, sowie pcDNA3.1 hinzugegeben. Für den Kontrollvektor pEGFP-C1 wurde das LB-Medium mit 50µl/ml Kanamycin ergänzt. Beide Selektionsmedien wurden im flüssigen Zustand in entsprechende Petrischalen gegeben, beschriftet und bei 4°C für den Versuchstag aufbewahrt.

2.2.4.3 Transformation und Klonierung der Promotorkonstrukte

Bereits vorbereitete Agar-Platten wurden im Inkubator auf 37°C vorgewärmt.

Die Konzentration der Plasmide wurde zunächst auf 100 ng/µl unter Hinzugabe von H₂O eingestellt. Dies erfolgte, genau wie die Lagerung der kompetenten Escherichia coli (Library Efficiency DH5α™, Life Technologies) auf Eis. Zu je 40 µl DH5α™ E.coli wurden nun je 1 µl Plasmid- DNA in ein Eppendorf-Gefäß hinzugegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Es erfolgte das frische Ansetzen von modifiziertem SOC-Medium (vgl.2.1.4.3). Nach kurzem Erhitzen (*heat shock*) von 45 sec bei 42°C im Thermoblock wurden die Proben für 2 Minuten auf Eis gelagert. Dieser Hitzeschock dient der Öffnung der Bakterienmembran und der verbesserten Transformation des Vektors in diese. Nach Hinzugabe von 400 µl modifiziertem SOC-Medium in jedes Eppendorf-Gefäß wurden die Bakterienkulturen für 1 Stunde bei 37°C und 200 rpm in einem Inkubationsschüttler (Gallenkamp) verbracht.

Zum Ausplattieren der Bakterienkultur wurden nach erfolgter Inkubation die Bakterien mittels Pasteur-Pipette auf die vorgewärmte Agar-Platten aufgetragen und mittels Glasspatel gleichmäßig verteilt. Es zeigte sich, dass die aufgetragene Bakterienmenge mit 20 µl, verglichen mit 100 µl, optimale Einzelkolonien ergab und so ein vereinfachtes Aufnehmen der Kolonien am Folgetag ermöglichte. Um eine Kontamination der folgenden Platten zu verhindern wurde der Glasspatel in 70 % Ethanol gelagert und anschließend über dem Bunsenbrenner abgeflämmt. Es erfolgte eine Übernachtkultur bei 37°C im Inkubator.

2.2.4.4 Bakterienselektion

Da nur ein gewisser Anteil der Bakterien Plasmide aufgenommen haben macht man sich die Antibiotikaresistenz des entsprechenden Plasmids zu Nutze. Durch diese Resistenz, in diesem Fall gegen Ampicillin bzw. Kanamycin wachsen auf dem Agar nur Bakterien, die das Plasmid aufgenommen haben, alle anderen werden im Wachstum inhibiert bzw. abgetötet.

An Tag 2 wurden die Agar-Platten des Vortages aus dem Inkubator auf Einzelkolonien kontrolliert. Es wurden 3 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum in ein Kulturröhrchen überführt. Mit Hilfe einer Einmal-Impföse wurde eine Einzelkolonie aufgenommen und in das entsprechend beschriftete Kulturröhrchen gegeben. Diese wurden im Inkubationsschüttler (Gallenkamp) bei 37°C und 200 rpm inkubiert. Nach 8 Stunden Inkubationszeit wurden 350 µl Bakterienkultur in einen vorbereiteten Erlenmeyerkolben, der 100 ml LB-Medium mit Antibiotikum enthielt, zur Übernachtskultur ebenfalls in den Inkubationsschüttler bei 37°C und 200 rpm überführt. An Tag 3 wurde die Übernachtskultur in 50 ml Röhrchen (2fach je Konstrukt) überführt und bei 4500 xg und 4°C 15 Minuten zentrifugiert.

2.2.4.5 Plasmid-Aufreinigung und Präparation

Die Aufreinigung und Präparation der klonierten Plasmide erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll des EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen).

Es wurden, um eine eventuell aufgetretene Kontamination oder zu geringe Ausbeute auf das Kit zurückführen zu können, Aliquots der jeweiligen Einzelschritte entnommen.

2.2.4.6 Kontrolle der Plasmidreinheit durch Agarose-Gel-Elektrophorese

Um eine Verunreinigung der Plasmide ausschließen zu können erfolgte eine Agarose-Gel-Elektrophorese der präparierten Proben. Hierbei wird die eingesetzte DNA ihrer Größe nach getrennt. So können durch mehrere Banden pro Tasche eine Verunreinigung bzw. genomische DNA nachgewiesen werden. Eine exemplarisch ausgewählte Kontrolle ist in Abbildung 1 dargestellt. Hier wurden die verwendeten *GRK2*-Plasmide, das A- sowie das G-Allel, sowie die leeren Transfektionsvektoren gegen einen standardisierten Größenmarker aufgetragen.

Hierfür wurde ein 0,8 % Agarose-Gel in den Abmessungen 7 cm x 10 cm x 0,75 cm gegossen. Dies setzte sich zusammen aus 50 ml SB-Puffer und 0,4 g Agarose. Als Farbstoff wurde 1 µl/ 10 ml Gel (W/V) SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies)

verwendet, der in der Toxizität und der Kanzerogenität dem herkömmlichen Ethidiumbromid überlegen ist. Der verwendete SB-Puffer (Sodium-Borat-Puffer) hat gegenüber dem oft verwendeten TBE-Puffer den Vorteil durch niedrige Leitfähigkeit schärfere Banden zu erzeugen. An das Gel wurden für 45 Minuten eine Spannung von 100 Volt angelegt. Zu je 1 µl Probe wurden 9 µl H₂O sowie 2 µl Orange DNA Loading Dye (Thermo Scientific) gegeben und in die entsprechenden Taschen eingefüllt. Als standardisierten Größenmarker wurden 12 µl Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Scientific) verwendet.

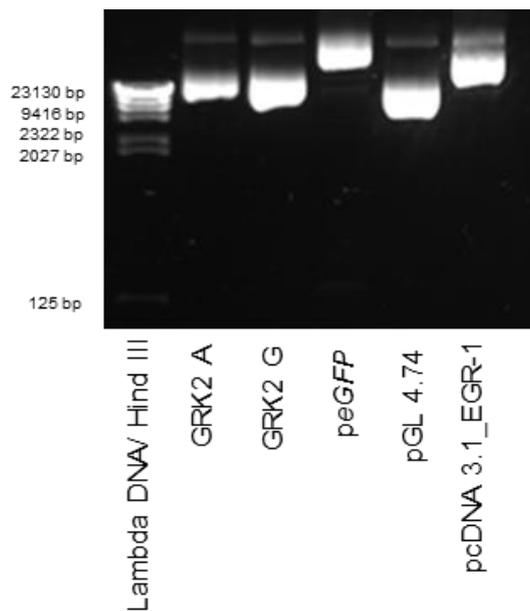


Abbildung 5: Agarosegel zur Kontrolle der Plasmidreinheit. Aufgetragen wurden die verwendeten Plasmide GRK2 A, GRK2 G, peGFP, pGL4.74 und pcDNA 3.1_EGR-1 sowie der DNA Marker Lambda DNA/HIND III.

2.2.4.7 Quantifizierung und Sequenzierung der Plasmide

Nach dem Abschluss der Plasmid-Präparation erfolgte der Versand der Proben zur Sequenzierung an GATC Biotech (Konstanz, Deutschland). Die Quantifizierung der DNA erfolgte mittels photometrischer Bestimmung bei 260 nm Wellenlänge in einem BioPhotometer plus (Eppendorf).

2.2.4.8 Reportervektoren

Reportervektor für GRK2- Promotorkonstrukte

Als Reportervektor für die GRK2-Promotorkonstrukte wurde pGL4.10[luc2] (Promega) gewählt. Hierbei handelt es sich um ein speziell für die Messung der Genexpression mittels Luciferase-Assay entwickeltem Vektor. Er beinhaltet ein so genanntes *luc2*-Gen,

welches für Luciferase des Glühwürmchens (*Photinus pyralis*) kodiert. Dieser Wert kann in der Expressionsmessung als firefly-Wert detektiert werden. Des Weiteren besitzt der Vektor zur Selektion eine Ampicillin-Resistenz.

Zur Normalisierung der firefly-Werte erfolgte die Einbringung eines zweiten Reportervektors. Hierfür wurde pGL4.74[hRLuc/TK] (Promega) verwendet. Es enthält das *hRLuc*-Luciferase-Gen, die Luciferase einer Qualle (*Renilla reniformis*). Zur Selektion wurde hier ebenfalls Ampicillin verwendet.

Reportervektor zur Erhebung der Transfektionseffizienz

Zur Feststellung der Transfektionseffizienz des jeweiligen Versuches wurde neben den Promotorkonstrukten auch der Reportervektor pEGFP-C1 (Clontech) cotransfiziert. Er kodiert für das verstärkte grün leuchtende Protein EGFP (*enhanced green fluorescent protein*) einer Qualle (*Aequorea victoria*). Bei erfolgreicher Transfektion einer Zelle mit dem pEGFP-Vektor lassen sich diese mittels Fluoreszenzmikroskopie (Anregungswellenlänge: 470 nm) zur Emission von grünem Licht anregen (Emmissionsmaximum 509 nm). Die Messung der Transfektionseffizienz erfolgte dann mit einem Fluoreszenzmikroskop.

2.2.5 Transiente Transfektion H9c2

Zur Identifikation eines geeigneten Transfektionsreagenzes wurde eine Testreihe mit verschiedenen kommerziell erhältlichen Produkten durchgeführt. Es wurden getestet:

FuGENE[®] 6 Transfection Reagent (Promega, Madison, USA)

Lipofectamine[®] LTX with Plus[™] Reagent (ThermoFischer Scientific, Waltham, USA)

peqfect DNA[®] (peqlab, Erlangen)

Fugene HD[®] (Promega, Madison, USA).

Unter den in dieser Arbeit ausgetesteten Transfektionsreagenzien zeigte FuGENE 6[®] (Promega) bei einer Zellzahl von 10.000 pro Well einer 96-Loch Platte die besten Ergebnisse. Die höchste Transfektionseffizienz wurde mit einem 3:1 Verhältnis von Transfektionsreagenz zu eingesetzter DNA erzielt.

Die verwendeten H9c2-Zellen wurden bei ca. 80 % Konfluenz verwendet und mittels 5ml TrypLE[®] (Gibco) 5 Minuten lang abgelöst. Es erfolgte die Überführung in 50 ml Gefäße unter Zugabe von 15 ml DMEM[®] mit 10 % FKS. Nach der Zentrifugation bei 500 x g und 7

min wurde der Überstand abgenommen und das Zellpellets in 5 ml frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Anschließend wurde, nach erfolgter Trypan-Vitalitätsfärbung, die Zellzahl in der vorbereiteten Neubauer-Zählkammer mittels Durchlichtmikroskopie bestimmt. Die gewünschte Zellzahl wurde berechnet, eingestellt und in eine beschriftete 96-Loch Kulturplatte gegeben.

Nach ausführlicher mikroskopischer Kontrolle erfolgte nach 24 Stunden die Transfektion gemäß den Herstellerangaben. Für einen Ansatz wurde zu 45,9µl OptiMEM (Gibco) 3 µl FuGENE 6® (Promega) Transfektionsreagenz gegeben. Dies wurde 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert bevor 100 ng DNA je Well eingesetzt wurde. Nach weiteren 15 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Transfektionslösung in die entsprechend beschriftete 96-Loch Platte gegeben. Sechs Stunden nach Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel auf DMEM ohne FKS. Dies soll eine Zellzyklussynchronisation durch Mangel an Wachstumsfaktoren ermöglichen.

Zur Bestimmung der Effizienz erfolgte die Transfektion mit pEGFP-C1 (Clontech). Dieser Vektor zeigt bei erfolgreicher Transfektion unter Fluoreszenzmikroskopie eine Emission von grünem Licht, die optisch quantifiziert werden kann.

Sämtliche folgenden Versuche erfolgten nach o.g. Schema.

Nach Abschluss der Versuche wurden sämtliche gentechnisch veränderten Organismen (GVO) im Autoklaven des Institutes autoklaviert und anschließend entsorgt.

2.2.6 Luciferase-Assay

Der Dual-Glow Luciferase-Assay beruht auf der Steigerung der Expression eines Enzyms, welches hinzugegebene Substrat unter Emittierung von Licht metabolisieren kann. Diese, sich proportional zur Genexpression verhaltende Zunahme der Lichtemission wurde mittels Luminometer (Berthold, Bad Wildbad) detektiert und quantifiziert.

Als experimenteller Reportervektor diente wie unter 2.2.4.8 beschrieben pGL4.10[luc2] (Promega). Dieser enthielt das zu untersuchende Insert des *GRK2*-Promotors. Um etwaige Schwankungen der Lebendzellzahl (Zellviabilität) bzw. der Transfektionseffizienz zu minimieren erfolgte eine Cotransfektion mit dem Kontrollvektor pGL4.74[hRluc/TK]. Dieser enthielt einen konstitutiv aktiven Promotor, den so genannten Renilla-Vektor und bildet so eine Kontrolle zur Normalisierung des experimentellen firefly-Wertes, welcher abhängig von den Versuchsbedingungen ist.

Die Zellen wurden zunächst wie unter 2.2.5 beschrieben ausgesät und transient mit den Vektoren pGL4.10_GRK2_G [luc2] (Promega) und pGL4.74[hRluc/TK] (Promega) kotransfiziert. Neben den experimentellen Werten wurden noch weitere Kontrollen in jeder 96-Loch Platte mitgeführt. Die Negativkontrollen erhielten statt des Vektormixes H₂O. Eine weitere Kontrolle erhielt die leeren Vektoren pGL4.10 [luc2] (Promega) und pGL4.74[hRluc/TK] (Promega).

Nach der jeweils angegebenen Stimulationsdauer wurden die Platten, falls nicht gesondert beschrieben, gemäß dem Herstellerprotokoll für das Dual-Glo[®] Luciferase Assay System (Promega) behandelt. Nach Zugabe von 75 µl Substrat je well und einer Aquilibrierungsdauer von zehn Minuten erfolgte die Messung im Luminometer (Bertholt). Die Ergebnisse wurden in RLU (relative light units) angegeben.

Bei der Auswertung wurden zunächst die gemessenen Werte für den leeren Vektor und die *GRK2*-Promotorkonstrukte um die Hintergrundaktivität (gemessen an den pseudotransfizierten Negativkontrollen) gemindert. Anschließend erfolgte die Bildung des firefly/renilla Quotienten zum Ausschluss etwaiger Störgrößen. Die nun vorliegenden Quotienten korrelieren nun mit der gemessenen Promotoraktivität des transfizierten Inserts.

2.2.7 Arbeiten mit Proteinen

2.2.7.1 Western-Blot

Das Western-Blot-Verfahren dient dem Nachweis spezifischer Proteine in Zelllysaten. Hierbei werden durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) zunächst die Proteine nach ihrer Größe und Ladung aufgetrennt. Anschließend erfolgt der Transfer der Proteine auf eine Membran. In dieser Arbeit wurde das so genannte Semi-dry-Blotting-Verfahren genutzt. Durch zwei verschiedene Antikörperreaktionen und einer Chemielumineszenzreaktion können die Proteine auf Filmen nachgewiesen werden.

Für die Versuche wurden die Zellen auf 10 cm Zellkulturplatten mit einer Zellzahl von $1,8 \times 10^6$ und 5 ml DMEM + 10 % FKS kultiviert.

Für das 8% Trenngel wurden folgende Komponenten in einem Erlenmeyerkolben zusammengefügt:

30% Acrylamid	4 ml
10 % SDS	150 µl
1,5 M TRIS-Puffer, pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O, demineralisiert	7,02 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	75µl

Für die Polymerisation wurden 7,5 µl TEMED hinzugefügt.

Das Trenngel wurde in die vorbereitete Mini-PROTEAN® Tetra Cell Gelkammer (Bio-Rad) gegeben und mit Isopropanol beschichtet.

Für das Sammelgel wurden folgende Komponenten zusammengefügt:

30% Acrylamid	4 ml
10 % SDS	150 µl
1,5 M TRIS-Puffer, pH 8,8	3,75 ml
H ₂ O, demineralisiert	7,02 ml
Ammoniumpersulfat (10%)	75µl

Das Verschlussgel besteht aus:

1,5 M Tris pH 8,8	1ml
Acrylamid (29:1)	1ml
TEMED	10µl
APS (10%)	10µl

Transferpuffer:

Tris-Puffer	3,03
Glycin	14,4g
Aqua dest.	bis auf 500ml auffüllen

Methanol	200ml
Aqua dest.	300ml

Der pH-Wert wurde bei 8,5 eingestellt.

Milchpuffer 5% Milchpulver in TBST mit 0,1% TWEEN 20

Für die *in vitro* Stimulationsversuche wurden die H9c2-Zellen wie unter Punkt 2.2.1.3 beschrieben kultiviert. Stimuliert wurden die Zellen mit 100 nM PMA für die angegebenen Zeitpunkte. Als Negativkontrolle wurden mit 10 µl DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Die eingesetzte DMSO-Menge entsprach dem DMSO-Gehalt der eingesetzten PMA-Lösung.

Nach Ablauf des Stimulationzeitraumes erfolgte die sofortige Kühlung der Zellkulturplatten auf Eis. Nun wurde mit der Zellkernextraktion gemäß der Herstelleranweisung des CelLytic™ NuCLEAR™ Extraction Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) fortgefahren. Im Anschluss an die Extraktion erfolgte zur quantitativen Bestimmung der Proteinmenge ein Bicinchoninsäure-Assay (BCA-Assay). Hier kann auf Grund der Reduktion von der Probe hinzugegebenen Cu^{2+} zu Cu^{+} und der damit einhergehenden Farbkomplexbildung mit BCA die Proteinmenge photometrisch bestimmt werden. Diese Messung erfolgt bei einer Wellenlänge von 562 nm. Im Anschluss daran erfolgte die Entnahme von 20 µg Protein aus der Probe. Diese wurde mit 2 µg Roti®-Load 1 Probenauftragepuffer (Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bei 95°C für 5 Minuten inkubiert. Nach dem Einfüllen des zuvor vorbereiteten SDS-Laufpuffers (10 %SDS in demineralisiertem Wasser) in die Kammer erfolgt das Einsetzen der Proben nach Einsetzen des Markers in die erste Tasche. Nun wurde zunächst beim Sammelgel eine Spannung von 110 Volt und beim Erreichen des Trenngel eine Spannung von 150 Volt eingestellt.

Nachdem das Filterpapier sowie die Blottingmembran zurechtgeschnitten wurde, wurde die Membran in Transferpuffer aquilibriert. Das gelaufene Gel wurde nun, nachdem es ebenfalls in Transferpuffer überführt wurde, in die Blottingkammer zwischen Filterpapier und Membran eingelegt. Erneutes Befeuchten mit Transferpuffer. Nach dem Verschluss der Kammer wurde eine Spannung von 15 Volt für eine Zeit von 30 Minuten angelegt. Um sicherzustellen, dass es beim Blottingvorgang zu einem erfolgreichen Proteintransfer gekommen ist, erfolgte im Anschluss daran die Anfärbung der Membran mit dem Azofarbstoff Ponceau S. Beides wurde in ein Probenröhrchen gegeben und auf einem Rollschüttler einige Minuten vermischt. Anschließend erfolgte ein vorsichtiges Abwaschen des überschüssigen Farbstoffes mittels H_2O .

Die primären Antikörper wurden in einem Verhältnis von 1:1000 in 5% BSA und TBST gegeben. Daraufhin wurde die Membran dem primären Antikörper hinzugefügt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die überschüssige Antikörperlösung bei -20°C zur späteren Wiederverwendung gelagert. Es erfolgen nun drei Waschungen für jeweils fünf Minuten mit TBST. Um sicherzustellen, dass die Proteinmenge gleichmäßig verteilt ist wurden Kontrollen, welche mit einem Antikörper gegen ACTB im Verhältnis 1:10000 behandelt wurden, mitgeführt. Der sekundäre goat anti-rabbit IgG-HRP Antikörper (Santa Cruz Biotechnology) wurde nun in einem Verhältnis von 1:4000 in 5 %TBST bereitgestellt. Die Membran wurde zusammen mit dem Sekundärantikörper eine Stunde im Rollschüttler inkubiert. Anschließend erfolgten erneut drei Waschperioden a 5 Minuten mittels TBST.

Als Chemilumineszenzsubstrat wurde SignalFire™ ECL Reagent (Cell Signaling, Leiden) gemäß den Herstellerangaben vorbereitet. Die Blottingmembran wurde auf eine Plastikfolie gegeben und 500 µl SignalFire™ hinzugefügt. Es folgte eine Inkubationsphase von einer Minute. Nun wurde der Film auf die Membran gelegt. Es erfolgte das Einlegen in bereitgestellte Entwicklerflüssigkeit für 30 Sekunden, gefolgt von Abwaschen mittels H₂O und dem einlegen in die Fixierflüssigkeit für eine Minute. Im Anschluss erfolgte die Detektion.

2.2.8 Statistische Methoden

Die Ergebnisse der quantitativen real-time PCR der *in vitro* Stimulationen wurden aus der StepOne plus Software (Thermo Fisher Scientific) in eine Excel-Tabelle (Microsoft) exportiert. Vor der Datenextraktion wurde manuell ein Schwellenwert (cycle threshold, C_t) von 15 festgelegt. Dies entspricht der Zykluszahl, bei der das detektierte Fluoreszenzsignal gut vom Hintergrund unterschieden werden konnte, da an diesem Punkt die Amplifikation exponentiell verlief. Dann erfolgte zunächst die Mittelwertbildung der C_t-Werte der Zweifachansätze einer jeden Probe.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse und um etwaige Störfaktoren wie z.B. Unterschiede der RNA-Extraktion oder Fehler der RT-Reaktion zu relativieren, erfolgt die Normierung der gewonnenen C_t-Werte auf das Kontrollgen *ACTB* gemäß der $2^{-\Delta Ct}$ Formel nach Livak und Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001). Die Eignung von *ACTB* als Kontrollgen bestätigte sich auch in zuvor durchgeführten Genexpressionsanalysen der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien, entsprechend den Empfehlungen zur Auswahl eines Referenzgenes bei quantitativen PCR-Experimenten (Klenke et al., 2016).

Die präsentierten Daten werden in Mittelwert und Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung aller Ergebnisse erfolgte mit GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, Inc, USA). Die Daten der Luciferase-Assays wurden mittels ungepaarten zweiseitigem Student's t test analysiert. Bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurde eine Ein-Wege ANOVA verwendet, die um eine Korrektur für multiples Testen, dem Holm-Sidak-Test erweitert wurde. Sämtliche Versuche sind mindestens in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt worden. Eine statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert von $<0,05$ angenommen. In den Abbildungen wurde ein p-Wert unter 0,05 durch einen Stern (*), ein p-Wert unter 0,01 durch zwei Sterne (**), ein p-Wert kleiner 0,001 durch drei Sterne (***) sowie ein p-Wert kleiner 0,0001 durch vier Sterne (****) markiert.

3. Ergebnisse

3.1 Transfektion von H9c2-Zellen mit aktivem *GRK2*-Promotorkonstrukt führt zu starkem Anstieg der Luciferase-Aktivität.

Abbildung 6 zeigt die Nukleotidsequenz der genomischen DNA vor dem *GRK2*-Translationsstartpunkt. Bereits vorhandene *In silico*-Analysen der Arbeitsgruppe zeigten im *GRK2*-Promotor vier putative EGR-1-Bindungsstellen, die sich zwischen -339 und -80 relativ zum Startpunkt der Translation befinden. In Abhängigkeit vom Allel weisen diese unterschiedliche Stärken der Bindung auf. Diese sind in Abbildung 6 mit den Zahlen römisch I, II, und III gekennzeichnet.

Durch Vorarbeiten der Arbeitsgruppe existierte ein *GRK2*-Promotorkonstrukt von nt-402/+72, welches im Folgenden als pGL4.10_*GRK2* beschrieben wird.

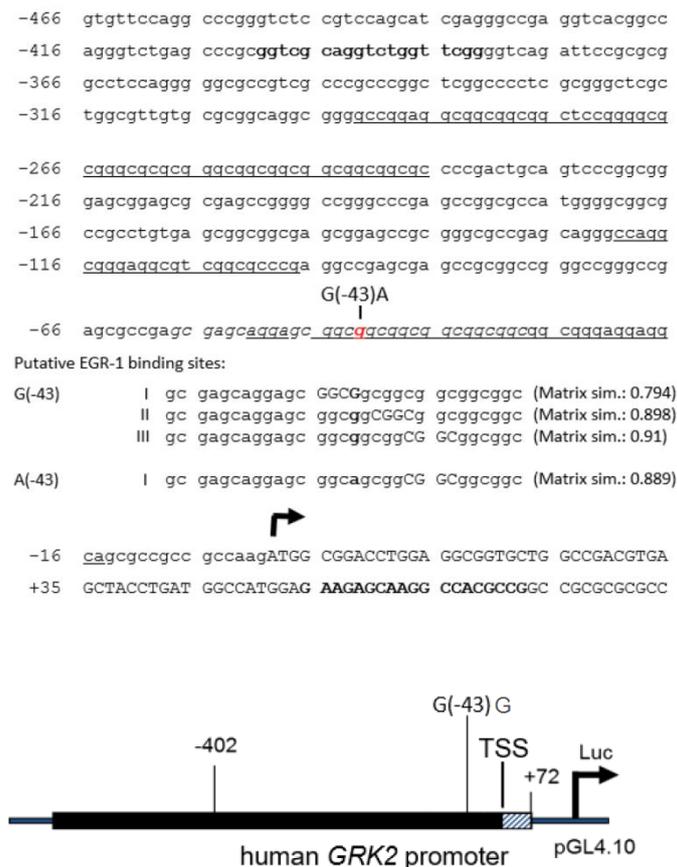


Abbildung 6: Nukleotidsequenz und Charakterisierung der 5'-flanking Region des menschlichen *GRK2*-Gens. Der Translationsstartpunkt wurde durch einen Pfeil markiert. Die Zahlen auf der linken Seite beschreiben das Verhältnis zum Translationsstartpunkt ATG. In Fett gesetzte Buchstaben zeigen die Primerbindungsstelle für das Klonieren des nt -402/+72- *GRK2*-Promotorkonstruktes. Unterstrichene Buchstaben zeigen putative EGR-1-Bindungsstellen (www.genomatrix.de), römisch I, II und III jeweils das Bindungsverhalten im G(-43) oder A(43) Allel.

Zur Detektion der basalen *GRK2*-Reporteraktivität nach Transfektion mit einem aktiven *GRK2*-Promotorkonstrukt (pGL4.10_*GRK2*) erfolgten Luciferase-Assays. Die gemessenen Firefly-Werte wurden wie unter Punkt 2.2.6 beschrieben nach Abzug der Hintergrundaktivität auf die Renilla-Aktivität normiert. Der gebildete Quotient entspricht der Promotoraktivität des eingesetzten *GRK2*-Promotor-Inserts. Um zu ermitteln, ob die Steigerung der Reportaktivität einer zeitlichen Dynamik folgt, erfolgte eine Zeitreihe in der die Aktivität nach 24, 48 und 72 Stunden gemessen wurde. Es zeigte sich ein sukzessiver Anstieg der Aktivität nach 72h Stunden im Vergleich zur Aktivität nach 24 Stunden. Hierbei sind mit einem $p < 0,0001$ nicht nur die gemessenen Werte der transfizierten Zellen untereinander als signifikant anzusehen, sondern auch der Vergleich zu den jeweiligen Daten der pseudotransfizierten Zellen (Abbildung 7): Da im Bereich des *GRK2*-Promotors des G-Allels drei putative EGR-1-Bindungsstellen existieren (vgl. *in-silico*-Analyse), könnten diese für die verstärkte Transkription von *GRK2* mitverantwortlich sein.

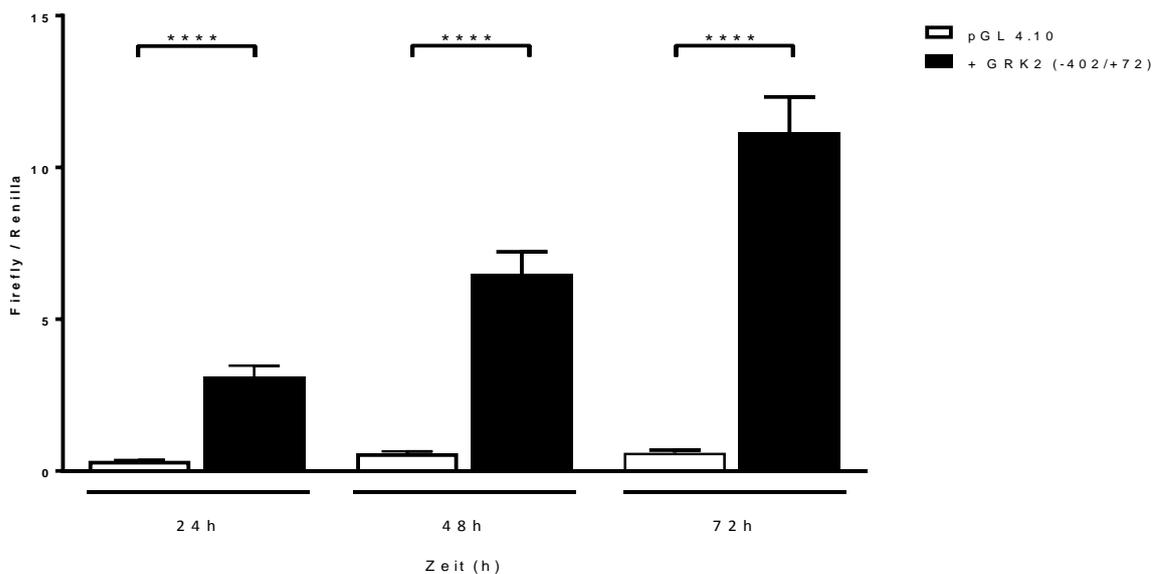


Abbildung 7: Einfluss einer transienten Transfektion mit pGL4.10_*GRK2* auf die *GRK2*-Promotoraktivität in H9c2-Zellen. Es wurde die Luciferase-Reporteraktivität zu den angegebenen Zeitpunkten in transfizierten Zellen im Vergleich zu pseudotransfizierten Zellen gemessen. Die Detektion der Aktivität erfolgte mittels Luciferase-Assay, Angabe des Firefly/Renilla-Quotienten nach Abzug der Hintergrundaktivität, Student's t-test, (****)= p -Wert $< 0,0001$

3.2 Der Einfluss vom PMA auf die endogene Expression von *GRK2* in glatten Muskelzellen der Ratte

Voruntersuchungen von Ramoz-Ruiz (Ramos-Ruiz et al., 2000) zeigten, dass eine Stimulation von glatten Muskelzellen der embryonalen Ratte (A10-Zellen) mit dem Phorbol ester PMA zu einer erhöhten *GRK2*-Promotoraktivität führt. Daher wurde zunächst die Expression von *GRK2* nach Stimulation der A10- Zellen mit 100 nM PMA durch eine quantitative real-time PCR gemessen. Im Vergleich zur mitgeführten Negativkontrolle, welche nur DMSO erhielt, sank initial die Expression von endogenem *GRK2* nach einer Stunde auf das 0,7-fache des Ausgangswertes ab. In den darauf folgenden Zeitpunkten ist ein sukzessiver Anstieg der Expression bis zu einem Maximum des fold changes auf 1,28 nach 5 Stunden im Vergleich zur mit DMSO behandelten Kontrollgruppe (Ctrl), welche auf den Wert 1 normiert wurde, zu verzeichnen. Dieser Anstieg zeigte sich jedoch im durchgeführten Student's t-test nicht signifikant (Ctrl 1 h vs. 5 h $p=0,857$). Im weiteren Zeitverlauf kann kein eindeutiger Zusammenhang zwischen Stimulation und *GRK2*-Expression abgeleitet werden (Abbildung 8).

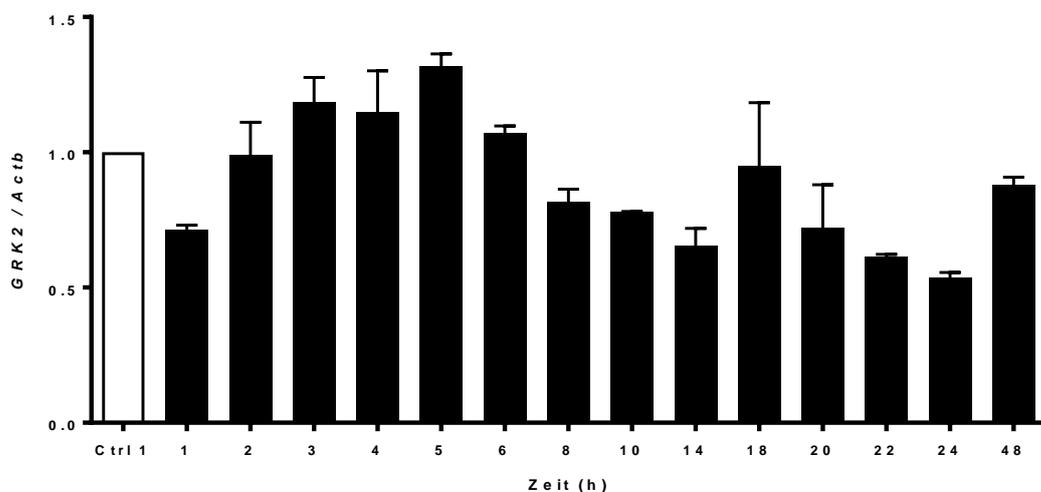


Abbildung 8: Einfluss von PMA auf die endogene Expression von GRK 2 in A10- Zellen Die Expression von *GRK2* in A10-Zellen wurde nach einer Stimulation mit 100 nM PMA mittels quantitativer real-time PCR untersucht. Kontrolle (Ctrl) mit DMSO stimuliert und normiert auf den Wert 1

3.3 Der Einfluss von PMA auf die endogene Expression von *GRK2* in Kardiomyoblasten der Ratte

Da im Fokus dieser Arbeit die funktionelle Analyse und die Signaltransduktion in Kardiomyoblasten im Vordergrund stehen, wurden nun die Versuche bei embryonalen Kardiomyoblasten der Ratte (H9c2-Zellen) wiederholt. Nach Stimulation mit 100 nM PMA zeigte sich ein sukzessiver signifikanter Anstieg der *GRK2*-Expression auf ein Maximum des 1,5-fachen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen nach fünf Stunden ($p=0,0075$, Abbildung 9). Es folgt eine anschließende Reduzierung der Expression von *GRK2* bis zu einem Minimalwert von 0,59 nach 20 Stunden. Im weiteren Verlauf kam es nach 48 Stunden erneut zu einem Anstieg der Expression bis auf einen fold change von 0,84 im Vergleich zum Ausgangswert des foldchanges von 0,99 nach einer Stunde Stimulation.

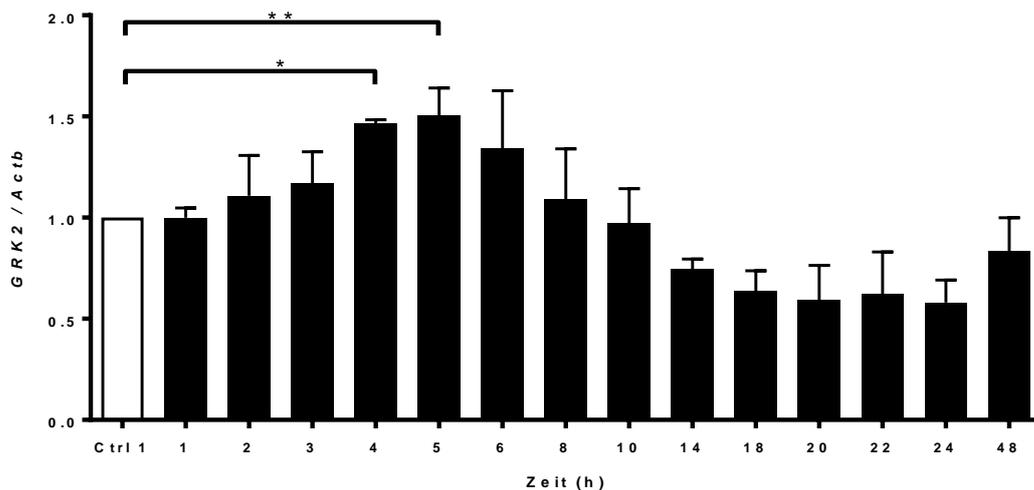


Abbildung 9: Einfluss von PMA auf die endogene Expression von GRK 2 in H9c2-Zellen. Die Expression von *GRK2* wurde nach Stimulation mit 100 nM PMA mittels quantitativer real-time PCR untersucht und auf das Kontrollgen *ACTB* normiert. Kontrolle (Ctrl) mit DMSO stimuliert und normiert auf den Wert 1; Student's t-Test, Ctrl 1 h vs. 4 h $p=0,016$, Ctrl 1 h vs. 5 h $p= 0,0075$; (*)= p -Wert< 0,05, (**)= p -Wert<0,01

3.4 Der Einfluss von PMA auf die endogene Expression von *EGR-1* in Kardiomyoblasten der Ratte

Es ist bereits bekannt, dass PMA die mRNA und Proteinexpression des Transkriptionsfaktor *EGR-1* steigert. Dies wurde bereits von Malakooti et al. in menschlichen Enterozyten des Kolons nachgewiesen (Malakooti et al., 2006). Zur Untersuchung, ob es auch in Zellen des kardiovaskulären Systems zu einer PMA-induzierten Stimulation kommt, erfolgten *in vitro*-Analysen der Expression von *EGR-1* in H9c2-Zellen. Das Maximum der gemessenen Expression ist mit einem fold change von 6,3 bereits nach einer Stunde im Vergleich zur mit DMSO stimulierten Kontrolle signifikant ($p=0,0003$) angestiegen (Abbildung 10). Im Verlauf der angeschlossenen Messzeitpunkte fällt die Expression deutlich ab, um nach acht Stunden bereits mit einem fold change der Expression von 0,8 die Negativkontrolle unterschritten zu haben.

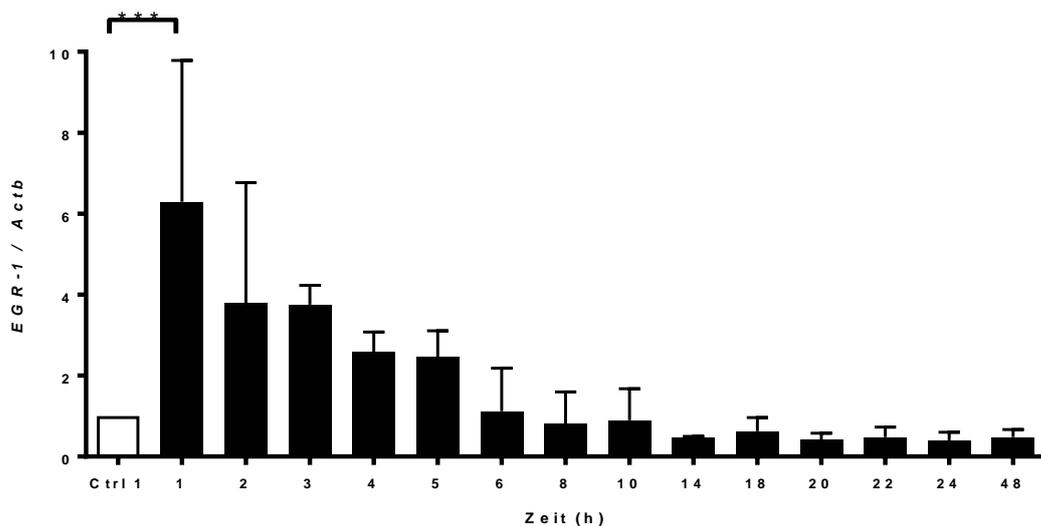


Abbildung 10: Einfluss von PMA auf die endogene Expression von *EGR-1* in H9c2-Zellen. Die Expression von *EGR-1* wurde nach Stimulation mit 100 nM PMA mittels quantitativer real-time PCR untersucht und auf das Kontrollgen *ACTB* normiert. Kontrolle (Ctrl) mit DMSO stimuliert und normiert auf den Wert 1; Student's t-Test, Ctrl 1 h vs. 1 h $p=0,0003$; (***)= p -Wert < 0,001

3.5 Untersuchung der *GRK2*-Expression in Kardiomyoblasten der Ratte nach Stimulation mittels inaktivem PMA (4 α -PMA)

Um sicherzustellen, dass die Wirkung vom PMA unter den bisherigen Stimulationsversuchen ausschließlich durch den aktiven Metaboliten und nicht ebenfalls durch das inaktivierte Molekül ausgelöst wird, erfolgt eine Negativkontrolle mit dem inaktiven 4 α -Phorbol-12-myristate-13-acetate (4 α -PMA).

Nach der Behandlung der Zellen mit PMA, sowie dem inaktiven Metaboliten und einer Inkubationszeit von vier Stunden kam es zu einer signifikant erhöhten *GRK2*-Expression in den mit PMA behandelten Zellen. In den mit dem inaktiven Metaboliten 4 α -PMA behandelten Zellen war die *GRK2*-Expression im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant verändert, eine Signifikanz konnte jedoch im Vergleich der *GRK2*-Expression zu den mit PMA behandelten Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 11).

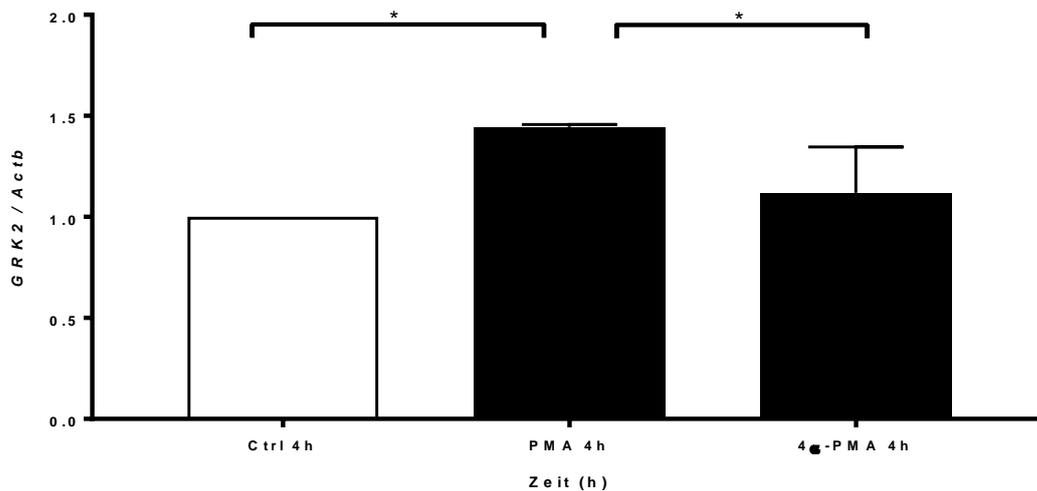


Abbildung 11: Vergleich der Expression von *GRK2* nach Stimulation mit PMA und 4 α -PMA in H9c2-Zellen. Die Expression von *GRK2* wurde nach einer Stimulation mit 100 nM PMA und 100 nM 4 α -PMA mittels quantitativer real-time PCR untersucht und auf die *ACTB*-Expression normiert. Kontrolle (Ctrl 4h) mit DMSO stimuliert und normiert auf den Wert 1; Student's t-Test, Ctrl 4 h vs. PMA 4 h p= 0,018, PMA 4 h vs. 4 α -PMA 4 h p= 0,046; (*)= p-Wert < 0,05

3.6 Untersuchung der *EGR-1*-Expression in Kardiomyoblasten der Ratte nach Stimulation mittels inaktivem PMA (4 α -PMA)

Um auch den stimulierenden Einfluss des aktiven PMA-Metaboliten im Vergleich zum inaktiven 4 α -PMA auf die *EGR-1*-Expression nachzuweisen erfolgten auch hier, analog zu den Versuchen von 3.4, eine quantitative PCR zur Untersuchung der Expression von *EGR-1* nach Stimulation mit o.g. Substanzen. Im direkten Vergleich der Ergebnisse zeigte sich nach vier Stunden Inkubationszeit eine signifikante Differenz in der Expression von *EGR-1* im Vergleich zur mitgeführten Kontrolle. Es zeigte sich ein fold change der Expression von 2,58 nach PMA-Stimulation im Vergleich zur Kontrolle ($p=0,0052$). Während der fold change der Expression von *EGR-1* bei den Zellen, die mit dem aktiven PMA-Metaboliten behandelt wurden, im Vergleich zu denen, die mit dem inaktiven Metaboliten stimuliert wurden 2,58 beträgt, zeigte sich bei den mit 4 α -PMA behandelten Zellen eine signifikante Reduktion des fold changes der Expression auf 1,1 ($p=0,0074$, Abbildung 12).

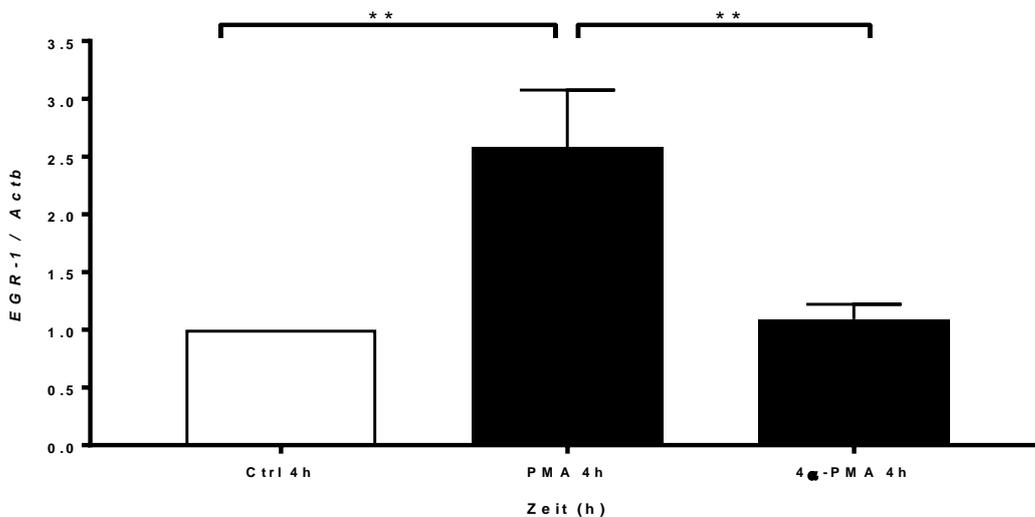


Abbildung 12: Vergleich der Expression von *EGR-1* nach Stimulation mit PMA und 4 α -PMA in H9c2-Zellen. Die Expression von *EGR-1* wurde nach Stimulation mit 100 nM PMA und 100 nM 4 α -PMA mittels quantitativer real-time PCR untersucht und auf die *ACTB*-Expression normiert. Kontrolle (Ctrl 4h) mit DMSO stimuliert und normiert auf den Wert 1; Student's t-Test, Ctrl 4 h vs. PMA 4 h $p=0,0052$, PMA 4 h vs. 4 α -PMA 4 h $p=0,0074$; (**)= p -Wert < 0,01

3.7 Auswirkung der Transkriptionsblockade auf die *GRK2*-Expression

Da gezeigt werden sollte, auf welchen Mechanismus die vermehrte Genexpression nach Stimulation mit PMA beruht, führten wir Versuche mit Actinomycin D durch. Bei Actinomycin D handelt es sich um ein Peptid-Antibiotikum, das mit Guanin-Resten der DNA interkaliert. Auf diese Weise kommt es zu Blockade der RNA-Polymerase und so zur Hemmung der Transkription. In den durchgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass der Anstieg der *GRK2*-Expression auf eine Steigerung der Transkription beruht. Bei Hemmung der Transkription durch Actinomycin D 30 Minuten vor Stimulation kommt es trotz PMA-Stimulation zu einem signifikanten Abfall ($p=0,011$) des fold changes der *GRK2*-Expression von 1,4 auf 1,1 nach 4 Stunden Inkubationszeit. Eine alleinige Actinomycin D-Stimulation über einen Zeitraum von 1h zeigte einen fold change von 0,68 (Abbildung 13).

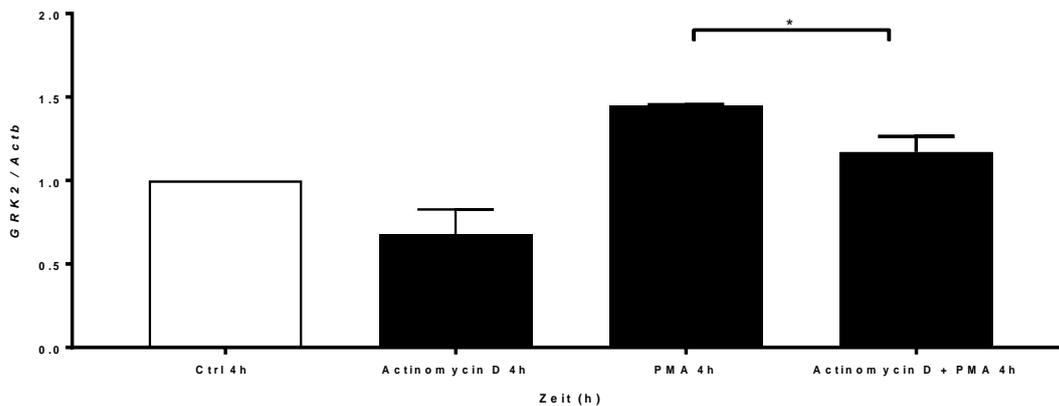


Abbildung 13: Vergleich der Expression von *GRK2* nach Stimulation mit PMA nach Vorbehandlung mit Actinomycin D in H9c2-Zellen. Die Expression von *GRK2* wurde nach Stimulation mit 100 nM PMA sowie 10 µg Actinomycin D mittels quantitativer real-time PCR untersucht und auf die *ACTB*-Expression normiert. Kontrolle (Ctrl 4h) mit DMSO stimuliert und normiert auf den Wert 1; Student's t-Test, PMA 4 h vs. Actinomycin D + PMA 4 h $p=0,011$; (*) = p -Wert < 0,05

3.8 Auswirkung der Transkriptionsblockade auf die *EGR-1*-Expression

Um auch für die mit der PMA-Stimulation ausgelöste Steigerung der Expression von *EGR-1* einen direkten Zusammenhang mit der Transkription herzustellen erfolgten auch hier rtPCR-Untersuchungen. Diese wurden analog zu 3.7 mit Actinomycin D in einer Konzentration von 5 µg/ml durchgeführt. Hier zeigte sich nach einer Stunde PMA-Stimulation ein fold change der *EGR-1*-Expression von 6,3. Eine Behandlung mit Actinomycin D, welche 30 Minuten vor PMA-Stimulation den Zellen zugesetzt wurde, bewirkte eine signifikante Reduktion des fold changes der Expression von *EGR-1* auf 1,1

($p=0,03$). Eine alleinige Actinomycin D-Stimulation über einen Zeitraum von 1h zeigte einen fold change von 0,28 (Abbildung 14).

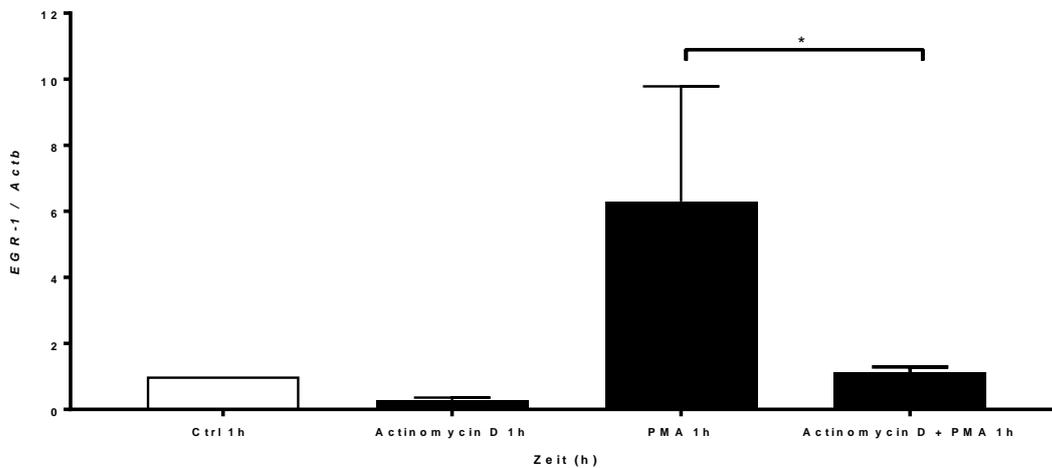


Abbildung 14: Vergleich der Expression von *EGR-1* nach Stimulation mit PMA nach Vorbehandlung mit Actinomycin D in H9c2-Zellen. Die Expression von *EGR-1* wurde nach Stimulation mit 100 nM PMA sowie 10 μ g Actinomycin D mittels quantitativer real-time PCR untersucht und auf die *ACTB*-Expression normiert. Kontrolle (Ctrl 1h) mit DMSO stimuliert und normiert auf den Wert 1; Student's t-Test PMA 1 h vs. Actinomycin D +PMA 1 h $p=0,03$; (*)= p -Wert < 0,05

3.9 Nachweis der Proteinexpression von GRK2 und EGR-1 mittels Western-Blots

Um auf Proteinebene einen Zusammenhang zwischen der Stimulation von H9c2-Zellen mit PMA und einer erhöhten Proteinexpression für EGR-1 bzw. GRK2 nachzuweisen wurden Western-Blots durchgeführt. Um sicherzustellen, dass es sich um eine homogene Proteinverteilung handelt wurden hier in allen Versuchen Kontrollen mit einem anti- β -Aktin-Antikörper mitgeführt.

3.9.1 Steigerung der Proteinexpression von EGR-1 nach Stimulation mit PMA

Die Zellen wurden wie unter 2.2.1.3 kultiviert und mit 100 nM PMA bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel DMSO bei den Negativkontrollen stimuliert. Wie in Abbildung 15 dargestellt zeigt sich eine Stunde nach Stimulation der Zellen mit PMA die Proteinexpression von EGR-1 erhöht. Der höchste Wert ist nach 2 Stunden Stimulation erreicht. Nach 3 Stunden ist bereits eine Abnahme der Expression zu verzeichnen. Die β -Aktin-Expression zeigte zu jedem Zeitpunkt ein homogenes Verteilungsmuster.

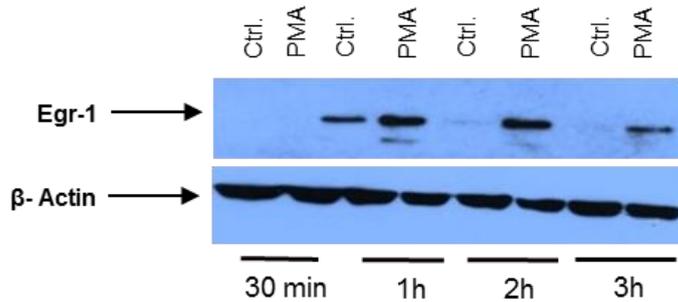


Abbildung 15: EGR-1-Proteinexpression in H9c2-Zellen nach Stimulation mit 100nM PMA zu den angegebenen Zeitpunkten im Western Blot, Kontrolle (Ctrl.) mit DMSO stimuliert

3.9.2 Steigerung der Proteinexpression von GRK2 nach Stimulation mit PMA

Analog zu 3.9.1 erfolgte die Messung der Proteinexpression von GRK2 nach Stimulation mit 100 nM PMA über verschiedene Zeitpunkte in H9c2-Zellen. Hierbei zeigte sich ein Maximum der GRK2-Proteinexpression nach einem Stimulationszeitraum von 2 Stunden, gefolgt von einer Abnahme der Expression nach 3 Stunden (vgl. Abbildung 16). Die β -Aktin-Expression zeigte zu jedem Zeitpunkt ein homogenes Verteilungsmuster.

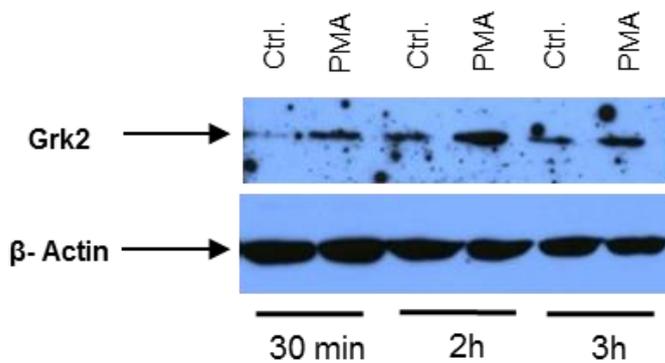


Abbildung 16: GRK2-Proteinexpression in H9c2-Zellen nach Stimulation mit 100 nM PMA zu den angegebenen Zeitpunkten im Western Blot; Kontrolle (Ctrl.) mit DMSO behandelt.

3.9.3 Steigerung der Expression von EGR-1 nach Stimulation mit Angiotensin II

Bei PMA handelt es sich um einen Diacylglycerol, welches wie unter 1.2.2 beschrieben, im Gq-Signalweg die Proteinkinase C aktiviert. Um nachzuweisen, dass auch Angiotensin 2 eine ähnliche Wirkung auf die EGR-1-Proteinexpression hat, erfolgten, analog zu dem PMA-Versuchen, Stimulationsversuche mit 100 nM Angiotensin II. Hier zeigte sich, wie in

Abbildung 17 abgebildet, ein Maximum der EGR-1-Proteinexpression nach einer Stunde. Diese schwächte im weiteren Verlauf nach 2 Stunden deutlich ab. Auch in diesen Experimenten zeigte sich einen homogene β -Aktin -Expression.

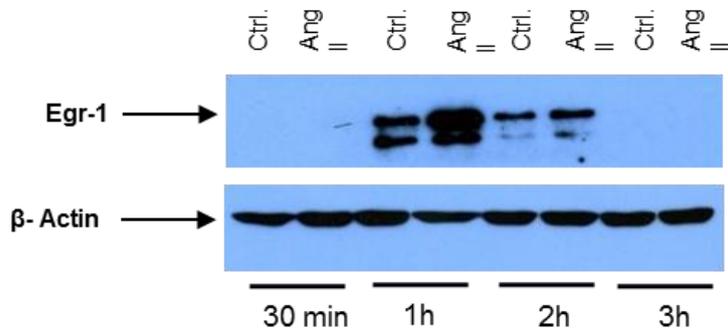


Abbildung 17: EGR-1-Proteinexpression in H9c2-Zellen nach Stimulation mit 100 nM Angiotensin II zu den angegebenen Zeitpunkten im Western Blot, Kontrolle (Ctrl.) mit DMSO behandelt.

3.9.4 Steigerung der Expression von GRK2 nach Stimulation mit Angiotensin II

Äquivalent zu 3.9.3 erfolgte die Messung der Proteinexpression von GRK2 nach Stimulation durch 100 nM Angiotensin in H9c2-Zellen. Hier zeigte sich ein Maximum in den untersuchten Zeitpunkten nach 2 Stunden Angiotensin II-Stimulation, gefolgt von einer Abnahme nach 3 Stunden (Abbildung 18). Die mitgeführten β -Aktin-Kontrollen zeigten hier eine gleichmäßige Proteinexpression.

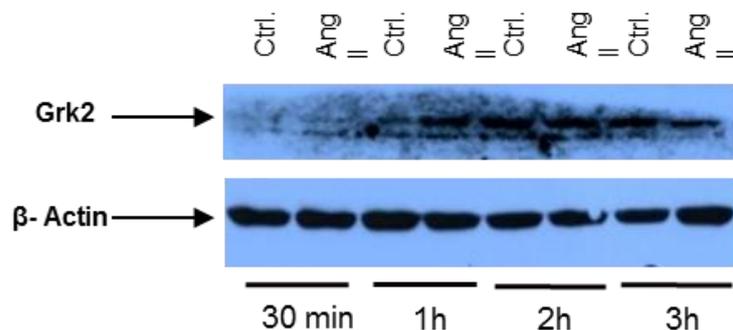


Abbildung 18: GRK2-Proteinexpression in H9c2-Zellen nach Stimulation mit 100 nM Angiotensin II (Ang II) zu den angegebenen Zeitpunkten im Western Blot, Kontrolle (Ctrl.) mit DMSO behandelt.

4. Diskussion

Die Pathophysiologie der Herzinsuffizienz ist komplex und bis heute nicht vollständig untersucht und verstanden. Dies ist jedoch aus klinischer Sicht, insbesondere im Hinblick auf mögliche medikamentöse Angriffspunkte, von großer Bedeutung.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf Untersuchungen des *GRK2*-Promotors, da dessen Regulation eine immense Bedeutung im kardiovaskulären System einnimmt. Ziel war es daher das Verständnis zu Regulationsmechanismen zu erweitern und den *GRK2*-Promotor näher zu analysieren.

Da die Regulation der *GRK2*-Expression über den Gs-Signalweg bereits bekannt und beschrieben war, sollte im Rahmen dieser Arbeit insbesondere die Beeinflussung des *GRK2*-Promotors durch den Gq-Signalweg überprüft werden. Um mögliche Regulationsmechanismen näher zu beschreiben wurde zunächst ein geeignetes Zellkulturmodell evaluiert und die Abhängigkeit der Stimulationsdauer auf die *GRK2*-Expression *in vitro* untersucht.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass eine Transfektion von H9c2-Zellen mit einem aktiven *GRK2*-Promotorkonstrukt zu einem signifikanten Anstieg der Promotoraktivität führt. Ein signifikanter Anstieg der Reporteraktivität im Luciferase-Assay konnte bereits nach 24 Stunden detektiert werden und erreichte sein Maximum nach 72 Stunden.

Hervorzuheben ist hierbei die Auswahl und Verwendung des *GRK2*-Promotorkonstruktes. Ramos-Ruiz et al. verwendeten zur genaueren funktionellen Analyse in ihren Versuchen an glatten Muskelzellen der embryonalen Rattenaorta (A10-Zellen) fünf Konstrukte mit unterschiedlicher Länge (Ramos-Ruiz et al., 2000). In den dort durchgeführten Luciferaseassays konnte gezeigt werden, dass das Plasmid -213 bis+50 die höchste Luciferase-Aktivität sowohl ohne als auch nach PMA-Stimulation besitzt. Zu einem signifikanten Anstieg der Luciferaseaktivität kam es jedoch erst nach einer Inkubation mit PMA über achtzehn Stunden (Ramos-Ruiz et al., 2000). Aufgrund dieser langen Inkubationsdauer diskutierten die Autoren die Möglichkeit, dass ein Transkriptionsfaktor regulativen Einfluss haben könnte.

PMA kann stellvertretend für Diacylglycerol die Proteinkinase C aktivieren und den Gq-Signalweg im Zellkulturmodell stimulieren. Hierbei handelt es sich um ein gängiges, in der wissenschaftlichen Forschung eingesetztes Verfahren zur Untersuchung der Regulation der Signaltransduktion (Parekh et al., 2000).

Das in dieser Arbeit verwendete Promotorkonstrukt stammt aus Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe. Hier wurden diese Erkenntnisse miteinbezogen und ein Konstrukt von -402 bis +72 relativ zum *GRK2*-Translationsstartpunkt gewählt. Dies beinhaltet zudem bis zu vier putative *EGR-1*-Bindungsstellen. Auf Grund des in Voruntersuchungen nachgewiesenen Polymorphismus zwischen Guanin und Adenosin an Stelle -43 relativ zum Translationsstartpunkt ergibt sich eine unterschiedliche Verteilung dieser *EGR-1*-Bindungsstellen. Drei davon wurden in Anwesenheit des G(-43)-Allels nachgewiesen, wohingegen bei Anwesenheit des A(-43) Allels lediglich eine Bindungsstelle nachgewiesen wurde. Wir verwendeten daher ein Promotorkonstrukt des G-Allels. Welcher Polymorphismus in der Arbeit von Ramos-Ruiz et al verwendet wurde ist in der Literatur nicht näher beschrieben.

Im Rahmen der Evaluation des geeigneten Zellkulturmodells zeigte eine Stimulation mit PMA als Induktor des Gq-Signalweges keine signifikante Steigerung der endogenen *GRK2*-Expression in glatten Muskelzellen der embryonalen Rattenaorta (A10-Zellen). Darüber hinaus folgte die *GRK2*-Expression, bezogen auf die Stimulationsdauer, keinem klaren Trend, sondern zeigte multiple Expressionsanstiege ohne Signifikanz zueinander. Verglichen mit den Ergebnissen von Ramos-Ruiz et al. erfolgte dort nur die Untersuchung der Stimulation nach 18h. Eine Messung über unterschiedliche Stimulationszeiträume wurde nicht durchgeführt. In unseren Versuchen zeigte sich ebenfalls nach 18 Stunden Inkubation ein erneuter Anstieg der endogenen *GRK2*-Expression. Dieser zeigt sich jedoch im Verhältnis zu dem Ergebnis nach 5 Stunden geringer und ebenfalls, bezogen auf die Kontrollgruppe, nicht signifikant.

Eine Stimulation von embryonalen Rattenkardiomyoblasten (H9c2-Zellen) mit PMA führte in dieser Arbeit zu einer signifikanten Steigerung der endogenen *GRK2*-Expression. Zudem stieg auch nach PMA-Stimulation die *EGR-1*-Expression signifikant an. Das Maximum der endogenen Expression zeigte sich bei der *GRK2*-Expression nach fünf Stunden Stimulation und bei der *EGR-1*-Expression bereits nach einer Stunde. Dies weist auf eine schnelle Hochregulation der *EGR-1*-Expression und den zeitlich nachgeschalteten Anstieg der *GRK2*-Expression nach PMA-Stimulation hin.

Wie in der Literatur beschrieben besitzt *EGR-1* als immediate-early-gene eine Schlüsselfunktion bei der myokardialen Entwicklung sowohl in Physiologie als auch in Pathophysiologie.

So konnten bereits Neyses et al. zeigen, dass *EGR-1* nach Stimulation mit Noradrenalin, Endothelin-1 und Angiotensin 2 in adulten Rattenkardiomyozyten vermehrt exprimiert wird (Neyes et al., 1993). Dies unterstreicht die Bedeutung von *EGR-1* im Rahmen der

Herzinsuffizienz, da es hier zu einer vermehrten sympathogen vermittelten humoralen Stressreaktion kommt.

Auch andere Arbeitsgruppen haben bereits die *EGR-1*-Expression in H9c2 Zellen untersucht. Agelli et al. konnten einen Anstieg der *EGR-1*-Expression nach Stimulation mittels H₂O₂ in H9c2 Zellen nachweisen (Aggeli et al., 2010). In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen wurde auch hier der Zeitpunkt der maximalen Expression von *EGR-1* früh, nach zwei Stunden Stimulationsdauer, detektiert.

Die Arbeitsgruppe von Eyries et al. beschäftigte sich mit der Regulation der Transkription des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE). Sie konnten unter anderem zeigen, dass sich durch die Behandlung mit PMA der Transkriptionsfaktor EGR-1 im Nukleoproteinkomplex menschlicher Endothelzellen (HUVEC) induzieren lässt (Eyries et al., 2002). Hierbei wurde äquivalent zu dieser Arbeit die Dosis von 100 nM zur Stimulation benutzt. Dies unterstützt die von Eyries et al. vermutete These, dass EGR-1 als Transkriptionsfaktor regulativ in den Signalweg von ACE eingreift und legt nahe, dass EGR-1 auch an der Regulation weiterer Signalwege beteiligt sein könnte.

Um die These zu verifizieren, dass es sich bei dem Anstieg der *GRK2*- und *EGR-1*-Expression durch PMA um einen transkriptionsvermittelten Effekt handelt, erfolgten Hemmstoffversuche unter Verwendung des Transkriptioninhibitors Actinomycin D.

Einer zeitgleichen Stimulation von H9c2-Zellen mit PMA und Actinomycin D folgte kein signifikanter Anstieg der *GRK2*- und *EGR-1*-Genexpression. Unsere Ergebnisse decken sich mit den Hemmstoffversuchen der Arbeitsgruppe Ramos-Ruiz et al. in A-10 Zellen. Hier wurden die Zellen mit Actinomycin D und PMA behandelt. Es zeigte sich, dass der stimulierende Effekt von PMA auf die *GRK2*-Expression hierdurch außer Kraft gesetzt wurde (Ramos-Ruiz et al., 2000). Actinomycin D interkaliert in die DNA durch Bindung an Guanin- und Cytosin-Nukleotide, auf diesem Wege kann die Transkription im Zellkulturmodell gehemmt werden. Der ausbleibende Anstieg der *GRK2*-Expression unter Inhibition lässt auf eine transkriptionsassoziierte Beeinflussung der *GRK2*-Expression nach Stimulation des Gq-Signalweges durch PMA schließen.

Um nachzuweisen, dass es sich bei dem Anstieg der Expression von *GRK2*- und *EGR-1*-mRNA um einen durch PMA vermittelten Vorgang handelt untersuchten wir den Einfluss des inaktiven PMA-Metaboliten 4 α -PMA. Nach Stimulation der H9c2-Zellen mit 4 α -PMA kam es zu keinem signifikanten Anstieg der *GRK2*- und *EGR-1*-Expression. Auch andere Arbeitsgruppen verwendeten zur Untersuchung von PMA-spezifischer Signaltransduktion das inaktive Struktur analogon 4 α -PMA. Batarseh et al. untersuchten die Promotoraktivität

des Translocator Protein (TSPO) in einer Nierenzelllinie durch Aktivierung der Proteinkinase C nach PMA-Stimulation. Nach Behandlung der Zellen mit 4 α -PMA blieb der zuvor detektierte Anstieg der Promotoraktivität aus. Dies wurde auch unter der Verwendung einer zehnfach höheren Konzentration von 4 α -PMA beobachtet (Batarseh et al., 2008). Dies spiegelt sich ebenfalls in den Ergebnissen von Malakooti et al. wider. Hier zeigte sich nach Behandlung einer interstinalen Epithelzelllinie mit 4 α -PMA kein Anstieg der NHE3-Expression im Vergleich zu der zuvor durchgeführten Stimulation mit den aktiven PKC-Aktivatoren PMA (Malakooti et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass 4 α -PMA als inaktives Analogon von PMA in der Lage ist, die PMA-vermittelte Signaltransduktion des Gq-Signalweges zu hemmen. Wir konnten nachweisen, dass es zum einen eine transkriptionsassoziierte Beeinflussung der *GRK2*-Expression nach PMA-Stimulation gibt. Zum anderen konnte eine PMA-Spezifität der Expressionsanstiege von sowohl *GRK2*- als auch *EGR-1*-mRNA gezeigt werden indem es nach 4 α -PMA-Behandlung zu keinem signifikanten Anstieg der *EGR-1*- oder *GRK2*-Expression kam.

Unsere Daten unterstützen daher die Hypothese, dass die gesteigerte *GRK2*-Expression nach PMA-Stimulation *EGR-1* vermittelt ist. Die Aktivierung der Gq-Signaltransduktion scheint somit in der Lage zu sein, eine Beeinflussung der Transkriptionsaktivität des *GRK2*-Promotors zu erreichen.

Nach Untersuchung der Beeinflussung der *EGR-1*- und *GRK2*-Expression auf Ebene der Transkription folgte weitergehend die Analyse der Translation.

In dieser Arbeit konnte durch Western-Blot-Experimente gezeigt werden, dass es nach Stimulation mit PMA und Angiotensin 2, dem eigentlichen Effektor am Gq-Rezeptor, zu einer vermehrten Proteinexpression von *EGR-1* und *GRK2* kommt. Interessanterweise zeigte sich hier parallel zu den mRNA-Expressionsanstiegen eine ähnliche zeitliche Dynamik im Anstieg der Proteinexpression. Das Maximum der *EGR-1*-Proteinexpression war bereits nach einer Stunde erreicht. Das Maximum der *GRK2*-Proteinexpression folgte nach zwei Stunden. Dies ist ein weiterer Hinweis für die Beteiligung von *EGR-1* an der *GRK2*-Expression. Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen der Arbeitsgruppe um Malakooti et al, die sich mit der Regulation des Na⁺/H⁺ Ausstauschers 3 (NHE3) in interstinalen Epithelzellen beschäftigt haben. Diese führten unter anderem Western Blot Analysen nach PMA-Stimulation durch, in denen das Maximum der *EGR-1*-Proteinexpression zwei Stunden vor Anstieg des NHE3-Proteinexpression detektiert wurde (Malakooti et al., 2006).

In der Folge stellt sich die Frage, welchen Einfluss die *EGR-1*-Expression, abseits der molekularen Grundlagen, auf pathophysiologische kardiale Ereignisse hat.

Bhindi et al. konnten 2012 zeigen, dass in einem myokardialen Ischämie/Reperfusion-Versuchsaufbau im Mausmodell die Inhibition von *EGR-1* durch spezifische DNAsymes zu einer Reduzierung der Infarktgröße führt (Bhindi et al., 2012). Hierbei handelt es sich um spezifische DNA-Sequenzen, welche durch eine katalytische Reaktion einzelne Gene spezifisch ausschalten können.

Darüber hinaus zeigt sich im Rahmen von Versuchen nach Remote ischemic preconditioning (RIPC) ein Abfall der *EGR-1*-Genexpression in Myokardzellen von Mäusen (Konstantinov et al., 2005). Bei RIPC handelt es sich um eine nicht-invasive Technik, bei der intermittierend kontrolliert eine Ischämie und Reperfusion ausgelöst wird und es hierdurch zu einer Gewebeprotektion kommt. Dieser protektive Effekt ist bisher in einer Vielzahl von klinischen Studien nachgewiesen worden (Thielmann et al., 2013). In *EGR-1* überexprimierten Zellen ist dieser kardioprotektive Effekt durch RIPC-Manöver nicht vorhanden (Singh et al., 2017). Daraus wurde 2017 durch Mudaliar et al. die Hypothese abgeleitet, dass durch das RIPC-Manöver eine verstärkte Freisetzung von reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) ausgelöst wird, welche die *EGR-1*-Expression abschwächt (Mudaliar et al., 2017).

Mit den Folgen einer Überexpression von Nab1, einem spezifischen endogenen *EGR-1*-Inhibitor, im Mausmodell beschäftigte sich die Arbeitsgruppe von Buitrago et al.. Eine vermehrte β -adrenerge Stimulation, sowie eine daraus resultierende Druckbelastung des Herzens führten in Nab1-überexprimierten Mäusen nicht zu einer verstärkten kardialen Hypertrophie. Nab1, auch *EGR-1*-Bindungs Protein genannt, inhibiert jedoch nicht das physiologische Wachstum unter kardialen Training (Buitrago et al., 2005).

Dies unterstreicht den Stellenwert von *EGR-1* als wichtiges Schlüsselgen in der Pathophysiologie der kardialen Maladaptation.

Da *EGR-1* jedoch in menschlichen Endothelzellen an einer Steuerung von mehr als 300 unterschiedlichen Genen aktiv beteiligt ist, stellt die Blockierung des gesamten Proteins keine selektive pharmakologische Therapiemöglichkeit dar. Neben den Zellzyklus regulierenden Proteinen interagiert *EGR-1* auch mit weiteren Wachstumsfaktoren und Cytokinen (Fu et al., 2003).

Eine Möglichkeit der selektiven pharmakologischen Intervention ist die Blockierung der Bindung von *EGR-1* an seine Zielgene. Als Regulator von GPCR und der damit

vermittelten kardialen Maladaptation im Rahmen einer Herzinsuffizienz, stellt *GRK2* ein Zielgen von höchstem Interesse dar.

4.1 GRK2 spielt als Regulator von GPCRs eine Schlüsselrolle in der Entstehung der Herzinsuffizienz

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren sind auf vielfältige Art und Weise an Regulationsmechanismen der Kardiomyozyten beteiligt. Welche Bedeutung die GPCR im Bereich der Therapie der kardiovaskulären Erkrankungen haben zeigt sich unter anderem daran, dass ca. ein Drittel der aktuell bestehenden Therapeutika auf deren Beeinflussung abzielt. Darüber hinaus bekamen Bob Lefkowitz und Brian Kobilka im Jahr 2012 den Nobelpreis für Chemie für ihre Erforschung der Signaltransduktion durch GPCR (Lin, 2013).

Wie bereits unter 1.2.1 dargestellt, besitzt *GRK2* als Mediator oder Effektor eine Schlüsselrolle in den pathologischen myokardialen Umbauprozessen im Rahmen einer Herzinsuffizienz. Dabei stellt *GRK2* einen möglichen Ansatzpunkt für pharmakologische Interventionen dar. Die Hemmung oder der knock-out von *GRK2* zeigte in unterschiedlichen Tiermodellen eine protektive Wirkung gegenüber kardialem Remodeling (Cannavo et al., 2018).

Durch den Einsatz von β -Blockern kommt es neben einem Ausgleich der myokardialen Kalziumhomöostase auch zu einer verminderten β -AR Desensibilisierung durch Abnahme der *GRK2*-Aktivität (Leineweber et al., 2005).

Neuere Forschungsentwicklungen zeigen nun eine Abkehr von der klassischen Agonist gegen Antagonist-Therapie hin zu einer zielgerichteten, individuellen Therapie.

So konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass durch einen Peptidinhibitor wie β -ARKct die kardiale Funktion durch Inhibierung der *GRK2* verbessert werden kann. Durch die molekulargenetische Zuhilfenahme von Adenovirusvektoren wird der Inhibitor in das Zytosol der Zielzelle gebracht und bindet an eine $G\beta\gamma$ -Untereinheit. Der *GRK2*-Einbau in die Doppellipidmembran und die daraus resultierende Aktivierung von *GRK2* wird verhindert. Im Rattenmodell mit chronischer Herzinsuffizienz zeigte sich 12 Wochen nach myokardialer Injektion neben einer Abnahme der *GRK2*-Expression und einer Aufhebung des negativen linksventrikulären Remodelings auch eine Verbesserung der Kontraktilität. Es zeigte sich überdies hinaus eine Normalisierung der Katecholamin- und Aldosteronkonzentrationen (Rengo et al., 2009).

Shang et al. konnten 2019 im Schweinmodell zeigen, dass eine intrakardiale Injektion von β -ARKct fünf Tage vor Induktion eines Kammerflimmerns und Beginn einer leitliniengerechten Reanimation zu einem verminderten myokardialen Gewebsuntergang führt. Neben einer reduzierten GRK2-Konzentration wurde sechs Stunden nach Wiederkehr des Spontankreislaufes ebenfalls eine bessere Ejektionsfraktion und niedrigere Konzentrationen von Troponin I, CK-MB und Laktat nachgewiesen (Shang et al., 2019). Dies konnte ebenfalls am Schweinmodell 6 Stunden nach kardiopulmonaler Bypassoperation nachgewiesen werden (Cong et al., 2020).

Eine Möglichkeit der GRK2-Hemmung, ohne eine virusvermittelte Gentherapie, besteht durch so genannte „small molecules“. Hierbei handelt es sich zum Beispiel um Gallein, einen Inhibitor des GRK2-G β -Komplexes. Studien in Mäusen mit bestehender Herzinsuffizienz zeigten neben einem verbesserten Überleben eine Verbesserung der kardialen Funktion und Abschwächung des kardiovaskulären Remodeling äquivalent zur Wirkung von β ARKct-Inhibitoren. Ebenfalls wurden hier eine Normalisierung der adrenalen Katecholaminspiegel beobachtet (Kamal et al., 2014).

Mit Paroxetin, einem bereits zugelassenen SSRI-Antidepressivum (Serotonin Reuptake Inhibitor) konnte ein weiteres Präparat identifiziert werden, das spezifisch GRK2 inhibiert. So profitierten Patienten, welche als Komorbidität neben einer Depression einen akuten Myokardinfarkt erlitten hatten, von einer Co-Therapie mit Paroxetin. Es kam zu einer Abnahme der GRK2-Konzentration in peripheren Lymphozyten, sowie zu einer verbesserten kardialen Funktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (Tian et al., 2016).

Eine Studie an Mäusen, die in Woche zwei bis sechs nach induziertem Myokardinfarkt mit Paroxetin behandelt wurden, zeigte eine deutliche Verbesserung der Ejektionsfraktion und eine Verminderung des linksventrikulären Durchmessers im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche mit Fluoxetin behandelt wurde. Jedoch zeigte sich auch, dass im klinischen Versuch zur nahezu vollständigen GRK2-Suppression sehr hohe Dosen Paroxetin eingesetzt werden müssten. Damit würden weitreichende neurologische Nebenwirkungen in Kauf genommen werden. Jedoch ist das Ansprechen von GRK2 auf Paroxetin ein wichtiger Schritt im Verständnis der Signaltransduktion und ein weiterer Schritt in der Entwicklung eines selektiven Inhibitors zur therapeutischen GRK2-Hemmung (Schumacher et al., 2015). Untersuchungen von Mayor et al. konnten des Weiteren GRK2 als einen wichtigen Baustein in der Entstehung von Übergewicht und Diabetes mellitus Typ II nachweisen (Mayor et al., 2018). Interessanterweise scheint EGR-1 ebenfalls ein Baustein für die Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ II darzustellen, vermittelt durch die Verstärkung der hepatischen Glukoneogenese (Shen et al., 2015). Somit sind beide

Proteine auch an der Entstehung von Risikofaktoren für die Entwicklung einer Herzinsuffizienz beteiligt, in der sie ebenfalls einen großen regulatorischen Einfluss besitzen. Dies zeigt noch einmal die enge Verzahnung beider Schlüsselgene.

Die Ergebnisse dieser Arbeit geben einen Hinweis auf eine Verbindung zwischen der Aktivierung des Gq-Signalweges und des β -adrenergen Signalweges. Der Transkriptionsfaktor EGR-1 könnte an der durch *in silico* Analysen detektierten Bindungsstelle am *GRK2*-Promotor regulativ eingreifen. Um diese Hypothese zu verifizieren müssten weitergehende Versuche durchgeführt werden. Eine Möglichkeit den Einfluss von EGR-1 auf die *GRK2*-Expression zu untersuchen könnte ein experimenteller Ansatz mit siRNA sein. Hierbei könnte der Einfluss der *EGR-1*-Defizienz auf die *GRK2*-Expression mit und ohne Stimulation durch PMA untersucht werden. Darüber hinaus müssten Versuchsreihen angelegt werden um diese Ergebnisse auch in menschlichen Kardiomyozyten bestätigen zu können.

Zur genaueren Charakterisierung der Bindung von EGR-1 an den *GRK2*-Promotor bieten sich weiterhin Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) an. Gekoppelt mit dem Vorhandensein eines EGR-1-Antikörpers könnten nun Supershift-Experimente eine Bindung bestätigen.

Sollte dies der Fall sein, könnte die Entwicklung einer selektiven Inhibition der EGR-1-Bindungsstelle am *GRK2*-Promotor eine vielversprechende pharmakologische Therapieoption darstellen. Es könnten so die Folgen der kardiovaskulären Maladaptation, welche durch *GRK2* ausgelöst werden, abgemildert werden ohne die physiologischen Regulationsmechanismen von EGR-1 zu verhindern.

Durch eine Genotypisierung von Patienten mit einer vorliegenden Herzinsuffizienz ist es zudem möglich festzustellen, welche Allelfrequenz im Bereich des *GRK2*-Promotors vorliegt und die Effizienz der selektiven EGR-1-Bindung an den *GRK2*-Promotor individuell abzuschätzen. Dies wäre ein weiterer Schritt hin zu einer hocheffektiven und nebenwirkungsarmen individualisierten Medizin.

5. Zusammenfassung

Die Herzinsuffizienz stellt mit ca. 26 Millionen Betroffenen weltweit eine der häufigsten Erkrankungen dar. Einen überwiegenden Teil der komplexen Steuerung von Herzmuskelzellen übernehmen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCR). Eine wichtige Funktion in der Regulation der GPCRs und der kardialen Maladaptation übernimmt die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase 2 (GRK2). Die Regulation der GRK2 steht im Fokus dieser Arbeit. In der Literatur ist beschrieben, dass auch der Transkriptionsfaktor EGR-1 (Early growth response 1) in der Entstehung von kardialer Maladaptation von Bedeutung ist. In silico Voruntersuchungen unserer Arbeitsgruppe wiesen drei putative EGR-1-Bindungsstellen am *GRK2*-Promotor nach. Diese Fakten stützen unsere These, dass EGR-1 regulativ die *GRK2*-Promotoraktivität beeinflussen könnte. Wir zeigten, dass die Transfektion von embryonalen Rattenkardiomyoblasten (H9c2-Zelllinie) mit einem aktiven *GRK2*-Promotorkonstrukt zu einem signifikanten Anstieg der Promotoraktivität führt. Weiterhin führten wir Stimulationsversuche mit dem Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA), einem Induktor des Gq-Signalweges, durch. In H9c2-Zellen kam es nach Stimulation zu einem signifikanten Anstieg der *GRK2*-mRNA-Expression mit einem Maximum nach fünf Stunden. Zudem stieg die *EGR-1*-mRNA-Expression signifikant an. Hier war das Maximum nach einer Stunde erreicht. Wir wiesen nach, dass die Expressionsanstiege für PMA spezifisch sind. Stimulationsversuche mit dem inaktiven Metaboliten 4 α -PMA führten zu keinem Anstieg der *GRK2*- und *EGR-1*-Expression. Wir belegten weiterhin, dass der Anstieg der *GRK2*-Expression nach PMA-Stimulation transkriptionsassoziiert ist. In Hemmstoffversuchen mit dem Transkriptionsinhibitor Actinomycin D kam es zu keiner signifikanten Änderung der *GRK2*- und *EGR-1*-Expression nach Stimulation mit PMA. In Western Blot Experimenten wiederholte sich das zeitliche Muster der Expressionsanstiege. Bereits eine Stunde nach PMA und Angiotensin 2-Stimulation zeigte sich das Maximum der EGR-1-Proteinexpression, gefolgt vom Maximum der GRK2 Expression nach zwei Stunden. Zusammenfassend unterstützen unsere Daten die Hypothese, dass die gesteigerte *GRK2*-Expression nach PMA-Stimulation EGR-1 vermittelt ist. Die Induktion der Gq-Signaltransduktion scheint somit in der Lage zu sein, eine Beeinflussung der Transkriptionsaktivität des *GRK2*-Promotors zu erreichen. Somit stellt die Inhibition der EGR-1-Bindung an den *GRK2*-Promotor eine vielversprechende selektive pharmakologische Therapieoption dar. Auf diese Weise könnte die adrenerge Desensibilisierung als Folge der kardiovaskulären Maladaptation im Rahmen der Herzinsuffizienz abgeschwächt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Aggeli, I. K., Beis, I., Gaitanaki, C. (2010): ERKs and JNKs mediate hydrogen peroxide-induced Egr-1 expression and nuclear accumulation in H9c2 cells. *Physiol Res* 59, 443-454.
2. Barbolina, M. V., Adley, B. P., Ariztia, E. V., Liu, Y., Stack, M. S. (2007): Microenvironmental regulation of membrane type 1 matrix metalloproteinase activity in ovarian carcinoma cells via collagen-induced EGR1 expression. *J Biol Chem* 282, 4924-4931.
3. Batarseh, A., Giatzakis, C., Papadopoulos, V. (2008): Phorbol-12-myristate 13-acetate acting through protein kinase Cepsilon induces translocator protein (18-kDa) TSP0 gene expression. *Biochemistry* 47, 12886-12899.
4. Berridge, M. J., Irvine, R. F. (1984): Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312, 315-321.
5. Bhindi, R., Fahmy, R. G., McMahon, A. C., Khachigian, L. M., Lowe, H. C. (2012): Intracoronary delivery of DNazymes targeting human EGR-1 reduces infarct size following myocardial ischaemia reperfusion. *J Pathol* 227, 157-164.
6. Billet, S., Aguilar, F., Baudry, C., Clauser, E. (2008): Role of angiotensin II AT1 receptor activation in cardiovascular diseases. *Kidney Int* 74, 1379-1384.
7. Buitrago, M., Lorenz, K., Maass, A. H., Oberdorf-Maass, S., Keller, U., Schmitteckert, E. M., Ivashchenko, Y., Lohse, M. J., Engelhardt, S. (2005): The transcriptional repressor Nab1 is a specific regulator of pathological cardiac hypertrophy. *Nat Med* 11, 837-844.
8. Bundesärztekammer, Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV), Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF). (2019). Nationale Versorgungsleitlinie chronische Herzinsuffizienz. (abgerufen
9. Cannavo, A., Komici, K., Bencivenga, L., D'Amico M, L., Gambino, G., Liccardo, D., Ferrara, N., Rengo, G. (2018): GRK2 as a therapeutic target for heart failure. *Expert Opin Ther Targets* 22, 75-83.
10. Cannavo, A., Rengo, G., Liccardo, D., Pagano, G., Zincarelli, C., De Angelis, M. C., Puglia, R., Di Pietro, E., Rabinowitz, J. E., Barone, M. V., Cirillo, P., Trimarco, B., Palmer, T. M., Ferrara, N., Koch, W. J., Leosco, D., Rapacciuolo, A. (2013): β 1-adrenergic receptor and sphingosine-1-phosphate receptor 1 (S1PR1) reciprocal downregulation influences cardiac hypertrophic response and progression to heart failure: protective role of S1PR1 cardiac gene therapy. *Circulation* 128, 1612-1622.

11. Christ, M., Störk, S., Dörr, M., Heppner, H. J., Müller, C., Wachter, R., Riemer, U. (2016): Heart failure epidemiology 2000-2013: insights from the German Federal Health Monitoring System. *Eur J Heart Fail* 18, 1009-1018.
12. Ciccarelli, M., Chuprun, J. K., Rengo, G., Gao, E., Wei, Z., Peroutka, R. J., Gold, J. I., Gumpert, A., Chen, M., Otis, N. J., Dorn, G. W., 2nd, Trimarco, B., Iaccarino, G., Koch, W. J. (2011): G protein-coupled receptor kinase 2 activity impairs cardiac glucose uptake and promotes insulin resistance after myocardial ischemia. *Circulation* 123, 1953-1962.
13. Cong, M., Fan, Y., Zhu, F., Ji, X., Sun, L., Yang, M., Li, N., Li, Q., Tan, Q. (2020): Adenoviral β ARKct Cardiac Gene Therapy Ameliorates Cardiac Function Following Cardiopulmonary Bypass in a Swine Model. *Shock*
14. Danowski, N. (2012). *Untersuchungen zu den Genen GRK2 und GRK5 in Zusammenhang mit der Expression kardialer mikroRNAs und deren Bedeutung bei Herzinsuffizienz*. (Dissertation, LMU München). Retrieved from <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:bvb:19-150113>
15. Dickinson, M. G., Kowalski, P. S., Bartelds, B., Borgdorff, M. A., van der Feen, D., Sietsma, H., Molema, G., Kamps, J. A., Berger, R. M. (2014): A critical role for Egr-1 during vascular remodelling in pulmonary arterial hypertension. *Cardiovasc Res* 103, 573-584.
16. Eyries, M., Agrapart, M., Alonso, A., Soubrier, F. (2002): Phorbol ester induction of angiotensin-converting enzyme transcription is mediated by Egr-1 and AP-1 in human endothelial cells via ERK1/2 pathway. *Circ Res* 91, 899-906.
17. Fahmy, R. G., Dass, C. R., Sun, L. Q., Chesterman, C. N., Khachigian, L. M. (2003): Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth. *Nat Med* 9, 1026-1032.
18. Ferguson, S. S. G. (2001): Evolving Concepts in G Protein-Coupled Receptor Endocytosis: The Role in Receptor Desensitization and Signaling. *Pharmacol Rev* 53, 1-24.
19. Fu, M., Zhu, X., Zhang, J., Liang, J., Lin, Y., Zhao, L., Ehrenguber, M. U., Chen, Y. E. (2003): Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. *Gene* 315, 33-41.
20. Giannuzzi, P., Temporelli, P. L., Bosimini, E., Gentile, F., Lucci, D., Maggioni, A. P., Tavazzi, L., Badano, L., Stoian, I., Piazza, R., Heyman, I., Levantesi, G., Cervesato, E., Geraci, E., Nicolosi, G. L. (2001): Heterogeneity of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction: results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardico-3 Echo Substudy. *Am Heart J* 141, 131-138.

21. He, J., Ogden, L. G., Bazzano, L. A., Vupputuri, S., Loria, C., Whelton, P. K. (2001): Risk factors for congestive heart failure in US men and women: NHANES I epidemiologic follow-up study. *Arch Intern Med* 161, 996-1002.
22. Holstiege J, A. M., Steffen A, Bätzing J. (2018): Prävalenz der Herzinsuffizienz – bundesweite Trends, regionale Variationen und häufige Komorbiditäten. Zentralinstitut für die kassenärztliche Versorgung in Deutschland. Versorgungsatlas-Bericht Nr. 18/0
23. Huang, Z. M., Gao, E., Fonseca, F. V., Hayashi, H., Shang, X., Hoffman, N. E., Chuprun, J. K., Tian, X., Tilley, D. G., Madesh, M., Lefer, D. J., Stamler, J. S., Koch, W. J. (2013): Convergence of G protein-coupled receptor and S-nitrosylation signaling determines the outcome to cardiac ischemic injury. *Sci Signal* 6, ra95.
24. Kamal, F. A., Mickelsen, D. M., Wegman, K. M., Travers, J. G., Moalem, J., Hammes, S. R., Smrcka, A. V., Blaxall, B. C. (2014): Simultaneous adrenal and cardiac g-protein-coupled receptor-g $\beta\gamma$ inhibition halts heart failure progression. *J Am Coll Cardiol* 63, 2549-2557.
25. Khachigian, L. M. (2006): Early growth response-1 in cardiovascular pathobiology. *Circ Res* 98, 186-191.
26. Klenke, S., Renckhoff, K., Engler, A., Peters, J., Frey, U. H. (2016): Easy-to-use strategy for reference gene selection in quantitative real-time PCR experiments. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 389, 1353-1366.
27. Konstantinov, I. E., Arab, S., Li, J., Coles, J. G., Boscarino, C., Mori, A., Cukerman, E., Dawood, F., Cheung, M. M., Shimizu, M., Liu, P. P., Redington, A. N. (2005): The remote ischemic preconditioning stimulus modifies gene expression in mouse myocardium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 130, 1326-1332.
28. Krasel, C., Dammeier, S., Winstel, R., Brockmann, J., Mischak, H., Lohse, M. J. (2001): Phosphorylation of GRK2 by protein kinase C abolishes its inhibition by calmodulin. *J Biol Chem* 276, 1911-1915.
29. Leineweber, K., Rohe, P., Beilfuss, A., Wolf, C., Sporkmann, H., Bruck, H., Jakob, H. G., Heusch, G., Philipp, T., Brodde, O. E. (2005): G-protein-coupled receptor kinase activity in human heart failure: effects of beta-adrenoceptor blockade. *Cardiovasc Res* 66, 512-519.
30. Lin, H. H. (2013): G-protein-coupled receptors and their (Bio) chemical significance win 2012 Nobel Prize in Chemistry. *Biomed J* 36, 118-124.

31. Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
32. Lympopoulos, A., Rengo, G., Gao, E., Ebert, S. N., Dorn, G. W., 2nd, Koch, W. J. (2010): Reduction of sympathetic activity via adrenal-targeted GRK2 gene deletion attenuates heart failure progression and improves cardiac function after myocardial infarction. *J Biol Chem* 285, 16378-16386.
33. Lympopoulos, A., Rengo, G., Koch, W. J. (2013): Adrenergic nervous system in heart failure: pathophysiology and therapy. *Circ Res* 113, 739-753.
34. Malakooti, J., Sandoval, R., Amin, M. R., Clark, J., Dudeja, P. K., Ramaswamy, K. (2006): Transcriptional stimulation of the human NHE3 promoter activity by PMA: PKC independence and involvement of the transcription factor EGR-1. *Biochem J* 396, 327-336.
35. Malhotra, R., D'Souza, K. M., Staron, M. L., Birukov, K. G., Bodi, I., Akhter, S. A. (2010): G α (q)-mediated activation of GRK2 by mechanical stretch in cardiac myocytes: the role of protein kinase C. *J Biol Chem* 285, 13748-13760.
36. Mayor, F., Jr., Cruces-Sande, M., Arcones, A. C., Vila-Bedmar, R., Briones, A. M., Salices, M., Murga, C. (2018): G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as an integrative signalling node in the regulation of cardiovascular function and metabolic homeostasis. *Cell Signal* 41, 25-32.
37. Means, C. K., Brown, J. H. (2009): Sphingosine-1-phosphate receptor signalling in the heart. *Cardiovasc Res* 82, 193-200.
38. Mudaliar, H., Rayner, B., Billah, M., Kapoor, N., Lay, W., Dona, A., Bhindi, R. (2017): Remote ischemic preconditioning attenuates EGR-1 expression following myocardial ischemia reperfusion injury through activation of the JAK-STAT pathway. *Int J Cardiol* 228, 729-741.
39. Neyses, L., Nouskas, J., Luyken, J., Fronhoffs, S., Oberdorf, S., Pfeifer, U., Williams, R. S., Sukhatme, V. P., Vetter, H. (1993): Induction of immediate-early genes by angiotensin II and endothelin-1 in adult rat cardiomyocytes. *J Hypertens* 11, 927-934.
40. Oldham, W. M., Hamm, H. E. (2008): Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 60-71.
41. Oyama, N., Urasawa, K., Kaneta, S., Sakai, H., Saito, T., Takagi, C., Yoshida, I., Kitabatake, A., Tsutsui, H. (2006): Angiotensin converting enzyme inhibitors attenuated the expression of G-protein coupled receptor kinases in heart failure patients. *Circ J* 70, 362-363.

42. Parekh, D. B., Ziegler, W., Parker, P. J. (2000): Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 19, 496-503.
43. Penela, P., Ribas, C., Sánchez-Madrid, F., Mayor, F., Jr. (2019): G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a multifunctional signaling hub. *Cell Mol Life Sci* 76, 4423-4446.
44. Peregrin, S., Jurado-Pueyo, M., Campos, P. M., Sanz-Moreno, V., Ruiz-Gomez, A., Crespo, P., Mayor, F., Jr., Murga, C. (2006): Phosphorylation of p38 by GRK2 at the docking groove unveils a novel mechanism for inactivating p38MAPK. *Curr Biol* 16, 2042-2047.
45. Pflieger, J., Gresham, K., Koch, W. J. (2019): G protein-coupled receptor kinases as therapeutic targets in the heart. *Nat Rev Cardiol* 16, 612-622.
46. Ponikowski, P., Anker, S. D., AlHabib, K. F., Cowie, M. R., Force, T. L., Hu, S., Jaarsma, T., Krum, H., Rastogi, V., Rohde, L. E., Samal, U. C., Shimokawa, H., Budi Siswanto, B., Sliwa, K., Filippatos, G. (2014): Heart failure: preventing disease and death worldwide. *ESC Heart Fail* 1, 4-25.
47. Ponikowski, P., Voors, A. A., Anker, S. D., Bueno, H., Cleland, J. G. F., Coats, A. J. S., Falk, V., González-Juanatey, J. R., Harjola, V. P., Jankowska, E. A., Jessup, M., Linde, C., Nihoyannopoulos, P., Parissis, J. T., Pieske, B., Riley, J. P., Rosano, G. M. C., Ruilope, L. M., Ruschitzka, F., Rutten, F. H., van der Meer, P. (2016): 2016 ESC Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Acute and Chronic Heart Failure. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 69, 1167.
48. Port, J. D. e. a. (2001): Altered beta-adrenergic receptor gene regulation and signaling in chronic heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 33, 887-905.
49. Ramos-Ruiz, R., Penela, P., Penn, R. B., Mayor, F., Jr. (2000): Analysis of the human G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) gene promoter: regulation by signal transduction systems in aortic smooth muscle cells. *Circulation* 101, 2083-2089.
50. Rengo, G., Lympopoulos, A., Zincarelli, C., Donnicuo, M., Soltys, S., Rabinowitz, J. E., Koch, W. J. (2009): Myocardial adeno-associated virus serotype 6-betaARKct gene therapy improves cardiac function and normalizes the neurohormonal axis in chronic heart failure. *Circulation* 119, 89-98.
51. Rengo, G., Pagano, G., Filardi, P. P., Femminella, G. D., Parisi, V., Cannavo, A., Liccardo, D., Komici, K., Gambino, G., D'Amico, M. L., de Lucia, C., Paolillo, S., Trimarco, B., Vitale, D. F., Ferrara, N., Koch, W. J., Leosco, D. (2016): Prognostic Value of Lymphocyte G Protein-Coupled Receptor Kinase-2 Protein Levels in Patients With Heart Failure. *Circ Res* 118, 1116-1124.

52. Robert-Koch-Institut. (Abrufdatum: 07.01.2021). Gesundheit in Deutschland, Abb. 2.1.2 Die zehn häufigsten Todesursachen 2013 (Primärquelle: Statistisches Bundesamt, Todesursachenstatistik). Berlin. In www.gbe-bund.de (Stichwortsuche: Todesursachen → Dokumentart Grafiken). (abgerufen
53. Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G., Kobilka, B. K. (2009): The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature* 459, 356-363.
54. Saadane, N., Alpert, L., Chalifour, L. E. (2000): Altered molecular response to adrenoreceptor-induced cardiac hypertrophy in Egr-1-deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278, H796-805.
55. Santulli, G., Campanile, A., Spinelli, L., Assante di Panzillo, E., Ciccarelli, M., Trimarco, B., Iaccharino, G. (2011): G protein-coupled receptor kinase 2 in patients with acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 107, 1125-1130.
56. Sato, P. Y., Chuprun, J. K., Schwartz, M., Koch, W. J. (2015): The evolving impact of G protein-coupled receptor kinases in cardiac health and disease. *Physiol Rev* 95, 377-404.
57. Schumacher, S. M., Gao, E., Zhu, W., Chen, X., Chuprun, J. K., Feldman, A. M., Tesmer, J. J., Koch, W. J. (2015): Paroxetine-mediated GRK2 inhibition reverses cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Sci Transl Med* 7, 277ra231.
58. Shang, D., Zhu, F., Tan, Q., Hu, B., Liu, D., Cong, M., Song, J., Li, T., Ji, X. (2019): Adenoviral β ARKct Cardiac Gene Transfer Ameliorates Postresuscitation Myocardial Injury in a Porcine Model of Cardiac Arrest. *Shock* 52, 631-638.
59. Shen, N., Jiang, S., Lu, J. M., Yu, X., Lai, S. S., Zhang, J. Z., Zhang, J. L., Tao, W. W., Wang, X. X., Xu, N., Xue, B., Li, C. J. (2015): The constitutive activation of Egr-1/C/EBP α mediates the development of type 2 diabetes mellitus by enhancing hepatic gluconeogenesis. *Am J Pathol* 185, 513-523.
60. Singh, L., Randhawa, P. K., Singh, N., Jaggi, A. S. (2017): Redox signaling in remote ischemic preconditioning-induced cardioprotection: Evidences and mechanisms. *Eur J Pharmacol* 809, 151-155.
61. Siryk-Bathgate, A., Dabul, S., Lympieropoulos, A. (2013): Current and future G protein-coupled receptor signaling targets for heart failure therapy. *Drug Des Devel Ther* 7, 1209-1222.
62. Slavíková, J., Kuncová, J., Topolcan, O. (2007): Plasma catecholamines and ischemic heart disease. *Clin Cardiol* 30, 326-330.

63. Sorriento, D., Gambardella, J., Fiordelisi, A., Iaccarino, G., Illario, M. (2019): GRKs and β -Arrestins: "Gatekeepers" of Mitochondrial Function in the Failing Heart. *Front Pharmacol* 10, 64.
64. Sun, N., Kim, K. M. (2021): Mechanistic diversity involved in the desensitization of G protein-coupled receptors. *Arch Pharm Res* 44, 342-353.
65. Thielmann, M., Kottenberg, E., Kleinbongard, P., Wendt, D., Gedik, N., Pasa, S., Price, V., Tsagakis, K., Neuhäuser, M., Peters, J., Jakob, H., Heusch, G. (2013): Cardioprotective and prognostic effects of remote ischaemic preconditioning in patients undergoing coronary artery bypass surgery: a single-centre randomised, double-blind, controlled trial. *Lancet* 382, 597-604.
66. Tian, X., Wang, Q., Guo, R., Xu, L., Chen, Q. M., Hou, Y. (2016): Effects of paroxetine-mediated inhibition of GRK2 expression on depression and cardiovascular function in patients with myocardial infarction. *Neuropsychiatr Dis Treat* 12, 2333-2341.
67. Ungerer, M., Bohm, M., Elce, J. S., Erdmann, E., Lohse, M. J. (1993): Altered expression of beta-adrenergic receptor kinase and beta 1-adrenergic receptors in the failing human heart. *Circulation* 87, 454-463.
68. Wang, J., Gareri, C., Rockman, H. A. (2018): G-Protein-Coupled Receptors in Heart Disease. *Circ Res* 123, 716-735.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Hospitalisierungen auf Grund einer Herzinsuffizienz	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signaltransduktion.....	11
Abbildung 3: Die pathologischen Auswirkungen von GRK2 und GRK 5 auf die Zellfunktion von Kardiomyozyten.	16
Abbildung 4: Schematische Darstellung der EGR-1 Wirkung auf Endothelzellen (EC) und glatte Muskelzellen (SMC).	17
Abbildung 5: Agarosegel zur Kontrolle der Plasmidreinheit.	37
Abbildung 6: Nukleotidsequenz und Charakterisierung der 5'-flanking Region des menschlichen <i>GRK2</i> -Gens.....	45
Abbildung 7: Einfluss einer transienten Transfektion mit pGL4.10_ <i>GRK2</i> auf die <i>GRK2</i> -Promotoraktivität in H9c2-Zellen.	46
Abbildung 8: Einfluss von PMA auf die endogene Expression von GRK 2 in A10- Zellen	47
Abbildung 9: Einfluss von PMA auf die endogene Expression von GRK 2 in H9c2-Zellen.	48
Abbildung 10: Einfluss von PMA auf die endogene Expression von <i>EGR-1</i> in H9c2-Zellen.	49
Abbildung 11: Vergleich der Expression von <i>GRK2</i> nach Stimulation mit PMA und 4 α -PMA in H9c2-Zellen.	50
Abbildung 12: Vergleich der Expression von <i>EGR-1</i> nach Stimulation mit PMA und 4 α -PMA in H9c2-Zellen.....	51
Abbildung 13: Vergleich der Expression von <i>GRK2</i> nach Stimulation mit PMA nach Vorbehandlung mit Actinomycin D in H9c2-Zellen.	52
Abbildung 14: Vergleich der Expression von <i>EGR-1</i> nach Stimulation mit PMA nach Vorbehandlung mit Actinomycin D in H9c2-Zellen.	53
Abbildung 15: EGR-1-Proteinexpression in H9c2-Zellen nach Stimulation mit 100nM PMA	54
Abbildung 16: GRK2-Proteinexpression in H9c2-Zellen nach Stimulation mit 100 nM PMA.....	54
Abbildung 17: EGR-1-Proteinexpression in H9c2-Zellen nach Stimulation mit 100 nM Angiotensin II	55
Abbildung 18: GRK2-Proteinexpression in H9c2-Zellen nach Stimulation mit 100 nM Angiotensin II (Ang II)	55

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte	21
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien	22
Tabelle 3: Verwendete Chemikalien, Pharmazeutika	22
Tabelle 4: Verwendete Zelllinien	25
Tabelle 5: : Verwendete Bakterienstämme.....	25
Tabelle 6: Verwendete Plasmide.....	25
Tabelle 7: Verwendete Primer für die reverse Transkription.....	25
Tabelle 8: Verwendete Primer für die quantitative rtPCR von <i>GRK2</i>	25
Tabelle 9: Verwendete Primer für die quantitative rtPCR von <i>EGR-1</i>	26
Tabelle 10: Verwendete Primer für die quantitative rtPCR von Actin beta	26
Tabelle 11: Verwendete Antikörper für Western Blots	26
Tabelle 12: Verwendete Kits	26
Tabelle 13: Programm der reversen Transkription im Thermocycler	32
Tabelle 14: qRT-PCR Programm <i>ACTB</i> - und <i>GRK2</i> - Genexpression	33
Tabelle 15: qRT-PCR Programm <i>EGR-1</i> - Genexpression	33

9. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	zu mRNA komplementäre DNA (<i>complementary DNA</i>)
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag (day)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	desoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
et al.	und andere (<i>et alteri</i>)
EF	Ejektionsfraktion
EtOH	Ethanol
FKS	fötales Kälberserum
G	Guanin
g (k,m,µ,n,p)	Gramm (kilo, milli, mikro, nano, piko)
h	Stunde (hour)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
HZV	Herzzeitvolumen
IU	Internationale Einheiten (international units)
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
l (m, µ)	Liter (milli, mikro)
Lsg.	Lösung
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
m (k,m,µ,n,p)	Meter (kilo, milli, mikro, nano, piko)
M (m,µ,n,p)	Molar (milli, mikro, nano, piko) = mol / l

min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Versuche
NaCl	Natriumchlorid
PAGE	Polyacrylamide Gelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration [H ⁺]
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
qRT-PCR	quantitative Reverse Transkriptase-PCR
RLU	<i>relative light units</i> (Relative Lichteinheiten)
RNA	Ribonukleinsäure (<i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Reverse Transkriptase
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamide Gelelektrophorese
sec	Sekunde(n)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (<i>Standard error of mean</i>)
t	Zeitpunkt (<i>time</i>)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBS (T)	<i>Tris-buffered saline</i> (Tris-gepufferte Salzlösung (+Tween))
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylen-(20)sorbitolmonolaurat
U	<i>unit</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
V	Volt
VE-Wasser	Demineralisiertes Wasser
W	Watt
x	fach
x g	Vielfaches der Gravitation, Erdbeschleunigung
gem.	Gemäß
DH5α™	kompetenten <i>Escherichia coli</i> (Library Efficiency DH5α™, Life Technologies)
E.coli	<i>Escherichia coli</i>

10. Danksagung

„Per aspera ad astra“ , Seneca

Auf diesem Wege möchte ich mich bei einigen Personen bedanken ohne die das Erstellen der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Mein größter Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Frey. Nicht nur für die Bereitstellung des Themas und der immer fortwährenden Betreuung auch in schwierigen Zeiten, sondern auch für die gemeinsamen konstruktiven Diskussionen und die Möglichkeit beim Aufbau des molekulargenetischen Labors der Klinik für Anästhesiologie mitwirken zu dürfen.

Ich danke Frau Dr. Andrea Engler für ihre sehr gute Betreuung während der experimentellen Phase und ihr stets offenes Ohr. Selbiges gilt für Frau Ursula Brecklinghaus und Frau Bärbel Hermann für ihre fortwährend freundliche und mannigfaltige Unterstützung. Des Weiteren danke ich dem gesamten Team des gynäkologischen Forschungslabors unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Sabine Kasimir-Bauer für die Bereitstellung von Laborgeräten und Ressourcen.

Ein weiterer Dank gilt der Else-Kröner-Fresenius-Stiftung und Frau Prof. Dr. Ursula Rauen und dem ELAN-Promotionskolleg.

Ich danke meiner Frau Eva-Maria für ihre nie endende Liebe, Unterstützung und Motivation. Dafür, dass sie stets an meiner Seite ist und mir die benötigte Kraft gibt. Ich danke auch unseren gemeinsamen Töchtern Sophie und Mira, die es schaffen durch ihre Freude, ihre Unbeschwertheit und ihre Liebe jeden Tag in etwas Besonderes zu verwandeln. Ebenso danke ich meinen Schwiegereltern Angelika und Johann und meiner gesamten Familie, sowie unseren Freunden.

Schließlich möchte ich mich bei meiner Mutter bedanken, welche immer an mich glaubt und mich fortwährend unterstützt. Ohne ihre Unterstützung und ihre Ratschläge wäre mein bisheriger Lebensverlauf in dieser Form nicht möglich gewesen.

Danke.

11. Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

