

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

**Die Plasmamembran-Kalzium-ATPase im Myokard:
Untersuchungen zu Wachstumssteuerung und subzellulärer
Lokalisation unter Verwendung transgener Ratten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Tobias Rother
aus Kempten (Allgäu)

Würzburg, Oktober 2001

Referent: Prof. Dr. med. Ludwig Neyses

Korreferent: Prof. Dr. med. Karl-Heinz Graefe

Dekan: Prof. Dr. med. V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2002

Der Promovend ist Arzt.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. EINFÜHRUNG	1
1.2. ROLLE DES KALZIUMS IM MYOKARD	2
1.3. DIE PLASMAMEMBRAN- Ca^{2+} -ATPASE (PMCA)	3
1.3.1. <i>Allgemeine Eigenschaften</i>	3
1.3.2. <i>Struktur und Topographie</i>	5
1.3.3. <i>Lokalisation</i>	7
1.3.4. <i>PMCA-Isoformen und Splicing-Varianten</i>	7
1.3.5. <i>Bisher bekannte Funktionen der PMCA</i>	10
1.3.5.1. Kalziumhomöostase	10
1.3.5.2. Wachstum und Differenzierung	10
1.3.6. <i>PMCA-transgene Ratten</i>	11
1.4. MYOKARDHYPERTROPHIE	13
1.4.1. <i>Definition</i>	13
1.4.2. <i>Auslösende Mechanismen</i>	13
1.4.3. <i>Signaltransduktion und Genexpression</i>	14
1.4.4. <i>Klinische Bedeutung</i>	15
1.5. CAVEOLAE	16
1.5.1. <i>Morphologie und Definition</i>	16
1.5.2. <i>Molekulare Zusammensetzung von Caveolae</i>	16
1.5.2.1. Caveolin	16
1.5.2.2. Membraneigenschaften und Lipide	17
1.5.2.3. Caveoläre und Caveolae-assoziierte Proteine	18
1.5.3. <i>Bisher bekannte Funktionen von Caveolae</i>	19
2. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
3. METHODEN	22
3.1 ZELLKULTUR	22
3.1.1 <i>Präparation von Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen</i>	22
3.1.2 <i>Kultur der Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen</i>	23

3.2. STIMULIERTES WACHSTUM	23
3.2.1. <i>Bestimmung der Zunahme des Gesamtproteins als Maß für das Zellwachstum</i>	23
3.2.2. <i>Bestimmung des Einbaus von ³H-Leuzin als Maß für Proteinsynthese</i>	24
3.3. IMMUNFLUORESCENZ	26
3.3.1. <i>Dreifachimmunfluoreszenz mit Färbung von Troponin, Aktin und Kernen</i>	26
3.3.2. <i>Doppelimmunfluoreszenz mit Färbung von Caveolin-3 und PMCA</i>	27
3.4. PROTEIN	28
3.4.1. <i>Präparation gereinigter Plasmamembranen aus Herzen 5 Tage alter Ratten</i>	28
3.4.2. <i>Detergenzextraktion von Proteinen aus gereinigten Plasmamembranen</i>	28
3.4.3. <i>Präparation Caveolae-reicher Membranen aus sarkolemmalen Membranen</i>	29
3.4.4. <i>Immunpräzipitation von Caveolin, PMCA und Dystrophin</i>	29
3.4.5. <i>Messung der Proteinkonzentration</i>	31
3.4.5.1. <i>Bio-Rad Protein Assay</i>	31
3.4.5.2. <i>Bio-Rad DC Protein Assay</i>	31
3.4.6. <i>Western-Blot-Analyse</i>	32
3.5. KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON DNA	34
3.6. STATISTISCHE AUSWERTUNG	34
4. RESULTATE	36
4.1. STIMULIERTES WACHSTUM	36
4.1.1. <i>Bestimmung des Einbaus von ³H-Leuzin als Maß für Proteinsynthese</i>	37
4.1.2. <i>Bestimmung der Zunahme des Gesamtproteins als Maß für Zellwachstum</i>	38
4.2. DREIFACHIMMUNFLUORESCENZ MIT FÄRBUNG VON TROPONIN, AKTIN UND KERNEN	40
4.3. VERSUCHE ZUR LOKALISATION DER PMCA IN CAVEOLAE	45
4.3.1. <i>Detergenzextraktion von Proteinen aus gereinigten Plasmamembranen</i>	45
4.3.2. <i>Doppelimmunfluoreszenz mit Färbung von Caveolin-3 und PMCA</i>	46
4.3.3. <i>Biochemische Präparation Caveolae-reicher Membranen aus sarkolemmalen Membranen</i>	49
4.3.4. <i>Koimmunpräzipitation von Caveolin, PMCA und Dystrophin</i>	50
4.4. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	52

5. DISKUSSION	53
5.1. EXPERIMENTE AN HPMCA4CI-TRANSGENEN RATTEN.....	53
5.2. SUBZELLULÄRE LOKALISATION DER PMCA	56
5.3. PERSPEKTIVEN.....	60
6. ZUSAMMENFASSUNG	64
7. LITERATURVERZEICHNIS	65
8. ANHANG	77
ABKÜRZUNGEN	77
LÖSUNGEN	78
CHEMIKALIEN, MATERIALIEN UND FERTIG-KITS	83
GERÄTE	85

1. Einleitung

1.1. Einführung

Das Kalziumion (Ca^{2+}) spielt als sekundärer Botenstoff (*second messenger*) eine wichtige Rolle bei der intra- und extrazellulären Signalübermittlung im Organismus von Säugetieren. Beispielsweise wurde bereits vor langer Zeit die Kalziumvermittelte Steuerung der (Herz-) Muskelkontraktion (siehe auch Kapitel 1.2.), der Freisetzung von Neurotransmittern, von Sekretionsvorgängen und unterschiedlichen Wachstums-, Proliferations- und Differenzierungsvorgängen entdeckt werden^{11,37}. Dabei geht man davon aus, dass viele Signalwege über eine feine Regulation der örtlichen (d.h. subzellulären) Kalziumkonzentration gesteuert werden^{2,10,11,112}.

Während die Konzentration an freiem, ionisiertem Kalzium (Ca^{2+}) des Extrazellularraum ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) mit 1,12-1,23 mmol/l angegeben wird, liegt die intrazelluläre Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) einer Zelle im Ruhezustand mit 10-100 nmol/l bis zu 10.000-fach niedriger (siehe Lehrbücher der Physiologie¹⁵⁰). Um sowohl diesen hohen Konzentrationsgradienten aufrecht zu erhalten, als auch die zur Signaltransduktion erforderlichen Ca^{2+} -Ionenströme zu ermöglichen, bedarf die Zelle eines leistungsfähigen Instrumentariums an Ionenkanälen, Transportern, ATPasen und Ca^{2+} -bindenden Proteinen. Die wichtigsten dieser Strukturen sind im Überblick in Abbildung 1 am Beispiel einer Herzmuskelzelle zusammengefasst.

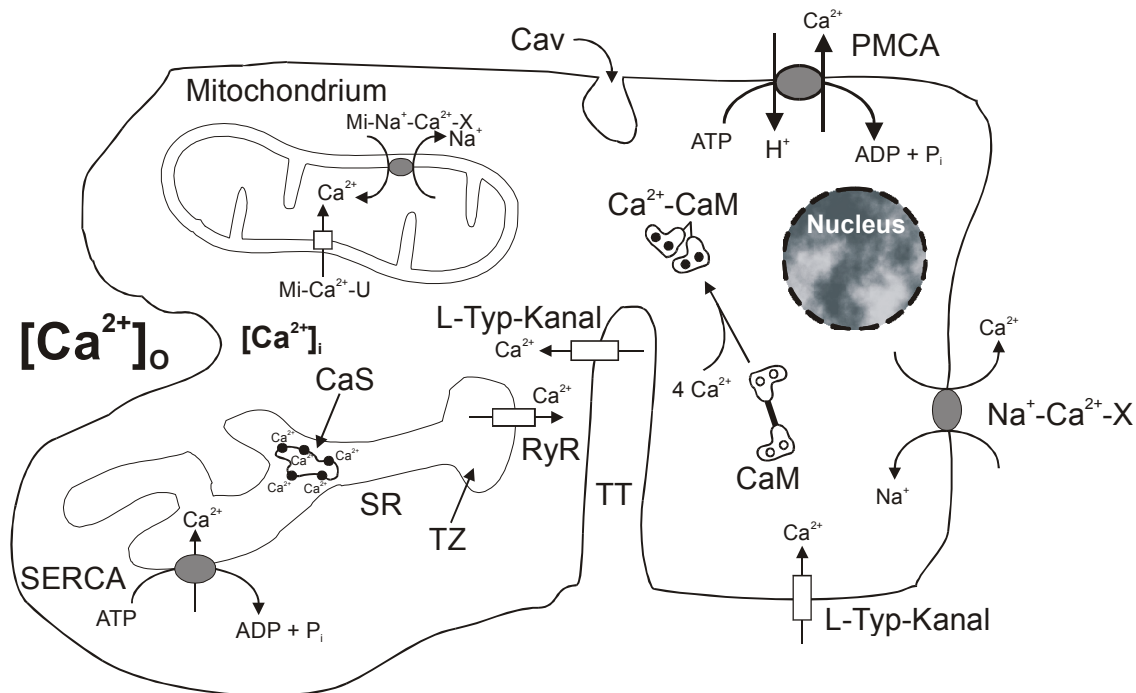


Abbildung 1: Kalziumhomöostase der Zelle. Dargestellt sind die Ca^{2+} -transportierenden Systeme einer Herzmuskelzelle und ihre intrazelluläre Lokalisation. **PMCA**: Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (siehe Kapitel 1.3.); **Na^+ - Ca^{2+} -X**: Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher der Plasmamembran^{33,121}; **SERCA**: Ca^{2+} -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums¹⁰⁶; **RyR**: Ryanodin-Rezeptor^{9,53}; **L-Typ-Kanal**: Spannungs-abhängiger Ca^{2+} -Kanal der Plasmamembran¹⁶²; **Mi- Na^+ - Ca^{2+} -X**: mitochondrialer Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher^{24,25}; **Mi- Ca^{2+} -U**: mitochondrialer Ca^{2+} -Uniporter^{24,25}; **SR**: sarkoplasmatisches Retikulum; **TZ**: terminale Zisterne des SR; **TT**: T-Tubulus; **Cav**: Caveola; **CaM**: Calmodulin^{67,109}; **Ca^{2+} -CaM**: Ca^{2+} -Calmodulin-Komplex; **CaS**: Calsequestrin⁶⁷; **$[\text{Ca}^{2+}]_i$** : intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration; **$[\text{Ca}^{2+}]_o$** : extrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration.

1.2. Rolle des Kalziums im Myokard

Die Basis der Herzaktion besteht in der kontrollierten, dosierten und koordinierten Kontraktion aller Kardiomyozyten. Der vom Sinusknoten ausgehende Impuls wird über ein spezielles Erregungsleitungssystem zu den durch *gap junctions* zu synzytialen Verbänden zusammengeschlossenen Herzmuskelzellen übertragen. Wie im Skelettmuskel kommt es im Rahmen der elektromechanischen Koppelung durch das über die Plasmamembran laufende Aktionspotential zur Öffnung der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle. Die einströmenden Kalziumionen führen durch Bindung an den Ryanodin-Rezeptor zur zusätzlichen Kalziumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (CIRC = *calcium induced release of calcium*)^{104,23,96}. Der Anstieg der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Bereich der kontraktilen Filamente ermöglicht letztlich über eine Konformationsänderung des Tro-

ponin-Tropomyosin-Komplexes die Aktin-Myosin-Interaktion und somit die Muskelkontraktion.

Beendet wird die Kontraktion durch einen Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ bis auf einen niedrigen diastolischen Wert. Grundsätzlich kommen für diese Absenkung die in Abbildung 1 dargestellten Transportsysteme (PMCA, SERCA, Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher der Plasmamembran) und Ca^{2+} -bindende Proteine in Frage (Übersicht in Rüegg 1992¹³²).

Anders als im Skelettmuskel, erfolgt im Herzmuskel die Steuerung der Kraftentfaltung nicht neuronal (d.h. durch Ansteuern verschieden vieler motorischer Einheiten), sondern durch eine Anpassung der $[Ca^{2+}]_i$, so z.B. über einen β -adrenergen Signalweg, der G_s -Protein/Proteinkinase A (PKA) vermittelt zur Phosphorylierung des L-Typ- Ca^{2+} -Kanals (mit erhöhter Öffnungswahrscheinlichkeit) führt¹⁶².

Unter pathologischen Umständen, wie z.B. chronisch hypoxischen Zuständen bei Herzhypertrophie oder koronarer Herzkrankheit, kann die Kalziumhomöostase verändert sein, wobei Veränderungen in der Expression der $[Ca^{2+}]_i$ -regulierenden Strukturen gefunden wurden (Übersicht in Swynghedauw¹⁶³ und Dhalla⁴⁰).

Neben der elektromechanischen Kopplung wird Kalzium auch mit anderen Funktionen im Herzen in Verbindung gebracht. So gibt es Hinweise, dass Ca^{2+} eine Rolle bei Wachstums- und Differenzierungsvorgängen von Kardiomyozyten eine Rolle spielt⁵⁶.

1.3. Die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase (PMCA)

1.3.1. Allgemeine Eigenschaften

Die PMCA wurde erstmals 1966 von Schatzmann¹³⁷ in Erythrozyten beschrieben. Nach bisherigem Wissen wird sie in praktisch allen eukaryontischen Zellen exprimiert, auch in solchen, wie z.B. Myozyten und Neuronen, für die früher der Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher als das alleinige Ca^{2+} -extrudierende System postuliert wurde¹²⁹. In vielen Zellarten ist sie jedoch das einzig bekannte Enzym für den Auswärtstransport von Kalzium.

Die PMCA bildet nur einen geringen Bruchteil aller Membranproteine. In Erythrozyten, die als besonders reich an dieser Pumpe gelten, wird ihr ein Anteil von ca. 0,01% - 0,1% an der Gesamtmenge an Membranproteinen zugeschrieben⁸⁴. Das entspricht etwa 700 PMCA-Molekülen pro Erythrozyt.

Wie alle P-Typ-ATPasen lässt sich die PMCA durch Orthovanadat und La^{3+} hemmen und bildet während der ATP-Hydrolyse ein intermediäres Aspartylphosphat (im Gegensatz zu den anderen Pumpen steigt bei der Hemmung mit La^{3+} jedoch der Anteil an Phosphoenzym an, was oft zur Identifikation des Enzyms benutzt wurde). Obwohl dabei eine Stöchiometrie von 2 transportierten Ca^{2+} -Ionen pro hydrolysiertem ATP thermodynamisch möglich wäre, geht man heute davon aus, dass dieser Quotient *in vivo* 1,0 beträgt^{138,122}. Die Frage, ob dieser Transport elektroneutral vonstatten geht ist noch nicht eindeutig geklärt. Akzeptiert ist jedoch die Erkenntnis, dass Protonen (H^+) antiportiert werden, wobei der $\text{Ca}^{2+} : \text{H}^+$ Quotient zwischen 0,5 - 1,0 liegen dürfte^{138,122}.

Weitere charakteristische Eigenschaften der PMCA sind ihre mannigfaltigen Regulationsmechanismen *in vivo* und *in vitro*. Schon in den 70er Jahren konnte eine Aktivierung der Pumpe durch direkte Interaktion mit Calmodulin (CaM) festgestellt werden^{77,57}, wobei es sich um einen kombinierten K_m - und V_{\max} -Effekt handelt. So konnte gezeigt werden, dass der K_m (Ca^{2+}) der Pumpe in Anwesenheit optimaler CaM-Konzentrationen (ca. 1 nM) von etwa $20\mu\text{M}$ auf ungefähr $0,5\mu\text{M}$ abfällt¹²².

In Abwesenheit von CaM kann die Pumpe noch durch verschiedene andere Mechanismen aktiviert werden (vorzugsweise durch Verminderung des K_m), so z.B. durch Anwesenheit saurer Phospholipide oder mehrfach ungesättigter Fettsäuren^{130,123,42}, durch proteolytische Behandlung¹⁶⁶, durch Phosphorylierung durch die Proteinkinasen A (PKA)¹¹⁶ oder C (PKC)¹⁵⁴ oder durch Bildung von Oligomeren⁸⁸.

Am Ende dieses Absatzes sind die allgemeinen Eigenschaften der PMCA noch einmal in einer Tabelle zusammengefasst.

Vorkommen	alle eukaryontischen Zellen
Masse	ca. 130 - 140 kDa
Transportmechanismus	Bildung eines intermediären Aspartylphosphats
Ladungsbalance	Ca ²⁺ -H ⁺ -Austausch, Ca ²⁺ :H ⁺ -Stöchiometrie 0,5 - 1
ATP-Affinität (K_m)	Zwei Stellen unterschiedlicher Affinität: Stelle mit hoher Affinität ca. 1-2,5 μM Stelle mit niedriger Affinität ca. 145-180 μM
Ca²⁺-Affinität (K_m)	>10 μM im nicht aktivierten Zustand >0,5 μM in maximal aktiviertem Zustand (± Calmodulin)
Inhibitoren	Orthovanadat (K _{1/2} ca. 3 μM) La ³⁺ (K _{1/2} ca. 1 μM) Carboxyeosin
Aktivatoren	Calmodulin (K _d ca. 1 nM) mehrfach ungesättigte Fettsäuren saure Phospholipide Phosphorylierung durch PKA oder PKC Oligomerisation

Tabelle 1: Allgemeine Eigenschaften der PMCA.

1.3.2. Struktur und Topographie

1988 gelang es Verma et al.¹⁷², eine der humanen PMCA Isoformen zu klonieren, während im selben Jahr Shull und Greeb zwei der vier bekannten Isoformen der Ratte aus Hirngewebe klonieren konnten¹⁴⁹. Anhand dieser Ergebnisse konnte auch zum ersten Mal die Primärstruktur des Enzyms abgeleitet werden. Die Pumpe selbst besteht aus einem einzigen Polypeptid mit, je nach Isoform und Splicing-Variante, zwischen 1169 und 1258 Aminosäuren und einer berechneten Masse zwischen 130 und 140 kDa.

Aus Analogiestudien anderer P-Typ-ATPasen und unter Zuhilfenahme computergestützter Berechnungen wurde eine Sekundärstruktur vorgeschlagen, wie sie in Abbildung 2 dargestellt ist⁵⁹.

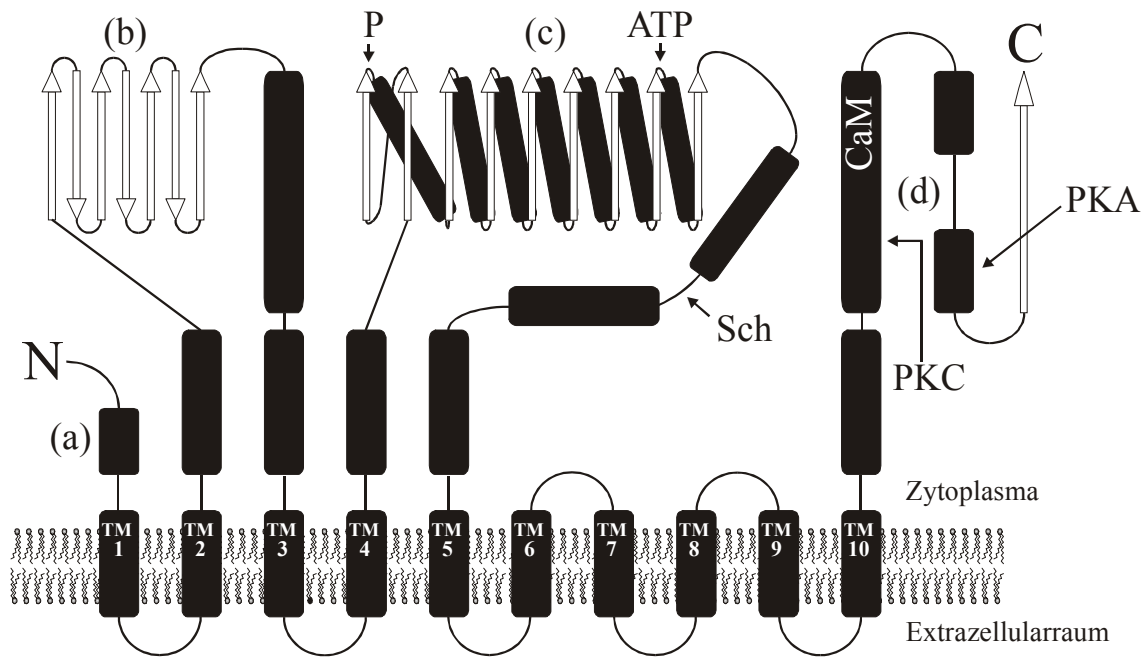


Abbildung 2: Topographie der PMCA (Zeichnung adaptiert aus Carafoli, 1992²⁸)

Das Modell wird im Text besprochen. Pfeile stellen Regionen aus β -Faltblättern dar, Zylinder repräsentieren α -Helices; N: N-terminales Ende; C: C-terminales Ende; TM 1-10: Transmembrandomänen 1-10; (a), (b), (c), (d): Hauptdomänen a-d; P: Aspartylrest mit Phosphorylierungsstelle; ATP: ATP-Bindungsstelle; Sch: "Scharnier"-Region; CaM: Calmodulin-Bindungsstelle; PKA und PKC: Phosphorylierungsstellen durch Proteinkinasen A und C.

Zehn Transmembrandomänen (TM 1-10), die nur durch kurze extrazytoplasmatische Peptid-Stücke verbunden sind, verankern das Polypeptid in der Plasmamembran, während ca. 80% der Masse (darunter sowohl das C-, als auch das N-terminale Ende) ins Zytoplasma ragen. Dieser Hauptteil formt vier Hauptdomänen (a, b, c, d, siehe Abb. 2), die sich vom N-Terminus bis TM 1, zwischen TM 2 und TM 3, zwischen TM 4 und TM 5 und von TM 10 bis zum C-Terminus erstrecken.

Die erste Domäne (a) enthält zum Teil α -Helices und variiert je nach Isoform zwischen 90 und 100 Aminosäureresten. Die zweite (b) besteht sowohl aus α -helicalen als auch aus β -Faltblatt-Strukturen. Sie enthält mindestens eine der Stellen, die für die Aktivierung durch saure Phospholipide verantwortlich sind¹⁷⁹ und wird in Analogie zu anderen P-Typ-ATPasen als die sog. "transducing unit" angesehen, welche die ATP-Hydrolyse an den Transport von Ca^{2+} -Ionen koppelt¹⁰⁶. Für die dritte Domäne (c), welche die meisten Aminosäurereste enthält, wird eine Struktur aus β -Faltblättern, die jeweils durch α -Helices unterbrochen werden, vorausgesetzt. In ihr befinden sich der Aspartyl-

rest, welcher während des Transports phosphoryliert wird (P) und, weiter C-terminal, die Bindungsstelle des ATP (ATP)^{75,48}. Des Weiteren konnte in dieser Domäne, analog zu anderen Transportern, eine "Scharnierstelle" (Sch) identifiziert werden, die durch eine Bewegung die Phosphorylierungsstelle in örtliche Nähe zum gebundenen ATP bringen soll³⁰. Die letzte Domäne (d) enthält wichtige Regulationsstellen. So konnte man dort die CaM-Bindungsstelle^{76,70,109} und Phosphorylierungsstellen der PKA und PKC identifizieren¹⁷³. Als möglicher Mechanismus für die Aktivierung/Inaktivierung der Pumpe durch diese Domäne wurde vorgeschlagen, dass sie sich in Abwesenheit von CaM wie ein Deckel über das aktive Zentrum auf Domäne 3 (c) legt und somit direkt die Interaktion von ATP bzw. Ca²⁺ mit der Pumpe unterbindet. Durch Bindung von CaM oder Phosphorylierung durch PKC schwingt die C-terminale Domäne zur Seite und gibt die Interaktionsstellen wieder frei^{44,45,27}.

1.3.3. Lokalisation

Die genaue subzelluläre Lokalisation der PMCA ist noch Gegenstand intensiver Forschung. Nach den bisherigen Ergebnissen muss man davon ausgehen, dass die ultrastrukturelle Verteilung in verschiedenen Zelltypen (unter Umständen auch für die einzelnen Isoformen und Subtypen, s. 1.3.4.) ein anderes Muster zeigt. So wurde z.B. für die quergestreifte Muskulatur sowohl eine homogene Verteilung des Enzyms über die Plasmamembran¹⁵⁹ als auch eine teilweise Lokalisation im T-tubulären System¹³³ beschrieben. Für exokrine Zellen konnten Unterschiede in der Verteilung des Enzyms und seiner Isoformen am basalen und apikalen Pol entdeckt werden¹⁷⁰, und Fujimoto erbrachte 1993 Hinweise auf eine Lokalisation der PMCA in Caveolae⁵⁰.

In derselben Arbeit wurde die Kollokalisierung der Pumpe mit einem IP₃-Rezeptor-artigen Protein postuliert, was sich, ähnlich wie die Berichte zur Kollokalisierung mit dem Dihydropyridin-Rezeptor¹³³, bei der Untersuchung der funktionellen Bedeutung des Enzyms als richtungsweisend herausstellen könnte. Aus diesem Grund wurden auch in dieser Arbeit Ansätze zur subzellulären Lokalisation und Aufdeckung eventueller Interaktionspartner verfolgt.

1.3.4. PMCA-Isoformen und Splicing-Varianten

Wie bereits weiter oben erwähnt, wurden nach und nach verschiedene Isoformen der Plasmamembran-Ca²⁺-ATPase entdeckt. Inzwischen steht fest, dass das Enzym zu einer

Multigen-Familie aus mindestens vier²⁶ möglicherweise fünf⁶⁶ Genen gehört, die auf die Chromosomen 12, 3, X und 1 lokalisiert werden konnten²⁹. Die Isoformen, deren komplette cDNA für verschiedene Spezies bereits bestimmt wurde, sind in Tabelle 2 mit den relevanten Literaturstellen aufgelistet. Auf Aminosäureebene besteht zwischen den einzelnen Isoformen jeweils eine Übereinstimmung von 75-85%¹⁶¹, wobei die größten Sequenzunterschiede in den C- und N-terminalen Regionen gefunden werden.

Isoform	Spezies	Literatur
PMCA 1	Mensch	Verma et al. 1988 ¹⁷²
	Ratte	Shull und Greeb 1988 ¹⁴⁹
PMCA 2	Mensch	Heim et al. 1992 ⁶⁵
	Ratte	Shull und Greeb 1988 ¹⁴⁹
PMCA 3	Mensch	Brown et al. 1996 ²⁰
	Ratte	Greeb und Shull 1989 ⁵⁸
PMCA 4	Mensch	Strehler et al. 1990 ¹⁶⁰
	Ratte	Keeton und Shull 1995 ⁸¹

Tabelle 2: PMCA-Isoformen deren komplette cDNA bekannt ist, mit den jeweiligen Originaltexten

Durch alternatives mRNA-Splicing an insgesamt vier möglichen Splicingstellen (A-D) wird die Diversität dieser vier Genprodukte beträchtlich erhöht (über 25 bekannte Splicingvarianten). Dabei geht man heute davon aus, dass dies hauptsächlich an den zwei Stellen A (in Nachbarschaft zur Phospholipid-Regulationsstelle) und C (innerhalb der CaM-Bindungsstelle) des Enzyms stattfindet, an welchen, je nach Isoform, bis zu drei Exons von unterschiedlicher Länge oder aber kein Exon inkludiert werden können. Die anderen beiden Splicingstellen B und D werden hier bewusst außer Acht gelassen, da B offensichtlich nur in sehr wenigen, außerordentlich spezialisierten Geweben und Zellarten vorkommt⁶⁸, und D wahrscheinlich aufgrund von Klonierungsartefakten identifiziert worden war¹⁶. Carafoli schlug 1994 in einem Übersichtsartikel³⁰ eine Nomenklatur zur Bezeichnung der unterschiedlichen Isoformen/Splicingvarianten vor, an die sich im Folgenden gehalten werden soll. Dabei steht ein erster kleiner Buchstabe für die entsprechende Spezies (z.B. r für Ratte, h für das humane Enzym), gefolgt von der Be-

zeichnung der Isoform (PMCA1 - 4), einem Grossbuchstaben (A oder C) für die Splicingstelle und einer römischen Ziffer, welche die Kombination der eingeschlossenen Exons angibt (I - keine Insertion, II - alle Exons, III, IV usw.). Somit stellt die, für diese Arbeit besonders wichtige, hPMCA4CI (da sie das in den unten beschriebenen transgenen Ratten überexprimierte Gen ist) die humane Isoform 4 der PMCA dar, die an der Splicingstelle C kein Exon enthält.

Zusätzlich sei hier noch die offizielle Gen-Nomenklatur erwähnt, die von der *Human Genome Organisation* (HUGO) im Rahmen des *Human Genome Project* erstellt wurde¹⁷⁵ und eine umfassende Klassifizierung der bekannten menschlichen Gene darstellt. Die Richtlinien dieser Nomenklatur und auch speziellere Informationen zu den einzelnen Genen (Nukleinsäure- und Proteinsequenzen, Chromosomenlokalisationen, Literaturverweise, u.v.m.) können online im Internet abgerufen werden^{168,167}. In Tabelle 3 ist die in dieser Arbeit verwendete und die offizielle HUGO-Nomenklatur mit Angabe des jeweiligen Genortes zusammengefasst.

Isoform	HUGO-Nomenklatur	Genort
PMCA 1	ATP2B1	12q21 – 12q23
PMCA 2	ATP2B2	3p26 – 3p25
PMCA 3	ATP2B3	Xq28 – Xq28
PMCA 4	ATP2B4	1q25 – 1q32

Tabelle 3: PMCA-Isoformen und offizielle Gen-Nomenklatur der *Human Genome Organisation* (HUGO). Zusätzlich sind die genauen Genorte der einzelnen Isoformen angegeben.

Biochemisch unterscheiden sich die einzelnen Varianten hauptsächlich in ihrer Affinität für Calmodulin (am stärksten PMCA2), jedoch liegen auch Unterschiede bezüglich der Bindung von ATP oder der Degradation durch Proteasen vor.

Nicht unerwartet stellte sich heraus, dass die einzelnen Isoformen typischerweise in bestimmten Geweben exprimiert werden^{156,157,159,15,80}. Generell scheinen die Isoformen 1 und 4 in praktisch allen Geweben vorzukommen, während 2 und 3 nur im Gehirn (auf mRNA- und Proteinebene) und in Herz- und Skelettmuskel (auf mRNA-Ebene⁶²) gefunden wurden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die beiden erstgenannten Isoformen eher eine allgemeine Funktion in der Regulation der zellulären Kalziumhomöostase ausüben, während letztere mit spezifischen Funktionen elektrisch erregbarer Zellen assoziiert sind.

1.3.5. Bisher bekannte Funktionen der PMCA

1.3.5.1. Kalziumhomöostase

Da die PMCA in einer breiten Palette von Zellen immer noch das einzig bekannte Ca^{2+} -transportierende Enzym darstellt³⁰, wird ihre Funktion in diesen Zellen als das für die Ca^{2+} -Homöostase verantwortliche "*housekeeping enzyme*" vermutet. Anders verhält es sich jedoch in den (elektrisch erregbaren) Zelltypen, wie Neuronen, Herz- und Skelettmuskelzellen, welche neben der PMCA noch weitere Ca^{2+} -Transporter exprimieren. So spielt die PMCA in den eben genannten Zelltypen gegenüber dem $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Antiporter und der SERCA wohl eher eine untergeordnete Rolle beim Abtransport des, im Rahmen der Muskelkontraktion⁸ oder der Neurotransmitterfreisetzung, in die Zelle gelangten Kalziums. Aufgrund ihrer geringen Kapazität, jedoch hohen Kalziumaffinität scheint sie hier eher für die Erhaltung und Feinregulation einer sehr niedrigen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ im Bereich unter 1 μM verantwortlich zu sein^{161,30}.

Diese Feinregulation darf jedoch nicht nur in Bezug auf die gesamtytosolische Ca^{2+} -Konzentration gesehen werden, zumal es Hinweise dafür gibt, dass örtlich begrenzte Zellregionen wie z.B. der subsarkolemmale Raum größeren Schwankungen hinsichtlich der lokalen Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{spm}}$) unterliegen als das restliche Zytoplasma⁷⁹. Die Notwendigkeit einer solchen subzellulären Ca^{2+} -Feineinstellung wird durch Forschungsergebnisse unterstrichen, welche eine ganze Reihe von (z. T. Kalzium-sensitiven) Rezeptor- und Signaltransduktionsmolekülen in begrenzten, eng umschriebenen Zellkompartimenten lokalisieren konnten (siehe 1.5. Caveolae).

1.3.5.2. Wachstum und Differenzierung

Ein weiterer wichtiger Schritt zur Charakterisierung der Funktion der PMCA war die Erkenntnis, dass im Verlauf der Differenzierung verschiedener Zelllinien unterschiedliche Splicingvarianten gebildet werden, und dass eine Überexpression des Enzyms die Differenzierungs- und Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen beeinflussen kann. So konnten z.B. Hammes et al.⁶² nicht nur die Verteilung unterschiedlich "gesplicter" PMCA-mRNAs in einer breiten Palette verschiedener Zellarten zeigen, sondern auch das Auftreten neuer PMCA1 und 4 Splicingvarianten während der Differenzierung von L6 Myoblasten zu L6 Myotuben entdecken. Ähnliches gilt auch für die Entwicklung

von undifferenzierten zu differenzierten PC12 Phäochromozytomzellen (dabei treten jedoch zusätzlich PMCA2 Isoformen auf).

In einer weiteren Arbeit unserer Arbeitsgruppe⁶³ wurden Untersuchungen an stabil hPMCA4CI-überexprimierenden myogenen Zelllinien (L6-Myoblasten) durchgeführt, die zeigen konnten, dass die Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben unter Stimulation mit Pferdeserum stark beschleunigt war. So wurde die Differenzierungszeit zu voll ausgebildeten Myotuben, die im Falle der nicht überexprimierenden Kontrollzellen 10-12 Tage dauerte, auf 6-8 Tage bei den überexprimierenden Zellen verkürzt. Dabei konnte in den überexprimierenden Zellen eine, im Vergleich zu den Kontrollzellen, 20-30% niedrigere zytosolische Ruhe-Ca²⁺-Konzentration gemessen werden. Diese Ergebnisse stellen den funktionellen Bezug zwischen PMCA und muskulärer Differenzierung bzw. Wachstum her und bilden somit die wichtigste Grundlage für die Hypertrophiever-suche an neonatalen Kardiomyozyten dieser Arbeit.

Darüber hinaus gibt es noch weitere Arbeiten, welche die PMCA in Verbindung mit der Modulation von Wachstum und Differenzierung auch in anderen Zelltypen wie z.B. Endothelzellen, glatten Muskelzellen und neuronalen Zellen bringen konnten^{100,69,18}.

1.3.6. PMCA-transgene Ratten

Zwar konnten in den letzten Jahren die Struktur, diverse Isoformen und Subtypen der PMCA und viele ihrer biochemischen Eigenschaften aufgedeckt werden, trotzdem besteht noch immer Unklarheit bezüglich ihrer speziellen Funktionen gerade in erregbaren Zellen, wie z.B. Kardiomyozyten, die ja zusätzlich zur PMCA mit weiteren (wesentlich "transportstärkeren") Kalziumpumpen ausgestattet sind¹². Eine anerkannte Methode zur Untersuchung solcher unbekannter Funktionen ist die Generierung von transgenen Tieren, welche das zu untersuchende Enzym unter der Kontrolle eines definierten Promotors organspezifisch überexprimieren (Methodik siehe Mullins 1990¹¹⁴). In diesem *gain of function model* können sowohl Auswirkungen der Überexpression am Gesamtorganismus beobachtet als auch Experimente mit isolierten Zellen durchgeführt werden.

Zu diesem Zweck wurden von A. Hammes vier transgene Rattenlinien etabliert⁶⁴, welche die cDNA der hPMCA4CI unter der Kontrolle des Ventrikel-spezifischen Ratten-Myosin-Leichtketten-2 (MLC-2v)-Promotors trugen und zwei weitere Linien mit derselben cDNA, jedoch unter der Kontrolle des Ratten- α -Myosin-Schwerketten (α -MHC)-Promotors.

Die anschließende Charakterisierung bezüglich des Transgens im Herzmuskel zeigte eine hohe hPMCA4CI-mRNA-Expression vor allem in den 3 bis 14 Tage alten Tieren, während auf Proteinebene im quantitativen Immunoblot eine 2,5- (in neonatalen Kardiomyozyten) bis 1,6-fache (in adulten Kardiomyozyten) PMCA-Überexpression gegenüber den Kontrollen nachgewiesen wurde. Zusätzlich konnte in hochgereinigten Plasmamembran-Präparationen eine erhöhte PMCA-Aktivität gemessen werden, welche gut mit der Überexpression korrelierte. Insofern konnte davon ausgegangen werden, dass ein voll funktionstüchtiges und aktives Enzym synthetisiert wurde. Kompensatorische Veränderungen in der Expression anderer Ca^{2+} -transportierender Enzyme (Na^+ - Ca^{2+} -Exchanger, SERCA, rPMCA) wurden ausgeschlossen.

Parallel zu den Versuchen dieser Arbeit wurden mit den transgenen Tieren hämodynamische Experimente *in vivo*, sowie elektrophysiologische Untersuchungen und Fura-2-Kalzium-Messungen an isolierten adulten Kardiomyozyten im Vergleich zu nicht transgenen Tieren durchgeführt. Dabei zeigten sich jedoch keine signifikanten Unterschiede bezüglich der gemessenen Parameter, wie z.B. linksventrikulärem systolischen Druck, arteriellem Mitteldruck, linksventrikulärem enddiastolischem Druck, rechtsatrialem Druck oder Herzfrequenz. Messungen der L-Typ-Kalzium-Ströme mit der Patch-Clamp-Methode zeigten bezüglich Spannungsabhängigkeit, Aktivierung und Inaktivierung ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Auch die Aufzeichnung des Zeitverlaufs des schnellen $[\text{Ca}^{2+}]_i$ Transienten, der in Anwesenheit von Thapsigargin und Ryanodin (Blockierung des sarkoplasmatischen Retikulums) durch den Einstrom von Ca^{2+} durch L-Typ-Kanäle induziert wurde, zeigte ein gleichartiges Verhalten von transgenen und Kontrollzellen.

Diese und weitere Eigenschaften sind in einer Veröffentlichung beschrieben, in welche auch ein großer Anteil der Resultate der vorliegenden Arbeit eingegangen ist⁶⁴.

Für die vorliegende Arbeit fanden MLC-2v-hPMCA4CL homozygot transgene Ratten (TG-Ratten) Verwendung, die mit normalen (Wildtyp) Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) verglichen wurden.

1.4. Myokardhypertrophie

1.4.1. Definition

Im klinischen Sprachgebrauch wird als Herzhypertrophie eine Gewichtszunahme des Organs, die alters- geschlechts- und körporgewichtsspezifische Normwerte überschreitet, bezeichnet. Diese Definition weicht von der strengen pathologisch-anatomischen Definition der Hypertrophie (=Volumenvermehrung der Zelle ohne Zellteilung) ab, da diese Gewichtszunahme sowohl auf der Größenzunahme der Kardiomyozyten (welche nicht mehr teilungsfähig sind) als auch auf einer zahlenmäßigen Vermehrung (=Hyperplasie) von Bindegewebszellen und extrazellulärer Matrix beruht. Im folgenden soll der Begriff "Hypertrophie" im engeren Sinn, d.h. in Bezug auf den einzelnen Kardiomyozyt gebraucht werden, da die Untersuchungen dieser Arbeit an isolierten Zellen durchgeführt wurden.

1.4.2. Auslösende Mechanismen

Die Mechanismen, die zur Entwicklung der Myokardhypertrophie führen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Jedoch konnten in den letzten Jahren *in vivo* und *in vitro* zahlreiche Stimuli identifiziert werden, auf welche Kardiomyozyten in relativ gleicher Art und Weise durch hypertrophes Wachstum antworten. Lange Zeit bekannt ist der Einfluss von mechanischen Faktoren wie z.B. Erhöhung der Vor- und/oder Nachlast^{85,86,107} (meist durch Steigerung des systemischen Blutdrucks) mit Dehnung der Muskelzellen. Trotzdem besteht zum Teil noch immer Uneinigkeit darüber, ob dies den direkten Auslösemechanismus darstellt, oder ob mechanischer Stress zur sekundären Freisetzung von Wachstumsfaktoren führt. Für letzteres sprechen Resultate, die eine, durch dauernde Dehnung hervorgerufene, Angiotensin-II (ATII)-Sekretion nachweisen konnten. Dieses führte dann auto- und parakrin zu muskulärem Wachstum¹³⁴. Eine noch stärkere Induktion nukleärer Hypertrophiesignale (siehe 1.4.3.) konnte durch repetitive Kontraktionen hervorgerufen werden⁸⁹.

Abgesehen von ATII konnten viele weitere Faktoren identifiziert werden, die das Gesamtkonzept der para- bzw. neuroendokrinen Steuerung kardialen Wachstums stützen: Schilddrüsenhormone⁶¹, α 1- und β -Adrenozeptoragonisten^{178,73,158}, saure und basische Fibroblastenwachstumsfaktoren¹⁷⁴, Endothelin^{148,117,71}, Insulin und *insulin-like growth*

factor (IGF)⁷² und der *platelet-derived growth factor BB* (PDGF-BB)¹¹⁸. Abbildung 3 zeigt noch einmal eine schematische Aufstellung der bekannten und möglichen Faktoren, die an der Myokardhypertrophie beteiligt sind.

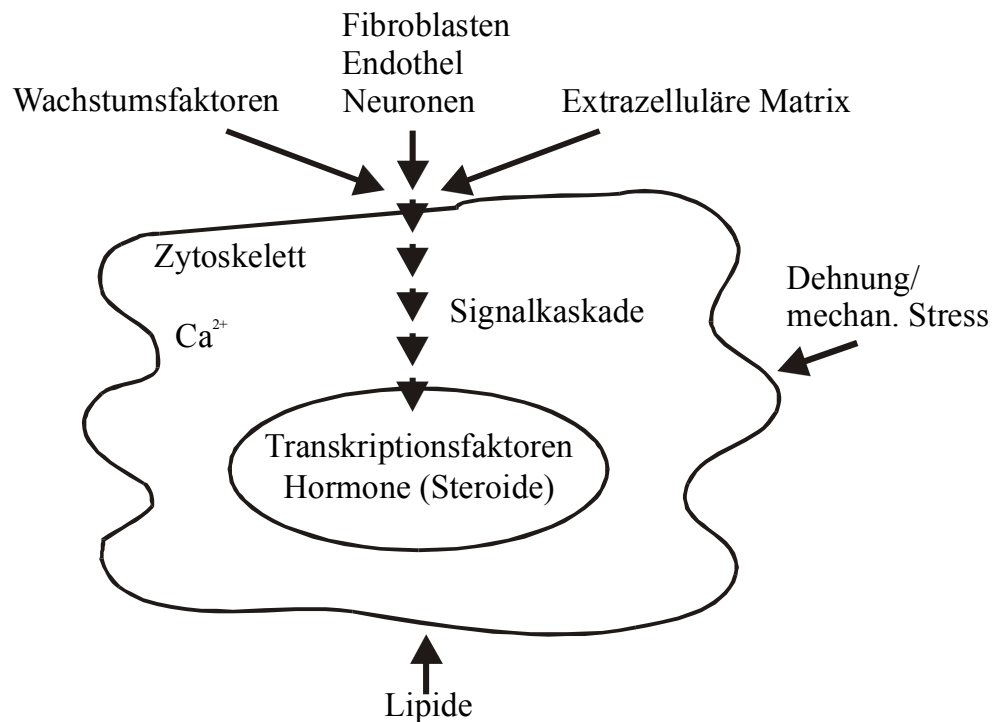


Abbildung 3: Zusammenstellung intra- und extrazellulärer Faktoren, welche mit der Myokardhypertrophie in Verbindung gebracht werden (nach Neyses und Pelzer 1995¹²⁰)

1.4.3. Signaltransduktion und Genexpression

Neben der Identifizierung Hypertrophie-induzierender Stimuli ist es Ziel der Forschung, die Signaltransduktionswege aufzudecken, welche das Wachstumssignal vom Rezeptor der Plasmamembran (oder eines intrazytoplasmatischen Rezeptors) in den Zellkern weiterleiten und somit zu einer veränderten Genexpression führen. In groben Zügen könnte dies etwa folgendermaßen aussehen: Ein Wachstumsstimulus (z.B. ATII) führt durch Bindung an seinen spezifischen Rezeptor zur Induktion einer zytoplasmatischen oder membranassoziierten Kinase. Dadurch werden in einer kaskadenartigen Reaktion verschiedene Proteine des Zytosols phosphoryliert, deren Endpunkt die MAP-Kinase (= *Mitogen Activated Protein Kinase*, MAPK) darstellt. Diese wird in den Kern transloziert und phosphoryliert dort spezifische Transkriptionsfaktoren, welche an Promotorsequen-

zen der genomischen DNA binden und so die mRNA-Transkription kodierender Gene regulieren¹⁰⁸.

Die Abläufe im Kern selbst sind nur zu einem geringen Teil aufgedeckt. Im Herzen scheinen jeweils mehrere Transkriptionsfaktoren zusammen für die Expression spezifischer Gene verantwortlich zu sein. Dies steht im Kontrast zum Skelettmuskel, wo einzelne "Meistergene" wie MyoD, Myogenin, Myf6 und Myf5 die muskuläre Differenzierung steuern. Einer dieser Transkriptionsfaktoren ist das Produkt des *Early-Growth-Response-1* (Egr-1) Gens, welches bereits 30-60 Minuten nach Einwirken eines hypertrophen Stimulus exprimiert wird. Für Egr-1 wurde gezeigt, dass unter Verwendung von Egr-1-Antisense-Oligonukleotiden die hypertrophe Antwort des Myokards auf Endothelin-1 unterdrückt werden kann¹¹⁷. Weitere Beispiele für solche Transkriptionsfaktoren sind NFAT3 (durch einen Calcineurin-abhängigen Signalweg induziert¹¹³) und MEF2 (gesteuert über die Ca²⁺/Calmodulin abhängigen Proteinkinasen (CAM-Kinasen) I und IV¹²⁷).

All dies führt letztendlich zur Expression eines veränderten Genprogramms¹¹⁵. Interessanterweise resultiert daraus bezüglich der Genexpression ein fetaler Phänotyp der Kardiomyozyten. So wurde z.B. bei den kontraktilen Proteinen ein Wechsel vom adulten Isoenzym α -Myosin-Heavy-Chain (α -MHC) zum fetalen β -MHC^{103,110} und ein Wiederauftreten des fetalen α -skelettalen Aktins¹⁴⁵ beschrieben. In dieses Bild passt auch die Reexpression des fetalen Markers Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF) im hypertrophen Myokard^{35,74}.

1.4.4. Klinische Bedeutung

Basierend auf der Framingham-Studie wurde zum ersten Mal die Bedeutung der linksventrikulären Hypertrophie (LVH) als eigenständiger Risikofaktor für den plötzlichen Herztod und andere kardiovaskuläre Erkrankungen beschrieben^{78,111}. Aufgrund ihrer hohen Prävalenz (3-7% der unter 50-Jährigen und 12-40% der 50 bis 80-Jährigen in der Framingham-Population) lässt sich ihre große epidemiologische und volkswirtschaftliche Bedeutung abschätzen.

1.5. Caveolae

1.5.1. Morphologie und Definition

Caveolae sind einheitlich aufgebaute, ca. 50 - 100 nm große, plasmalemmale Invaginationen, welche nicht von einer (Clathrin-) Hülle ummantelt sind und meist durch ein kurzes Halsstück mit dem Extrazellularraum kommunizieren. Sie wurden erstmals in den 50er-Jahren im Gallenblasenepithel¹⁷⁶ und später in Endothelzellen²² beschrieben. Auch in Adipozyten, Fibroblasten, Skelett- und Herzmuskelzellen^{52,128,155} konnten zahlreiche Caveolae entdeckt werden und man geht davon aus, dass sie in fast allen Zelltypen vorkommen³.

Lange Zeit wurden nur die oben genannten, rein morphologischen Merkmale zur Identifizierung von Caveolae angewandt. Erst mit der Etablierung eines umfassenden biochemischen Instrumentariums und der Entdeckung der Caveoline (als caveoläre "Marker-Proteine", siehe 1.5.2.) konnten härtere Kriterien zur Identifizierung und Isolierung caveolärer Membranen erstellt werden, wie sie in einer Übersichtsarbeit von Richard Anderson⁴ zusammengefasst sind: (a) Unlöslichkeit gegenüber Triton X-100 bei 4°C, (b) eine relativ geringe Dichte und (c) Reichtum an Glycosphingolipiden, Cholesterin und Lipid-verankerten Membranproteinen.

1.5.2. Molekulare Zusammensetzung von Caveolae

1.5.2.1. Caveolin

Die Arbeitsgruppe um Anderson konnte 1992 das Caveolin, ein 22 kDa Marker-Protein für Caveolae, identifizieren¹³¹, welches fast gleichzeitig auch unter dem Namen VIP21 als Transformations-abhängiges v-*Src*-Substrat in transformierten Fibroblasten^{54,55} und als Bestandteil von Transportvesikeln des Golgi-Komplexes⁹⁰ beschrieben wurde. Mittlerweile sind mindestens drei Gene mit vier Genprodukte des Caveolins bekannt: Caveolin-1 α , -1 β ¹⁴⁰, -2¹⁴¹ und -3¹⁶⁴ (eventuell noch zwei weitere im Nematoden *Caenorhabditis elegans*¹⁶⁵). Dabei entstehen Caveolin-1 α und -1 β aus einem einzigen Gen durch alternative Initiation bei der Translation, während die anderen beiden Isoformen durch eigene Gene kodiert werden.

Unterschiede zwischen den Isoformen bestehen in der Anzahl der Aminosäurereste (Cav-1 α : 178 AS \approx 22 kDa; Cav-1 β : 147 AS; Cav-2: 149 AS; Cav-3: 151 AS \approx 18

kDa), ihrer Sequenz (jedoch große Ähnlichkeit zwischen Cav-1 und -3: ca. 65% identisch und 85% ähnlich, basierend auf konservativer Aminosäure-Substitution¹⁶⁴) und ihrer gewebsspezifischen Expression. Cav-1 und -2 werden in den meisten Zelltypen exprimiert (Cav-2 besonders in Adipozyten), außer in Skelett- und Herzmuskelzellen, die nur Cav-3 enthalten. Glatte Muskelzellen exprimieren sowohl Cav-1 als auch Cav-3¹⁶⁴.

Die nun beschriebene Ultrastruktur des Cav-1 ist bisher am besten charakterisiert. Aufgrund der großen Ähnlichkeit zwischen Cav-1 und Cav-3 können die folgenden Ausführungen als allgemeiner Bauplan der Caveolin-Multigen-Familie angesehen werden.

Eine hydrophobe 33-AS-Sequenz verankert das Protein in der Plasmamembran, so dass sowohl der N- als auch der C-Terminus frei ins Zytoplasma ragen. Dadurch ergibt sich eine haarnadelartige Sekundärstruktur³⁸. Von der intramembranösen Domäne ein Stück in Richtung aminoterminalen Ende (AS-Reste 61-101 des Cav-1) befindet sich die sogenannte Caveolin-Homooligomerisations-Domäne (CHD). An dieser Stelle lagern sich bis zu ca. 16 Caveolin-Monomere unter Mitwirkung bestimmter Lipide zu großen Komplexen zusammen, welchen man große Bedeutung für die Strukturgebung der Caveolae beimisst¹³⁶. Innerhalb der CHD befindet sich eine Subdomäne (AS-Reste 82-101 des Cav-1), die als Bindungsstelle für heterotrimere G-Proteine und für Tyrosinkinasen der Src-Familie^{92,94,95,164} identifiziert wurde. Man geht inzwischen davon aus, dass diese Sequenz als allgemeine, multivalente Bindungs- und Interaktionsstelle für caveoläre Proteine dient. Li et al.⁹³ schlugen deswegen den Namen "*Caveolin Scaffolding Domain*" (CSD = Caveolin Gerüstdomäne) vor.

1.5.2.2. Membraneigenschaften und Lipide

Wie schon weiter oben erwähnt, besitzen caveoläre Membranen eine spezifische Zusammensetzung bezüglich ihrer Lipide. Im Vergleich zur "normalen" Plasmamembran, haben sie einen hohen Gehalt an Cholesterin, Sphingomyelin, Ceramiden und Gangliosiden^{21,101,126}. Diese sind zum einen für die Dichteigenschaften und die Resistenz gegenüber Detergenzien bei niedrigen Temperaturen verantwortlich, wie Versuche an Cholesterin- und Sphingomyelin-reichen Liposomen gezeigt haben^{144,1}. Zum anderen sind sie auch am Aufbau der typischen Form von Caveolae beteiligt. So führt z.B. die künstliche Verminderung des zellulären Cholesterins zum Verschwinden invaginierter Caveolae⁹⁴.

1.5.2.3. Caveoläre und Caveolae-assoziierte Proteine

Die Forschung der letzten Jahre hat gezeigt, dass in Caveolae eine große Anzahl zellulärer Proteine mit verschiedensten Funktionen konzentriert sind. Tabelle 4 gibt eine nach Eigenschaften/Funktionen geordnete Übersicht über bisher in Caveolae lokalisierte Proteine, unabhängig davon, ob dies mit biochemischen und/oder morphologischen Methoden erfolgte oder in welchem Zelltyp oder welcher Spezies der Nachweis erbracht wurde.

Art der Moleküle	Name
Acylierte Proteine	Heterotrimeres G-Protein G_{α} und G_{β} Tyrosinkinasen Src, Fyn, Hck, Lck Endotheliale NO-Synthase (eNOS) CD-36 Caveolin
Glycosylphosphatidylinositol (GPI) verankerte Proteine	Folat-Rezeptor T-Zell-Markerprotein Thy 1 Alkalische Phosphatase Urokinase Rezeptor 5'-Nucleotidase CD-14 Prion Protein
Prenylierte Proteine	Rap1A Ras
Membran Rezeptoren	Rezeptoren für: Platelet Derived Growth Factor (PDGF) Insulin Epidermal Growth Factor (EGF) Receptor for Advanced Glycation End Product (RAGE) Cholecystokinin (CCK) Azetylcholin (M2-ACh-Rezeptor) Katecholamine (β_2 -Rezeptor) Bradykinin (BK B2 Rezeptor) Endothelin (Subtyp A und B Rezeptor) Atrialer Natriuretischer Faktor (ANF – Typ B Rezeptor) SR-B1

Art der Moleküle	Name
Signaltransduktionsmoleküle	Proteinkinase C $_{\alpha}$ (PKC $_{\alpha}$) SH2-containing protein (SHC) Son of sevenless protein (SOS) GRB2 Mitogen aktivierte Proteinkinase (MAPK) Adenylate Cyclase SH2-containing proteintyrosinphosphatase (SYP) Phosphatidylinositol 3 (PI3) Kinase Raf1 Calmodulin
Membrantransporter	Porin IP $_3$ sensibler Ca $^{2+}$ -Kanal Plasmamembran Ca $^{2+}$ -ATPase (PMCA) Aquaporin-1 H $^{+}$ -ATPase
Strukturmoleküle	Annexin II Ezerin Myosin Vesicle associated membrane protein (VAMP) N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein (NSF) Aktin Dystrophin Gelsolin Spectrin
Verschiedene	Flotillin Cholera Toxin Untereinheit A

Tabelle 4: Proteine, die mit biochemischen und/oder morphologischen Methoden in Caveolae lokalisiert wurden (zusammengestellt aus Anderson 1998⁴ und Couet et al. 1997³⁸).

Als Mechanismen für diese zielgerichtete Akkumulation werden molekulare Interaktionen der oben genannten Proteine mit caveolären Lipiden (z.B. Cholesterin mit Caveolin⁹⁴), mit Caveolin (z.B. G $_{\alpha}$, Src-Tyrosinkinase, eNOS^{93,95,164,46}) oder Acylierung (z.B. Src-Tyrosinkinase¹⁴⁷ oder eNOS¹⁴⁶) verantwortlich gemacht. Interessanterweise scheint die Interaktion mit Caveolin vom Aktivierungszustand der jeweiligen Moleküle abzuhängen, wobei in der Regel die inaktiven Formen interagieren.

1.5.3. Bisher bekannte Funktionen von Caveolae

Bis zum jetzigen Zeitpunkt wurden vier Hauptfunktionen für Caveolae vorgeschlagen (nach Travis 1993¹⁷¹). Im einzelnen sind diese: (a) der Transport von Molekülen durch

Endothelzellen, im Sinne von Transportvesikeln, (b) die zelluläre Aufnahme von kleinen Molekülen, wie z.B. Folat (ein Prozess, der Potozytose genannt wird), (c) die Bildung einer örtlich distinkten Plattform für Signaltransduktionsmoleküle und (d) die Vermittlung des Effluxes von *de novo* synthetisiertem und aus LDL stammendem Cholesterin⁴⁷. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese Funktionen aus Untersuchungen an verschiedenen Zelltypen und Spezies abgeleitet wurden. Insofern ist von einer unterschiedlichen Ausprägung je nach Zelltyp und Gewebe auszugehen.

Aufgrund des Umfangs der hierzu vorliegenden Forschungsergebnisse muss bezüglich der oben unter (a), (b) und (d) genannten Funktionen auf die entsprechenden Übersichtsartikel^{171,4,38} verwiesen werden. Nur auf die caveoläre Signaltransduktion soll im Folgenden noch eingegangen werden, da die Erkenntnisse auf diesem Gebiet eine wichtige Grundlage für die Arbeit darstellen.

Wie aus Tabelle 4 (s.o.) zu entnehmen, konnte eine große Anzahl von Signaltransduktionsmolekülen dem caveolären System zugeordnet werden, welche die unterschiedlichsten zellulären und systemischen Funktionen beeinflussen können: Stoffwechsel (z.B. Insulinrezeptor, β -Adrenozeptor), Sekretion (Cholecystokinin), Wachstum und Differenzierung (z.B. PDGF- und EGF-Rezeptor, MAPK, Ras, Raf 1), cardiovaskuläre Funktionen (z.B. β -Adrenozeptor, M2-ACh-Rezeptor, eNOS) und viele mehr. Caveolae bilden somit eine Plattform, welche auf engstem Raum die Aufnahme, Modulation und Transduktion intra- und extrazellulärer Signale ermöglicht.

Dabei war für diese Arbeit richtungsweisend, dass sich an diesen "Brennpunkten" nicht nur unterschiedliche Signalwege kreuzen, die wichtige Rollen bei der Entwicklung der Myokardhypertrophie spielen (PDGF, β AR, eNOS, MAPK usw., siehe 1.4.3.), sondern auch, dass erste Hinweise dafür vorlagen, dass die PMCA durch ihre Lokalisation in Caveolae⁵⁰ zusammen mit anderen Ca^{2+} -gesteuerten Molekülen (eNOS¹⁴⁶, IP3-sensitiver Ca^{2+} -Kanal^{49,51}) in diese Wege eingreifen kann.

2. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl bereits umfangreiche Ergebnisse über die biochemischen Eigenschaften der Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase, ihre Regulation durch Calmodulin und Proteinkinasen und die gewebespezifische Isoform-Verteilung vorliegen, bleibt ihre Funktion *in vivo* weiterhin unklar. Dies gilt insbesondere für elektrisch erregbare Gewebe, wie den Herzmuskel, der noch über andere Ca^{2+} -Transportsysteme verfügt. Erste Ergebnisse aus dem eigenen Labor konnten den Einfluss der PMCA auf muskuläres Wachstum und Differenzierung zeigen. Um diesen Ansatz weiter zu verfolgen und auf den Bereich des kardialen Wachstums bzw. der Myokardhypertrophie auszuweiten, wurden von A. Hammes transgene Ratten etabliert, welche eine humane Isoform der Kalziumpumpe myokardspezifisch überexprimierten und nun zur weiteren Charakterisierung zur Verfügung standen.

Zusätzlich lagen erste Hinweise dafür vor, dass die PMCA durch eine Lokalisation in Caveolae in engster räumlicher Beziehung zu Strukturen wachstums- und differenzierungssteuernder Signalwege stehen könnte.

Basierend auf oben Genanntem, wurde folgende Arbeitshypothese aufgestellt:

Auch in Kardiomyozyten nimmt die Plasmamembran- Ca^{2+} -ATPase Einfluss auf die Steuerung von Wachstums- und Differenzierungsvorgängen, wie sie im Rahmen der Herzhypertrophie auftreten. Diese Einflussnahme geschieht an einem genau definierten Ort, den Caveolae, die eine Art Schaltzentrale zellulärer Signaltransduktion darstellen.

Um diese Hypothese zu testen wurde eine zweigleisige Vorgehensweise gewählt:

- 1) Unter Verwendung anerkannter Methoden (Detergenzextraktion, Caveolae-Präparation, Doppel-Immunfluoreszenz, Co-Immunpräzipitation) sollte die caveoläre Lokalisation der PMCA in Kardiomyozyten untersucht und eine mögliche Interaktion mit Caveolin-3 oder anderen caveolären Proteinen dargestellt werden.
- 2) Unterschiede im Wachstumsverhalten im Vergleich von normalen zu PMCA-transgenen Ratten sollten am Model von Kulturen neonataler Kardiomyozyten überprüft werden, welche zu hypertrophem Wachstum stimuliert wurden. Messparameter sollten Gesamtprotein, Proteinsynthese und Morphologie sein.

3. Methoden

Alle Lösungen und Puffer, Chemikalien, Materialien und Fertig-Kits und die verwendeten Geräte sind in jeweils eigenen Abschnitten unter 8. Anhang aufgelistet.

3.1 Zellkultur

3.1.1 Präparation von Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen

(Methode nach Simpson und Savion¹⁵¹)

Alle Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Materialien und Lösungen wurden entweder vom Hersteller keim- und pyrogenfrei geliefert oder waren durch vorangehendes Autoklavieren (mindestens 20 min bei 120 °C und 1,6 bar) in einem Sterilisator, bzw. durch Filtration durch einen sterilen Filter mit einer Porengröße von $\leq 0,2 \mu\text{m}$ von bakterieller Kontamination befreit worden.

Zwei Tage alten Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten), bzw. hPMCA4CI-transgenen Ratten (TG-Ratten) wurden die Herzen entnommen. Nach Spülen in *Calcium and Bicarbonate Free Hanks with Hepes* (CBFHH) mit 1,5 IE/ml Heparin-Natrium, um die Blutgerinnung zu unterbinden, wurden die Herzen mittels Skalpellern zerteilt und in 20 ml einer Fermentierlösung für die Kardiomyozytenpräparation überführt. Es folgten 2 Verdauungsschritte, während derer die Suspensionen aus Herzen und Fermentierlösung 20 Minuten bei niedriger Geschwindigkeit auf einem Magnetrührer und abschließend mit einer 10 ml Pipette gemischt wurden. Nach zweiminütigem Absetzen wurde der Überstand der Suspensionen, welcher herausgelöste Zellen enthielt, abgenommen, verworfen (da am Anfang des Verdaus übermäßig viele Nicht-Kardiomyozyten enthalten waren) und durch frische Fermentierlösung ersetzt.

Weitere 8-12 Verdauungsschritte von nur 5-minütiger Dauer wurden durchgeführt, bei welchen der Überstand, der nun überwiegend Kardiomyozyten enthielt, in 50 ml Probenröhrchen gesammelt wurde, in welchen zur Inaktivierung der Verdauungsenzyme jeweils 7,5 ml fetales Kälberserum (FCS) vorgelegt waren.

Nach Beendigung des Verdaus wurden die Zellen in einer Zentrifuge mit Ausschwingrotor 10 Minuten bei 150 x g pelletiert und der Überstand verworfen. Das

Pellet wurde in ca. 28 ml MEM/5 Medium resuspendiert und durch einen Zellstrainer hindurch auf zwei 10 cm Petrischalen verteilt.

Das sog. *Preplating* wurde 1 Stunde im Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ durchgeführt. Dabei wurde ausgenutzt, dass sich die in der Suspension enthaltenen Nicht-Kardiomyozyten (hauptsächlich Fibroblasten) wesentlich schneller absetzten und am Boden der Schale hafteten. Der Überstand mit den Kardiomyozyten wurde anschließend abgenommen, homogen gemischt und die enthaltenen vitalen Zellen unter Verwendung von Trypan-Blau in der Fuchs-Rosenthal-Kammer ausgezählt.

Jeweils 1,5 Millionen Zellen in 6 ml MEM/5 pro 6 cm Petrischale wurden für die Wachstumsversuche mit Bestimmung des Gesamtproteins, 700000 Zellen in 3 ml MEM/5 pro 6-Well für die Wachstumsversuche mit Bestimmung des ³H-Leuzin-Einbaus und 70000 Zellen in 750 µl MEM/5 pro 24-Well auf Glas-Objektträger für Immunfluoreszenz-Färbungen ausgesetzt.

3.1.2 Kultur der Kardiomyozyten aus neonatalen Rattenherzen

Nach der Präparation (s. 3.1.1.) folgte eine 24 stündige Absetz- und Anwachsphase, während derer die Kardiomyozyten in MEM/5 verblieben. Danach wurde das MEM/5 entfernt, die Schalen zweimal mit PBS gewaschen und das „Hungermedium“ MEM/TI zugegeben. Nach 48 Stunden, in welchen der Zellstoffwechsel in Abwesenheit wachstumsfördernder Stimuli auf ein basales Niveau abgesunken und geschädigte Zellen abgestorben waren, konnten man durch mikroskopische Auszählung die Dichte der Kardiomyozyten mit 150-200 Zellen/mm² bestimmen und die Zellkulturen für Wachstumsversuche und Immunfluoreszenz-Färbungen verwenden.

3.2. Stimuliertes Wachstum

3.2.1. Bestimmung der Zunahme des Gesamtproteins als Maß für das Zellwachstum

Am 3. Tag nach Präparation der Kardiomyozyten-Kulturen wurde das „Hungermedium“ MEM/TI (s.o.) abgenommen und, nach Waschen mit PBS, gegen frisches MEM/TI ersetzt, welches zusätzlich entweder 2 Vol% FCS, 2 µmol/l Norepinephrin (NE), 50 ng/ml *Platelet Derived Growth Factor BB* (PDGFBB) oder keinen Wachstumsstimulus ent-

hielt. Dazu wurden für jeden Stimulus (bzw. auch für die unstimulierten Kontrollzellen) für jede der festgelegten Inkubationszeiten 15h, 24h, 39h und 48h je zwei 6 cm Petrischalen von transgenen (TG-) Kardiomyozyten und Wildtyp (Sprague Dawley = SD) - Kardiomyozyten verwendet.

Nach Ablauf der Inkubationszeiten wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mittels eines Latex Zell-Scrapers in 700 µl PBS von den Petrischalen abgenommen und in 1,5 ml Eppendorf-Caps überführt. Durch kurzes (ca. 10 s) Zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge, max. 14000 x g) wurden die Zellen pelletiert und nach Entfernen des Überstandes durch Zufügen von 700 µl eines Lysis-Puffers für Gesamtprotein von Zellkulturen lysiert.

Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden photometrisch als Doppelwerte mit dem Bio-Rad DC Protein Assay bestimmt, welcher auf dem Prinzip der Lowry-Methode¹⁰⁵ die Messung SDS-haltiger Proben ermöglicht (s. 3.4.5.2.).

Zusätzlich wurde die DNA-Konzentration der Proben fluoreszenzphotometrisch, ebenfalls als Doppelwert, mit dem Hoechst 33258 Fluorochrom (siehe 3.5.) gemessen. Als Standards dienten dabei Proben von Lachs-Sperma-DNA bekannter Konzentration. Die DNA-Konzentration wurde als Maß für die Zahl der in den Proben enthaltenen Zellen angesehen, da durch das im Medium stets enthaltenen Bromodesoxyuridin (BrdU) eine DNA-Vermehrung bzw. eine Proliferation von Zellen (und Bakterien) unterbunden worden war.

Zur Auswertung wurde der Quotient aus den gemittelten Protein- und DNA-Konzentrationen (Protein/DNA) jeder Probe berechnet. Dieser stellte eine von der eingegangenen Zellzahl unabhängige Proteinkonzentration jeder Probe dar. Das Wachstum der Zellen wurde in Prozent als Quotient der Protein/DNA-Verhältnisse von stimulierten zu nicht stimulierten Zellen für jede Inkubationsdauer berechnet. In der Tabellenkalkulation Microsoft Excel wurde das Wachstum von TG- im Vergleich zu SD-Kardiomyozyten tabellarisch dargestellt.

3.2.2. Bestimmung des Einbaus von ³H-Leuzin als Maß für Proteinsynthese

Am 3. Tag nach Präparation der Kardiomyozyten-Kulturen wurde das „Hungermedium“ MEM/TI (s.o.) abgenommen und, nach Waschen mit PBS, gegen frisches MEM/TI ersetzt, welches zusätzlich entweder 2 Vol% FCS, 2 µmol/L Norepinephrin (NE), 50 ng/ml *Platelet Derived Growth Factor BB* (PDGFBB) oder keinen Wachstumsstimulus

enthielt. Dazu wurden für jeden Stimulus und für die unstimulierten Kontrollzellen für jede der festgelegten Inkubationszeiten 24h und 36h je zwei Schälchen auf einem 6-Well von transgenen (TG-) Kardiomyozyten und Wildtyp (Sprague Dawley = SD) - Kardiomyozyten verwendet.

Vier Stunden vor Ablauf der jeweiligen Inkubationszeit wurde das Medium wieder entfernt und nach erneutem Waschen mit PBS gegen ein gleichartiges Medium ersetzt, welchem zuvor Tritium-markiertes Leuzin in einer Endaktivität von 2,5 $\mu\text{Ci/ml}$ Medium zugesetzt worden war. Für die restlichen vier Stunden der Wachstumsstimulation verblieben die Zellen in diesem Medium.

Danach wurde das Medium entfernt, die Schälchen zwei Mal mit PBS gewaschen, die Zellen mit 750 μl 1% w/v (Gewicht/Volumen = 1g/100ml) SDS lysiert und in 2 ml Eppendorf-Caps überführt. Sodann wurden die DNA-Konzentrationen der Proben als Doppelwerte mit dem Hoechst 33258 Fluorochrom (siehe 3.5.) bestimmt.

Zum Rest der Proben (ca. 730 μl) wurden 500 μl 10% Trichloressigsäure (TCA) zugefügt und die enthaltenen Proteine für 30 min bei Raumtemperatur gefällt, welche anschließend durch 10-minütiges Zentrifugieren (Eppendorf-Zentrifuge, 14000 x g) pelletiert wurden. Die Überstände, welche das nicht in Protein eingebaute ^3H -Leuzin enthielten, wurden verworfen, während die Pellets nach zweimaligem Waschen mit 10% TCA in jeweils 750 μl 1% w/v SDS wieder aufgelöst wurden. Nach Überführung der Lösungen in Counter-Röhrchen und Zusetzen von jeweils 5 ml Szintillationsflüssigkeit konnte die enthaltene Radioaktivität in einem β -Counter quantitativ in *counts per minute* (CPM) gemessen werden (Zählzeit: 10 min/Probe an drei verschiedenen Meßpunkten).

Zur Auswertung wurde der Quotient aus den gemessenen CPM und gemittelten DNA-Konzentrationen (CPM/DNA) jeder Probe berechnet. Dieser stellte ein von der eingegangenen Zellzahl unabhängiges Maß für die Proteinsynthese der Kardiomyozyten jeder Probe dar. Die Synthesesteigerung der Zellen wurde in Prozent als Quotient der CPM/DNA-Verhältnisse von stimulierten zu nicht stimulierten Zellen für jede Inkubationsdauer berechnet. In der Tabellenkalkulation Microsoft Excel wurde die Zunahme der Proteinsynthese von TG- im Vergleich zu SD-Kardiomyozyten graphisch als Säulendiagramme dargestellt.

3.3. Immunfluoreszenz

Die hier verwendeten Antikörper wurden alle von den im Anhang angegebenen Herstellern bezogen. Lediglich die beiden polyklonalen Anti-PMCA-Antikörper (2A und 4N) wurden unserem Labor freundlicherweise von Dr. D. Guerini (ETH Zürich, Schweiz) überlassen.

3.3.1. Dreifachimmunfluoreszenz mit Färbung von Troponin, Aktin und Kernen

Kulturen von TG- und SD-Kardiomyozyten, welche zu diesem Zweck auf Glas-Objektträgern in 24-Well-Kulturschalen ausgesät worden waren, wurden ab dem 3. Tag nach der Präparation für weitere 24 h in MEM/TI inkubiert, welches entweder 2 Vol% FCS, 20 μ M NE oder keinen Wachstumsstimulus enthielt. Danach wurden die Zellen mit PBS gewaschen und bei Raumtemperatur für 30 Minuten in 2% w/v Paraformaldehyd (PFA) fixiert.

Nach erneutem Waschen mit PBS wurde für weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur Blockierlösung für Immunfluoreszenz auf die Zellen gegeben, um unspezifische Bindungen zu unterdrücken. Absaugen der Blockierlösung und Waschen mit PBS folgten, bevor ein monoklonaler Maus-Anti-Troponin-T-Antikörper in einer Verdünnung von 1:400 in PBS zugegeben wurde. Auf jeweils 2 Wells von TG- und SD-Kardiomyozyten wurde als Negativ- und Spezifitätskontrolle nur PBS (ohne Antikörper) gegeben. Die Inkubation mit dem Primärantikörper wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt. Am nächsten Tag wurde der Primärantikörper entfernt, erneut mit PBS gewaschen und die Zellen bei Raumtemperatur, im Dunkeln (zur Vermeidung des Ausbleichens der Farbstoffe) für eine Stunde in PBS mit 1:2000 4,6-Diamidino-2-Phenylindol-Lösung (DAPI; Kernfärbung), 166 nmol/l Phalloidin (Aktinfilamentfärbung) und 1:500 Cy²-markiertem Ziegen-Anti-Maus-Antikörper inkubiert. Die Wells für die Negativkontrollen wurden dabei zum einen nur mit dem markierten Anti-Maus-Antikörper (in PBS) und zum anderen mit PBS ohne jegliche fluoreszierende Substanz inkubiert.

Nach Entfernung der Fluoreszenzfarbstoffe und 5-maligem Waschen der Zellen mit PBS wurden die Glas-Slides in Mowiol auf Glasobjektträgern eingedeckt und die Ränder der Slides mit klarem Nagellack versiegelt um die Austrocknung zu verhindern.

Anschließend konnten die Präparate unter einem Zeiss-Fluoreszenz-Mikroskop ausgewertet werden. Dabei wurden folgende Anregungswellenlängen für die einzelnen Fluo-

reszenzfarbstoffe verwendet: DAPI – 350 nm; Phalloidin – 596 nm; Cy²: 490 nm. Auswertungskriterien waren Form und Größe der Zellen im Vergleich von stimulierten zu nicht stimulierten Zellen und im Vergleich von SD- zu TG-Kardiomyozyten. Außerdem konnte die Kontamination der Kardiomyozyten-Kulturen durch Nicht-Kardiomyozyten anhand der Troponin-T-Färbung überprüft werden. Die Ergebnisse wurden durch beispielhafte Fotoaufnahmen dokumentiert.

3.3.2. Doppelimmunfluoreszenz mit Färbung von Caveolin-3 und PMCA

Die Vorbereitung der Zellen wurde bis zur Entfernung der Blockierlösung wie unter 3.3.1. beschrieben durchgeführt. Ebenfalls über Nacht bei 4°C erfolgte die gleichzeitige Inkubation mit den beiden Primärantikörpern: monoklonaler Maus-Anti-Caveolin-3-Antikörper (1:500) und polyklonaler Kaninchen-Anti-PMCA-Antikörper (1:500) in PBS. Als Negativkontrollen wurden jeweils 4 Wells von TG- und SD-Kardiomyozyten verwendet, von denen je 1 Well nur mit dem Anti-Caveolin-3-Antikörper, je 1 Well nur mit dem Anti-PMCA-Antikörper und je 2 Wells nur mit PBS inkubiert wurden. Nach Entfernung der Primärantikörper-Lösung und Waschen mit PBS erfolgte die gemeinsame Inkubation mit den fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern Cy²-konjugierter Ziegen-Anti-Maus-Antikörper (1:250) und Texas-Red-konjugierter Maus-Anti-Kaninchen-Antikörper (1:500) in PBS. Nach Art einer Kreuzprobe wurden die Wells für die Negativkontrolle, die mit einem Maus-Primärantikörper inkubiert worden waren, nun mit dem Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper, die mit dem Kaninchen-Primärantikörper mit dem Anti-Maus-Sekundärantikörper inkubiert. Die beiden Wells ohne Primärantikörper wurden jeweils mit einem der beiden Sekundärantikörper versehen. Nach einer Stunde bei Dunkelheit und 4°C wurden die Antikörper wieder entfernt, mit PBS gewaschen und die Präparate wie unter 3.3.2. beschrieben eingedeckt und versiegelt.

Die Auswertung erfolgte an einem Bio-Rad-Zeiss-Konfokal-Mikroskop. Dabei wurden Bilder mit den Anregungswellenlängen 490 nm für Cy² und 596 nm für Texas-Red aufgenommen, welche mit der zugehörigen "Laser-Sharp-Software" der Fa. Bio-Rad additiv überlagert wurden. Die Orte der Kolo-kalisation von Caveolin-3 und PMCA konnten so durch die Entstehung einer gelben Färbung identifiziert werden. Zur Dokumentation wurden beispielhafte Ausschnitte ausgedruckt.

3.4. Protein

3.4.1. Präparation gereinigter Plasmamembranen aus Herzen 5 Tage alter Ratten

(Sarkolemma-Präparation, SL-Präparation)

Alle Arbeitsschritte dieser Präparation wurden auf Eis durchgeführt. Sämtliche Puffer und Lösungen wurden vor Gebrauch im Eiswasser gekühlt.

Die Herzen von 5 Tage alten Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten), bzw. hPMCA4CI-transgenen Ratten⁶⁴ wurden durch Dekapitation und Thorakotomie entfernt, kurz in physiologischer Kochsalzlösung ausgespült und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Jeweils ca. 40 dieser Herzen wurden mit dem etwa fünffachen Volumen Puffer 1 für SL-Präparation überschichtet, in einem Ultra-Turrax-Tissue-Grinder zerkleinert und anschließend in einem Glashomogenisator zerrieben. Nach 5-minütigem Zentrifugieren (Festwinkelrotor, 500 x g, 4°C) wurde der Überstand abgenommen und für 30 Minuten bei 12000 x g, 4°C zentrifugiert, während das Pellet verworfen wurde. Der Überstand der Zentrifugation wurde abgenommen und mit Puffer 2 für SL-Präparation auf das 2,5-fache Volumen aufgefüllt. Zu diesem Gemisch wurde anschließend das 3-fache Volumen Puffer 3 für SL-Präparation zugegeben. Die so entstandene Lösung enthielt neben den Zellproteinen 247,5 mmol/l Sucrose, 1 mmol/l Imidazole, 114 mmol/l NaCl, 28,5 mmol/l MOPS, 81,25 µmol/l PMSF und jeweils 1 mg/ml Leupeptin, Aprotinin und Pepstatin. Daraufhin wurde die Lösung auf die Röhrchen einer Ultrazentrifuge verteilt und 90 Minuten bei 160000 x g in einem Ausschwingrotor zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets (welche nun die gereinigten Plasmamembranen enthielten) wurden in einer möglichst geringen Menge Puffer 4 für SL-Präparation resuspendiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration mit dem Bio-Rad Protein Assay wurden die Proben bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

3.4.2. Detergenzextraktion von Proteinen aus gereinigten Plasmamembranen

(Methode nach Schnitzer et al. 1995¹⁴³)

Gereinigte Plasmamembranen (s. 3.4.1.) von 5 Tage alten SD-Ratten (ca. 100 µg Protein pro Probe) wurden nach Zusetzen eines Lysis-Puffers für Detergenzextraktion, welcher entweder 1% w/v SDS, 60 mmol/l β-D-Glucopyranosid (βOG), 2 Vol% Triton X-100 oder 1,5% w/v Digitonin enthielt, für 1 Stunde bei 4°C unter leichtem Schütteln lysiert. Durch einstündige Zentrifugation bei 14000 x g und 4°C wurden die gelösten und

ungelösten Bestandteile der Membranen separiert. Überstände und Pellets wurden voneinander getrennt und die Überstände in SDS-haltigem Lysis-Puffer für Detergenzextraktion aufgelöst. Nach Bestimmung der Proteinkonzentrationen der Proben mit dem Bio-Rad-DC-Proteinassay (s. 3.4.5.2.) wurden gleiche Mengen Protein im Western-Blot (s. 3.4.6.) auf das Vorhandensein von PMCA und Caveolin-3 überprüft.

3.4.3. Präparation Caveolae-reicher Membranen aus sarkolemmalen Membranen

(Methode nach Song et al. 1996¹⁵⁵)

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und unter Verwendung eiskalter Puffer und Lösungen durchgeführt.

Gereinigte Plasmamembranen (s. 3.4.1.) von 5 Tage alten SD-Ratten (ca. 1,2 mg Protein) wurden mit 500 mmol/l Natriumcarbonat, pH 11, auf 2 ml Gesamtvolumen aufgefüllt. Durch Ultraschallbehandlung mit einem Ultraschallstab (5 Stöße à 20 Sekunden, 25 kJ) wurden die Membranen zerkleinert und anschließend mit 2 ml Sucrose 90 für Caveolae-Präparation auf eine Gesamtkonzentration von 45% w/v Sucrose, 25mmol/l MES, 150 mmol/l NaCl gebracht. Das Gemisch wurde am Boden eines 12 ml Röhrchens für die Ultrazentrifuge platziert und durch Übersichtung mit je 4 ml Sucrose 35 und Sucrose 5 für Caveolae-Präparation ein diskontinuierlicher 5-35-45% Sucrosegradient erstellt. Anschließend wurden die Membranstücke durch 20-stündiges Zentrifugieren im Ausschwingrotor bei 160000 x g, 4°C aufgetrennt. 12 Fraktionen à 1 ml wurden von oben beginnend abgenommen und deren Proteinkonzentration mit dem Bio-Rad Proteinassay (s. 3.4.5.1.) bestimmt. Daraus wurde der prozentuale Anteil jeder Fraktion an der Gesamtmenge des eingesetzten Proteins berechnet. Sodann wurde eine konstante Menge Protein aus jeder Fraktion im Western-Blot (s. 3.4.6.) auf das Vorliegen von PMCA und Caveolin-3 untersucht und dem Anteil am Gesamtprotein gegenübergestellt.

3.4.4. Immunpräzipitation von Caveolin, PMCA und Dystrophin

(Methode nach Lisanti et al. 1996¹⁵⁵)

Die hier verwendeten Antikörper wurden alle von den im Anhang angegebenen Herstellern bezogen. Lediglich die beiden polyklonalen Anti-PMCA-Antikörper (2A und 4N) wurden unserem Labor freundlicherweise von Dr. D. Guerini (ETH Zürich, Schweiz) überlassen.

Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis und unter Verwendung eiskalter Puffer und Lösungen durchgeführt. *Pre-Clearing*, Immunkomplexbildung und Bindung an Protein A fanden im Kühlraum bei 4°C statt.

1,5 mg Protein aus gereinigten sarkolemmalen Membranen (s. 3.4.1.) von SD- und TG-Ratten wurden im 6,5-fachen Volumen Immunpräzipitationspuffer (IP), welcher als Detergenz entweder 1 Vol% Triton X-100 und 60 mmol/l β -D-Glucopyranosid, 2% w/v CHAPS oder 2,5 % w/v Digitonin enthielt, für 15 Minuten im Ultraschallbad lysiert.

Anschließend wurde durch Zugabe von 50 μ l einer 1:1 ProteinA/Sepharose : PBS Suspension (ProtA/S) und 1-stündiges Mischen der Proben bei langsamer Umdrehung auf einem Rotary-Mixer ein *Pre-Clearing* durchgeführt, bei welchem unspezifisch an ProtA/S bindende Proteine aus der Lösung entfernt wurden. In einem Zentrifugationsschritt (1 Stunde, 4°C, 14000 x g, Zentrifuge mit Festwinkelrotor) wurde das Lysat von ungelöstem Material und ProtA/S getrennt. Der Überstand wurde abgenommen und durch Bestimmung der Proteinkonzentration und Berechnung des Zielvolumens daraus, zur Standardisierung mit IP auf 1 mg Protein/ml verdünnt. Sodann wurde die Probe gleichmäßig auf 6 Ansätze verteilt.

Zu diesen wurden 6 verschiedene Antikörper jeweils in einer Verdünnung von 1:125 (=2 μ g Antikörper pro 1000 μ g Protein) zugegeben: monoklonaler Maus-Anti-Caveolin-3-Antikörper, polyklonaler Maus-Anti-Caveolin-3-Antikörper, monoklonaler Maus-Anti-PMCA-Antikörper ("5F10"), polyklonaler Kaninchen-Anti-PMCA-Antikörper (2A-AK), monoklonaler Maus-Anti-Dystrophin-Antikörper und monoklonaler Maus-Anti-Östrogenrezeptor-Antikörper (als unspezifischer Antikörper). Als zusätzliche Negativkontrolle wurde ein 7. Ansatz hergestellt, welcher den 5F10-Ak und anstelle des Lysats nur IP enthielt. Zur Immunkomplexbildung wurden die 7 Proben bei langsamer Umdrehung 7 Stunden auf dem Rotary-Mixer gemischt. Anschließend wurde jeder Probe das 0,5-fache Volumen ProteinA/S zugesetzt und über Nacht erneut bei langsamer Umdrehung auf dem Rotary-Mixer gemischt. Während dieses Schrittes sollten die Immunkomplexe an den F_c-Rezeptor des Protein A binden. Durch Puls-Zentrifugation (5 Sekunden, 14000 U/min) wurden die ProtA/S-Kügelchen pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 3 Mal mit PBS gewaschen.

Durch Resuspendieren der Pellets in 40 μ l Puffer 4 für SL-Präparation (s. 3.4.1.) und 40 μ l 3-fach Sample-Puffer für Western-Blot (s. 3.4.6.) und anschließendem Erhitzen der

Proben (10 min, 95°C) wurden die Antikörper-Protein-A- und Immunkomplex-Bindungen wieder gelöst. Nach erneuter Puls-Zentrifugation wurden die Überstände abgenommen und direkt im Western-Blot auf Vorhandensein von Caveolin-3 und PMCA überprüft. Dabei wurde pro Spur etwa die Hälfte eines Überstandes verwendet.

3.4.5. Messung der Proteinkonzentration

Beide genannten Methoden basieren auf der Methode nach Lowy¹⁰⁵, welche auf der photometrischen Bestimmung der Farbreaktion zwischen dem Folin-Ciocalteu Phenol Reagenz mit Tyrosyl-Resten des zu bestimmenden Proteins basiert. Der Einfachheit und leichteren Standardisierung wegen, wurden zwei Fertig-Kits von Bio-Rad verwendet, je nachdem welche Art von Proben gemessen werden sollte.

3.4.5.1. Bio-Rad Protein Assay

Die Proteinkonzentration der Proben, welche kein Detergenz enthielten (3.4.1. SL-Präparation und 3.4.3. Caveolae-Präparation) wurden mit diesem Assay bestimmt. Die Proben wurden nach den Angaben des Herstellers (Bio-Rad) verarbeitet und bei 595 nm gegen einen Leer-Ansatz im Photometer gemessen. Dabei verwendete das Gerät eine vorher erstellte und gespeicherte Eichgerade mit BSA als Standard zur automatischen Berechnung der Konzentration aus der Extinktion nach dem Lambert-Beer-Gesetz ($E = \epsilon \cdot c \cdot d$).

3.4.5.2. Bio-Rad DC Protein Assay

Diese Methode wurde für die Proben, welche SDS (bzw. Detergenzien) enthielten durchgeführt (3.2.1. Gesamtprotein aus Zellkultur, 3.4.2. Detergenzextraktion), da der „einfache“ Protein Assay nicht mit SDS kompatibel ist. Zur Messung solcher Proben stellt Bio-Rad einen Assay zur Verfügung, bei welchem durch ein zusätzliches Reagenz der störende Einfluss des SDS auf die Farbreaktion unterbunden wird. Die Proben wurden nach den Angaben des Herstellers verarbeitet und bei 750 nm gegen einen Leer-Ansatz im Photometer gemessen. Wiederum diente eine vorher erstellte und gespeicherte Eichgerade mit BSA als Standard zur automatischen Konzentrationsberechnung.

3.4.6. Western-Blot-Analyse

(Methode nach Laemmli 1970⁹¹)

Die Western-Blot-Analyse wurde zur semiquantitativen Auswertung der Versuche der Detergenzextraktion (3.4.2.), der Präparation Caveolae-reicher Membranen (3.4.3.) und zur qualitativen Auswertung der Immunpräzipitations-Versuche (3.4.4.) verwendet. Ziel war jeweils der gleichzeitige Nachweis von Caveolin-3 und PMCA in den untersuchten Proben.

Bei der semiquantitativen Auswertung wurden jeweils gleiche Mengen Protein aus jeder Probe entnommen, mit Puffer 4 für SL-Präparation auf gleiche Volumina aufgefüllt und 3-fach Sample-Puffer für Western-Blot im Verhältnis 3:1 zugegeben. Bei der qualitativen Auswertung wurden jeweils gleiche Volumina aus den Immunpräzipitations-Proben direkt eingesetzt. In jedem Fall wurden die Proben vor der Elektrophorese für 5 Minuten bei 95°C und anschließend für 20 Minuten bei 25°C vorinkubiert, um etwaige Protein-Protein-Interaktionen zu lösen.

Die so vorbereiteten Proben wurden auf 4-20% SDS-Polyacrylamid-Gele (Fertiggele der Fa. Bio-Rad) mit linearem Gradienten aufgetragen. Zusätzlich wurde auf jedem Gel jeweils 1 Bahn mit einem farbigen Protein-Größenstandard (*prestained* Kaleidoskop-Marker) und einer Positivkontrolle (ca. 10-20 µg SL-Protein mit 3-fach Sample-Puffer im Verhältnis 3:1) beladen. Es folgte die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) mit einer ca. 10-minütigen Einlaufphase bei 70V und einer individuell langen Trennphase bei 120V. Anhand der Laufdistanz des Markers und der Bromophenolblau-Front wurde die Elektrophorese zu dem Zeitpunkt unterbrochen (nach ca. 90 Minuten), zu welchem eine optimale Auftrennung erreicht war. Anschließend wurden die Gele für 30 Minuten in Transferpuffer für Western-Blot äquilibriert.

Der Proteintransfer erfolgte auf eine PVDF-Membran, welche entsprechend den Herstelleranweisungen vorbereitet worden war (jeweils kurze Äquilibrierung in Methanol, Aqua dest. und Transferpuffer). Dazu wurden *Sandwichs* aus Whatman Filtern, Gelen, Membranen und wiederum Whatman Filtern geschichtet und in der Blotting-Kammer in Transferpuffer 18 Stunden bei einer konstanten Stromstärke von 100 mA geblottet. Zur Vermeidung einer Überhitzung wurde in die Kammer zusätzlich ein Kühlakku eingesetzt.

Danach wurden die PVDF-Membranen 30 Minuten in 50% Methanol äquilibriert und zur groben Überprüfung des gelungenen Transfers für 2 Minuten in Ponceaurot-Lösung angefärbt. Nach einigen Waschvorgängen mit Aqua dest. konnten die unspezifisch gefärbten Proteinbanden und die Gleichmäßigkeit der Beladung der einzelnen Bahnen beurteilt werden.

Um eine unspezifische Bindung der später eingesetzten Antikörper zu unterdrücken, wurden die Membranen anschließend 1 Stunde bei Raumtemperatur in Blockierlösung für Western-Blot auf einem Kipp-Shaker inkubiert. Danach wurden die Membranen unter Orientierung an den Markerbanden mit einem Skalpell ungefähr in einer Höhe von 70-72 kDa geschnitten.

Es folgte die 1-stündige Inkubation in der Primäantikörper Lösung, wobei bei den oberen Anteilen der Membranen (Markerbanden 200–70 kDa) der monoklonale Anti-PMCA-Antikörper, bei den unteren Anteilen (Markerbanden 70–7 kDa) der monoklonale Anti-Caveolin-3-Antikörper (Verdünnung jeweils 1:1000) eingesetzt wurde. Auch dieser Schritt (wie auch die folgenden Schritte) wurde zur gleichmäßigen Inkubation auf einem Kipp-*Shaker* durchgeführt. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper schloss sich eine ca. 35-minütige Waschphase in Waschlösung 1 an, wobei die Waschlösung 5 Mal gewechselt wurde. Wiederum für 1 Stunde erfolgte die Inkubation mit den Meerrettichperoxidase konjugierten Sekundäantikörpern. Auch hiernach erfolgten 2 jeweils 15-minütige Waschphasen, zuerst mit Waschlösung 2, dann mit Waschlösung 1 für Western-Blot, wiederum mit 5-fachem Austauschen der Lösungen.

Zum Schluss wurde mit den Membranen eine Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt. Dazu wurde ein Fertig-Kit (ECL-Kit) nach den Anweisungen des Herstellers benutzt. Den so behandelten Membranen wurden in einer Film-Kassette für verschiedene Zeiten Filme exponiert und anschließend maschinell entwickelt. Die sichtbaren Banden wurden anhand ihrer Stärke und in Bezug auf den Größenstandard und die Positiv- bzw. Negativkontrollen beurteilt.

Um die Membranen erneut verwenden zu können (z.B. zur Inkubation mit anderen Antikörpern, Spezifitätskontrolle mit Sekundäantikörper, s.u., usw. ...) mussten sie gestrippt werden, ein Vorgang, bei welchem die gebundenen Antikörper entfernt werden, während die zu untersuchenden Proteine an den Membranen fixiert bleiben. Dazu wurden die Membranen 30 min bei 55°C in einem Hybridisierungs-Ofen bei langsamer

Umdrehung in Striplösung für Western-Blot inkubiert. Anschließend wurde die Striplösung durch 30-minütiges Waschen in PBS (5-facher Austausch) für Western-Blot entfernt. Zur Überprüfung des Strip-Erfolges wurden die Membranen der Chemilumineszenz-Reaktion (ECL-Kit) unterzogen. Ein Ausbleiben der Filmschwärzung wurde als vollständige Entfernung der Antikörper angesehen.

Danach konnten die Membranen entweder mit anderen Primär- und Sekundärantikörpern oder als zusätzliche Spezifitätskontrolle nur mit dem zuvor verwendeten Sekundärantikörper inkubiert werden. Damit sollte eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers an die zu untersuchenden Proteine ausgeschlossen werden. Das Vorgehen war dabei wie bereits weiter oben beschrieben, mit der Ausnahme, dass die Inkubation mit dem Primärantikörper und die nachfolgenden Waschschrte in Waschlösung 1 übersprungen wurden. Ausreichende Spezifität wurde angenommen, wenn bei gleicher Expositionsdauer der Membranen gegenüber dem Film bei der Spezifitätskontrolle keine Schwärzung der zuvor nachgewiesenen Proteinbanden auftrat.

3.5. Konzentrationsbestimmung von DNA

(Methode nach Cesarone et al. 1979³⁴)

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration in den Proben der Wachstumsversuche (s. 3.2.) als Maß für die eingegangene Zellzahl wurde eine Methode verwendet, welche auf der fluoreszenzphotometrischen Bestimmung der Bindung des Hoechst 33258 Fluorochroms an DNA basiert. Dazu wurden jeweils 20 µl der Proben 1:100 mit SSC verdünnt und 1 ml Hoechst 33258 Fluorochrom in einer Konzentration von 1,5 µmol/l (in SSC) zugesetzt. Nach 15-minütiger Reaktionszeit wurde die 450 nm Emission in einem Fluoreszenzphotometer bei einer Exzitationswellenlänge von 360 nm gemessen. Zur Leerwertbestimmung wurde eine Probe ohne Zell-Lysat eingesetzt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte automatisch durch das Gerät anhand einer vorher erstellten und gespeicherten Eichgerade aus bekannten Konzentrationen von Lachs-Sperma-DNA.

3.6. Statistische Auswertung

Die Ergebnisse der Wachstumsversuche (siehe 3.2.) wurden zusammengefasst, indem aus den prozentualen Wachstumssteigerungen für jede Inkubationsdauer der Mittelwert

gebildet und der dazu gehörige Standardfehler des Mittelwerts (SEM) berechnet wurde. Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen für SD- und TG-Ratten wurden mit dem Student-T-Test (zweiseitig, eindimensional) auf Signifikanz überprüft. Dabei wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ als signifikant angesehen.

Sämtliche Berechnungen wurden mit der Tabellenkalkulation Microsoft Excel durchgeführt.

4. Resultate

4.1. Stimuliertes Wachstum

Wie bereits in Kapitel 2 dargelegt, sollten im Rahmen dieser Arbeit Unterschiede zwischen normalen Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) und transgenen (TG) Ratten, welche die hPMCA4CI myokardspezifisch überexprimierten, aufgedeckt werden. Als Basis dafür diente ein Analogieschluss zu den Ergebnissen, die zuvor in unserem Labor bei Differenzierungsversuchen an normalen und hPMCA4CI-transgenen L6-Myoblasten erzielt worden waren⁶³.

Die Versuche stellten prinzipiell die Übertragung der Experimente an L6-Zellen auf ein Modell mit Kardiomyozyten dar. Dabei wurde jedoch nicht die Aktivität der Kreatinphosphokinase (als Differenzierungsmarker) gemessen, da dieses Enzym keinen geeigneten Differenzierungsparameter im Myokard darstellt und diese Zellen bereits differenziert sind. Statt dessen wurden zwei Wachstumsparameter gemessen (Einbauraten von radioaktiv markiertem Leuzin als Maß für die Proteinsynthese und Zunahme des Gesamtproteins), welche als Maß für Zellwachstum und -hypertrophie angesehen wurden. Dabei wurde erwartet, mit der Methode des ³H-Leuzin-Einbaus, größere Unterschiede beobachten zu können, da hierbei nicht ein kumulativer Effekt vor dem großen Hintergrund des Gesamtzellproteins (wie in 4.1.2.), sondern ein dynamischer Prozess bestimmt wurde, der aus mathematischer Sicht etwa der Steigung (1. Ableitung) der „Wachstumskurve“ aus Tabelle 5 (siehe 4.1.2.) entsprechen sollte. Die Resultate, welche mit der Methode der Gesamtproteinmessung erzielt wurden, sollten somit als Bestätigung der Phänomene dienen, die bei der Messung der Proteinsynthese gesehen wurden.

Da sowohl der ³H-Leuzin-Einbau als auch die Gesamtproteinkonzentration jeweils auch von der Zellzahl abhängig waren, musste noch ein zweiter Parameter bestimmt werden, welcher die Zellzahl erfasste. Hierzu wurde der DNA-Gehalt der Proben bestimmt, da durch das stets im Medium enthaltene Basenanalogen Bromodesoxyuridin (BrdU) eine DNA-Vermehrung und Zellteilung (v.a. der Nicht-Kardiomyozyten) ausgeschlossen wurde und die DNA-Menge somit proportional zur Zellzahl sein sollte. Als Wachstumsstimulanzien dienten „klassische“ hypertrophe Stimuli, wie sie in der Lite-

ratur beschrieben worden waren. Dabei wurde sowohl ein pluripontenter Stimulus (2 Vol% fetales Kälberserum, FCS), als auch andere Stimuli (2 $\mu\text{mol/l}$ Noradrenalin, NE und 50 ng/ml *Platelet Derived Growth Factor BB*, PDGFBB) ausgewählt (siehe Kapitel 1.4.), deren Signaltransduktion zumindest teilweise aufgeklärt ist¹⁷⁷, bzw. für welche bereits Vorstellungen über die zelluläre Lokalisation ihres Rezeptor-Moleküls existieren¹⁰².

4.1.1. Bestimmung des Einbaus von ³H-Leuzin als Maß für Proteinsynthese

Insgesamt wurden 5 unabhängige Versuche mit FCS, 1 Versuch mit PDGFBB und 2 unabhängige Versuche mit NE (Noradrenalin) durchgeführt.

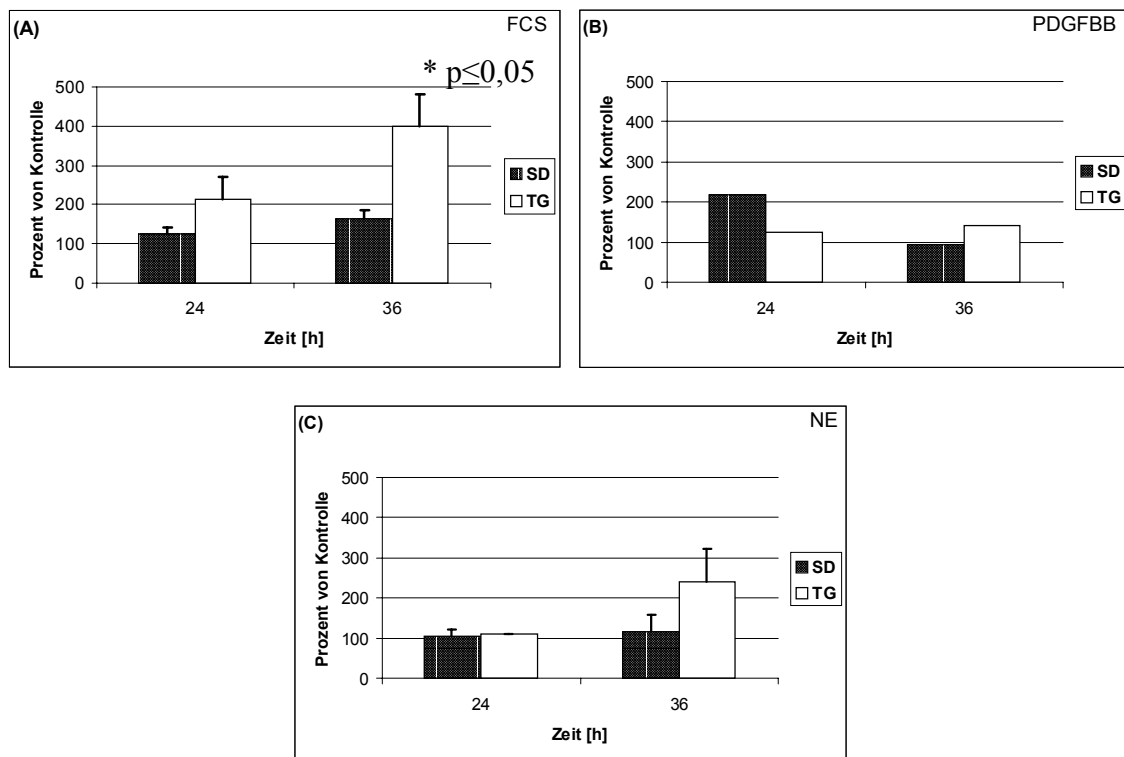


Abbildung 5 A-C: Zunahme des ³H-Leuzin-Einbaus von normalen (SD) und transgenen (TG) Kardiomyozyten unter Stimulation mit **2 Vol% FCS (A, n=5)**, **50 ng/ml PDGFBB (B, n=1)** und **2 $\mu\text{mol/l}$ NE (C, n=2)** in Bezug auf unstimulierte Kontrollzellen nach den zwei Zeitpunkten 24h und 36h. Die einzelnen Balken stellen jeweils das Verhältnis des ³H-Leuzin-Einbau/DNA-Quotienten der stimulierten Zellen im Bezug zum ³H-Leuzin-Einbau/DNA-Quotienten der unstimulierten Kontrollzellen in Prozent dar (**Prozent von Kontrolle**). Die eingezeichneten Fehlerindikatoren repräsentieren den Standardfehler des Mittelwertes (SEM), der aus den Prozentwerten der Einzelversuche für jeden Zeitpunkt berechnet wurde. Der Student-T-Test ergab bei Stimulation mit FCS nach 36h einen signifikanten (* $p \leq 0,05$) Unterschied zwischen SD- und TG-Kardiomyozyten.

Es zeigte sich, dass alle drei Stimuli den Einbau von ^3H -Leuzin steigern konnten (siehe Abbildung 5). Dabei wurde eine Erhöhung um bis zu 299% (TG nach 36 h mit FCS) gegenüber den Kontrollen erreicht. Demgegenüber zeigte NE eine maximale Steigerung um 141% (TG nach 36 h) und PDGFBB „nur“ um 117% (SD nach 24 h).

Wichtigste Beobachtung war jedoch, dass die TG-Kardiomyozyten im Vergleich zu SD-Kardiomyozyten wesentlich stärker auf mindestens zwei der drei Stimuli reagierten (siehe Abbildung 5). So war die Zunahme der Proteinsynthese der TG bei Stimulation mit FCS nach 24 h um den Faktor 4,6 (TG: $114 \pm 57\%$; SD: $25 \pm 15\%$), nach 36 h um den Faktor 4,7 (TG: $299 \pm 82\%$; SD: $64 \pm 22\%$) größer, als die der SD-Kardiomyozyten. Mit NE war der Zuwachs bei TG nach 24 h 2,3-fach (TG: $9 \pm 3\%$; SD: $4 \pm 17\%$), nach 36 h 8,8-fach (TG: $141 \pm 82\%$; SD: $16 \pm 41\%$) größer als bei SD. Die Stimulation mit PDGFBB zeigte kein eindeutiges Ergebnis: nach 24 h war die Proteinsynthese der SD-deutlich gegenüber den TG-Kardiomyozyten erhöht (TG: 25%; SD: 117%), nach 36 h herrschten umgekehrte Verhältnisse (TG: 42%; SD: -7%).

Die statistische Auswertung mit dem Student-T-Test ergab bei der Stimulation mit FCS nach 36 h einen signifikanten ($p \leq 0,05$) Unterschied zwischen TG und SD.

4.1.2. Bestimmung der Zunahme des Gesamtproteins als Maß für Zellwachstum

Insgesamt wurden 3 unabhängige Versuche mit FCS, 2 unabhängige Versuche mit PDGFBB und 1 Versuch mit NE durchgeführt.

Es zeigte sich sowohl bei TG- als auch SD-Kardiomyozyten bei allen drei verwendeten Stimuli eine Zunahme des (Gesamt-)Protein/DNA-Verhältnisses, bezogen auf die unstimulierten Kontrollzellen (ab hier kurz als „Wachstum“ bezeichnet). Dabei verursachte FCS den stärksten, PDGFBB einen mittleren und NE den geringsten Anstieg: maximal +54% mit FCS, maximal +47% mit PDGFBB, maximal + 30% mit NE, jeweils nach 39 h bei TG-Kardiomyozyten. Im zeitlichen Verlauf konnte bei FCS und PDGFBB sowohl mit TG- als auch mit SD-Kardiomyozyten ein Maximum des „Wachstums“ nach 39 h beobachtet werden, während die Werte nach 48 h wieder abfielen. Ein gleichartiger Verlauf konnte auch bei TG-Kardiomyozyten beobachtet werden, welche mit NE stimuliert worden waren, während in diesem Fall die SD-Kardiomyozyten erst nach 48 h ihr Maximum erreicht hatten (siehe Tabelle 5).

Die auffälligste und möglicherweise wichtigste Beobachtung war jedoch auch hier, dass die TG-Kardiomyozyten bei allen drei Stimuli eine größere Bereitschaft zum „Wachstum“ zeigten, als SD-Kardiomyozyten. So lag das „Wachstum“ mit FCS bis 39 h von TG um den Faktor 1,5 höher als bei SD (TG: $54 \pm 16\%$ Zunahme von Protein/DNA gegenüber unstimuliert; SD: $36 \pm 19\%$ Zunahme), bis zu den Zeitpunkten 15 h und 24 h sogar um den Faktor 2,25 (TG: $27 \pm 4\%$; SD: $12 \pm 5\%$) und 1,6 (TG: $24 \pm 3\%$; SD: $15 \pm 16\%$). PDGFBB vermochte das „Wachstum“ von TG bis 39 h um den Faktor 2,14 (TG: $47 \pm 6\%$; SD: $22 \pm 17\%$), NE um den Faktor 3,0 (TG: 10% ; SD: 30%) gegenüber SD zu steigern (siehe Tabelle 5).

A		FCS (n = 3)			
Zeit [h]	SD [%] ± SEM	TG [%] ± SEM			
15	112 ± 5	127 ± 4			
24	115 ± 16	124 ± 3			
39	136 ± 18	154 ± 16			
48	117 ± 13	143 ± 8			

B		PDGFBB (n = 2)			
Zeit [h]	SD [%] ± SEM	TG [%] ± SEM			
15	120 ± 6	113 ± 15			
24	101 ± 3	104 ± 6			
39	122 ± 16	147 ± 6			
48	105 ± 2	137 ± 8			

C		NE (n = 1)	
Zeit [h]	SD [%]	TG [%]	
15	102	106	
24	95	110	
39	110	130	
48	124	116	

Tabelle 5: Zunahme des Protein/DNA-Quotienten von normalen (SD) und transgenen (TG) Kardiomyozyten unter Stimulation mit **2 Vol% FCS** (A, n=3), **50 ng/ml PDGFBB** (B, n=2) und **2 µmol/l NE** (C, n=1) in Bezug auf unstimulierte Kontrollzellen nach den vier Zeitpunkten 15h, 24h, 39h und 48h. Die einzelnen Werte stellen jeweils das Verhältnis des Protein/DNA-Quotienten der stimulierten Zellen im Bezug zum Protein/DNA-Quotienten der unstimulierten Kontrollzellen in Prozent dar (**Prozent von Kontrolle**). Der angegebene Standardfehler des Mittelwertes (**SEM**) wurde aus den Prozentwerten der Einzelversuche für jeden Zeitpunkt berechnet.

4.2. Dreifachimmunfluoreszenz mit Färbung von Troponin, Aktin und Kernen

Die Ergebnisse aus 4.1.1. und 4.1.2. zeigten das Phänomen einer erhöhten Wachstumsbereitschaft bei TG-Kardiomyozyten. Als nächstes sollte untersucht werden, ob dieses mit auffälligen morphologischen Unterschieden zwischen den transgenen und normalen Zellen einherging. Dazu wurde eine relativ einfache fluoreszenzmikroskopische Methode herangezogen, bei welcher Troponin T, Aktin und Kerne angefärbt wurden. Zur Darstellung der Veränderungen durch Wachstumsstimulation wurde ein Teil der Zellen für 24 h, wie in 4.1.1 und 4.1.2., mit 2 Vol% FCS oder 2 $\mu\text{mol/l}$ NE inkubiert. Bei der Auswertung wurde vor allem auf Größe, Form und Querstreifung der Zellen geachtet. Hiermit sollten auffällige qualitative Unterschiede erfasst werden. Zusätzlich wurde die Kontamination der Zellkulturen durch Nicht-Kardiomyozyten (v.a. Fibroblasten) anhand der Abwesenheit von Troponin T in Nicht-Kardiomyozyten beurteilt.

Generell zeigte sich eine Vergrößerung der Zellen nach 24-stündiger Stimulation, welche auch mit einer Zunahme der Querstreifung einherging. Grobe qualitative Unterschiede in der Morphologie von TG- und SD-Kardiomyozyten wurden mit dieser Methode nicht festgestellt. Der Anteil an Nicht-Kardiomyozyten in den Kulturen betrug in der Regel $\leq 10\%$. Dieses Ergebnis wurde vor allem bezüglich der Wachstumsversuche (siehe 4.1.) als wichtige Kontrolle gewertet, da dadurch bestätigt wurde, dass die gemessenen Wachstumsphänomene tatsächlich auf eine Reaktion der Kardiomyozyten zurück zu führen waren und nicht auf einer Vermehrung, bzw. Vergrößerung der Fibroblasten. Die Negativkontrollen zeigten keine Färbung.

In den Abbildungen 6.1. bis 6.3. sind beispielhafte Aufnahmen nach Stimulation mit FCS, NE oder ohne Stimulation dargestellt.

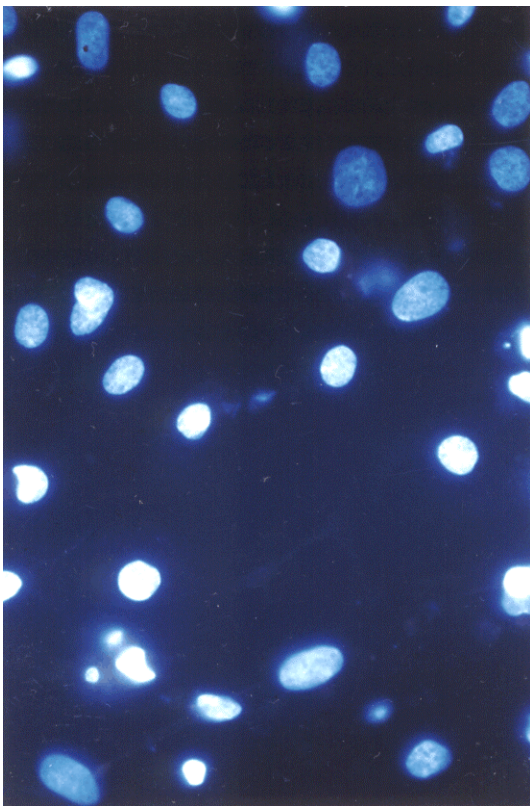
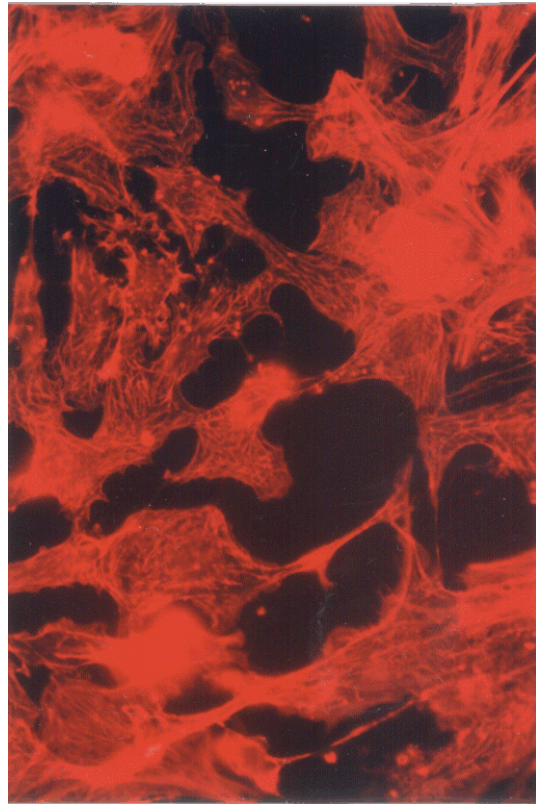
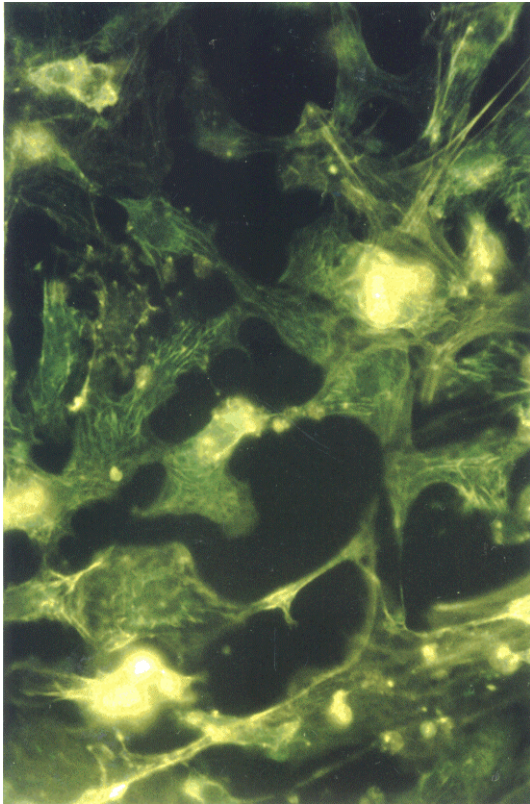


Abbildung 6.1a: Aufnahmen von transgenen (TG) Kardiomyozyten, welche 24 h lang **ohne Wachstumsstimulus** in Kultur gewachsen waren. Abgebildet sind jeweils Färbungen für Troponin T (**grün** = Cy²-Farbstoff – links oben), Aktin (**rot** = Phalloidin – rechts oben) und für Kerne (**hellblau** = DAPI – links unten). Ursprüngliche Vergrößerung 630x.

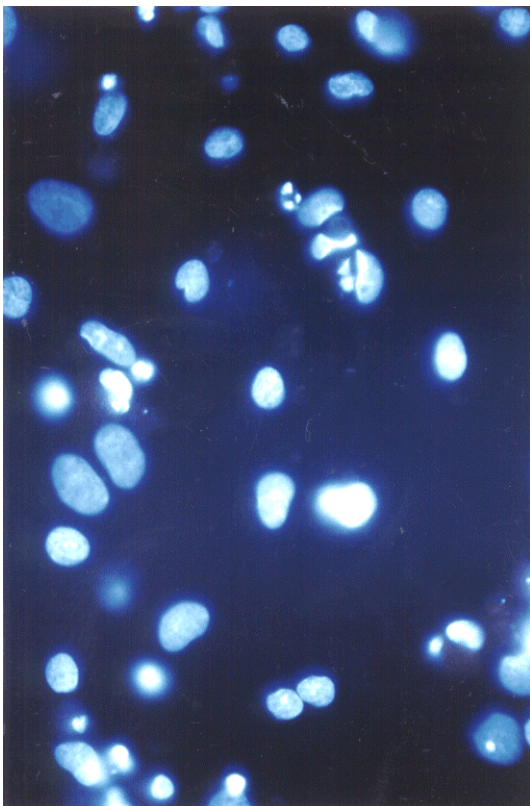
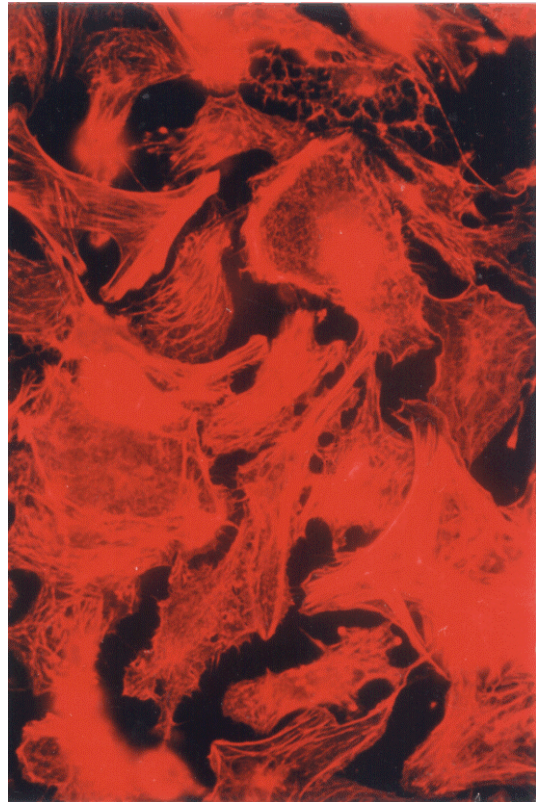
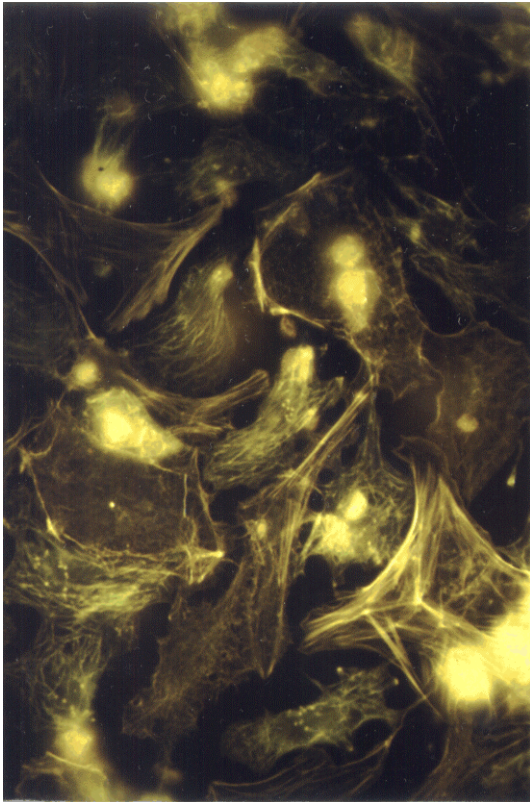


Abbildung 6.1b: Aufnahmen von normalen (SD) Kardiomyozyten, welche 24 h lang **ohne Wachstumsstimulus** in Kultur gewachsen waren. Abgebildet sind jeweils Färbungen für Troponin T (**grün** = Cy²-Farbstoff – links oben), Aktin (**rot** = Phalloidin – rechts oben) und für Kerne (**hellblau** = DAPI – links unten). Ursprüngliche Vergrößerung 630x.

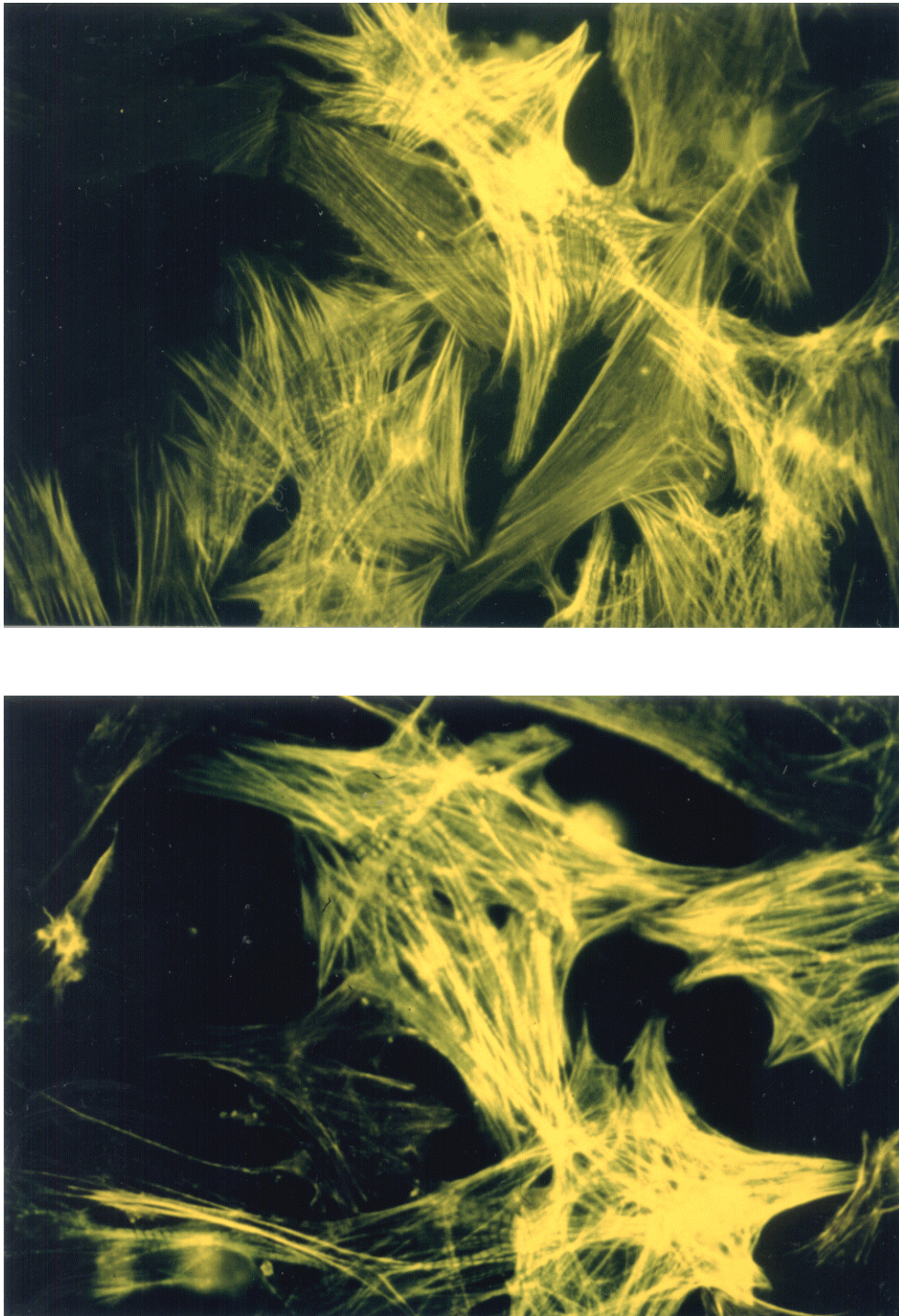


Abbildung 6.2.: Aufnahmen von transgenen (TG - oberes Bild) und normalen (SD - unteres Bild) Kardiomyozyten, welche 24 h lang mit **2 Vol% FCS** stimuliert worden waren. Abgebildet ist jeweils eine Färbungen für Troponin T (Cy²-Farbstoff) Ursprüngliche Vergrößerung 630x.

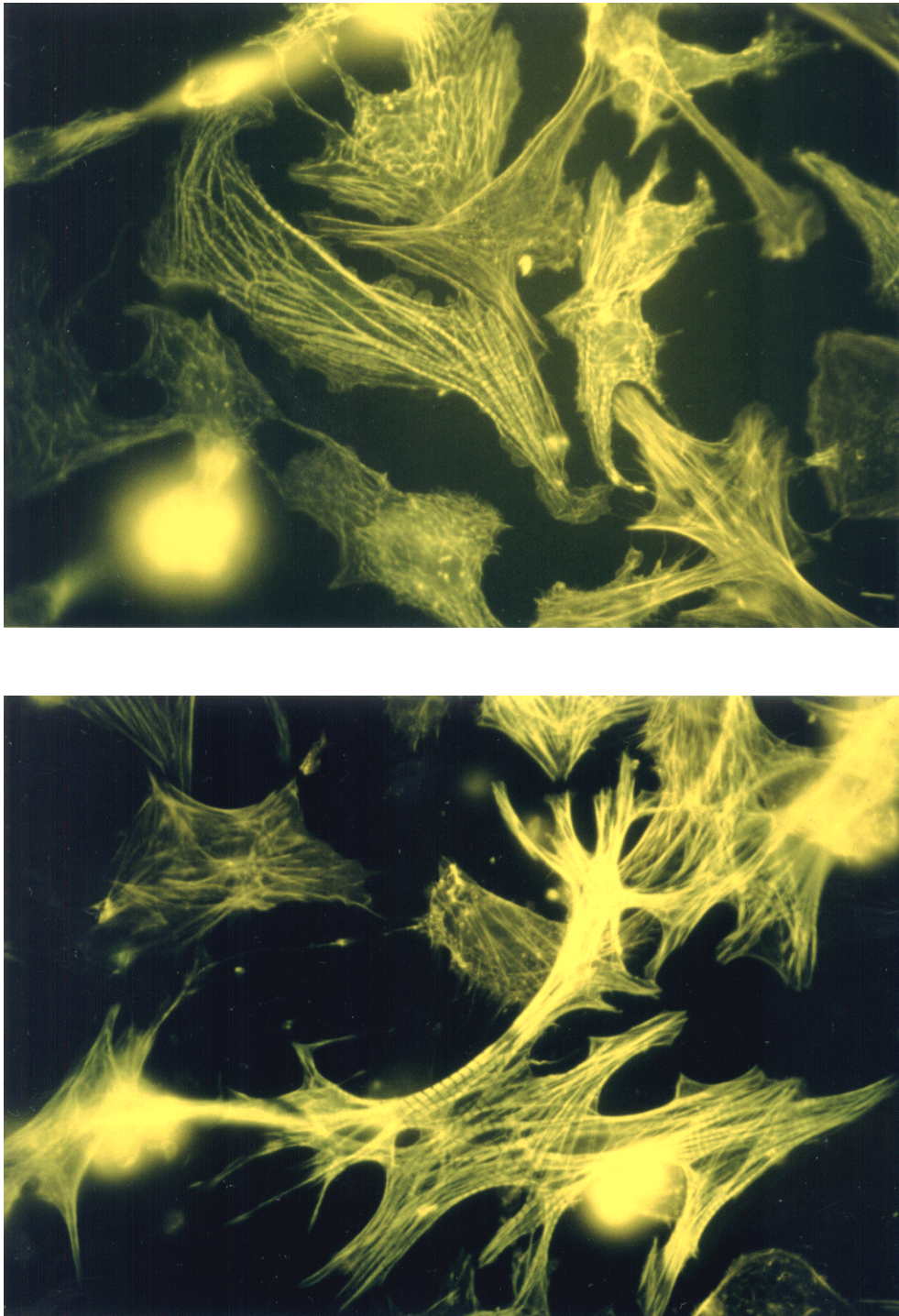


Abbildung 6.3.: Aufnahmen von transgenen (TG - oberes Bild) und normalen (SD - unteres Bild) Kardiomyozyten, welche 24 h lang mit $2 \mu\text{mol/l}$ NE stimuliert worden waren. Abgebildet ist jeweils eine Färbungen für Troponin T (Cy^2 -Farbstoff) Ursprüngliche Vergrößerung 630x.

4.3. Versuche zur Lokalisation der PMCA in Caveolae

Die Ergebnisse aus den Wachstumsversuchen wiesen darauf hin, dass die PMCA weniger bei der Kontraktion/Relaxation der Muskelzellen beteiligt ist, sondern eher in die Signaltransduktion wachstumsfördernder/hypertropher Stimuli integriert sein könnte.

Da die subzelluläre Lokalisation eines Moleküls oftmals Hinweise auf seine Funktion gibt, sollte die genaue Lokalisation der PMCA in Kardiomyozyten untersucht werden. Aufgrund einer Veröffentlichung von Fujimoto⁵⁰, in welcher die PMCA mit der Methode der Immunogoldfärbung in Caveolae lokalisiert wurde, sollte zunächst dieses Kompartiment untersucht werden.

Als Markerprotein für Caveolae wurde für Endothelzellen und die meisten anderen Zelltypen das Caveolin-1, für den Herz- und Skelettmuskel das Caveolin-3 beschrieben⁴. Die folgenden Resultate zeigen mit verschiedenen Methoden die Kolo-kalisation von PMCA mit Caveolin-3.

4.3.1. Detergenzextraktion von Proteinen aus gereinigten Plasmamembranen

In zahlreichen Veröffentlichungen wurden Caveolae aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften bei der Solubilisierung von Membranen mit verschiedenen Detergenzien definiert (Zusammenfassung in Anderson 1998⁴). So gilt z.B. die Resistenz der caveolären Membran gegenüber Triton X-100 bei 4°C als eine besonders charakteristische Eigenschaft, welche auch schon in früheren Arbeiten (Schnitzer et al. 1995)¹⁴³ benutzt wurde, um untersuchte Strukturen in Caveolae zu lokalisieren. Mit der Methode der Detergenzextraktion (siehe 3.4.2.), welche anhand obiger Veröffentlichung in diesem Labor etabliert und auf die gegebene Problemstellung adaptiert wurde, sollte auf einfache Weise überprüft werden, ob die PMCA ähnliche Lösungseigenschaften wie Caveolin-3 besitzt.

Als Detergenzien wurden 1% w/v (Gewicht/Volumen, 1% = 1g/100ml) SDS, 60 mmol/l β -Octylglucopyranosid (β OG), 1,5 Vol% Triton X-100 (TX100) und 1,25% w/v Digitonin (Dig) benutzt. Gleiche Mengen Protein von, durch die Detergenzien aufgelöstem (Überstand/*Supernatant* – S) und nicht aufgelöstem (Pellet – P), SL-Material wurden im Western Blot auf Vorhandensein von PMCA und Caveolin-3 überprüft.

Während durch Solubilisierung mit SDS die gesamten Membranen aufgelöst wurden, so dass bei der Trennung durch Zentrifugation kein Pellet auftauchte, zeigte sich, dass durch Verwendung der anderen drei Detergenzien unterschiedliche Mengen von Cave-

olin-3 und PMCA in Lösung gebracht werden konnten. Im Vergleich der Banden für Caveolin-3 (jeweils zwischen Pellet und Überstand) für jedes Detergenz zeigte sich, dass TX100 die geringste, β OG eine mittlere und Digitonin die größte Menge dieses Strukturproteins in Lösung bringen konnte. Der Vergleich der Banden für die PMCA zeigte ein qualitativ gleiches Ergebnis, so dass ähnliche oder gleiche Lösungseigenschaften für die Membranabschnitte in welchen Caveolin-3 oder PMCA enthalten waren angenommen werden konnten. Insbesondere die weitgehende Unlöslichkeit gegenüber TX100 spricht somit für eine caveoläre Lokalisation der Pumpe. Dieser Versuch konnte insgesamt drei Mal mit gleichen Ergebnissen reproduziert werden.

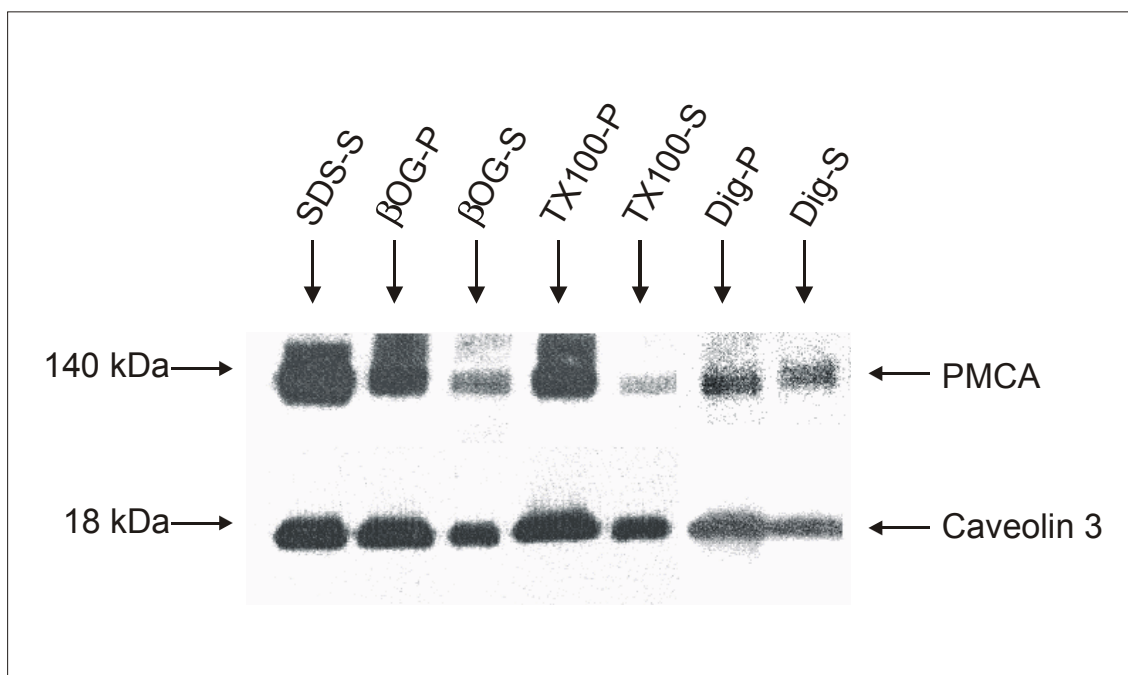


Abbildung 7: Western-Blot von SL-Material aus neonatalen Herzen von SD-Ratten, welches der Solubilisierung durch die vier Detergenzien **SDS**, β -Octylglucopyranosid (**β OG**), Triton X-100 (**TX100**) und Digitonin (**Dig**) ausgesetzt worden war. Aufgetragen sind gleiche Mengen (bezüglich Protein) der nach Solubilisierung und Zentrifugation entstehenden Pellets (**P**) und Überstände (**S**), mit Ausnahme von SDS, welches kein Pellet zurückließ. Gesucht wurde nach **PMCA** (140 kDa) und **Caveolin-3** (18 kDa).

4.3.2. Doppelimmunfluoreszenz mit Färbung von Caveolin-3 und PMCA

Da die Resultate aus der Detergenzextraktion nur hinweisend und nicht beweisend für eine Lokalisation der PMCA in Caveolae des Herzmuskels waren, sollte noch mit mindestens zwei weiteren unabhängigen Methoden dieser Nachweis geführt werden. Zunächst wurde dazu eine optische Methode, ähnlich der von Chun et al. 1994³⁶, etabliert: Caveolin-3 und PMCA wurden in Kardiomyozyten mittels Immunfluoreszenz gleich-

zeitig in zwei verschiedenen Farben (rot und grün) angefärbt. Von identischen Bildausschnitten wurden jeweils Aufnahmen mit beiden Anregungswellenlängen für die Fluoreszenzfarbstoffe angefertigt und anschließend elektronisch additiv überlagert. Orte der Kolo-kalisation von PMCA und Caveolin-3 erschienen dann gelb. Um eine möglichst genaue Auflösung zu erreichen und um Überlagerungseffekte zu unterbinden, wurde ein Konfokal-Mikroskop verwendet, mit welchem Aufnahmen angefertigt werden können, die nur eine sehr dünne horizontale Schnittebene scharf abbilden. Zusätzlicher Vorteil des verwendeten Konfokal-Mikroskop war, dass die entstehenden Bilder nicht durch konventionelle Fotografie festgehalten, sondern direkt digitalisiert und in einen angeschlossenen Rechner eingespeist werden konnten. So kam es zu keinen Qualitätsverlusten durch sekundäres Scannen der Bilder.

In den nicht überlagerten Einzelaufnahmen (siehe Abbildung 8 A) zeigte sich bei der Darstellung von Caveolin-3 eine feinkörnige Anfärbung der Kardiomyozyten (Fibroblasten zeigten erwartungsgemäß keine Färbung). Die leichte perinukleäre Betonung der Färbung deckt sich mit der Annahme, dass Caveolae zwischen Golgi-Komplex und Plasmamembran „shutteln“ können^{21,97}. Die Darstellung der PMCA (Abbildung 8 B) wies ebenfalls eine feinkörnige Struktur mit perinukleärer Betonung auf. Im *Overlay* (Abbildung 8 C) konnte man anhand der Gelbfärbung viele Orte identifizieren, an denen PMCA und Caveolin-3 kolokalisiert waren. Die Negativkontrollen, welche zur Überprüfung der Spezifität der Färbung und der Kreuzreaktion der verwendeten Sekundärantikörper angesetzt worden waren (siehe 3.3.2.), zeigten keine Färbung (in Abbildung 8 nicht dargestellt). Diese Ergebnisse wurden in 2 unabhängigen Versuchen in gleicher Weise reproduziert.

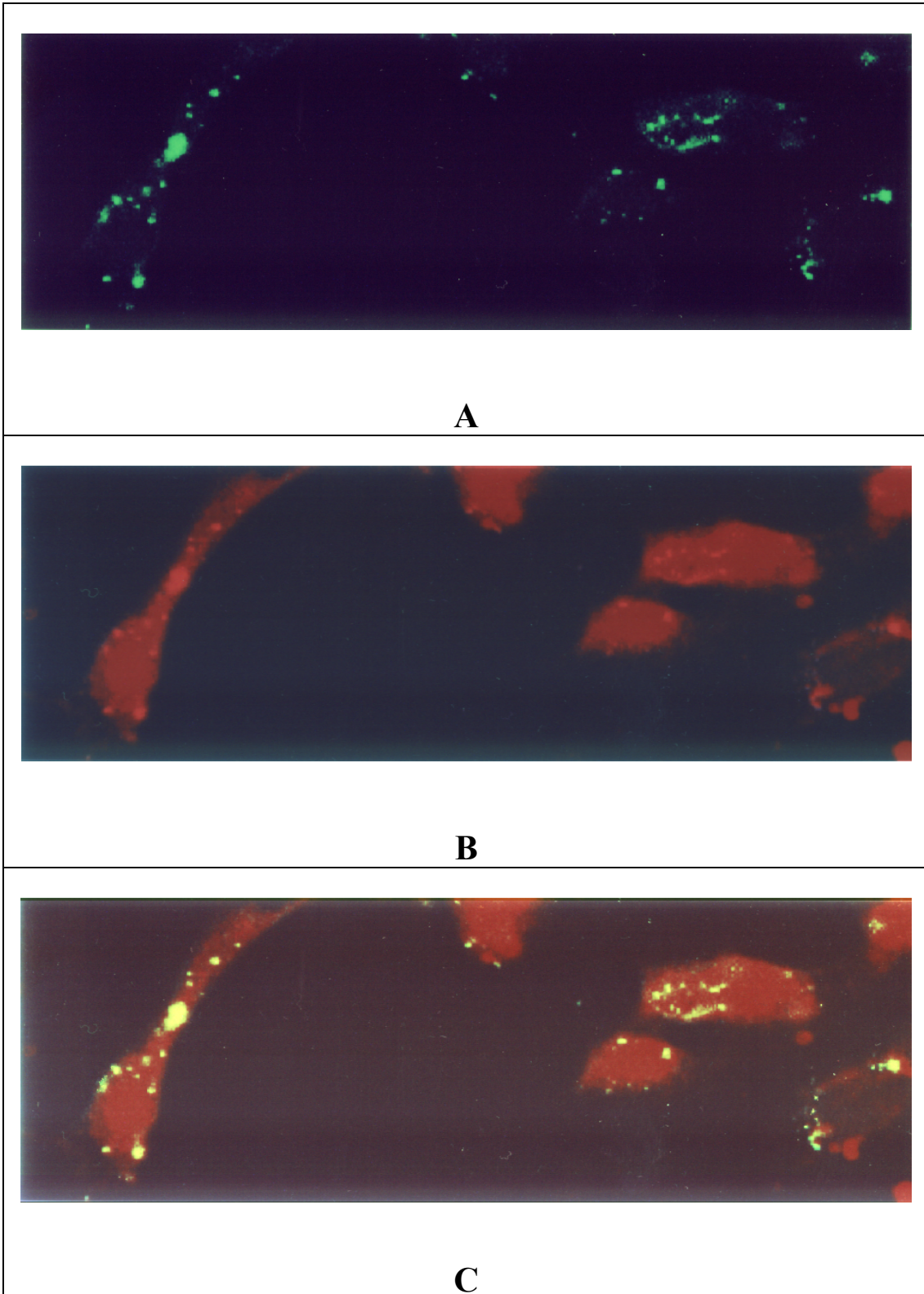
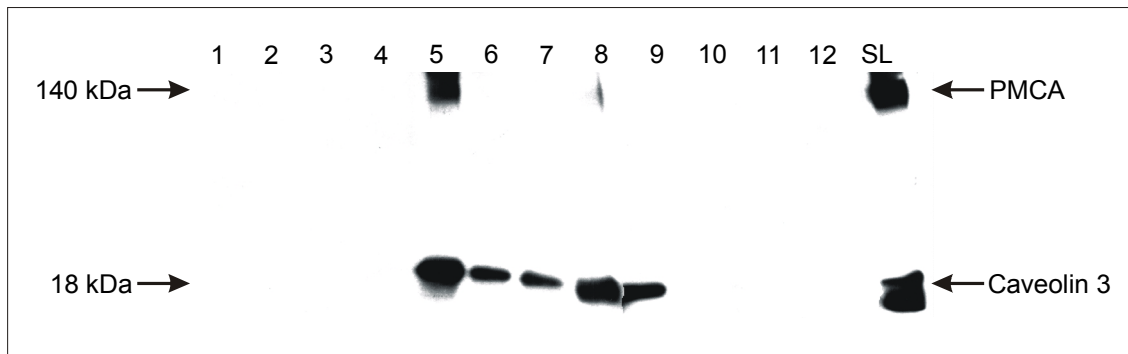


Abbildung 8: Doppelimmunfluoreszenzfärbung von normalen SD-Kardiomyozyten für Caveolin-3 (**A** – grün / Cy²-Farbstoff) und PMCA (**B** – rot / Texas-Red). Im *Overlay* (**C**) werden Orte der Kolokalisation gelb sichtbar. Vergrößerung 800x.

4.3.3. Biochemische Präparation Caveolae-reicher Membranen aus sarkolemmalen Membranen

Neben der optischen, sollte nun auch eine biochemische Methode angewandt werden, um die PMCA in Caveolae zu lokalisieren. Zu diesem Zweck wurde das Prinzip der Präparation von Caveolae-reichen Membranen über einen Dichtegradienten gewählt, welches als anerkannte Methode schon von einigen Labors aus der Caveolae-Forschung benutzt worden war, um Proteine in Caveolae zu lokalisieren: SL-Membranen werden nach mechanischer Zerkleinerung durch Ultraschall auf einem diskontinuierlichen 5%-35%-45%-Sucrose-Gradienten in der Ultrazentrifuge aufgetrennt. Anschließend wird der Gradient in 12 gleich große (je 1 ml) Fraktionen aufgeteilt und gleiche Mengen Protein aus jeder Fraktion im Western-Blot auf Caveolin-3 und PMCA überprüft. Nach den Angaben aus der Literatur¹⁵⁵ sollten sich die caveolären Membranen überwiegend in Fraktion 5 finden.

Im Western-Blot zeigte sich eine Anreicherung von Caveolin-3 in den Fraktionen 5 bis 9, mit einem Maximum in Fraktion 5. Die PMCA war ebenfalls in Fraktion 5 stark angereichert, während sie in den anderen Fraktionen nicht nachgewiesen werden konnte. Die Berechnung der prozentualen Anteile jeder Fraktion an der gesamten Proteinmenge ergab, dass in Fraktion 5 nur 3,4% des eingesetzten Proteins enthalten waren, was zusätzlich für eine starke und selektive Anreicherung caveolärer Membranen sprach, in welchen die PMCA ebenfalls lokalisiert war. Diese Resultate konnten in qualitativ gleicher Weise drei Mal reproduziert werden.



Fraktion Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
% Gesamtprotein	10.3	2.7	0.7	2.1	3.4	11.0	4.1	5.5	29.5	7.5	12.3	11.0

Abbildung 9: Western-Blot gleicher Mengen von Protein aus den 12 Fraktionen des Dichtegradienten mit Darstellung von PMCA (140 kDa) und Caveolin-3 (18 kDa). Als Positivkontrolle wurde eine zusätzliche Bahn mit Sarkolemma-Material (SL) beladen. Die darunter angeordnete Tabelle zeigt die Anteile jeder Fraktion am Gesamtprotein, welches auf dem Gradienten aufgetrennt wurde.

4.3.4. Koimmunpräzipitation von Caveolin, PMCA und Dystrophin

Neben der Kenntnis der zellulären Lokalisation der PMCA ist das Wissen von Interaktionspartnern des Enzyms für die Aufklärung von Funktion und Wirkmechanismen bedeutsam. Eine Methode, welche sowohl Lokalisation als auch zumindest teilweise die Interaktion von Proteinen aufklären kann, ist die Koimmunpräzipitation. Die Koimmunpräzipitation ist ein häufig angewandtes Verfahren bei der Aufklärung von Interaktionspartnern von löslichen zytosolischen Proteinen. Die Übertragung der Methode auf ein Transmembranprotein, wie die PMCA, warf einige Probleme auf. Zum einen mussten Detergenzien eingesetzt werden, um die PMCA überhaupt in Lösung zu bringen, die aber auch die Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen der PMCA und möglichen Interaktionspartnern zerstören konnten. Es war auch unklar, ob der Einsatz eines Detergenz nicht vielleicht die Konformation der Epitope für die Antikörperbindung verändert und ob die zur Verfügung stehenden Antikörper überhaupt für die (Ko-) Immunpräzipitation geeignet waren. In umfangreichen Versuchsreihen wurden alle kritischen Parameter, wie Art und Konzentration des Detergenz, verschiedene Antikörper und deren Konzentrationen und verschieden lange Präzipitationszeiten bei unterschiedlichen Temperaturen getestet, um die Methode so zu optimieren, wie sie in 3.4.4. beschrieben ist. Digitonin in einer Konzentration von 2,5% w/v kristallisierte sich als bestes Detergenz heraus, da es einen relativ hohen Anteil der PMCA in Lösung bringen konnte (siehe auch 4.3.1. und Abbildung 7). Als präzipitierende Antikörper wurden zuletzt verwendet:

3 unterschiedliche Anti-PMCA-Antikörper (ein monoklonaler: Klon 5F10 und zwei polyklonale: Klone 2A und 4N), 2 unterschiedliche Anti-Caveolin-3-Antikörper (je ein monoklonaler und ein polyklonaler) und ein monoklonaler Anti-Dystrophin-Antikörper, da die Lokalisation von Dystrophin in Caveolae des Skelettmuskels in der Literatur beschrieben worden war¹⁵⁵. Als Negativ- und Spezifitätskontrollen wurden ein Präzipitationsansatz mit einem Anti-Östrogen-Rezeptor-Antikörper (als unspezifischer Antikörper) und ein Ansatz mit dem 5F10-Antikörper aber ohne Zusatz von lysierten Membranen verwendet. Als Positivkontrolle wurde eine Bahn im Western-Blot mit reinem SL-Material beladen. Gesucht wurde dabei wieder nach PMCA und Caveolin-3.

Caveolin-3 konnte ausschließlich in der Positivkontrolle und in den beiden Proben nachgewiesen werden, bei welchen Anti-Caveolin-3-Antikörper zur Präzipitation verwendet worden waren. Mit anderen Antikörpern und auch erwartungsgemäß in den beiden Negativkontrollen wurde kein Caveolin-3 nachgewiesen. Die PMCA tauchte nur in der Positivkontrolle und den Proben mit dem 5F10-Antikörper und dem Anti-Dystrophin-Antikörper auf. Es zeigte sich somit, dass 1. sowohl Caveolin-3 als auch die PMCA unter den gewählten Bedingungen mit jeweils spezifischen Antikörpern (5F10, poly- und monoklonaler Anti-Caveolin-3-Antikörper) präzipitierbar sind, dass 2. diese Präzipitation aufgrund der eindeutig negativen Negativkontrollen spezifisch ist, und dass 3. bei der Präzipitation von Dystrophin die PMCA kopräzipitiert wird, was eine direkte Interaktion zwischen beiden Proteinen vermuten lässt. Zusammen mit der Tatsache, dass andere Arbeitsgruppen Dystrophin in Caveolae des Skelett-/Herzmuskels lokalisiert hatten, unterstützt dieses Ergebnis ebenfalls die Hypothese der Lokalisation der PMCA in Caveolae. Diese Ergebnisse konnten 2 Mal in unabhängigen Experimenten reproduziert werden.

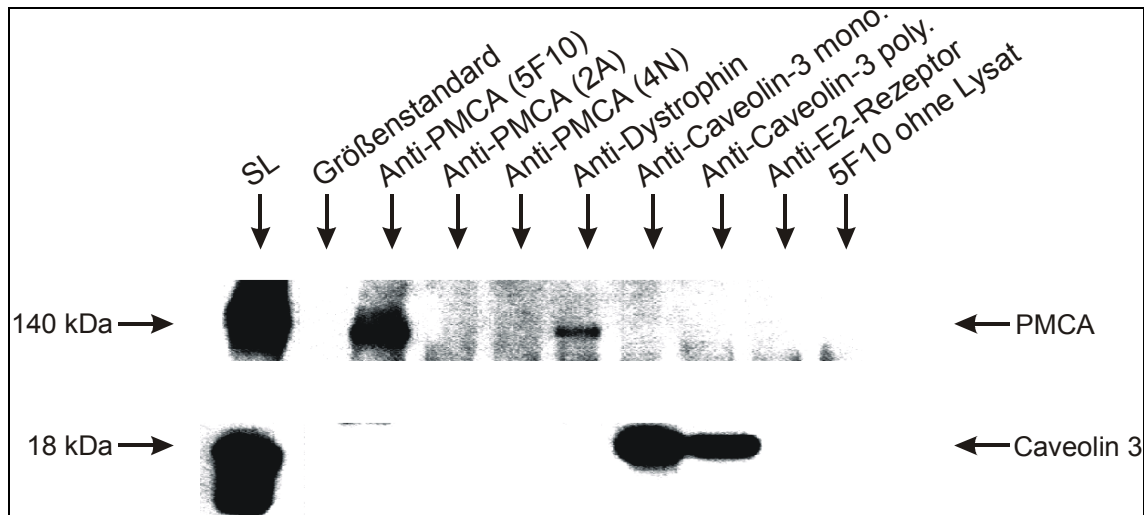


Abbildung 10: Immunpräzipitation von Digitonin-lysierten SL-Membranen aus PMCA-transgenen Herzen: Die Präzipitation erfolgte mit den in der obersten Zeile angegebenen Antikörpern. Anschließend wurde das präzipitierte Material im Western-Blot auf das Vorhandensein von **PMCA** (mit dem monoklonalen Anti-PMCA-Ak "5F10", Bande bei 140 kDa) und **Caveolin-3** (mit dem monoklonalen Anti-Caveolin-3-Ak, Bande bei 18 kDa) getestet. Im einzelnen sind folgende Bahnen von links nach rechts aufgetragen: Positivkontrolle mit gereinigten Membranproteinen (**SL**), Bahn für **Größenstandard**, 3 Bahnen von Präzipitationen mit Anti-PMCA-Aks (**5F10**, **2A** und **4N**), Präzipitation mit Anti-Dystrophin-Ak (**Anti-Dystrophin**), 2 Präzipitationen mit **mono-** und **polyklonalem Anti-Caveolin-3-Ak** und 2 Bahnen mit Negativkontrollen (Präzipitation mit **Anti-Östrogen-(E2)-Rezeptor-Ak** und Präzipitation mit **5F10 ohne Lysat**)

4.4. Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Überblick konnten folgende Resultate erzielt werden:

Wachstumsexperimente an Primärzellkulturen von hPMCA4CI-transgenen und normalen Kardiomyozyten zeigten eine erhöhte Wachstumsbereitschaft der PMCA-überexprimierenden Zellen, welche auf einen starken Anstieg der Proteinsynthese in diesen Zellen zurückzuführen ist. Die Hypothese, dass die PMCA in den Caveolae der Membranen des Herzmuskels lokalisiert sei, konnte durch vier unabhängige optische und biochemische Methoden erhärtet werden. Zusätzlich konnte eine Interaktion der PMCA mit Dystrophin, einem Caveolae-assoziierten Protein, entdeckt werden.

5. Diskussion

5.1. Experimente an hPMCA4CI-transgenen Ratten

Ziel der Experimente an Kardiomyozyten-Kulturen war die Beantwortung der Frage, ob in Analogie zu den Ergebnissen an myogenen L6-Zellen aus dem eigenen Labor⁶³ eine PMCA-Überexpression ebenfalls die Wachstumsgeschwindigkeit zu beeinflussen vermag. Zusätzlich sollte ein morphologischer Vergleich zwischen transgenen und Wildtyp-Kardiomyozyten durchgeführt werden.

Die angewandten Methoden waren zum Teil schon in der eigenen Arbeitsgruppe etabliert und orientierten sich an allgemein anerkannten und mit früheren Veröffentlichungen vergleichbaren Protokollen. So wurde z.B. die Methode der Primärkultur neonataler Kardiomyozyten mit anschließender Wachstumsstimulierung aus dem Labor von P. Simpson übernommen, der diese über einen langen Zeitraum entwickelt, evaluiert und mit ihr diverse Aspekte des hypertrophen Wachstums von Herzmuskelzellen unter dem Einfluss von Katecholaminen untersucht hatte^{151,152,153}. Auch die anderen in diesem Zusammenhang verwendeten Methoden, wie die Messung von Gesamtprotein, DNA, Einbaurate von ³H-Leuzin und die Fluoreszenzfärbung der Zellen, werden allgemein angewandt und basieren zum Teil auf kommerziellen Fertig-Kits.

Die morphologische Untersuchung der Zellen zeigte keine wesentlichen Unterschiede im Vergleich zwischen normalen und transgenen Kardiomyozyten. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass die Fluoreszenzmikroskopie nur bedingt geeignet ist, solche Unterschiede aufzudecken. Dies liegt zum einen daran, dass bei der mikroskopischen Darstellung nur eine zweidimensionale Betrachtung möglich ist und somit gerade bei der Abschätzung der Zellgröße ein wichtiger Messparameter verloren geht, zum anderen an der Schwierigkeit, einfache, objektive, mess- und standardisierbare Kriterien zu etablieren, anhand derer die Morphologie von Zellen wissenschaftlich beurteilbar ist. Aus diesen Gründen wurde auf eine extensive Ausarbeitung der Immunfluoreszenzstudien mit entsprechendem zeitlichen und materiellen Aufwand verzichtet.

Die Resultate der Wachstumsversuche demonstrierten eine erhöhte Wachstumsbereitschaft der PMCA-überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen, gemessen an der Einbaurrate radioaktiv markierten Leuzins und bestätigt durch die Zunahme des Gesamtproteins. FCS erwies sich dabei als stärkster Stimulus.

Im Folgenden sollen nun die erzielten Resultate aus den Wachstumsexperimenten in einen Zusammenhang mit bereits veröffentlichten Arbeiten gesetzt werden, welche ebenfalls die Funktion der PMCA durch Überexpression in verschiedenen Zelltypen im Hinblick auf eine Modulation zellulären Wachstums und Differenzierung untersucht hatten. So führt z. B. die Überexpression der rPMCA-1CII in Endothelzellen aus Rattenaorta zu einer Verzögerung im Übergang der G1- zur S-Phase des Zellzyklus¹⁰⁰, während die Überexpression derselben PMCA-Isoform in vaskulären glatten Muskelzellen deren signifikant verlangsamte Wachstumsrate⁶⁹ bewirkte. Ein ähnliches Phänomen trat bei hPMCA-4CI-transfizierten CHO-Zellen (*chinese hamster ovary cells*) auf, bei denen ebenfalls eine Reduktion der Wachstumsgeschwindigkeit zu beobachten war⁶⁰.

Im Gegensatz zu den eben genannten Ergebnissen, welche den Zielparameter **Wachstum** beobachteten, steht die bereits in der Einleitung beschriebene Arbeit aus dem eigenen Labor, in welcher die Überexpression der hPMCA4CI mit der beschleunigten **Differenzierung** von Skelettmuskel-Myoblasten in Verbindung gebracht werden konnte⁶³. In diesen Kontext passen auch die Resultate der Arbeitsgruppe um Brandt¹⁸, die einen anderen Weg, als den des "gain of function" Models beschritten hatte: Durch stabile Transfektion einer Phäochromozytom-Zelllinie mit einem PMCA-1 Antisense Konstrukt konnte die Expression des Enzyms verringert werden. Dabei wurde gezeigt, dass das NGF-induzierte Auswachsen von Neuriten, ein Phänomen, welches als Differenzierungsmerkmal angesehen wird, in den transfizierten Zellen unterdrückt wurde. Dieser Ansatz war nötig, da es im Moment noch keine Substanz gibt, die in der Lage ist, die PMCA spezifisch zu hemmen, ohne dass davon auch andere Enzyme beeinträchtigt würden.

Die Beeinflussung unterschiedlicher Phänomene, d.h. Differenzierung im Falle der Myoblasten und Phäochromozytomzellen einerseits und Wachstum am Beispiel der Endothelzellen der Rattenaorta und der Kardiomyozyten in der vorliegenden Arbeit andererseits, lässt sich durch die unterschiedlichen Zelltypen, aber auch durch die verschie-

denen verwendeten PMCA-Isoformen erklären, die sich nicht nur hinsichtlich ihrer Expression in den einzelnen Geweben, sondern auch in Bezug auf ihre regulatorischen Eigenschaften unterscheiden. So enthält z.B. die von Liu et al.¹⁰⁰ verwendete Isoform rPMCA-1CII das gesamte alternative Exon im C-terminalen Bereich, welches für einen Teil der Calmodulin-Bindungsregion kodiert. Dieses Exon fehlt in der Isoform 4CI, was sich in einer höheren Calmodulin-Bindungsaffinität zeigt. Auch in anderen Eigenschaften unterscheiden sich die einzelnen Isoformen, wie z.B. die cAMP-abhängige Phosphorylierung, die nur für die hPMCA-4CI gezeigt werden konnte^{160,43}.

Die zugrunde liegenden Mechanismen, über welche die PMCA in die wachstumsregulierenden Signalkaskaden eingreift, sind weiterhin unklar. Ausgehend von der Funktion des Kalziumtransports könnte dies über eine Regulation der intrazellulären Kalziumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) erfolgen. Die bisher hierzu vorliegenden Ergebnisse sind jedoch nicht ganz eindeutig. Zwar konnte in einigen der oben angeführten Arbeiten, wie z.B. bei der Überexpression der PMCA in vaskulären glatten Muskelzellen⁶⁹, genauso wie in den Arbeiten aus dem eigenen Labor an L6-Myoblasten⁶³, eine (geringe) signifikante Absenkung der $[Ca^{2+}]_i$ nachgewiesen werden, im Fall der PMCA-transgenen Ratten konnte dieser Nachweis in Kardiomyozyten nicht erbracht werden⁶⁴. Dabei stellt sich jedoch die Frage, ob die dazu benutzte Fura-2-Methode sensitiv genug ist, um auch geringere und subzellulär (d.h. auf einige Nanometer) begrenzte Veränderungen der Kalziumkonzentrationen zu erfassen.

Erfolgsversprechender als Kalziummessungen erscheinen zur Aufdeckung der involvierten Signaltransduktionswege somit Untersuchungen bezüglich der subzellulären Lokalisation der Pumpe und möglicher Interaktionspartner. Ersteres wurde beispielsweise von der Arbeitsgruppe um Fujimoto⁵⁰ und auch in der eigenen Arbeit untersucht, wobei eine caveoläre Lokalisation der PMCA gezeigt werden konnte. Auch im Hinblick auf die Interaktionspartner konnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. So zeigten weiterführende Arbeiten aus dem eigenen Labor, dass die PMCA4CI im Bereich des C-Terminus mit einer definierten Domäne (PDZ-Domäne) der NO-Synthase I (NOS-I) interagiert und die NO-Produktion beeinflusst (persönliche Mitteilung von Dr. K. Schuh). Auf diese Ergebnisse wird in Kapitel 5.3. noch genauer eingegangen werden.

Zusammenfassend konnten die in den vorhergehenden Abschnitten zitierten Arbeiten zeigen, dass eine veränderte Expression der PMCA Wachstum und Differenzierung unterschiedlicher Zelltypen zu beeinflussen vermag. Die in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse zeigen dieses Phänomen zum ersten Mal auch an Kardiomyozyten und passen insofern gut in ein Gesamtkonzept, welches die PMCA nicht nur als reine Kalziumpumpe interpretiert, sondern dem Enzym eine definierte Funktion in der Steuerung zellulärer Wachstums- und Differenzierungsprozesse zugesteht.

5.2. Subzelluläre Lokalisation der PMCA

Basierend auf dem Wissen um die Wichtigkeit der genauen subzellulären Lokalisation vieler Moleküle und auf Ergebnissen, die zeigen konnten, dass die PMCA im Myokard nur eine untergeordnete Rolle bei der Regulation des Kontraktions-/Relaxationszyklus spielt⁸ und auch deren Überexpression zu keinen messbaren Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ führt⁶⁴, wurde folgende Arbeitshypothese aufgestellt: Die PMCA besitzt eine genau definierte subzelluläre Lokalisation in Kardiomyozyten und nimmt dort über die Steuerung der lokalen Kalziumkonzentration Einfluss auf die zelluläre Signaltransduktion.

Als Kandidat für das zu untersuchende Zellkompartiment wurden die Caveolae ausgewählt. Maßgeblich hierfür war, dass von der Arbeitsgruppe um Fujimoto⁵⁰ bereits Hinweise für die Lokalisation der PMCA in Caveolae erbracht worden waren. Allerdings enthält die dabei angewandte Methode der Immunogoldfärbung und elektronenmikroskopischen Darstellung vor allem durch die notwendige Fixation des Gewebes Artefaktmöglichkeiten, welche es sinnvoll erscheinen ließen, den Nachweis der caveolären Lokalisation der PMCA noch durch andere Methoden zu bestätigen.

Ein weiterer Grund für die Auswahl der Caveolae als aussichtsreiches Zellkompartiment war, dass dort bereits eine große Anzahl von (z. T. Kalzium-sensitiven) Rezeptoren und Signaltransduktionsmolekülen lokalisiert worden waren, die Einfluss auf Wachstum und Differenzierung nehmen (siehe 1.5. und Tabelle 4).

Da die biochemische Charakterisierung von Caveolae und assoziierter Proteine einen relativ neuen Zweig der Forschung darstellt, musste bei der Auswahl der Methoden großer Wert darauf gelegt werden, dass diese schon allgemein anerkannt und gut eta-

bliert waren. Insofern erfolgte die Orientierung, wie auch im Fall der oben genannten Wachstumsversuche, an bereits veröffentlichten Arbeiten aus anerkannten Arbeitsgruppen auf diesem Gebiet. So wurde z. B. die Methode der Reinigung caveolärer Membranen auf einem diskontinuierlichen Sucrose-Gradienten anhand der in zahlreichen Veröffentlichungen^{98,139,140,92,99} beschriebenen Protokolle aus der Arbeitsgruppe von P. Lisanti (der als erster Caveolin-3 klonierte) im eigenen Labor etabliert und die Resultate an den vorbekannten Ergebnissen validiert. Auch die Detergenzextraktion¹⁴³, Immunpräzipitation⁹⁷ und Doppelimmunfluoreszenzfärbung³⁶ waren vorbeschrieben und konnten für das eigene Projekt angepasst werden.

Mit allen eben genannten morphologischen und biochemischen Methoden konnten starke Hinweise dafür erbracht werden, dass die PMCA in Kardiomyozyten zumindest zu einem großen Anteil in Caveolae lokalisiert ist.

Diese Ergebnisse passen gut zu den z.T. schon erwähnten Arbeiten von Fujimoto⁵⁰ und Schnitzer¹⁴², die in Kardiomyozyten und anderen Zelltypen ebenfalls Caveolae als Zielort der PMCA identifizieren konnten.

Die Frage inwieweit diese Ergebnisse den Schluss zulassen, dass die PMCA generell in Caveolae lokalisiert ist, muss kritisch beurteilt werden. Es ist wahrscheinlich, dass die Caveolae in den Zellen der unterschiedlichen Gewebe entsprechend deren spezieller Funktionen unterschiedlich aufgebaut sind. Dies könnte sich dabei nicht nur in der Expression verschiedener Caveolin-Isoformen (z.B. Caveolin-1 in Endothelzellen, Caveolin-3 in Muskelzellen), sondern auch in der An- bzw. Abwesenheit anderer Moleküle wie der PMCA zeigen. Auch wurde in keiner der Arbeiten eine Differenzierung bezüglich der einzelnen Isoformen und Splicingvarianten der Kalziumpumpe durchgeführt, so dass offen bleiben muss, ob sich die zelltyp- und differenzierungsspezifischen Unterschiede in der Expression der einzelnen Varianten des Enzyms nicht auch auf die Lokalisation innerhalb der Zelle auswirken. Diese Frage kann letztlich erst dann geklärt werden, wenn für die einzelnen Isoformen ausreichend spezifische Antikörper zur Verfügung stehen.

Ebenfalls unklar bleibt, ob sich die PMCA statisch oder nur temporär in den caveolären Membranabschnitten aufhält. Es wäre durchaus denkbar, dass die Pumpe durch Lateral-diffusion in der Plasmamembran die Caveolae auch verlassen kann. Analog zu anderen

Molekülen wie z.B. G_{α}^{92} , Src⁹³ oder eNOS⁴⁶, für die gezeigt werden konnte, dass vor allem die inaktiven Formen mit Caveolin interagieren, könnte dies auch auf die PMCA zutreffen.

Insofern bilden die Ergebnisse der Lokalisationsversuche eine Ausgangsbasis für weiterführenden Untersuchungen bezüglich der Funktion der PMCA im Myokard.

Ein unerwartetes Ergebnis dieser Arbeit war der Nachweis der Koimmunpräzipitation der PMCA zusammen mit Dystrophin, der eine Interaktion der beiden Moleküle nahe legt. Diese Tatsache wurde zum einen als weiterer Hinweis für die caveoläre Lokalisation der PMCA gewertet, da Dystrophin in der Literatur als Caveolae-assoziiertes Protein beschrieben ist^{155,41}, zum anderen werden dadurch neue Perspektiven für mögliche Funktionen der PMCA eröffnet.

Das Dystrophin-Gen liegt auf dem X-Chromosom, enthält mehrere Promotoren und kodiert so für verschiedene Isoformen die in unterschiedlichen Geweben wie Muskel, Purkinje-Zellen, periphere Nerven und anderen spezifisch exprimiert werden^{14,135}. Dystrophin bildet in seiner Tertiärstruktur eine stabartige Form und steht mit einer Vielzahl membranassoziierter Proteine in Verbindung, die in ihrer Gesamtheit als Dystrophin-assoziierte (Glyco-)Proteine (DAG bzw. DAP) bezeichnet werden. Darunter befinden sich Dystroglycane, Syntrophine, Utrophine und viele mehr (Zusammenfassung in Tinsley 1994¹⁶⁹). Zusätzlich wurden auch andere Moleküle identifiziert, die mit Dystrophin und den DAP interagieren, wie z.B. die neuronale NO-Synthase (nNOS)¹⁹. Funktionell wird dem Dystrophin-DAP-Komplex eine Bedeutung bei der mechanischen Kopplung des Zytoskeletts an die Plasmamembran zugesprochen. Es wird jedoch auch zunehmend darüber diskutiert, ob nicht auch ein Einfluss der DAG auf die membranständigen Ionenkanäle und Signaltransduktionsmoleküle bestehen könnte³².

Medizinische Bedeutung erlangte das Dystrophin durch die Erkenntnis, dass eine, durch verschiedene Mutationen hervorgerufene, verminderte oder fehlende Expression zu dystrophischen Erkrankungen des Skelettmuskels führt, deren bekannteste die Duchennesche Muskeldystrophie (DMD) ist. Neben dem Skelettmuskel manifestieren sich die DMD und andere Muskeldystrophien auch häufig durch Kardiomyopathien. Letzteres ist insofern besonders interessant, da inzwischen Hinweise dafür vorliegen, dass das Dystrophin bzw. die DAG/DAP auch eine entscheidende Rolle bei der Entstehung vi-

raler^{6,7} (durch direkte Spaltung des Dystrophins durch eine Virus-Protease) aber auch anderer Herzmuskelerkrankungen, wie z.B. der dilatativen Kardiomyopathie^{13,124,125} spielen.

Diese gerade dargestellte, bei weitem nicht erschöpfliche Zusammenfassung könnte ausschlaggebend für eine neue Richtung der Erforschung der Funktion der PMCA sein. Der über die Interaktion mit Dystrophin zumindest wahrscheinlich gemachte Zusammenhang der Pumpe mit dystrophinopathischen Kardiomyopathien kann als Grundlage für die Hypothese dienen, dass eine Fehlfunktion des Dystrophin-PMCA-Komplexes an der Pathogenese von Kardiomyopathien beteiligt ist.

Eine weitere interessante Tatsache an der Kolo-kalisation der PMCA mit Dystrophin ist, dass die Pumpe dadurch in enge örtliche Nähe zur ebenfalls Dystrophin-assoziierten (siehe oben) NO-Synthase gerückt wird. Somit befinden sich ein Kalzium-**regulierendes** (PMCA) und ein Kalzium-**reguliertes** Enzym (NOS, Zusammenfassung in Arnal 1999⁵) in direkter Nachbarschaft. Eine Beeinflussung der NO-Produktion durch die PMCA wäre eine mögliche Schlussfolgerung. Zieht man neuere Ergebnisse hinzu, die zeigen konnten, dass durch chronische Behandlung von Ratten mit dem NOS-Inhibitor N⁰-Nitro-L-Arginin-Methyl-Ester (L-NAME) eine Myokardhypotrophie hervorgerufen werden konnte³⁹, so lässt sich erneut ein Bogen zur oben beschriebenen Wachstumsmodulation durch die PMCA spannen.

Zusätzliches Gewicht erhält diese Hypothese durch neue Resultate aus dem eigenen Labor (Persönliche Mitteilung von Dr. K. Schuh, die im Folgenden dargestellten Ergebnisse stehen kurz vor der Veröffentlichung). Dabei konnten gezeigt werden, dass sowohl die PMCA4CI, als auch die NO-Synthase I (NOS-I) durch einen Anti-Dystrophin-Antikörper aus Herzgewebekomogenaten präzipitiert wurden, was eine direkte (physikalische) Interaktion dieser drei Moleküle nahe legt. Die Interaktionsstelle der PMCA für diesen Komplex konnte durch Präzipitation von Dystrophin durch ein an Sepharose gebundenes Polipeptid aufgedeckt werden, welches den 15 C-terminalen Aminosäuren der PMCA entsprach (eine Sequenz, welche an sogenannte PDZ-Domänen, z. B. der NOS-I bindet^{82,83,87}). Während die Interaktionsstelle für diesen Komplex im Falle der NOS-I somit die PDZ-Domäne sein dürfte, fehlt diese im Dystrophin, so dass die Interaktion hierbei entweder über eine andere, noch unbekannt Domäne im gleichen Pro-

tein, oder aber über ein Adapter-Protein (z.B. aus dem Komplex der Dystrophin-assoziierten Proteine, wie die Syntrophine) vermittelt wird.

Zusätzlich konnte in der selben Arbeit in Transfektionsversuchen gezeigt werden, dass die Überexpression der normalen PMCA (jedoch nicht einer PMCA-Mutante, die nicht an PDZ-Domänen binden konnte) die NO-Synthese durch eine normale NOS-I verminderte, während eine NOS-I-Mutante ohne PDZ-Domäne nicht durch PMCA-Überexpression beeinflusst wurde. Die Bedeutung dieser Regulation am isolierten Herz wurde durch Ischämie-Reperfusion-Versuche untersucht. Dabei zeigte sich ein vollständiger Verlust der myokardialen Regenerationsfähigkeit durch PMCA4CI-Überexpression, die durch die Gabe des NO-Donors S-Nitroso-N-Acetyl-D,L-Penicillamin (SNAP) wieder hergestellt werden konnte.

Insgesamt stellen die oben aufgezeigten Resultate einen wichtigen Schritt dar, bei der Aufklärung der Signalwege, über welche die PMCA in die zelluläre Signaltransduktion eingreift.

5.3. Perspektiven

Im Folgenden sollen nun zwei Hypothesen aufgezeigt werden, wie die PMCA unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit und der im vorhergehenden Kapitel dargestellten weiterführenden Resultate in die wachstumssteuernden Signalkaskaden einer Herzmuskelzelle eingreifen könnte. Dabei ist die erste Hypothese allgemeiner gehalten und versucht die Wachstumsbeeinflussung über eine Anpassung der örtlichen Kalziumkonzentration in Caveolae zu erklären, während die zweite speziell auf die oben beschriebene Interaktion und Regulation zwischen Dystrophin, PMCA und NOS-I eingeht.

1. Caveolae bilden durch ihre flaschenartig in die Plasmamembran eingestülpte Form ein eigenes Zellkompartiment, das gut dafür geeignet ist, im Inneren eine unterschiedliche Konzentration verschiedener Ionen und anderer Substanzen aufzubauen, als dies im übrigen Extrazellularraum der Fall ist. Die PMCA könnte durch zielgerichteten Transport von Ca^{2+} in das Lumen dieser Strukturen dort eine zur extrazellulären Kalziumkonzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_o$) vergleichsweise

hohe caveoläre Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cav}}$) aufbauen. Im Falle einer PMCA-Überexpression wäre diese Anreicherung noch stärker und würde zu einem noch größeren Konzentrationsunterschied zwischen $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cav}}$ und $[\text{Ca}^{2+}]_i$ führen. Ein hypertropher Stimulus, welcher über einen caveolären Rezeptor übermittelt wird, könnte nun Ionenkanäle öffnen, so dass es zu einem Einstrom von Kalziumionen aus dem Caveolae-Lumen in das Zellinnere kommt. Je höher der Konzentrationsgradient, umso größer ist der Einstrom und umso stärker fällt die Amplifizierung des Signals durch Kalzium als *second messenger* aus, was sich letztlich dann in beschleunigtem Wachstum äußert. Zur Verdeutlichung dieser Vorgänge wurde der Ablauf nochmals in Abbildung 11 zusammengefasst.

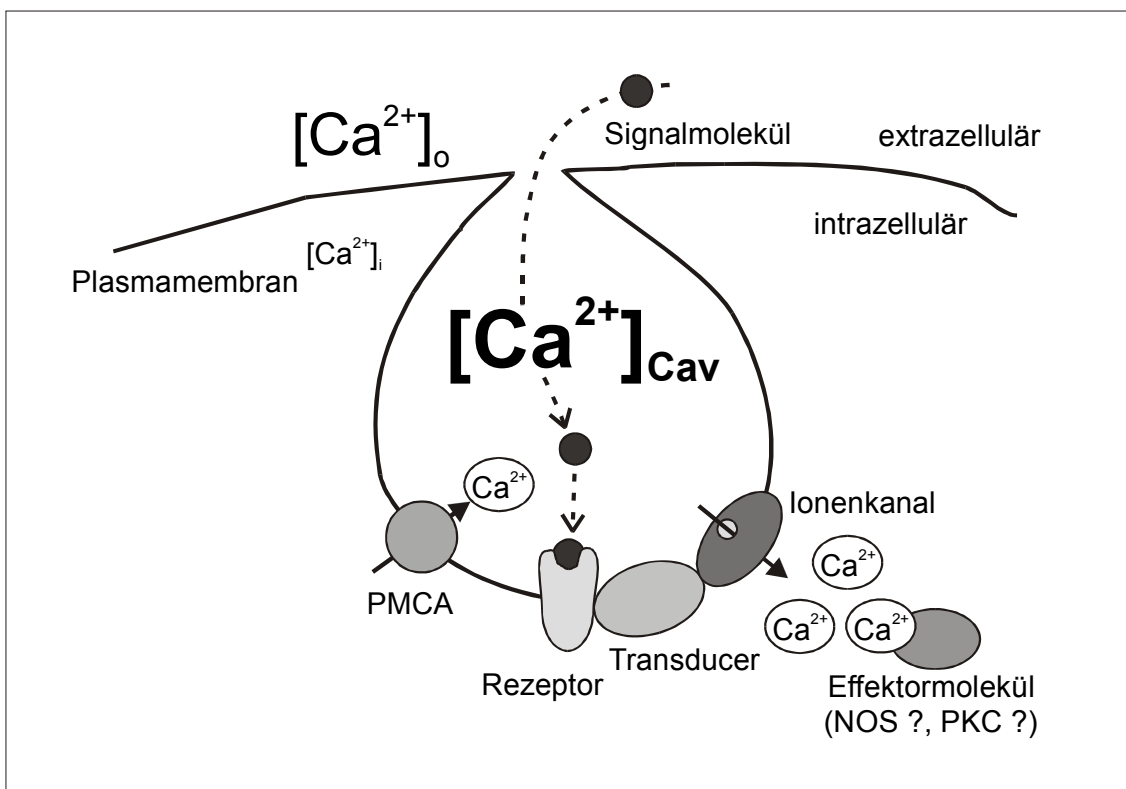


Abbildung 11: Modulation von hypertrophen Signaltransduktionswegen durch die PMCA, über Regulation der intracaveolären Kalziumkonzentration. Schematisch dargestellt ist ein Ausschnitt der Plasmamembran mit einer Caveola. Die Kalziumpumpe schafft gegenüber dem "normalen" Extrazellulärraum eine höhere lokale Kalziumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cav}}$. Bindet ein Signalmolekül an seinen intracaveolären Rezeptor, so kommt es (eventuell über Vermittlung eines Transducers) zur Öffnung von Ionenkanälen. Die einströmenden Ca^{2+} -Ionen können so als *second messenger* benachbarte Effektormoleküle steuern. $[\text{Ca}^{2+}]_o$: Extrazelluläre Kalziumkonzentration; $[\text{Ca}^{2+}]_i$: intrazelluläre Kalziumkonzentration; $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{Cav}}$: caveoläre Kalziumkonzentration; NOS: NO-Synthase; PKC: Proteinkinase C

2. Die drei caveolären Proteine PMCA, Dystrophin und nNOS bilden durch direkte, physikalische Interaktion über spezielle Bindungsdomänen (C-Terminus der PMCA, PDZ-Domäne der Nos-I) einen Komplex im Bereich der (caveolären) Plasmamembran. Durch eine Anpassung der lokalen Kalziumkonzentration vermag die PMCA die NO-Produktion der direkt benachbarten NOS-I zu steuern, die selbst ebenfalls durch Kalzium und Calmodulin reguliert wird. NO kann dann als *second* bzw. *third messenger* in weitere Signalwege eingreifen und letztlich zu einer Veränderung myokardialen Wachstums führen, wie zumindest ansatzweise bereits von deOliveira et al.³⁹ in Versuchen an adulten Ratten, die mit dem NOS-Inhibitor L-NAME behandelt wurden, gezeigt werden konnte. Abbildung 12 zeigt schematisch den beschriebenen Komplex aus Dystrophin, PMCA und NOS-I.

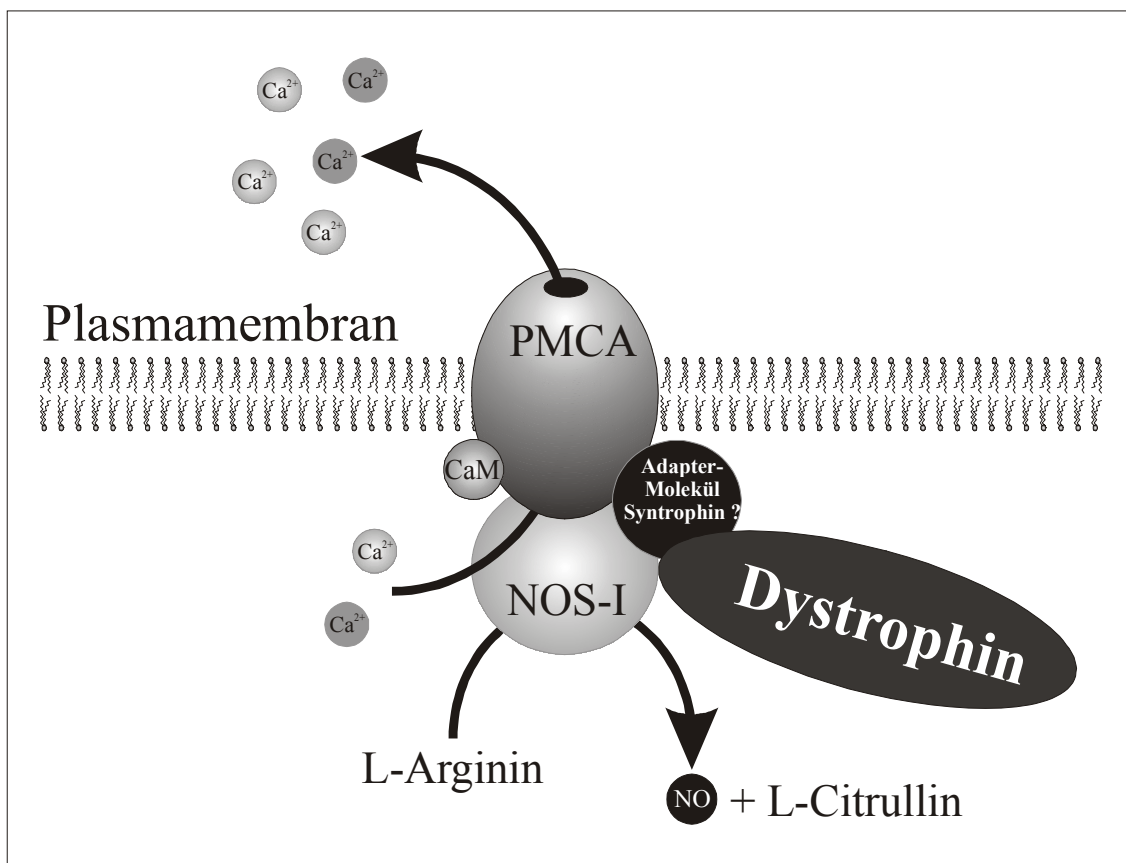


Abbildung 12: Komplex aus **PMCA**, NO-Synthase I (**NOS-I**) und **Dystrophin**, welcher durch eine Interaktion der drei Moleküle an spezifischen Bindungsstellen (PDZ-Domänen; im Falle des Dystrophin, welches keine PDZ-Domäne besitzt, evtl. über ein Adapter-Molekül) koordiniert wird. Durch Regulation der lokalen Kalziumkonzentration kann die durch Calmodulin (**CaM**) gesteuerte PMCA die Aktivität der ebenfalls

Calmodulin und Kalzium-abhängigen NOS-I beeinflussen und so die Produktion von **NO** (unter Bildung von **L-Citrullin**) aus **L-Arginin** regulieren. Die Abbildung wurde freundlicherweise von Dr. K. Schu und Prof. Dr. Neyses zur Verfügung gestellt und stammt aus der bereits zitierten und zur Veröffentlichung eingereichten Arbeit aus dem eigenen Labor über Interaktion und Regulation von PMCA, NOS-I und Dystrophin.

Die künftigen Arbeiten zur Erforschung der Funktion der PMCA müssen nun darauf ausgerichtet sein, den Signalweg genau zu charakterisieren, über welchen die PMCA in die Wachstumssteuerung der Herzmuskelzelle eingreift. Dabei können die eben aufgezeigten Theorien als Ausgangspunkte dienen, um die Signalkaskade sowohl aufwärts als auch abwärts zu verfolgen.

Bezüglich der Frage welche Signalereignisse vor einer Aktivierung/Inaktivierung der PMCA (zur Steuerung tiefer gelegener Signalmoleküle) liegen, wäre ein Versuchsansatz ähnlich der Wachstumsexperimente dieser Arbeit denkbar. So könnten z.B. durch Aktivitätsmessung der PMCA und Messung der NO-Synthese in Kulturen von "normalen" und hPMCA-transgenen neonatalen Kardiomyozyten unter Einsatz verschiedener hypertropher Stimuli die Signale gefunden werden, welche die PMCA, bzw. den PMCA-NOS-Komplex beeinflussen. Zusätzlich könnte unter Einsatz des NOS-Inhibitors L-NAME die Nivellierbarkeit dieses Einflusses überprüft werden.

Für das Verständnis der Weiterverarbeitung der PMCA-induzierten Signale wäre die Kenntnis weiterer Interaktionspartner des PMCA-NOS-I-Dystrophin-Komplexes hilfreich. Hierzu könnten zusätzliche Kopräzipitationsversuche durchgeführt werden.

Insgesamt kann davon ausgegangen werden, dass bisher nur ein kleiner Teil des komplexen Netzwerks bekannt ist, in welches die PMCA eingewoben ist. Insofern müssen noch viele weiterführende Untersuchungen durchgeführt werden, bis alle Einzelheiten aufgeklärt sind.

6. Zusammenfassung

Die Plasmamembran Ca^{2+} -ATPase (PMCA) ist ein in den meisten eukaryontischen Zellen exprimiertes Enzym. Sie katalysiert den Transport von Kalziumionen aus der Zelle und besitzt gegenüber Kalzium eine hohe Affinität jedoch geringe Transportkapazität. Trotz der guten biochemischen Charakterisierung der Pumpe ist ihre Funktion in Zellen wie Kardiomyozyten, die zusätzlich über andere Ca^{2+} -Transportsysteme wie den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher verfügen, weiterhin unklar.

Erste Ergebnisse aus dem eigenen Labor an PMCA-überexprimierenden L6-Myoblasten zeigten einen Einfluss des Enzyms auf deren Wachstum und Differenzierung. Um diese Erkenntnisse auf den Herzmuskel zu übertragen war im Vorfeld ein transgenes Rattenmodell generiert worden, welches die hPMCA4CI unter einem myokardspezifischen Promotor überexprimierte. Dieses Modell stand für die vorliegende Arbeit zur weiteren Charakterisierung zur Verfügung.

Untersucht wurde zunächst das Wachstumsverhalten von Primärkulturen neonataler Kardiomyozyten unter Stimulation mit fetalem Kälberserum, Noradrenalin und dem *Platelet Derived Growth Factor BB*, jeweils im Vergleich zwischen transgenen und Wildtyp-Kardiomyozyten. Dabei zeigte sich ein beschleunigtes Wachstum der PMCA-überexprimierenden Zellen.

In einem zweiten Ansatz wurden Untersuchungen angestellt, um die subzelluläre Lokalisation der PMCA innerhalb der Herzmuskelzelle aufzudecken. Dabei wurden im Speziellen die Caveolae als Ort der möglichen Lokalisation untersucht, kleine, ca. 50-100 nm große Einstülpungen der Plasmamembran, mit charakteristischer Lipid- und Proteinzusammensetzung, darunter auch viele Rezeptoren und Signaltransduktionsmoleküle. Insgesamt konnte mit den Methoden der Detergenzextraktion, Doppelimmunfluoreszenz, Präparation Caveolae-reicher Membranen und Immunpräzipitation gezeigt werden, dass die PMCA zu einem großen Teil in Caveolae lokalisiert ist. Zusätzlich konnte in der Immunpräzipitation eine Interaktion der PMCA mit dem Caveolae-assoziierten Zytoskelettprotein Dystrophin dargestellt werden.

Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die PMCA über eine Steuerung der lokalen Kalziumkonzentration im Bereich der Caveolae modulierend in wachstumsregulierende Signaltransduktionswege von Kardiomyozyten eingreifen kann.

7. Literaturverzeichnis

1. Ahmed SN, Brown DA, London E: On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent- insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent- insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 1997;36:10944-10953
2. Alkon DL, Rasmussen H: A spatial-temporal model of cell activation. *Science* 1988; 239:998-1005
3. Anderson RG: Plasmalemmal caveolae and GPI-anchored membrane proteins. *Curr.Opin.Cell Biol.* 1993;5:647-652
4. Anderson RG: The caveolae membrane system. *Annu.Rev.Biochem.* 1998;67:199-225
5. Arnal JF, Dinh-Xuan AT, Pueyo M, Darblade B, Rami J: Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. *Cell Mol.Life Sci.* 1999;55:1078-1087
6. Badorff C, Berkely N, Mehrotra S, Talhouk JW, Rhoads RE, Knowlton KU: Enteroviral protease 2A directly cleaves dystrophin and is inhibited by a dystrophin-based substrate analogue. *J.Biol.Chem.*2000;275:11191-11197
7. Badorff C, Lee GH, Knowlton KU: Enteroviral cardiomyopathy: bad news for the dystrophin-glycoprotein complex. *Herz* 2000;25:227-232
8. Bassani JW, Bassani RA, Bers DM: Relaxation in rabbit and rat cardiac cells: species-dependent differences in cellular mechanisms. *J.Physiol.(Lond.)* 1994;476:279-293
9. Bennett DL, Cheek TR, Berridge MJ, De Smedt H, Parys JB, Missiaen L, Bootman MD: Expression and function of ryanodine receptors in nonexcitable cells. *J.Biol.Chem.* 1996;271:6356-6362
10. Berridge MJ: Calcium signaling and cell proliferation. *Bioessays* 1995;17:491-500
11. Berridge MJ: Elementary and global aspects of calcium signaling. *J Exp.Biol.* 1997; 200:315-319
12. Bers DM, Bassani JW, Bassani RA: Competition and redistribution among calcium transport systems in rabbit cardiac myocytes. *Cardiovasc.Res.* 1993;27:1772-1777
13. Bies RD, Maeda M, Roberds SL, Holder E, Bohlmeier T, Young JB, Campbell KP: A 5' dystrophin duplication mutation causes membrane deficiency of alpha-dystroglycan in a family with X-linked cardiomyopathy. *J.Mol.Cell Cardiol.* 1997;29: 3175-3188
14. Blake DJ, Kröger S: The neurobiology of Duchenne muscular dystrophy: learning lessons from muscle? *Trends Neurosci.* 2000;23:92-99
15. Brandt P, Neve RL, Kammesheidt A, Rhoads RE, Vanaman TC: Analysis of the tissue-specific distribution of mRNAs encoding the plasma membrane calcium-pumping ATPases and characterization of an alternately spliced form of PMCA4 at the cDNA and genomic levels. *J.Biol.Chem.* 1992;267:4376-4385

16. Brandt P, Ibrahim E, Bruns GA, Neve RL: Determination of the nucleotide sequence and chromosomal localization of the ATP2B2 gene encoding human Ca^{2+} -pumping ATPase isoform PMCA2. *Genomics* 1992;14:484-487
17. Brandt PC, Vanaman TC: The plasma membrane calcium pump: not just another pretty ion translocase. *Glycobiology*. 1996;6:665-668
18. Brandt PC, Sisken JE, Neve RL, Vanaman TC: Blockade of plasma membrane calcium pumping ATPase isoform I impairs nerve growth factor-induced neurite extension in pheochromocytoma cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996;93:13843-13848
19. Brenman JE, Chao DS, Xia H, Aldape K, Brecht DS: Nitric oxide synthase complexed with dystrophin and absent from skeletal muscle sarcolemma in Duchenne muscular dystrophy. *Cell* 1995;82:743-752
20. Brown BJ, Hilfiker H, DeMarco SJ, Zacharias DA, Greenwood TM, Guerini D, Strehler EE: Primary structure of human plasma membrane Ca^{2+} -ATPase isoform 3. *Biochim.Biophys.Acta* 1996;1283:10-13
21. Brown DA, Rose JK: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992;68:533-544
22. Bruns RR, Palade GE: Studies on blood capillaries. I. General organization of blood capillaries in muscle. *J.Cell Biol.* 1968;37:244-276
23. Cannell MB, Cheng H, Lederer WJ: The control of calcium release in heart muscle. *Science* 1995;268:1045-1049
24. Carafoli E, Tiozzo R, Rossi C.S., Lugli G.: Mitochondrial Ca^{2+} -uptake and heart relaxation, in Bolis E, Keynes RD, Wilbrandt W (eds): *Role of membranes in secretory processes*. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 1972, pp 175-181
25. Carafoli E: The transport of calcium across the inner membrane of mitochondria., in Carafoli E (ed): *Membrane transport of calcium*. Academic Press, London, 1982, pp 109-139
26. Carafoli E: The calcium pumping ATPase of the plasma membrane. *Annu.Rev.Physiol* 1991;53:531-547
27. Carafoli E, Kessler F, Falchetto R, Heim R, Quadroni M, Krebs J, Strehler EE, Vorherr T: The molecular basis of the modulation of the plasma membrane calcium pump by calmodulin. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 1992;671:58-68
28. Carafoli E: The Ca^{2+} pump of the plasma membrane. *J Biol.Chem.* 1992;267:2115-2118
29. Carafoli E, Guerini D: Molecular and cellular biology of plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Trends in Cardiovasc.Med.* 1993;3:177-184
30. Carafoli E: Biogenesis: plasma membrane calcium ATPase: 15 years of work on the purified enzyme. *FASEB J* 1994;8:993-1002
31. Carafoli E: Plasma membrane calcium pump: structure, function and relationships. *Basic.Res.Cardiol.* 1997;92 Suppl 1:59-61
32. Carlson CG: The dystrophinopathies: an alternative to the structural hypothesis. *Neurobiol.Dis.* 1998;5:3-15

33. Caroni P, Reinlib L, Carafoli E: Charge movements during the Na^+ - Ca^{2+} exchange in heart sarcolemmal vesicles. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1980;77:6354-6358
34. Cesarone CF, Bolognesi C, Santi L: Improved Microfluorometric DNA Determination in Biological Material Using 33258 Hoechst. *Analytical Biochemistry* 1979; 100:188-197
35. Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S: Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response. *FASEB J.* 1991;5:3037-3046
36. Chun M, Liyanage UK, Lisanti MP, Lodish HF: Signal transduction of a G protein-coupled receptor in caveolae: colocalization of endothelin and its receptor with caveolin. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994;91:11728-11732
37. Clapham DE: Calcium signaling. *Cell* 1995;80:259-268
38. Couet J, Li S, Okamoto T, Scherer PE, Lisanti MP: Molecular and Cellular Biology of Caveolae; Paradoxes and Plasticities. *Trends in Cardiovasc.Med.* 1997;7:103-110
39. de Oliveira CF, Cintra KA, Teixeira SA, De Luca IM, Antunes E, De Nucci G: Development of cardiomyocyte hypertrophy in rats under prolonged treatment with a low dose of a nitric oxide synthesis inhibitor. *Eur.J.Pharmacol* 2000;391:121-126
40. Dhalla NS, Wang X, Beamish RE: Intracellular calcium handling in normal and failing hearts. *Exp.Clin.Cardio.* 1996;1:7-20
41. Doyle DD, Goings G, Upshaw-Earley J, Ambler SK, Mondul A, Palfrey HC, Page E: Dystrophin associates with caveolae of rat cardiac myocytes: relationship to dystroglycan. *Circ Res* 2000. Sep.15.;87.(6.):480-488
42. Enyedi A, Flura M, Sarkadi B, Gardos G, Carafoli E: The maximal velocity and the calcium affinity of the red cell calcium pump may be regulated independently. *J.Biol.Chem.* 1987;262:6425-6430
43. Enyedi A, Filoteo AG, Gardos G, Penniston JT: Calmodulin-binding domains from isozymes of the plasma membrane Ca^{2+} pump have different regulatory properties. *J.Biol.Chem.* 1991;266:8952-8956
44. Falchetto R, Vorherr T, Brunner J, Carafoli E: The plasma membrane Ca^{2+} pump contains a site that interacts with its calmodulin-binding domain. *J.Biol.Chem.* 1991;266:2930-2936
45. Falchetto R, Vorherr T, Carafoli E: The calmodulin-binding site of the plasma membrane Ca^{2+} pump interacts with the transduction domain of the enzyme. *Protein Sci.* 1992;1:1613-1621
46. Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T: Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *J.Biol.Chem.* 1996;271:22810-22814
47. Fielding PE, Fielding CJ: Plasma membrane caveolae mediate the efflux of cellular free cholesterol. *Biochemistry* 1995;34:14288-14292

48. Filoteo AG, Gorski JP, Penniston JT: The ATP-binding site of the erythrocyte membrane Ca^{2+} pump. Amino acid sequence of the fluorescein isothiocyanate-reactive region. *J.Biol.Chem.* 1987;262:6526-6530
49. Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A, Mikoshiba K, Ogawa K: Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J.Cell Biol.* 1992;119:1507-1513
50. Fujimoto T: Calcium pump of the plasma membrane is localized in caveolae. *J.Cell Biol.* 1993;120:1147-1157
51. Fujimoto T, Miyawaki A, Mikoshiba K: Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae is linked to actin filaments. *J.Cell Sci.* 1995; 108:7-15
52. Gabella G, Blundell D: Effect of stretch and contraction on caveolae of smooth muscle cells. *Cell Tissue Res* 1978;190:255-271
53. Giannini G, Sorrentino V: Molecular structure and tissue distribution of ryanodine receptors calcium channels. *Med.Res Rev.* 1995;15:313-323
54. Glenney JRJ: Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J.Biol.Chem.* 1989;264:20163-20166
55. Glenney JRJ, Soppet D: Sequence and expression of caveolin, a protein component of caveolae plasma membrane domains phosphorylated on tyrosine in Rous sarcoma virus-transformed fibroblasts. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1992;89:10517-10521
56. Goldspink PH, Russell B: The cAMP response element binding protein is expressed and phosphorylated in cardiac myocytes. *Circ.Res.* 1994;74:1042-1049
57. Gopinath RM, Vincenzi FF: Phosphodiesterase protein activator mimics red blood cell cytoplasmic activator of $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{ATPase}$. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1977;77:1203-1209
58. Greeb J, Shull GE: Molecular cloning of a third isoform of the calmodulin-sensitive plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase that is expressed predominantly in brain and skeletal muscle. *J.Biol.Chem.* 1989;264:18569-18576
59. Green NM: ATP-driven cation pumps: alignment of sequences. *Biochem.Soc.Trans.* 1989;17:972
60. Guerini D, Schroder S, Foletti D, Carafoli E: Isolation and characterization of a stable Chinese hamster ovary cell line overexpressing the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *J.Biol.Chem.* 1995;270:14643-14650
61. Gustafson TA, Markham BE, Morkin E: Effects of thyroid hormone on alpha-actin and myosin heavy chain gene expression in cardiac and skeletal muscles of the rat: measurement of mRNA content using synthetic oligonucleotide probes. *Circ.Res.* 1986;59:194-201
62. Hammes A, Oberdorf S, Strehler EE, Stauffer T, Carafoli E, Vetter H, Neyses L: Differentiation-specific isoform mRNA expression of the calmodulin-dependent plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *FASEB J* 1994;8:428-435

63. Hammes A, Oberdorf MS, Jenatschke S, Pelzer T, Maass A, Gollnick F, Meyer R, Afflerbach J, Neyses L: Expression of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase in myogenic cells. *J.Biol.Chem.* 1996;271:30816-30822
64. Hammes A, Oberdorf MS, Rother T, Nething K, Gollnick F, Linz KW, Meyer R, Hu K, Han H, Gaudron P, Ertl G, Hoffmann S, Ganten U, Vetter R, Schuh K, Benkwitz C, Zimmer HG, Neyses L: Overexpression of the sarcolemmal calcium pump in the myocardium of transgenic rats. *Circ.Res.* 1998;83:877-888
65. Heim R, Hug M, Iwata T, Strehler EE, Carafoli E: Microdiversity of human-plasma-membrane calcium-pump isoform 2 generated by alternative RNA splicing in the N-terminal coding region. *Eur.J.Biochem.* 1992;205:333-340
66. Heiss NS, Rogner UC, Kioschis P, Korn B, Poustka A: Transcription mapping in a 700-kb region around the DXS52 locus in Xq28: isolation of six novel transcripts and a novel ATPase isoform (hPMCA5). *Genome Res.* 1996;6:478-491
67. Heizmann CW, Hunziker W: Intracellular calcium-binding proteins: more sites than insights. *Trends.Biochem.Sci.* 1991;16:98-103
68. Howard A, Legon S, Walters JR: Human and rat intestinal plasma membrane calcium pump isoforms. *Am.J.Physiol.* 1993;265:G917-G925
69. Husain M, Jiang L, See V, Bein K, Simons M, Alper SL, Rosenberg RD: Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by plasma membrane Ca^{2+} -ATPase. *Am.J.Physiol.* 1997;272:C1947-C1959
70. Ikura M, Clore GM, Gronenborn AM, Zhu G, Klee CB, Bax A: Solution structure of a calmodulin-target peptide complex by multidimensional NMR. *Science* 1992;256:632-638
71. Ito H, Hirata Y, Hiroe M, Tsujino M, Adachi S, Takamoto T, Nitta M, Taniguchi K, Marumo F: Endothelin-1 induces hypertrophy with enhanced expression of muscle-specific genes in cultured neonatal rat cardiomyocytes. *Circ.Res.* 1991;69:209-215
72. Ito H, Hiroe M, Hirata Y, Tsujino M, Adachi S, Shichiri M, Koike A, Nogami A, Marumo F: Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes. *Circulation* 1993;87:1715-1721
73. Iwaki K, Sukhatme VP, Shubeita HE, Chien KR: Alpha- and beta-adrenergic stimulation induces distinct patterns of immediate early gene expression in neonatal rat myocardial cells. fos/jun expression is associated with sarcomere assembly; Egr-1 induction is primarily an alpha 1-mediated response. *J.Biol.Chem.* 1990;265:13809-13817
74. Izumo S, Nadal GB, Mahdavi V: Protooncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1988;85:339-343
75. James P, Zvaritch EI, Shakhparonov MI, Penniston JT, Carafoli E: The amino acid sequence of the phosphorylation domain of the erythrocyte Ca^{2+} ATPase. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1987;149:7-12

76. James P, Maeda M, Fischer R, Verma AK, Krebs J, Penniston JT, Carafoli E: Identification and primary structure of a calmodulin binding domain of the Ca²⁺ pump of human erythrocytes. *J.Biol.Chem.* 1988;263:2905-2910
77. Jarrett HW, Penniston JT: Partial purification of the Ca²⁺-Mg²⁺ ATPase activator from human erythrocytes: its similarity to the activator of 3':5' - cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 1977;77:1210-1216
78. Kannel WB, Gordon T, Offutt D: Left ventricular hypertrophy by electrocardiogram. Prevalence, incidence, and mortality in the Framingham study. *Ann.Intern.Med.* 1969;71:89-105
79. Kargacin GJ: Calcium signaling in restricted diffusion spaces. *Biophys.J.* 1994; 67:262-272
80. Keeton TP, Burk SE, Shull GE: Alternative splicing of exons encoding the calmodulin-binding domains and C termini of plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms 1, 2, 3, and 4. *J.Biol.Chem.* 1993;268:2740-2748
81. Keeton TP, Shull GE: Primary structure of rat plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoform 4 and analysis of alternative splicing patterns at splice site A. *Biochem.J.* 1995;306:779-785
82. Kim E, DeMarco SJ, Marfatia SM, Chishti AH, Sheng M, Strehler EE: Plasma membrane Ca²⁺ ATPase isoform 4b binds to membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) proteins via their PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) domains. *J.Biol.Chem.* 1998;273:1591-159
83. Kim E, Niethammer M, Rothschild A, Jan YN, Sheng M: Clustering of Shaker-type K⁺ channels by interaction with a family of membrane-associated guanylate kinases. *Nature* 1995;378:85-88
84. Knauf PA, Proverbio F, Hoffman JF: Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca-ATPase and Na, K-ATPase in human red cell ghosts. *J.Gen.Physiol.* 1974;63:324-336
85. Komuro I, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Katoh Y, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y: Stretching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression. *J.Biol.Chem.* 1990;265:3595-3598
86. Komuro I, Katoh Y, Kaida T, Shibazaki Y, Kurabayashi M, Hoh E, Takaku F, Yazaki Y: Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes. Possible role of protein kinase C activation. *J.Biol.Chem.* 1991;266:1265-1268
87. Kornau HC, Schenker LT, Kennedy MB, Seeburg PH: Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* 1995;269:1737-1740
88. Kosk KD, Bzdega T: Activation of the erythrocyte Ca²⁺-ATPase by either self- association or interaction with calmodulin. *J.Biol.Chem.* 1988;263:18184-18189
89. Kubisch C, Wollnik B, Maass A, Meyer R, Vetter H, Neyses L: Immediate-early gene induction by repetitive mechanical but not electrical activity in adult rat cardiomyocytes. *FEBS Lett.* 1993;335:37-40

90. Kurzchalia TV, Dupree P, Monier S: VIP21-Caveolin, a protein of the trans-Golgi network and caveolae. *FEBS Lett.* 1994;346:88-91
91. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685
92. Li S, Okamoto T, Chun M, Sargiacomo M, Casanova JE, Hansen SH, Nishimoto I, Lisanti MP: Evidence for a regulated interaction between heterotrimeric G proteins and caveolin. *J.Biol.Chem.* 1995;270:15693-15701
93. Li S, Couet J, Lisanti MP: Src tyrosine kinases, Galpha subunits, and H-Ras share a common membrane-anchored scaffolding protein, caveolin. Caveolin binding negatively regulates the auto-activation of Src tyrosine kinases. *J.Biol.Chem.* 1996; 271:29182-29190
94. Li S, Song KS, Lisanti MP: Expression and characterization of recombinant caveolin. Purification by polyhistidine tagging and cholesterol-dependent incorporation into defined lipid membranes. *J.Biol.Chem.* 1996;271:568-573
95. Li S, Seitz R, Lisanti MP: Phosphorylation of caveolin by src tyrosine kinases. The alpha-isoform of caveolin is selectively phosphorylated by v-Src in vivo. *J.Biol.Chem.* 1996;271:3863-3868
96. Lipp P, Niggli E: Submicroscopic calcium signals as fundamental events of excitation--contraction coupling in guinea-pig cardiac myocytes. *J.Physiol.(Lond.)* 1996; 492:31-38
97. Lisanti MP, Tang ZL, Sargiacomo M: Caveolin forms a hetero-oligomeric protein complex that interacts with an apical GPI-linked protein: implications for the biogenesis of caveolae. *J.Cell Biol.* 1993;123:595-604
98. Lisanti MP, Scherer PE, Vidugiriene J, Tang Z, Hermanowski VA, Tu YH, Cook RF, Sargiacomo M: Characterization of caveolin-rich membrane domains isolated from an endothelial-rich source: implications for human disease. *J.Cell Biol.* 1994; 126:111-126
99. Lisanti MP, Tang Z, Scherer PE, Sargiacomo M: Caveolae purification and glycosylphosphatidylinositol-linked protein sorting in polarized epithelia. *Methods Enzymol.* 1995;250:655-668
100. Liu BF, Guangmao C, Kuo TH: Suppression of rat aortic endothelial cell growth by overexpression of plasma membrane calcium pump. *Mol.Biol.Cell* 1995;6:
101. Liu P, Anderson RG: Compartmentalized production of ceramide at the cell surface. *J.Biol.Chem.* 1995;270:27179-27185
102. Liu P, Ying Y, Ko YG, Anderson RG: Localization of platelet-derived growth factor-stimulated phosphorylation cascade to caveolae. *J.Biol.Chem.* 1996;271:10299-10303
103. Lompre AM, Schwartz K, dAlbis A, Lacombe G, Van Thiem N, Swynghedauw B: Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature* 1979;282:105-107

104. López LJ, Shacklock PS, Balke CW, Wier WG: Local, stochastic release of Ca^{2+} in voltage-clamped rat heart cells: visualization with confocal microscopy. *J.Physiol.(Lond.)* 1994;480:21-29
105. Lowy OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J Biol.Chem.* 1951;193:265-275
106. MacLennan DH, Brandl CJ, Korczak B, Green NM: Amino-acid sequence of a Ca^{2+} + Mg^{2+} -dependent ATPase from rabbit muscle sarcoplasmic reticulum, deduced from its complementary DNA sequence. *Nature* 1985;316:696-700
107. Mann DL, Kent RL, Cooper G: Load regulation of the properties of adult feline cardiocytes: growth induction by cellular deformation. *Circ.Res.* 1989;64:1079-1090
108. Marshall CJ: Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* 1995;80:179-185
109. Meador WE, Means AR, Quijcho FA: Target enzyme recognition by calmodulin: 2.4 A structure of a calmodulin-peptide complex. *Science* 1992;257:1251-1255
110. Mercadier JJ, Lompré AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K: Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ.Res.* 1981;49:525-532
111. Messerli FH: Left ventricular hypertrophy, arterial hypertension and sudden death. *J.Hypertens.Suppl.* 1990;8:S181-S186
112. Meyer T: Cell signaling by second messenger waves. *Cell* 1991;64:675-678
113. Molkenkin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN: A calcineurin-dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy. *Cell* 1998;93:215-228
114. Mullins JJ, Ganten D: Transgenic animals: new approaches to hypertension research. *J.Hypertens.Suppl.* 1990;8:S35-S37
115. Nadal GB, Mahdavi V: Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin.Invest.* 1989; 84:1693-1700
116. Neyses L, Reinlib L, Carafoli E: Phosphorylation of the Ca^{2+} pumping ATPase of heart sarcolemma and erythrocyte plasma membrane by the cAMP-dependent protein kinase. *J.Biol.Chem.* 1985;260:10283-10287
117. Neyses L, Nousek J, Vetter H: Inhibition of endothelin-1 induced myocardial protein synthesis by an antisense oligonucleotide against the early growth response gene-1. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991;181:22-27
118. Neyses L, Nousek J, Oberdorf S, Vetter H: Induction of the early growth response gene-1 and protein synthesis by platelet derived growth factor BB and insulin in rat cardiomyocytes. *Circulation* 1991;II-396
119. Neyses L, Pelzer T: The biological cascade leading to cardiac hypertrophy. *Eur.Heart J* 1995;16 Suppl N:8-11

120. Neyses L, Pelzer T: [Molecular adaptation of the heart to hypertension] Molekulare Adaption des Herzens an Hypertonie. *Z.Kardiol.* 1995;84 Suppl 4:71-76
121. Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD: Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na^+ - Ca^{2+} exchanger. *Science* 1990;250:562-565
122. Niggli V, Adunyah ES, Penniston JT, Carafoli E: Purified $(\text{Ca}^{2+}$ - $\text{Mg}^{2+})$ -ATPase of the erythrocyte membrane. Reconstitution and effect of calmodulin and phospholipids. *J.Biol.Chem.* 1981;256:395-401
123. Niggli V, Adunyah ES, Carafoli E: Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids, and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} - ATPase. *J.Biol.Chem.* 1981;256:8588-8592
124. Nigro V, Okazaki Y, Belsito A, Piluso G, Matsuda Y, Politano L, Nigro G, Ventura C, Abbondanza C, Molinari AM, Acampora D, Nishimura M, Hayashizaki Y, Puca GA: Identification of the Syrian hamster cardiomyopathy gene. *Hum.Mol.Genet.* 1997;6:601-607
125. Oldfors A, Eriksson BO, Kyllerman M, Martinsson T, Wahlstrom J: Dilated cardiomyopathy and the dystrophin gene: an illustrated review. *Br.Heart J.* 1994;72:344-348
126. Parton RG: Ultrastructural localization of gangliosides; GM1 is concentrated in caveolae. *J.Histochem.Cytochem.* 1994;42:155-166
127. Passier R, Zeng H, Frey N, Naya FJ, Nicol RL, McKinsey TA, Overbeek P, Richardson JA, Grant SR, Olson EN: CaM kinase signaling induces cardiac hypertrophy and activates the MEF2 transcription factor in vivo. *J.Clin.Invest.* 2000. 2000;105:1395-1406
128. Rayns DG, Simpson FO, Bertaud WS: Surface features of striated muscle. Guinea-pig cardiac muscle. *J.Cell Sci.* 1968;3:467-482
129. Reuter H, Seitz N: The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J.Physiol.(Lond.)* 1968;195:451-470
130. Ronner P, Gazzotti P, Carafoli E: A lipid requirement for the $(\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+})$ -activated ATPase of erythrocyte membranes. *Arch.Biochem.Biophys.* 1977;179:578-583
131. Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG: Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 1992;68:673-682
132. Rüegg JC: *Calcium in muscle contraction*. Springer Verlag, 1992, pp 56-58
133. Sacchetto R, Margreth A, Pelosi M, Carafoli E: Colocalization of the dihydropyridine receptor, the plasma-membrane calcium ATPase isoform 1 and the sodium/calcium exchanger to the junctional-membrane domain of transverse tubules of rabbit skeletal muscle. *Eur.J.Biochem.* 1996;237:483-488
134. Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S: Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes in vitro. *Cell* 1993;75:977-984
135. Sadoulet PH, Kunkel LM: Dystrophin and its isoforms. *Brain Pathol.* 1996;6:25-35

136. Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP: Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995;92:9407-9411
137. Schatzmann HJ: ATP-dependent Ca^{2+} extrusion from human red cells. *Experientia* 1966;22:364-365
138. Schatzmann HJ: Carafoli E (ed): *Membrane Transport of Calcium*. Academic Press, London, 1982, pp 41-108
139. Scherer PE, Lisanti MP, Baldini G, Sargiacomo M, Mastick CC, Lodish HF: Induction of caveolin during adipogenesis and association of GLUT4 with caveolin-rich vesicles. *J.Cell Biol.* 1994;127:1233-1243
140. Scherer PE, Tang Z, Chun M, Sargiacomo M, Lodish HF, Lisanti MP: Caveolin isoforms differ in their N-terminal protein sequence and subcellular distribution. Identification and epitope mapping of an isoform-specific monoclonal antibody probe. *J.Biol.Chem.* 1995;270:16395-16401
141. Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP: Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1996;93:131-135
142. Schnitzer JE, Oh P, Jacobson BS, Dvorak AM: Caveolae from luminal plasmalemma of rat lung endothelium: microdomains enriched in caveolin, Ca^{2+} -ATPase, and inositol trisphosphate receptor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1995;92:1759-1763
143. Schnitzer JE, McIntosh DP, Dvorak AM, Liu J, Oh P: Separation of caveolae from associated microdomains of GPI-anchored proteins. *Science* 1995;269:1435-1439
144. Schroeder R, London E, Brown D: Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994;91:12130-12134
145. Schwartz K, de la Bastie D, Bouveret P, Oliviero P, Alonso S, Buckingham M: Alpha-skeletal muscle actin mRNA's accumulate in hypertrophied adult rat hearts. *Circ.Res.* 1986;59:551-555
146. Shaul PW, Smart EJ, Robinson LJ, German Z, Yuhanna IS, Ying Y, Anderson RG, Michel T: Acylation targets endothelial nitric-oxide synthase to plasmalemmal caveolae. *J.Biol.Chem.* 1996;271:6518-6522
147. Shenoy SA, Dietzen DJ, Kwong J, Link DC, Lublin DM: Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J.Cell Biol.* 1994;126:353-363
148. Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR: Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes. A paracrine mechanism for myocardial cell hypertrophy. *J.Biol.Chem.* 1990;265:20555-20562
149. Shull GE, Greeb J: Molecular cloning of two isoforms of the plasma membrane Ca^{2+} -transporting ATPase from rat brain. Structural and functional domains exhibit

- similarity to Na⁺,K⁺- and other cation transport ATPases. *J.Biol.Chem.* 1988;263:8646-8657
150. Silbernagl S, Despopoulos A: Grundlagen, Zellphysiologie, in Silbernagl S, Despopoulos A (eds): *Taschenatlas der Physiologie*. 3rd ed., Georg Thieme Verlag Stuttgart - New York, 1991, pp 15-17
151. Simpson P, McGrath A, Savion S: Myocyte hypertrophy in neonatal rat heart cultures and its regulation by serum and by catecholamines. *Circ.Res.* 1982;51:787-801
152. Simpson P: Norepinephrine-stimulated hypertrophy of cultured rat myocardial cells is an alpha 1 adrenergic response. *J Clin.Invest.* 1983;72:732-738
153. Simpson P: Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an alpha 1-adrenergic receptor and induction of beating through an alpha 1- and beta 1-adrenergic receptor interaction. Evidence for independent regulation of growth and beating. *Circ.Res.* 1985;56:884-894
154. Smallwood JI, Gügi B, Rasmussen H: Regulation of erythrocyte Ca²⁺ pump activity by protein kinase C. *J.Biol.Chem.* 1988;263:2195-2202
155. Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lissant MP: Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J.Biol.Chem.* 1996;271:15160-15165
156. Stahl WL, Eakin TJ, Owens JWJ, Breininger JF, Filuk PE, Anderson WR: Plasma membrane Ca²⁺-ATPase isoforms: distribution of mRNAs in rat brain by in situ hybridization. *Brain Res.Mol.Brain Res.* 1992;16:223-231
157. Stahl WL, Keeton TP, Eakin TJ: The plasma membrane Ca²⁺-ATPase mRNA isoform PMCA 4 is expressed at high levels in neurons of rat piriform cortex and neocortex. *Neurosci.Lett.* 1994;178:267-270
158. Starksen NF, Simpson PC, Bishopric N, Coughlin SR, Lee WM, Escobedo JA, Williams LT: Cardiac myocyte hypertrophy is associated with c-myc protooncogene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1986;83:8348-8350
159. Stauffer TP, Guerini D, Carafoli E: Tissue distribution of the four gene products of the plasma membrane Ca²⁺ pump. A study using specific antibodies. *J.Biol.Chem.* 1995;270:12184-12190
160. Strehler EE, Strehler PM, Vogel G, Carafoli E: mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:6908-6912
161. Strehler EE: Plasma membrane Ca²⁺ pumps and Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Semin.Cell Biol.* 1990;1:283-295
162. Striessnig J: Pharmacology, structure and function of cardiac L-type Ca(2+) channels. *Cell Physiol. Biochem.* 1999;9:242-269
163. Swynghedauw B: Heart failure: A disease of adaptation. *Heart Failure* 1990;6:57-62

164. Tang Z, Scherer PE, Okamoto T, Song K, Chu C, Kohtz DS, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP: Molecular cloning of caveolin-3, a novel member of the caveolin gene family expressed predominantly in muscle. *J.Biol.Chem.* 1996;271:2255-2261
165. Tang Z, Okamoto T, Boontrakulpoontawee P, Katada T, Otsuka AJ, Lisanti MP: Identification, sequence, and expression of an invertebrate caveolin gene family from the nematode *Caenorhabditis elegans*. Implications for the molecular evolution of mammalian caveolin genes. *J.Biol.Chem.* 1997;272:2437-2445
166. Taverna RD, Hanahan DJ: Modulation of human erythrocyte $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ATPase activity by phospholipase A2 and proteases. A comparison with calmodulin. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1980;94:652-659
167. The Genome Database. <http://www.gdb.org/gdb/>. 23-2-2001. Internet Communication
168. The Human Genome Organisation (HUGO). <http://www.gene.ucl.ac.uk/hugo/>. 11-1-2001. Internet Communication
169. Tinsley JM, Blake DJ, Zuellig RA, Davies KE: Increasing complexity of the dystrophin-associated protein complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1994;91:8307-8313
170. Toescu EC, Petersen OH: Region-specific activity of the plasma membrane Ca^{2+} pump and delayed activation of Ca^{2+} entry characterize the polarized, agonist-evoked Ca^{2+} signals in exocrine cells. *J.Biol.Chem.* 1995;270:8528-8535
171. Travis J: Cell biologists explore 'tiny caves'. *Science* 1993;262:1208-1209
172. Verma AK, Filoteo AG, Stanford DR, Wieben ED, Penniston JT, Strehler EE, Fischer R, Heim R, Vogel G, Mathews S: Complete primary structure of a human plasma membrane Ca^{2+} pump. *J.Biol.Chem.* 1988;263:14152-14159
173. Wang KK, Wright LC, Machan CL, Allen BG, Conigrave AD, Roufogalis BD: Protein kinase C phosphorylates the carboxyl terminus of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase from human erythrocytes. *J.Biol.Chem.* 1991;266:9078-9085
174. Weiner HL, Swain JL: Acidic fibroblast growth factor mRNA is expressed by cardiac myocytes in culture and the protein is localized to the extracellular matrix. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 1989;86:2683-2687
175. White JA, McAlpine PJ, Antonarakis S, Cann H, Eppig JT, Frazer K, Frezal J, Lancet D, Nahmias J, Pearson P, Peters J, Scott A, Scott H, Spurr N, Talbot C, Povey S: Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. *Genomics* 1997;45:468-471
176. Yamada E: The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol* 1955;1:445-458
177. Yamazaki T, Yazaki Y: Molecular basis of cardiac hypertrophy. *Z.Kardiol* 2000 Jan.; 89.(1.):1.-6. 2000;89:1-6
178. Zierhut W, Zimmer HG: Significance of myocardial alpha- and beta-adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy. *Circ.Res.* 1989;65:1417-1425
179. Zvaritch E, James P, Vorherr T, Falchetto R, Modyanov N, Carafoli E: Mapping of functional domains in the plasma membrane Ca^{2+} pump using trypsin proteolysis. *Biochemistry* 1990;29:8070-8076

8. Anhang

Abkürzungen

βOG:	β-Octyl-Gluco-Pyranosid
BrdU:	Bromodesoxyuridine
CaM:	Calmodulin
cAMP:	cyclic Adenosinmonophosphat
CHO:	chinese hamster ovary cells
Ci:	Curie
CPM:	counts per minute
DAP:	Dystrophin assoziierte Proteine
Dig:	Digitonin
DNA:	desoxyribonucleic acid
ECL:	enhanced chemiluminescence
FCS:	fetal calf serum
h:	Stunde
HEPES:	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-ethansulfonat
IP3:	Inositol-(1,4,5)-trisphosphat
kD:	Kilo Dalton
M:	Molar
MHC:	myosin heavy chain
MLC:	myosin light chain
NaCa-X:	Na ⁺ /Ca ²⁺ -Austauscher
NE:	Norepinephrin (Noradrenalin)
NGF:	nerve growth factor
NO:	nitric oxide
NOS:	NO-Synthase
PBS:	phosphat-buffered saline
PDGFBB:	platelet derived growth factor BB
PMCA:	Plasmamembran-Ca ²⁺ -ATPase
ProtA/S	Protein A/Sepharose
RNA:	ribonucleic acid
rpm:	Rotationen pro Minute
RyR:	Ryanodin-Rezeptor
s:	Sekunde
SD:	Sprague-Dawley Tiere
SEM:	Standardfehler des Mittelwerts
SERCA:	sarko/endoplasmatische Retikulum Ca ²⁺ -ATPase
SL:	Sarkolemma
SR:	sarkoplasmatisches Retikulum
TG:	hPMCA4CI transgene Ratten
TX100:	Triton X 100
V:	Volt
Vol:	Volumen
W:	Watt
w/v:	Gewicht/Volumen (1% = 1g / 100ml Flüssigkeit)

Lösungen

Name im Text (Abkürzung):

Zusammensetzung:

Zellkultur

calcium and bicarbonate free Hanks with Hepes
(CBFHH)

137 mmol/l NaCl,
5,36 mmol/l KCl,
0,81 mmol/l MgSO₄ x 7 H₂O,
5,55 mmol/l Dextrose,
0,44 mmol/l KH₂PO₄,
0,34 mmol/l Na₂HPO₄,
20,06 mmol/l Hepes, pH 7,4
in Aqua dest.

Fermentierlösung für die Kardiomyozytenpräparation

CBFHH, pH 7,4,
1,5 mg/ml Trypsin
0,025 ng/ml DNase

MEM/5

Minimal Essential Medium Eagle,
50 U/ml Penicillin G,
50 µg/ml Streptomycin,
15,37 µg/ml Bromo-Deoxy-Uridin
(BrdU),
2 µg/ml Vitamin B₁₂,
5 Vol% FCS

Phosphate Buffered Saline für Zellkultur (PBS)

137 mmol/l NaCl,
2,7 mmol/l KCl,
8,1 mmol/l Na₂HPO₄ x 2 H₂O,
1,5 mmol/l KH₂PO₄,
pH 7,4
in Aqua dest.

MEM/TI

Minimal Essential Medium Eagle
50 U/ml Penicillin G,
50 µg/ml Streptomycin,
15,37 µg/ml BrdU,
2 µg/ml Vitamin B₁₂,
10µg/ml Transferrin,
10µg/ml Zn-Insulin

Lysis-Puffer für Gesamtprotein von Zellkulturen

10 mmol/l TRIS-HCl, pH 7,0,
40 mmol/l NaCl,
10 mmol/l EDTA,
1% w/v SDS
in Aqua dest.

Immunfluoreszenz

Paraformaldehyd 2% w/v

20 g/l Paraformaldehyd in PBS für
Zellkultur,
pH 7,4
in Aqua dest.

Blockierlösung für Immunfluoreszenz

PBS für Zellkultur, pH 7,4,
1% w/v Bovines Serumalbumin
(BSA),
0,5 Vol% Triton X100,
0,15 Vol% Tween 20**Membranproteine**

Puffer 1 für SL-Präparation

0,6 mol/l Sucrose,
10 mmol/l Imidazole,
0,1 mmol/l PMSF,
1 mg/ml Leupeptin,
1 mg/ml Aprotinin,
1 mg/ml Pepstatin,
pH 7,0
in Aqua dest.

Puffer 2 für SL-Präparation

160 mmol/l NaCl,
40 mmol/l MOPS,
0,1 mmol/l PMSF,
1 mg/ml Leupeptin,
1 mg/ml Aprotinin,
1 mg/ml Pepstatin,
pH 7,4
in Aqua dest.

Puffer 3 für SL-Präparation

120 mmol/l NaCl,
30 mmol/l MOPS,
250 mmol/l Sucrose,
75 μ mol/l PMSF,
1 mg/ml Leupeptin,
1 mg/ml Aprotinin,
1 mg/ml Pepstatin,
pH 7,4
in Aqua dest.

Puffer 4 für SL-Präparation

100 mmol/l NaCl,
54 mmol/l LiCl,
6 mmol/l KCl,
20 mmol/l MOPS,
0,1 mmol/l PMSF,
1 mg/ml Leupeptin,
1 mg/ml Aprotinin,
1 mg/ml Pepstatin,
in Aqua dest.

Detergenzextraktion

Lysispuffer für Detergenzextraktion

25 µmol/l TRIS HCl, pH 7,0,
10 mmol/l EDTA,
1 mmol/l Natriumorthovanadat,
0,1 mmol/l PMSF,
0,5 mmol/l Dithiotreitol (DTT),
Detergenz:
1% w/v SDS
oder 60 mmol/l β-D-Glucopyranosid,
oder 2 Vol% Triton X-100,
oder 1,5% w/v Digitonin
in Aqua dest.

Präparation Caveolae-reicher Membranen

Sucrose 90 für Caveolae-Präparation

90% w/v Sucrose,
50 mmol/l MES, pH 6,5,
300 mmol/l NaCl
in Aqua dest.

Sucrose 35 für Caveolae-Präparation

35% w/v Sucrose,
250 mmol/l MES, pH 6,5,
150 mmol/l NaCl,
250 mmol/l Natriumcarbonat, pH 11
in Aqua dest.

Sucrose 5 für Caveolae-Präparation

5% w/v Sucrose,
250 mmol/l MES, pH 6,5,
150 mmol/l NaCl,
250 mmol/l Natriumcarbonat, pH 11
in Aqua dest.

Immunpräzipitation

Immunpräzipitationspuffer (IP)

10 mmol/l TRIS Base, pH 8,0,
0,15 mol/l NaCl,
1 mmol/l EDTA,
1 mmol/l EGTD,
0,2 mmol/l Natriumorthovanadat,
1 mmol/l PMSF,
1 mg/ml Leupeptin,
1 mg/ml Aprotinin,
1 mg/ml Pepstatin,
Detergenz:
1 Vol% Triton X-100
und 60 mmol/l β -D-Glucopyranosid,
oder 2% w/v CHAPS,
oder 2,5 % w/v Digitonin
in Aqua dest.

Western-Blot

3-fach Sample-Puffer für Western-Blot

187,5 mmol/l TRIS HCl, pH 6,8,
30 Vol% Glyzerin,
6% w/v SDS,
15 Vol% 2-b-Mercaptoethanol,
0,5 % w/v Bromophenolblau,
in Aqua dest.

Elektrophorese-Puffer für Western-Blot

25 mmol/l TRIS Base,
192 mmol/l Glycin,
0,1 % w/v SDS,
pH 8,3,
in Aqua dest.

Transferpuffer für Western-Blot

25 mmol/l TRIS Base,
192 mmol/l Glycin,
20 Vol% Methanol,
pH 8,3,
in Aqua dest.

Phosphate Buffered Saline für Western
(Western-PBS)

58 mmol/l Na_2HPO_4 ,
17 mmol/l $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$,
68 mmol/l NaCl,
pH 7,4,
in Aqua dest.

Ponceaurot-Lösung für reversible Proteinfär-
bung im Western-Blot

2 % Trichloressigsäure (TCA),
0,2 % w/v Ponceaurot,
in Aqua dest.

Blockierlösung für Western-Blot	5 % w/v Milchpulver (fettfrei), 0,1 Vol% Tween 20, in Western-PBS, pH 7,16
Primärantikörper-Lösung für Western-Blot	1 % w/v Milchpulver (fettfrei), in Western-PBS, pH 7,45, Primärantikörper: Monoklonaler Anti-PMCA-AK 1:1000 oder Monoklonaler Anti-Caveolin-3-AK 1:1000
Waschlösung 1 für Western-Blot	1 % w/v Milchpulver (fettfrei), 0,1 Vol% Tween 20, in Western-PBS, pH 7,45
Sekundärantikörper Lösung für Western-Blot	1 % w/v Milchpulver (fettfrei), 0,1 Vol% Tween 20, in Western-PBS, pH 7,45, Sekundärantikörper: Kaninchen-Anti-Maus-AK, Meerret- tichperoxidase konjugiert, 1:1000
Waschlösung 2 für Western-Blot	1 % w/v Milchpulver (fettfrei), 0,3 Vol% Tween 20, in Western-PBS, pH 7,45
Striplösung für Western-Blot	2,5 % w/v SDS, 62,5 mmol/l TRIS HCl, 0,7 Vol% 2-b-Mercaptoethanol, pH 6,7, in Aqua dest.

Chemikalien, Materialien und Fertig-Kits

Alle nicht im Folgenden erwähnten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, bezogen. Der Reinheitsgrad war mindestens "pro analysi".

Chemikalie/Material:	Firma:
Acrylamid	Bio-Rad
Antikörper:	
Kaninchen-Anti-PMCA-Ak (2A) polyklonal	Dr. Danilo Guerini, Biochemie III,
Kaninchen-Anti-PMCA-Ak (4N) polyklonal	ETH Zürich (Schweiz)
Maus-Anti-Caveolin-3-Ak, monoklonal	Transduction Laboratories
Maus-Anti-Caveolin-3-Ak, polyklonal	Transduction Laboratories
Maus-Anti-Dystrophin-Ak, monoklonal	Dianova
Maus-Anti-Kaninchen-Ak (Texas-Red-konjugiert)	Dianova
Maus-Anti-PMCA-Ak (5F10), monoklonal	Dianova
Maus-Anti-Östrogen-Rezeptor-Ak, monokl.	Dianova
Maus-Anti-Troponin-T-Ak, monoklonal	Sigma
Ziegen-Anti-Maus-Ak (Cy ² -Konjugiert)	Dianova
Ziegen-Anti-Maus-Ak (Meerrettich-Peroxidase-Konjugiert)	Amersham
Aprotinin	Boehringer Mannheim
BIS (N, N'-Methylen-bis-Acrylamid)	Bio-Rad
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Boehringer Mannheim
BrdU	Sigma
CHAPS	Dojindo Laboratories
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma
Digitonin	Boehringer Mannheim
DNase	Boehringer
DTT (Dithiotreitol)	Serva
ECL-Kit	Biomol
Ethanol	Sigma
FCS	Biochrom, S 0115
Fertiggele SDS-PAGE 4-20%	Bio Rad
Filme für Western-Blot	AGFA
Glasslides	Fa. Noras
Heparin	Liquemin, Roche
HEPES	Serva, Heidelberg
Hoechst 33258 Fluorochrom	Hoechst
Insulin	Serva
Kodan Spray	Hans Rosemann GmbH
Lachs-Sperma-DNA	Sigma
Leuzin (H ³ -markiert)	Amersham
Leupeptin	Boehringer Mannheim
Magermilchpulver	Freema
Minimal essential medium (MEM)	Sigma

Chemikalie/Material:	Firma:
MES (2-N-Morpholinoethansulfonsäure)	Serva
Mercaptoethanol	Serva
MOPS	Sigma
Mowiol	Hoechst
NaCl (0,9%ige isotonische Lösung)	Braun Melsungen AG
Natrium-Dodecyl-Sulphat (SDS)	Sigma
Norepinephrin	Hoechst
Objektträger	Menzel
(β -)Octyl-Glucopyranosid	Sigma
PDGF-BB	Sigma
Pepstatin	Boehringer Mannheim
Petrischalen (24-Wells, 6-Wells, 6 cm)	Greiner
Phalloidin	Sigma
PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid)	Sigma
Ponceaurot	Sigma
Protein A/Sepharose	Upstate Biotechnologies
Proteinbestimmungs Kit	Bio-Rad
Proteinbestimmungs Kit DC	Bio-Rad
Proteinstandard (Kaleidoskop Marker)	Bio Rad
PVDF-Membran	Millipore
Skalpell	Medicon
Sprague-Dawley-Ratten	Tierstall Medizinische Klinik
Sterilfilter 0,22 μ m, Millex	Millipore
Szintillationsflüssigkeit	Amersham
TEMED (N, N, N', N'-Tetramethyldiamin)	Bio-Rad
Triton X-100	Bio Rad
Tubes/Caps (1,5 ml; 2 ml; 10 ml; 50 ml)	Eppendorf / Falcon
Tween 20	Sigma
Whatman 3MM Papier	Whatman
Zell-Scraper	Sarstedt

Geräte

Gerät:

β-Counter
 Entwicklermaschine
 Elektrophorese- und Blottingkammer
 Filmkassette mit Verstärkerfolien
 Fluoreszenzphotometer
 Folien-Schweißgerät
 Fotodrucker
 Fotokamera
 Glashomogenisator
 Hybridisierungs-Ofen und -röhren
 Inkubator Zellkultur
 Kipp-Shaker
 Küvetten
 Magnetrührer
 Mikroskope:
 Fluoreszenzmikroskop
 invers (Zellkulturen)
 Konfokal-Mikroskop
 Photometer
 Pipetten
 Pipettus (10 ml Elektropipette)
 Power Supply Gerät für Elektrophorese/Blot
 Rotary-Mixer
 Stabhomogenisator
 Sterilbank
 Sterilisator
 Thermocycler
 Tissue Grinder (Ultra Turrax)
 Ultraschallbad
 Ultraschallstab
 Zählkammer (Fuchs-Rosenthal-Kammer)
 Zellstrainer
 Zentrifugen:
 Für 1,5/2 ml Caps, Festwinkelrotor
 Für 10 ml Tubes, Festwinkelrotor
 Für 50 ml Tubes, Ausschwingrotor
 Ultrazentrifuge, Ausschwingrotor SW-TI41

Firma:

Packard
 Agfa
 Bio Rad
 Agfa
 Perkin Elmer
 Blauring, FS 500
 Fuji
 Pentax
 Biomed B. Braun
 Pharmacia
 Labotect, Steri-Cult 200
 Von Keutz
 Hellma
 Ikamag ret
 Zeiss, Axiovert
 Leitz, Labovert
 Zeiss/Bio Rad
 Shimadzu
 Eppendorf
 Hirschmann
 Biometra
 Rotary
 Braun Melsungen
 Bio-Flow
 Fedegari
 Biomed B. Braun
 Janke und Kunkel
 Julabo
 Julabo
 Fa. Brand
 Fa. Noras
 Eppendorf
 Sigma-2K15
 Beckmann
 Beckmann

Danksagung

Folgenden Personen, die mir beim Anfertigen der vorliegenden Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, möchte ich meinen besonderen Dank aussprechen:

Prof. Dr. L. Neyses

Dr. K. Schuh

Dr. A. Hammes

S. Oberdorf-Maass

Curriculum Vitae

Wolfram Tobias Rother

Persönliche Angaben:

Geburtsdatum	26. Januar 1973
Geburtsort	Kempton (Allgäu)
Familienstand	Ledig
Staatsangehörigkeit	Deutscher
Eltern	Rotraud Rother, Grundschullehrerin Josef Rother, Sonderschullehrer
Geschwister	Verena Rother, Gymnasiallehrerin Ulrich Rother, Medizinstudent im 8. Semester

Schulbildung:

09/1979 - 07/1983	Grundschule Kempton Nord
09/1983 - 07/1992	Carl-von-Linde-Gymnasium Kempton Neusprachlicher Zweig: Englisch, Latein, Französisch <u>Leistungskurse:</u> Mathematik und Physik
07/1992	Abitur: Gesamtnote 1,1

Zivildienst:

08/1993 - 10/1993	Städtisches Krankenhaus München Schwabing Krankenpflege auf einer kardiologischen Station
-------------------	--

Studium:

10/1993 – 5/2000	Medizinstudium an der "Bayerischen Julius-Maximilians-Universität" in Würzburg
09/1995	Ärztliche Vorprüfung, Gesamtnote "sehr gut"
08/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote "gut"
03/1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote "sehr gut"
05/2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote "gut"

Gesamtnote der Ärztlichen Prüfung: "sehr gut" (1,5)

Curriculum Vitae

Forschung: Seit November 1996 experimentelle Arbeit im molekular-kardiologischen Labor von Prof. Dr. med. L. Neyses (Medizinische Klinik der Universität Würzburg, seit August 2001 University of Manchester, UK) über Funktion und Lokalisation der Plasmamembran Kalzium ATPase (PMCA) im Herzen

Arzt im Praktikum: Seit 01.07.2000 Arzt im Praktikum in der Zweiten Medizinischen Klinik (Direktor Prof. Dr. med. B. Göke) des Klinikums Großhadern der Ludwigs-Maximilians-Universität München


Tobias Rother

München, den 9. Oktober 2001